

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
COMITÊ CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO FINAL
PIB-B/0057/2014 - AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS TNF- α E IFN- γ NO SORO DE
PACIENTES COM DENGUE NA CIDADE DE MANAUS

Nome: Flávio Souza Melo, FAPEAM
Orientador: Dr. José Fernando Marques Barcellos.

Manaus
2016

SUMÁRIO

Resumo	01
1.Introdução	02
2. Objetivo	04
3. Materiais e Métodos	05
4. Resultados e Discussão	10
5. Conclusões	12
6. Referências.....	11

RESUMO

Dengue constitui uma arbovirose de grande importância em nossa região, sendo *Aedes aegypti* seu principal vetor. O vírus da dengue apresenta quatro subtipos (DENV-1, 2, 3 e 4), e todos estes estiveram presentes concomitantemente no surto da doença que ocorreu no ano de 2011 na cidade de Manaus. Esta doença é classificada como febre da dengue (FD), febre hemorrágica da dengue (FHD) ou a síndrome do choque da dengue (SCD). Em relação às células T, estas podem sofrer diferenciação em células T *Helper*, as quais secretam citocinas e são responsáveis pela coordenação de células como as T citotóxicas, que realizam controle de infecções virais. Dependendo do tipo e combinação de citocinas presentes no microambiente de diferenciação, as células T *Helper* podem desenvolver-se como subtipos Th1, Th2 e a mais recente descoberta, Th17, sendo esta última o objeto do presente estudo, através da quantificação das citocinas pró-inflamatórias Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Interferon Gama (IFN- γ), e sua correlação com os grupos de pacientes apresentando quadro de dengue grave e não-grave e controle negativo. As citocinas séricas TNF- α e IFN- γ quantificadas a partir do soro para determinação do perfil de resposta imune Th17 através de Kit CBA FLEX Th1 Th2 Th17 (BD Biosciences), demarcando assim a presença ou ausência destas citocinas. Em ambas as citocinas quantificadas (IFN- γ e TNF- α) foi possível avaliar que os grupos de dengue (grave e não grave) apresentaram concentrações aumentadas e estatisticamente significativas em relação ao grupo controle negativo. Não houve diferença entre os grupos dengue grave e não grave para as citocinas IFN- γ e TNF- α analisadas. Assim como não houve como inferir na existência de um padrão definido como Th1, Th2 ou Th17 para os casos de dengue grave e ou não grave. Uma estratificação das amostras analisadas em relação aos seus sorotipos poderia elucidar a possível ligação destas citocinas com a gravidade da doença. A renovação desta pesquisa constituiu uma vertente do Projeto FAPEAM universal: **IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO E PERFIL DE CITOCINAS EM PACIENTES COM DENGUE** (Doutorado), devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas.

Palavras-chave: Dengue; Citocinas; imunologia; TNF- α ; IFN- γ .

1. INTRODUÇÃO

A dengue é a principal arbovirose transmitida ao homem através da picada do mosquito, *Aedes aegypti*, seu principal vetor (1, 2, 4). O vírus da dengue é um vírus-RNA de cadeia simples, pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, apresentando 4 sorotipos (DENV-1, 2, 3 e 4), com sequência genética homóloga de 65-70% (3, 8, 9).

Após a inoculação pelo mosquito, o vírus da dengue infecta e replica-se ativamente em queratinócitos, células de Langerhans e demais células dendríticas, células musculares estriadas e lisas, além de fibroblastos. Em seguida é estabelecida a viremia, onde se dissemina por todo o organismo, coincidindo com o desenvolvimento da fase febril. Neste momento o vírus pode estar livre no plasma, ou intracelularmente em macrófagos, pois apresenta tropismo positivo por células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos, monócitos e células B) (6).

A fase febril pode durar de 2-7 dias antes de a temperatura diminuir. A seguir, instala-se a forma clínica da doença, com uma ampla faixa desde um mal estar discreto até quadro clínico hemorrágico, eventualmente fatal (7, 12). No entanto, a maioria dos casos de dengue registrados são assintomáticos, e a doença clinicamente aparente, que representa <10% de todos os casos é classificada em febre da dengue (FD), febre hemorrágica da dengue (FHD) ou a síndrome do choque da dengue (SCD) (13). A FD é uma doença febril auto-limitante, porém de curso debilitante. É acompanhada por uma combinação de sintomas não-específicos, incluindo cefaleia, mialgia, dor retro-orbital e erupção cutânea (14). Já a FHD/SCD, que representam as formas mais graves da dengue, geralmente ocorrem como infecção secundária com um sorotipo heterólogo da primária, e são caracterizadas por extravasamento de plasma e distúrbios na hemostasia e picos de febre (8).

