



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - 2013/2014



AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS IL-17 E IL-23 NO SORO DE PACIENTES
COM DENGUE NA CIDADE DE MANAUS

Bolsista: Flávio Souza Melo, CNPq

MANAUS – AM
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - 2013/2014

RELATÓRIO FINAL
PIB-B/0003/2013

AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS IL-17 E IL-23 NO SORO DE PACIENTES
COM DENGUE NA CIDADE DE MANAUS

Bolsista: Flávio Souza Melo, CNPq
Orientador: José Fernando Marques Barcellos

MANAUS – AM
2014

RESUMO

A dengue é uma arbovirose de importância médica e epidemiológica, uma vez que é responsável por grandes epidemias e alto grau de morbimortalidade. É transmitido pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti*, com quadro clínico variando desde simples mal-estar, passando por sintomas de febre alta e cefaleias, até os sintomas graves de hemorragias ou choque da dengue. Este vírus apresenta afinidade pelas células do sistema mononuclear fagocitário, e a liberação de diversas citocinas tem sido associada aos quadros clínicos característicos desta enfermidade. O sistema imunológico é responsável pela defesa do organismo contra diversos agentes patogênicos, e atua por meio da resposta imunológica, que é um intrincado sistema composto por diversas células, substâncias e mecanismos interdependentes, resultando na atuação de uma resposta adquirida. Esta é mediada pelos linfócitos B e T, com maior especificidade aos patógenos invasores. Os linfócitos originam-se de uma célula precursora comum, porém seguem caminhos de diferenciação celular diferentes, resultando em duas classes de linfócitos T: os linfócitos T citotóxicos (LT) e os linfócitos T *Helper* (Th) ou auxiliares, estes últimos apresentando diferentes subtipos, de acordo com o padrão de citocinas liberadas. Um destes subtipos, os Linfócitos Th do Tipo 17 (Th17), após sofrerem processo de maturação, liberam dentre outras citocinas as IL-17, porém são modulados por outras citocinas (IL)-2, IL-4, IL-6 e IL-17. Estas citocinas relacionadas à resposta Th17 foram o objeto de análise do presente estudo, pois tem sido sugerido um papel importante na patogênese das formas graves da dengue, pois podem facilitar a inoculação do vírus em células fagocitárias, além de estimular a secreção de fatores que aumentam a permeabilidade vascular. Este estudo foi de natureza retrospectiva de caráter transversal com componente analítico, do qual três grupos amostrais representativos de casos de dengue grave, não grave e grupo controle negativo foram avaliados. As amostras positivas foram disponibilizadas pela Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMTHVD), que dispensou a necessidade da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras do grupo controle negativo foram coletadas na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM), após abordagem individual aos doadores desta instituição e assinatura do TCLE. Ao final do processamento e análise estatística dos dados obtidos, determinou-se os níveis séricos das citocinas (IL)-2, IL-4, IL-6 e IL-17, com perfil da resposta Th17, nos grupos positivos e negativos para o diagnóstico de dengue, através de Kit CBA FLEX Th1 Th2 Th17 (BD Biosciences). O presente estudo fez parte do projeto de mestrado **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TH 17 NO SORO DE PACIENTES COM DENGUE** do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas.

Palavras-chave: dengue, citocinas, resposta TH17

1. Introdução

A maioria das respostas imunes bem-sucedidas envolve as imunidades humoral e celular, mas em algumas condições os dois tipos de reações efetoras são mutuamente excludentes. Células Th podem desenvolver diferentes polaridades de produção de citocinas, como Th1, Th2 ou Th17. Os fatores responsáveis pela polarização da resposta Th em um padrão predominante tem sido extensamente investigados (18).

Um novo subtipo de células Th, conhecidas como Th17, que produzem Interleucinas do tipo 17 (IL-17) isoladamente ou em combinação com Interferon γ (IFN- γ), foram identificadas recentemente (18). A diferenciação de células *naïve* para o fenótipo Th17 é mediada por várias citocinas, incluindo fator de transformação de crescimento β (TGF- β), IL-1 β , IL-6, IL-21 e IL-23 em ratos e seres humanos. Além disso, IL-1 β mostrou ampliar a resposta Th17 na presença de IL-23 (17, 19).

A infecção pelo vírus da dengue é uma importante arbovirose, que apresenta quatro diferentes sorotipos DEN-1, DEN-2, DEN3 e DEN-4, à medida que foram introduzidos resultaram em epidemias que afetaram diversos países (20). Os vários sorotipos do vírus da dengue são transmitidos aos humanos através da picada do mosquito *Aedes* infectado, principalmente *Aedes aegypti*, de distribuição tropical e subtropical ao redor do planeta (21).