O diagnóstico de FHD exige o preenchimento de quatro critérios: febre, manifestações hemorrágicas, trombocitopenia (contagem de plaquetas de 100.000 células/mm³), e evidência de extravasamento de plasma (derrame pleural, ascite, hemoconcentração de 20% ou hipoproteïnemia) (15). Dessa forma, a FHD é dividida em quatro graus (I a IV), sendo que os graus III e IV constituem a SCD (Síndrome do Choque da Dengue) com choque hipotensivo ou pressão de pulso fina, mais sinais clínicos de choque (1, 9, 16).

O sistema imunológico é um complexo de organização ao 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 (10, 20, 21).

Os linfócitos T *Helper* (Th) ou auxiliares constituem uma das células efetoras da resposta adquirida, secretando citocinas e responsáveis pela coordenação da atividade de outras células imunes como linfócitos B, macrófagos ou linfócitos T citotóxicos, estando os últimos envolvidos no controle de vírus e células cancerosas, evidenciando o sinergismo entre os dois subtipos de linfócito T na defesa contra os patógenos intracelulares (11, 26).

Os linfócitos T *Helper* (Th) são subdivididos a partir do perfil de citocinas que liberam. Após um estímulo proveniente 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 no microambiente, que apresentam um papel fundamental nesta diferenciação (17, 18, 22).

A diferenciação em Th17 depende da presença de IL-23, o que representa um perfil inflamatório. Este subtipo celular representa importante proteção contra patógenos extracelulares. Produz as citocinas IL-17, IL-22 e IL-26. As citocinas da família IL-17 são produzidas de igual forma por neutrófilos induzindo a produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF- α em células endoteliais (27).

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 (19, 25).

Tem-se sugerido que FHD/SCD manifestam-se em um contexto de produção exacerbada de citocinas, cujo alvo é o endotélio vascular, levando a um aumento da permeabilidade vascular, ocorrência de manifestações hemorrágicas, hemoconcentração, e em alguns casos, o desenvolvimento de choque intratável, evoluindo a óbito (5, 23, 24).

Diversas citocinas tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) e as interleucinas (IL)-6, IL-1, IL-17, têm sido associados a efeitos deletérios durante o quadro de dengue (6). Dentre estas citocinas que podem induzir extravasamento de plasma, estão incluídas IFN- γ , IL-2 e TNF- α , pois estão aumentadas em casos de FHD (3, 28, 29, 30).

O IFN- γ é a principal citocina, responsável pela ativação de macrófago e suas ações estão intimamente ligadas, nos eventos tanto da imunidade inata, quanto da adaptativa, e ainda nas respostas a patógenos intracelulares. As células NK secretam IFN- γ , em resposta à ativação aos ligantes na superfície das células hospedeiras infectadas. O IFN- γ modula negativamente a resposta Th2, e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta Th1, o que permite uma homeostasia no sistema imune e uma resposta imunológica balanceada (31).

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina multifuncional que tem efeitos na inflamação, sepse, metabolismo lipídico e proteico, hematopoiese, angiogênese e resistência do hospedeiro a parasitas e tumores malignos (32).

O TNF- α é um importante mediador de apoptose onde a interação do receptor de TNF ao seu receptor TNF-1 (TNF-R1) ativa várias vias de transdução de sinal (33).

O TNF- α é conhecido por ser um dos mais potentes ativadores do endotélio microvascular e consequentemente indutor do aumento da permeabilidade capilar estando associado a mecanismos de ativação da coagulação e fibrinólise na síndrome do choque da dengue (34).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal:

- Avaliar a relação entre os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias no soro de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial positivo e negativo para dengue.

2.2 Objetivos Específicos:

- Verificar os níveis séricos da citocina IFN- γ ;
- Verificar os níveis séricos da citocina TNF- α .
- Avaliar o comportamento das citocinas supracitadas e correlacionar sua presença ou ausência aos quadros de dengue grave e não-grave.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Caracterização da Pesquisa

Este estudo é retrospectivo de caráter transversal com componente analítico, selecionando-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. Estão sendo utilizadas amostras coletadas durante um surto de dengue 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 faz parte do projeto de mestrado do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas, inserido na Plataforma Brasil. Neste, com 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 há Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE a aplicado aos doadores da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM).

3.2 Seleção das Amostras

Utiliza-se 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 oriundo de amostras de soro de doadores de sangue oriundos da FHMEMOAM, que selecionados após abordagem individual na recepção da FHMOAM, durante a triagem de rotina de doação de sangue, no período matutino diariamente até a obtenção do N amostral (30 amostras) que aceitarem participar do estudo após assinatura do TCLE.

3.3 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 continham siglas de sistema alfa-numérico, impedindo assim, o reconhecimento amostra-doador/paciente.

3.4 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.

3.5 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 tiverem suas amostras não aptas para distribuição pela FHEMOAM.

3.6 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 é minimizado através da codificação (siglas alfa numéricas) das amostras, impedindo desta forma a identificação dos pacientes, pois se tratam 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.

3.7 Avaliação do Perfil de Citocinas e Resposta Imune

Foi determinado ao final do processamento das amostras o perfil das citocinas séricas INF- γ e TNF- α e realizada a sua análise. As citocinas séricas INF- γ e TNF- α estão sendo 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 Biosciencies), demarcando assim a presença ou ausência destas citocinas dentre os grupos positivos e negativos.

3.8 Análise dos Dados

Utilizou-se a 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%). Se os dados não apresentam normalidade pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov aplicou-se Estatística não paramétrica. Em todas as análises foi considerado o 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 utilizando-se o Software Livre R e Minitab®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IFN- γ na dengue

O IFN- γ é produzido durante um determinado tipo de resposta do linfócito T auxiliar 1 e pode refletir a ativação de células T CD8⁺ com produção de citocinas pró-inflamatórias, e é apontada como a chave da ativação endógena, promovendo efeitos antimicrobianos de macrófagos.

Nesse estudo o IFN- γ apresentou níveis séricos semelhantes quando comparados os grupos de pacientes dengue não grave ao de dengue grave (gráfico 01), mostrando-se diferentes quando comparados ao grupo controle negativo.

Dado este que difere dos estudos de Azeredo e colaboradores (35). Neste estudo eles encontraram altos níveis de IFN- γ , observados em pacientes com dengue em asiáticos e latino-americanos posteriormente associando a presença desta citocina a gravidade da doença.

Trabalhos associam a ligação do IFN- γ a outras citocinas, entre elas o TNF- α , bem como, demais mediadores envolvidos no recrutamento e ativação de plaquetas, predeterminado aumento da permeabilidade endotelial, hipotensão e o choque, caracterizando desta forma o agravamento da doença (36 e 37). Por fim estudo realizado na Índia em um total de 332 pacientes hospitalizados onde destes 62 apresentaram dengue grave, sendo o sorotipo DENV 1 o mais predominante, tendo porém a presença dos demais sorotipos exceto o DENV 4 (38), diferem de nossos achados uma vez que o aumento dos níveis de IFN- γ foi observado em um maior número de casos de pacientes com dengue grave em relação ao grupo dengue não grave.

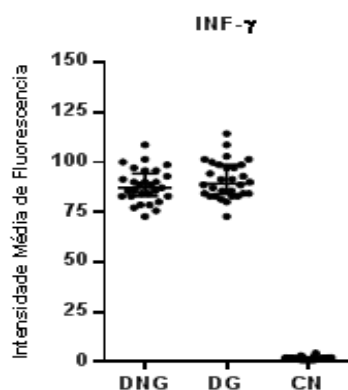


Gráfico 01. Intensidade média das citocinas séricas IFN- γ em pacientes dos grupos: dengue não grave (DNG), dengue grave (DG) e controle negativo (CN). **** = significativo entre si, ns = não significativo ($P < 0,05$).

4.2 TNF- α na dengue

Neste estudo foi encontrada inconsistência nos níveis de TNF- α na doença grave contra formas de doença leve. Algumas hipóteses sugerem diferenças nos sorotipos de vírus da dengue ou na resposta imune do hospedeiro, como por exemplo, diferentes polimorfismos genéticos do TNF- α que poderiam explicar o resultado da doença.

Os resultados para a citocina pró-inflamatória TNF- α , neste estudo demonstrou como apresentado no gráfico 02 a equiparação quando comparados os grupos de pacientes classificados em dengue não grave, dengue grave, como mostra a não significância entre os grupos. Porém quando comparamos os grupos dengue não grave e dengue grave ao grupo controle negativo de ambos é possível determinar a significância quando verificado o p valor de $< 0,0001$.

Estes resultados corroboram com trabalhos já realizados. Algumas hipóteses sugerem diferenças nos sorotipos de vírus da dengue ou na resposta imune do hospedeiro, como por exemplo, diferentes polimorfismos genéticos do TNF- α que poderiam explicar o resultado da doença. Estudos associam a presença de TNF- α a gravidade da doença, fato este não observado em nenhum dos grupos avaliados neste estudo (39 e 40).

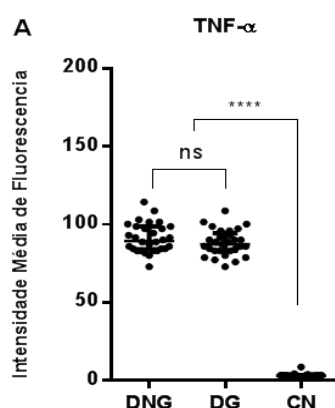


Gráfico 02. Intensidade média da citocina sérica TNF- α em pacientes dos grupos: dengue não grave (DNG), dengue grave (DG) e controle negativo (CN). **** = significativo entre si, ns = não significativo ($P < 0,05$).