Qualquer um desses sorotipos pode causar sintomas desde mal-estar febril autolimitante chamado Febre da Dengue (DF) até a febre hemorrágica da dengue (DHF) e síndrome do choque da dengue (DSS). Esta doença apresenta-se como uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em crianças em vários países endêmicos asiáticos e sul-americanos (22, 23). É necessário compreender o padrão de resposta Th17 na dengue, de forma a melhorar o entendimento sobre a patogênese desta doença. Além disso, poucas publicações abordaram a relação da resposta Th17 e a dengue, o que demonstra a importância da presente pesquisa.

2 Revisão de literatura

2.1 Dengue

A dengue é uma arbovirose transmitida ao homem pela picada de um mosquito *Aedes aegypti*, o vetor principal, porém outros como o *A. albopictus* também sejam importantes para a transmissão da doença. Ambos proliferam principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (1, 2). Os vírus da dengue pertencem ao gênero Flavivirus, família Flaviviridae, apresentando 4 sorotipos (DEN-1, DEN2, DEN-3 e DEN-4) (3). Em janeiro de 2001, o sorotipo DEN3 foi introduzido no Brasil, sendo responsável pela epidemia de 2002, quando foram notificados aproximadamente 800 mil casos, apresentando nos dois anos seguintes uma incidência diminuída. Em 2005 houve aumento na incidência, e em 2008 mais de 700 mil casos e 45 mil hospitalizações por dengue foram registrados (4).

Após a inoculação pelo mosquito, o vírus da dengue replica-se ativamente em células musculares estriadas, lisas e fibroblastos, além dos linfonodos locais. Em seguida é estabelecida a viremia, onde se dissemina por todo o organismo, podendo estar livre no plasma, ou intracelularmente em macrófagos, pois este vírus apresenta tropismo positivo por células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos, monócitos e células B) (5).

Com um período de incubação de 7 a 10 dias, a seguir disso apresenta-se a forma clínica da doença, com uma ampla faixa desde mal-estar inaparente até quadro clínico hemorrágico, eventualmente fatal. A maior parte das infecções por dengue é assintomática ou muito suave, com febre indiferenciada característica, com presença ou ausência de erupção cutânea, principalmente em bebês ou crianças pequenas. Já em crianças maiores e nos adultos está presente a Febre da Dengue (DF), que consiste em febre alta, cefaleia, mialgia, artralgia, dor retro-orbital e prurido maculopapular. O vazamento de plasma é um indicativo de Febre Hemorrágica da Dengue (DHF), sendo caracterizada por hemorragia, trombocitopenia (abaixo de 100.000/ml), e hematócrito elevado (superior a 20%). Alguns pacientes evoluem para falha circulatória, chamada de Síndrome do Choque da Dengue (SSD), marcada principalmente pela hipotensão, e é classificada em média (graus I e II) e grave (graus III e IV) (1).

A liberação de diversas citocinas e mediadores inflamatórios pela resposta imunológica ao vírus do dengue é responsável por uma maior permeabilidade vascular, resultando em extravasamento anormal de plasma e alterações hemostáticas (6).

2.2 Sistema Imunológico

O sistema imunológico ou sistema imune é um complexo de organização a nível celular e molecular, especializado na defesa do organismo contra infecções, células cancerosas e as transplantadas. A sua forma de atuação dá-se por meio de uma resposta imune, dividida conceitualmente em inata ou natural e adquirida, porém tem seu limite cada vez mais sutil, com a descoberta de novos componentes que unem as duas respostas (7, 8).

A resposta inata representa uma forma de defesa rápida e generalizada contra número limitado de estímulos. Esta é representada por barreiras biológicas, físicas ou químicas, células específicas, tanto as fagocíticas (neutrófilos, macrófagos, monócitos e células *Natural Killer* - NK), quanto as que liberam mediadores inflamatórios (basófilos, mastócitos, eosinófilos), além de moléculas solúveis (proteínas de fase aguda, complemento e citocinas), que dispensam contato prévio com agentes agressores para sua atuação e, portanto, não se alteram qualitativa ou quantitativamente após este contato (9, 10).

Promovendo um elo entre as respostas inata e adquirida, encontram-se as células apresentadoras de antígenos (APC), representadas principalmente pelas células dendríticas (DC), além dos macrófagos. Esta intermediação entre as respostas é causada por estimulação de elementos da resposta inata e por viabilizarem uma estimulação eficiente dos linfócitos B e T - que compõem a resposta adquirida, principalmente dos últimos, que obrigatoriamente necessitam do processamento e apresentação de antígenos por uma APC. Os antígenos capturados são processados no interior da célula e apresentados em sua superfície, inseridos em moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), que podem ser de dois tipos MHC classe I e classe II, que ativam Linfócitos T citotóxicos (LT) e T *Helper* (Th), respectivamente (11).

A resposta adquirida é mediada por células especializadas, os linfócitos B e T, sendo as suas principais características ao contrário da resposta inata, a especificidade e diversidade de reconhecimento, possuindo a capacidade de especialização da resposta quando o organismo é exposto novamente a determinado agressor, configurando o conceito de memória imunológica, além de autolimitação e tolerância aos componentes do próprio organismo (9).

2.3 Linfócitos

Células-tronco pluripotentes originam as células precursoras mielóides e linfóides, estas últimas dão origem aos linfócitos T, B e *Natural Killer*. Desse ponto, os linfócitos seguem dois caminhos distintos: Os precursores dos linfócitos T (LT) deixam a medula óssea em direção ao timo, onde sofrerão todo um processo de seleção e maturação. Apenas os linfócitos T maduros deixam o timo passando para a circulação. As células que originarão os linfócitos B (LB) permanecem na medula até sua maturação, quando a abandonam em direção à circulação e migram para os órgãos linfóides secundários. As moléculas responsáveis pelo reconhecimento de antígenos nos linfócitos B, fazem parte da família de imunoglobulinas, IgM e IgD. Por outro lado nos linfócitos T são denominados receptores dos linfócitos T (TCR) (12).

Os linfócitos B são responsáveis pela imunidade humoral, que é caracterizada pela liberação de anticorpos capazes de neutralizar, marcar ou mesmo destruir os antígenos pelos quais foram gerados. Além disso, os linfócitos B atuam como APC, apresentando MHC classe II e, portanto, estimulam a proliferação de linfócitos T *Helper*, que posteriormente geram um *feedback* positivo, no qual estes estimulam a proliferação e diferenciação dos linfócitos B (7, 12).

O processo de maturação dos linfócitos T ocorre em etapas sequenciais, que envolvem a recombinação da expressão do TCR, proliferação das células, expressão de co-receptores CD4 e CD8, além de seleção positiva e negativa por apresentação de antígenos que ocorre no timo. A seleção é importante para regular o nível de atividade dos linfócitos T: a seleção positiva consiste na capacidade da

célula de reconhecer antígenos próprios, estejam estes associados a MHC classe I ou II e, diferenciando-se em linfócito T específico, ou na ausência desse reconhecimento entrar em apoptose. Já a seleção negativa é o outro oposto, quando as células apresentam afinidade exagerada ao antígeno próprio do organismo, ativando a apoptose, reduzindo as chances de processos autoimunes (7).

Os linfócitos T *Helper* (Th) ou auxiliares constituem um dos tipos de células efetoras da resposta adquirida, secretando citocinas e são responsáveis pela coordenação da ativação e atividade de outras células imunes como linfócitos B, macrófagos ou linfócitos T citotóxicos, estando os últimos envolvidos no controle de vírus e células cancerosas, onde ocorre sinergismo entre os dois subtipos de linfócito T na defesa contra os patógenos intracelulares (13).

2.4 Linfócitos T *Helper* e Respostas Th

Os linfócitos T *Helper* (Th) são subdivididos funcionalmente a partir do padrão de citocinas que liberam, pois morfologicamente são indistinguíveis. Posteriormente a um estímulo advindo de uma APC, um linfócito precursor Th0 pode diferenciar-se em um linfócito Th tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2) ou tipo 17 (Th17), de acordo com as citocinas presentes, que apresentam um papel fundamental na diferenciação desses subtipos de linfócitos (9).

A diferenciação dos CD4 em linfócitos Th1 ocorre na presença de IL -12 e IFN - γ , que determinam um perfil inflamatório. Este subtipo celular produz IL -2, que induz a proliferação de linfócitos T citotóxicos, além de aumentar sua capacidade. Outra citocina produzida é o IFN - γ que é responsável pela ativação de macrófagos e linfócitos T citotóxicos, com papel relevante na defesa contra patógenos intracelulares, além de induzir um *feedback* positivo para diferenciação de Th0 em Th1 e inibindo a via Th2 (7).