5. CONCLUSÃO

Em ambas as citocinas quantificadas (IFN- γ e TNF- α) foi possível avaliar que os grupos de dengue (grave e não grave) apresentaram concentrações aumentadas e estatisticamente significativas em relação ao grupo controle negativo.

Não houve diferença entre os grupos dengue grave e não grave para as citocinas IFN- γ e TNF- α analisadas.

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

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

7. 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. Banerjee M, Chatterjee T, Choudhary GS, Srinivas V, Kataria VK. Dengue: A Clinicohaematological Profile. *MJAFI*. 2008; 64(4): 333-36.
4. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Ha SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496(7446): 504-7.
5. 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.
6. 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.
7. Malavige GN, Ogg GS. T cell responses in dengue viral infections. *Journal of Clinical Virology*. 2013;58(4):605-11.
8. 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.
9. Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological reviews*. 2008;225(1):300-13.
10. Barreto ML, Teixeira MG. Dengue in Brazil: epidemiological situation and contribution to a research agenda. *estudos avançados*. 2008;22(64):53-72.
11. Laboissière, P., 2013. Onze estados concentram 74% dos casos notificados dedengue. Publicado em 12/04/2013, <http://www.fiocruz.br/rededengue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=208&sid=9>
12. Lee I-K, Lee W-H, Liu J-W, Yang KD. Acute myocarditis in dengue hemorrhagic fever: a case report and review of cardiac complications in dengue-affected patients. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(10):e919-e22.
13. Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *BMJ: British Medical Journal*. 2002;324(7353):1563.
14. Mammen M, Lyons A, Innis B, Sun W, McKinney D, Chung R, et al. Evaluation of Dengue Virus strains for human challenge studies. *Vaccine*. 2014.
15. Narvaez F, Gutierrez G, Pérez MA, Elizondo D, Nuñez A, Balmaseda A, et al. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(11):e1397.
16. Srikiatkachorn A, Krautrachue A, Ratanaprakarn W, Wongtapradit L, Nithipanya N, Kalayanarooj S, et al. Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonographic study. *The Pediatric infectious disease journal*. 2007;26(4):283-90.

17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Srikiatkachorn A, Green S. Markers of dengue disease severity. *Dengue Virus: Springer*; 2010. p. 67-82.
21. Jobim M, Jobim LF. Natural killer cells and immune surveillance. *Jornal de pediatria*. 2008;84(4 Suppl):S58-67. Epub 2008/12/04.
22. 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.
23. 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.
24. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52. Epub 1998/04/01.
25. 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.
26. 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 efectoras 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.
27. Bilate AM. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de reumatologia clínica*. 2007;8(2):47-51.
28. 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*.
29. Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, et al. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*. 2008;376(2):429-35.
30. Lobo MRG, Furtado SC, Galvão JR, Paula L, Barcellos JFM. Citocinas na dengue: Inovações do sistema imune. *Scientia Amazonia*. 2014; 3(1).
31. Mills KH, McGuirk P. Antigen-specific regulatory T cells—their induction and role in infection. *Seminars in immunology*. 2004; 2(1):107-117.
32. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature*. 1990; 346(6281).

33. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995; 3 (6).
34. Wati S, Rawlinson SM, Ivanov RA et al. Tumour necrosis factor alpha (TNF- α) stimulation of cells with established dengue virus type 2 infection induces cell death that is accompanied by a reduced ability of TNF- α to activate nuclear factor κ B and reduced sphingosine kinase-1 activity. *Journal of general virology*. 2011; 92 (4).
35. Azeredo, E. L.; Zagne, S. M.; Alvarenga, A. R. et al. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 4, p. 437-449, 2006.
36. Mangada, M. M.; Endy, T. P.; Nisalak, A. et al. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *Journal of Infectious Diseases*, v. 185, n. 12, p. 1697-1703, 2002.
37. Mangada, M. M.; Rothman, A. L. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *The Journal of Immunology*, v. 175, n. 4, p. 2676-2683, 2005.
38. Priyadarshini, D.; Gadia, R. R.; Tripathy, A. et al. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PloS one*, v. 5, n. 1, p. e8709, 2010.
39. Vitarana, T.; De Silva, H.; Withana, N. et al. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *The Ceylon medical journal*, v. 36, n. 2, p. 63-65, 1991.
40. Braga, E. L.; Moura, P.; Pinto, L. M. et al. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 2, p. 229-232, 2001.