A diferenciação em Th2 depende da presença de IL -4 e determina um perfil anti-inflamatório. Este subtipo celular produz IL -4, IL -5, IL -6 e IL -10, contribuindo para a defesa humoral, através dos linfócitos B. Analogamente a Th1, a citocina IL -4, promove um *feedback* positivo, para a diferenciação dos linfócitos Th0 em Th2 e inibe a via Th1(14).

2.5 Linfócitos e Resposta Th17

A diferenciação em Th17 depende da presença de IL -23, apresentando perfil inflamatório. Este subtipo celular representa importante proteção contra agressores extracelulares, descoberto recentemente a partir do isolamento da IL -23, que é produzida por macrófagos, apresentando papel pró-inflamatório. Produz as citocinas IL -17, IL -22 e IL -26. As citocinas da família IL -17 são produzidas de igual forma por neutrófilos sendo potentes indutoras da inflamação, por estimular a produção de citocinas inflamatórias como IL -6, IL -1 e TNF- α em células endoteliais (14).

A regulação da diferenciação e produção dos diferentes subtipos de linfócitos Th, dependem de um intrincado processo de regulação cruzada a partir das citocinas produzidas por esses mesmos subtipos celulares. A via de diferenciação Th17 é antagonizada por citocinas produzidas pelos subtipos Th1 e Th2. A exata compreensão dos mecanismos de polarização Th em humanos é fundamental para um melhor

entendimento dos mecanismos fisiopatológicos das doenças inflamatórias crônicas e para possivelmente desenvolver formas mais eficazes de imunoterapia (12).

2.6 Resposta Th17 à infecção pelo vírus da Dengue

Dentre os fatores que parecem contribuir para o estabelecimento da Febre Hemorrágica da Dengue, está a presença de anticorpos após sucessivas infecções por diferentes sorotipos do vírus da dengue. Esta hipótese é levantada com base, na capacidade de uma resposta inflamatória mais potente ao vírus (4). Neste caso de infecções sequenciais, as células Th parecem exercer alguma influência negativa para o doente, uma vez que promove o fenômeno de facilitação por anticorpos de penetração viral em macrófagos (*Antibody Dependent Enhancement* - ADE). O IFN γ liberado pelos linfócitos Th aumentam a expressão dos receptores Fc γ na membrana de macrófagos, tornando mais suscetíveis à infecção viral (15). A imunidade permanente ocorre somente para o mesmo sorotipo, e a imunidade cruzada entre os diferentes sorotipos é breve.

A resposta Th17 tem um importante papel na defesa do hospedeiro contra patógenos específicos e são potentes indutoras de autoimunidade e inflamação tecidual. Um número significativo de citocinas está significativamente aumentado em pacientes com DHF e dentre essas, as induzidas pelas células Th17. IL-17 demonstraram causar o aumento da secreção de IL -6, IL -8 e valores altos de MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) têm sido encontrados na DHF, o que pode reduzir as junções oclusivas de células endoteliais, como uma causa potencial de vazamento de plasma nessa forma da doença (16). Porém ainda são poucas as publicações a respeito do papel da IL -17 em infecções virais (17).

É de importância fundamental compreender o papel exato dessas células e das citocinas liberadas por elas na patogênese da DHF para entender o mecanismo desta doença e os mecanismos envolvidos na troca de resposta entre Th1 e Th2 (17) e a descoberta das células Th17, permitiu correlacionar alguns casos de ausência daquelas formas de resposta presente com a DHF (16).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a resposta Th17 no soro de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial positivo e negativo para dengue.

3.2. Objetivos Específicos

Inicialmente, o projeto apresentava o seguinte objetivo específico:

- Verificar por meio de citometria de fluxo os níveis séricos das citocinas IL-17 e IL-23,

No entanto, devido a grande demanda de pesquisadores envolvidos em estudos com o soro de pacientes acometidos no surto de dengue de 2011, além de a pesquisa com a citocina IL-23 requerer maior quantidade de soro e a não funcionalidade dos Kit's recebidos para a avaliação desta citocina, optamos por realizar a avaliação de outras três citocinas, que apresentam grande relevância na evolução imunopatológica da dengue. Portanto, os seguintes objetivos foram propostos, a partir do segundo semestre de realização da pesquisa:

- Verificar por meio de citometria de fluxo os níveis séricos das citocinas interleucina (IL)-2, IL-4, IL-6 e IL-17.

4. Materiais e Métodos

4.1 Caracterização da Pesquisa

Este estudo foi retrospectivo de caráter transversal com componente analítico, onde selecionou-se amostras positivas para dengue grave e não grave classificadas por método Reação Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real do soro de indivíduos adultos. Utilizamos amostras coletadas durante um surto de dengue ocorrido na cidade de Manaus no período de Janeiro a Abril de 2011 e armazenadas em biofreezer a -20° C na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMTHVD).

O presente estudo fez parte do projeto de mestrado do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas, inserido na Plataforma Brasil. Neste, tivemos dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para as amostras já coletadas e armazenadas na (FMTHVD) Instituição colaboradora que concordou em fornecer as amostras com a devida anuência. Para as amostras dos controles negativos aplicou-se um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE aos doadores da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMEMOAM).

4.2 Seleção das Amostras

Foi utilizado um total de noventa amostras divididas em três grupos distintos de trinta amostras. Um grupo composto por sessenta amostras positivas, selecionadas aleatoriamente do Biobanco da FMTHVD. Sendo trinta amostras com diagnóstico para dengue grave; e um grupo de trinta amostras positivas para dengue não grave, de pacientes adultos, não índios (separadas previamente das demais amostras de pacientes grávidas, menores e índios).

Um grupo de trinta amostras negativas oriundas de soro de doadores de sangue da FHMEMOAM, que foram selecionados após abordagem individual na recepção da FHMEMOAM, durante a triagem de rotina de doação de sangue, no período matutino diariamente até a obtenção do N amostral (30 amostras) que aceitaram participar do estudo após assinatura do TCLE.

4.3 Informações dos Pacientes

As informações foram mantidas em sigilo absoluto, preservando a identidade de todos os sujeitos envolvidos nesta pesquisa. Além disso, as amostras positivas e negativas contiveram siglas de sistema alfa-numérico, impedindo assim, o reconhecimento amostra-doador/paciente.

4.4 Critérios de Inclusão

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

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

4.5 Critérios de Exclusão

- Grupo Controle Positivo: Pacientes menores de 18 anos, Pacientes índios e pacientes sem diagnóstico clínico/laboratorial confirmado para dengue. Não participaram deste estudo as amostras que obtiveram diagnóstico de outras doenças tropicais atendidas na referida Fundação.
- Grupo Controle Negativo: Doadores que não aceitaram assinar o TCLE. Foram excluídos também, doadores que eventualmente tiveram suas amostras não aptas para distribuição pela FHEMOAM.

4.6 Riscos

- Grupo Controle Positivo: 1- Dengue Grave (30 amostras); 2-Dengue Não Grave (30 amostras) Para o grupo controle positivo o risco existente de perda do anonimato foi minimizado através da codificação (siglas alfa numéricas) das amostras, impedindo desta forma a identificação dos pacientes, pois se tratavam de amostras já coletadas, armazenadas e disponibilizadas pela FMTHDV.
- Grupo Controle Negativo: Doadores voluntários oriundos da FHEMOAM (30 amostras). Risco Mínimo causado pela lesão inerente do bisel da agulha, sendo que esta já ocorreria, como rotina durante o processo de doação voluntária de sangue.

4.7 Avaliação do Perfil de Citocinas e Resposta Imune

Determinou-se ao final do processamento das amostras o perfil das citocinas séricas interleucinas (IL)-2, IL-4, IL-6 e IL-17 e realizou-se sua análise. As citocinas séricas foram quantificadas a partir de uma alíquota de soro para determinação do perfil de resposta imune Th1 Th2 Th17 através de Kit CBA FLEX Th1 Th2 Th17 (BD Biosciences), demarcando assim a presença ou ausência destas citocinas dentre os grupos positivos e negativos.

4.8 Análise dos Dados

Utilizou-se estatística descritiva para apresentação do perfil de citocinas dos grupos avaliados, dos pacientes selecionados. A partir de estudo piloto para as principais variáveis estudadas, procedeu-se o cálculo da amostra ideal, considerando-se um $P=0,05$ (poder estatístico de 95%). Em todas as análises foi considerado nível de significância de 0,05. Os resultados das dosagens de citocinas em diferentes grupos foram comparados usando Análise de Variância de um Fator (One-Way-ANOVA), com teste de Tukey para análise pos-hoc. Realizou-se Correlação de Pearson e Regressão Linear para analisar a relação das

citocinas séricas entre os grupos avaliados, traçando assim o perfil de grupos etários, sexo e cronicidade da doença. Todas as análises estatísticas foram realizadas no utilizando-se o Software Livre R e Minitab®.

5. Resultados e Discussão

Devido à alta demanda de pesquisadores avaliando o soro dos pacientes acometidos pelo surto de dengue ocorrido no ano de 2011, somado à necessidade de uma alíquota maior de soro para pesquisa de IL-23, procedeu-se no segundo semestre da pesquisa a avaliação de outras citocinas também envolvidas na resposta imune contra a infecção por vírus da dengue.

A interleucina-2 é uma citocina produzida a partir de células T, com grande importância na regulação do crescimento e diferenciação de células T e B, células assassinas naturais (NK), após interação com seus respectivos receptores. O sistema de sinalização de IL-2R prossegue através por três vias diferentes, que medeiam o fluxo de sinais mitogênicos e de promoção de sinais de sobrevivência (24).

A interleucina-4 é produzida por células T helper do tipo 2, e está ligada a ativação de mastócitos, desempenha papel importante no aumento da produção de IgE e da expressão de seus receptores por muitas células inflamatórias, responsáveis pelo início e manutenção do processo inflamatório, quando ocorre a infiltração eosinofílica, degranulação de mastócitos e lesão intersticial (25).

A interleucina-6 é uma citocina que exerce atividades tanto nas respostas imune inata como na adaptativa. Ela é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas e é considerada uma citocina pró-inflamatória (26, 27).

A interleucina-17A é uma citocina pró-inflamatória que induz a produção de vários mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , NOS-2, metaloproteases e quimiocinas. Além disso, a IL-17A é capaz de regular em camundongos a granulopoiese através do fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), que por sua vez, aumenta o número de neutrófilos. Embora trabalhos anteriores tenham descrito a presença de citocinas IL-17A na dengue, ainda não se sabe ao certo a importância destas citocinas na imunopatogênese desta doença (28, 29).

Os níveis séricos das interleucinas IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17A quando comparados entre os grupos de pacientes com dengue grave e não-grave apresentaram-se aproximados, não sendo considerados estatisticamente significantes. Porém, quando comparados os grupos de dengue (grave e não grave) ao controle negativo, houve considerável elevação sérica dos níveis das citocinas, havendo então relevância estatística. Tratou-se de parte de um estudo pioneiro em Manaus, onde se pode demonstrar uma variação nos índices das citocinas testadas nos pacientes com dengue, apresentando variações entre os grupos. No entanto, ainda não foi possível correlacioná-las com a exacerbação do quadro. As discrepâncias apresentadas nos gráficos, denominadas de *outlier*, podem ser oriundas de características intrínsecas de cada amostra ou do paciente, não sendo as mesmas para diferentes citocinas. Desta forma, mais estudos devem ser realizados nessa temática para associar o sorotipo viral (DENV-1, 2, 3 e 4) à gravidade da doença, para um melhor manejo do paciente que apresenta dengue grave. Nesse sentido, a continuação desta pesquisa foi possibilitada com a aprovação da renovação deste Projeto de Iniciação Científica com o título: AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS IFN-gama E TNF-alfa NO SORO DE PACIENTES COM DENGUE NA CIDADE DE MANAUS. Sob o código (PIB-B/0057/2014).

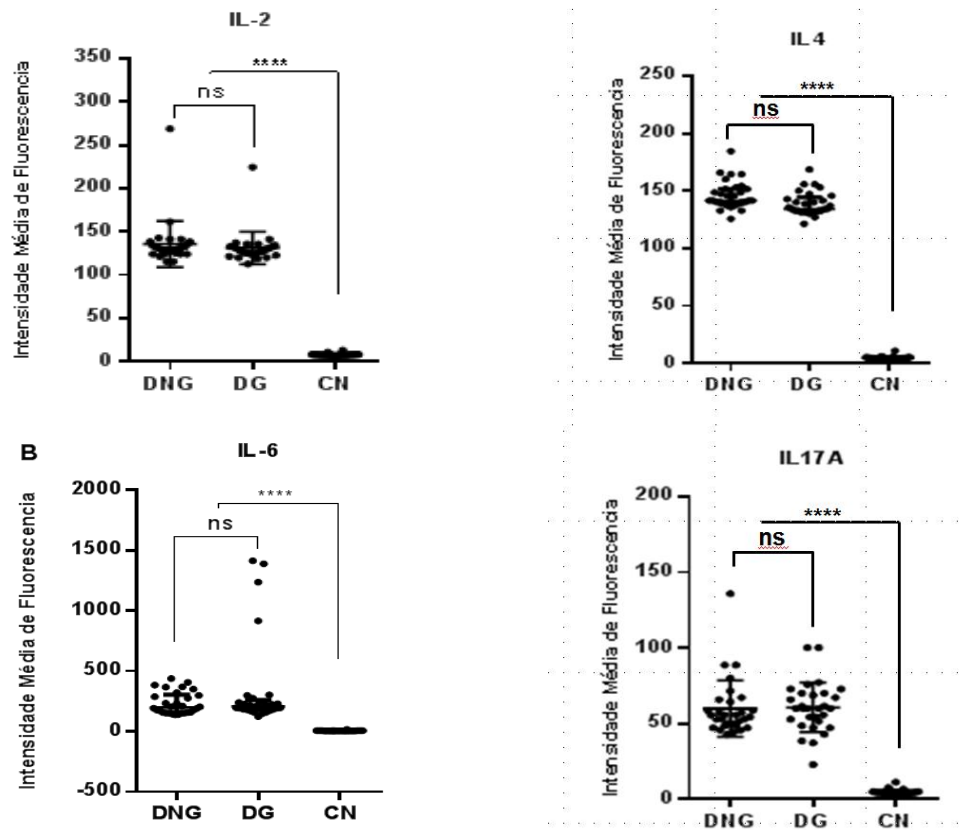


Gráfico 01: Intensidade média das citocinas séricas: IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17A em pacientes dos grupos: dengue não grave (DNG), dengue grave (DG) e controle negativo (CN). **** = significativo entre si, ns = não significativo (P<0,05).

2. Conclusão

A infecção por dengue apresenta alta morbi-mortalidade, além de surtos representativos, incluindo-se aqui o ocorrido na cidade de Manaus no ano de 2011, onde os quatro sorotipos virais estiveram presentes, inclusive em co-infecções. Desta forma, fez-se necessário avaliar os fatores que concorrem para as complicações do quadro desta doença, como extravasamento de plasma, que ocorre na dengue grave e síndrome do choque da dengue (SCD), com pior prognóstico.

A presente pesquisa, a partir da análise por citometria de fluxo das citocinas IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17A, permitiu confirmar a associação entre a infecção por vírus dengue e o aumento do nível de citocinas, apontada por diversos estudos. Por outro lado, ainda não foi possível correlacionar a elevação do nível de determinadas citocinas com um quadro clínico exacerbado de dengue, indicando a necessidade da realização de novos estudos que atuem com a estratificação das amostras baseadas nos sorotipos virais.

3. Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Ago 2013	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2014	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Revisão de Literatura	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
2	Coleta das amostras do controle negativo	R	R										
3	Processamento das amostras do controle negativo		R	R									
4	Processamento das amostras do controle positivo				R	R							
5	Elaboração do Relatório Parcial					R	R						
6	Análise dos Dados							R	R	R			
7	- Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória)										R	R	R
8	- Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)											R	R

R = realizado

Referências (segundo Vancouver)

1. Guzmán MG, Kouri G. Dengue: uma atualização. Coleção estudos da cidade. 2002;47:1-17.
2. Bricks LF. Vacinas para a dengue: perspectivas. *Pediatria*. 2004;26:268-81.
3. Pham AM, Langlois RA. Replication in Cells of Hematopoietic Origin Is Necessary for Dengue Virus Dissemination. *PLoS pathogens*. 2012;8(1):e1002465.
4. Barreto ML, Teixeira MG. Dengue in Brazil: epidemiological situation and contribution to a research agenda. *estudos avançados*. 2008;22(64):53-72.
5. Figueiredo LTM. Estudo sobre diagnóstico laboratorial e sintomas do dengue, durante epidemia ocorrida na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil; Laboratory diagnosis and symptoms of dengue, during an outbreak in the Ribeirão Preto region, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop SAo Paulo*. 1992;34(2):121-30.
6. Singhi S, Kissoon N, Bansal A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. *Jornal de pediatria*. 2007;83(2 Suppl):S22-35. Epub 2007/05/29.
7. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *The New England journal of medicine*. 2000;343(2):108-17. Epub 2000/07/13.
8. Jobim M, Jobim LF. Natural killer cells and immune surveillance. *Jornal de pediatria*. 2008;84(4 Suppl):S58-67. Epub 2008/12/04.
9. Cruvinel Wde M, Mesquita D, Jr., Araujo JA, Catelan TT, de Souza AW, da Silva NP, et al. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Revista brasileira de reumatologia*. 2010;50(4):434-61. Epub 2010/12/03.
10. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *The New England journal of medicine*. 2000;343(1):37-49. Epub 2000/07/07.
11. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52. Epub 1998/04/01.
12. Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWSd, Cruvinel WdM, Andrade LEC, et al. Immune system-part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Revista brasileira de reumatologia*. 2010;50(5):552-80.
13. Hennino A, Vocanson M, Chavagnac C, Saint-Mezard P, Dubois B, Kaiserlian D, et al. Fisiopatologia da dermatite de contato alérgica: papel das células T CD8 efetoras e das células T CD4 regulatórias Update on the pathophysiology with special emphasis on CD8 effector T cells and CD4 regulatory T cells. *An Bras Dermatol*. 2005;80(4):335-47.
14. Bilate AM. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de reumatologia clínica*. 2007;8(2):47-51.
15. Figueiredo LTM. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. *Medicina, Ribeirão Preto*. 1999;32(1):15-20.
16. Gupta N, Chaturvedi U. Can helper T-17 cells play a role in dengue haemorrhagic fever. 2009.
17. Jain A, Pandey N, Garg RK, Kumar R. IL-17 Level in Patients with Dengue Virus Infection & its Association with Severity of Illness. *Journal of clinical immunology*. 2013;33(3):613-8. Epub 2013/01/01.
18. D'Elis MM, Benagiano M, Della Bella C, Amedei A. T-cell response to bacterial agents. *Journal of infection in developing countries*. 2011;5(9):640-5. Epub 2011/09/16.
19. Waite JC, Skokos D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *International journal of inflammation*. 2012;2012:819467. Epub 2012/01/10.
20. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in microbiology*. 2002;10(2):100-3. Epub 2002/02/06.
21. Idrees S, Ashfaq UA. A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. *Genetic vaccines and therapy*. 2012;10(1):6. Epub 2012/08/30.
22. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2010;67(16):2773-86. Epub 2010/04/08.
23. Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2006;11(8):1238-55. Epub 2006/08/15.
24. Costa VV, Fagundes CT, Souza DG, Teixeira MM. Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection: Protection versus Disease Induction. *The American journal of pathology*. 2013;182(6):1950-61.
25. Arias J, Valero N, Mosquera J, Montiel M, Reyes E, Larreal Y, et al. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology*. 2014 3//;452-453(0):42-51

26. Soundravally R, Hoti S, Patil SA, Cleetus C, Zachariah B, Kadiravan T, et al. Association between proinflammatory cytokines and lipid peroxidation in patients with severe dengue disease around defervescence. *International Journal of Infectious Diseases*. 2014;18:68-72.
27. Mourtzikou A, Alepaki M, Stamouli M, Pouliakis A, Skliris A, Karakitsos P. Evaluation of serum levels of IL-6, TNF- α , IL-10, IL-2 and IL-4 in patients with chronic hepatitis. *Inmunología*. Aceito em Jan-2013.
28. Torrentes-Carvalho A, Marinho CF, Oliveira-Pinto LM, Oliveira DB, Damasco PV, Cunha RV, Souza LJ, Azeredo EL, Kubelka CF. Regulation of T lymphocyte apoptotic markers is associated to cellactivation during the acute phase of dengue. *Immunobiology*. 2014; 219:329-40.
29. Lobo MRG, Furtado SC, Galvão JR, Paula L, Barcellos JFM. Citocinas na dengue: Inovações do sistema imune. *Scientia Amazonia*. 2014; 3(1)

ANEXOS

ANEXO A – Trabalho apresentado no 5º Simpósio de Imunologia da UFAM.



5º SIMPÓSIO DE IMUNOLOGIA

22 A 24 DE MAIO DE 2014

Certificado

Certificamos que o trabalho *“Avaliação das interleucinas (IL-2, IL-4, IL-6 e IL17A) no soro de pacientes com dengue grave e não-grave na cidade de Manaus”*, sob autoria de: Melo, F.S.; Furtado, S.C.; Lobo, M.R.G.; Barcellos, J.F.M., foi apresentado na forma de pôster no 5º Simpósio de Imunologia, no dia 23 de maio de 2014.

Manaus – Amazonas, 24 de maio de 2014.


Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani
Coordenador do Workshop


Profa. Dra. Aya Sadahiro
Vice-Coordenadora do PPGIBA



PPGIBA
UFAM
CAPES
FAPEAM
AMAZONAS GOVERNO DO ESTADO
SECTI
Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação
Certificado pela ISO 9001:2008