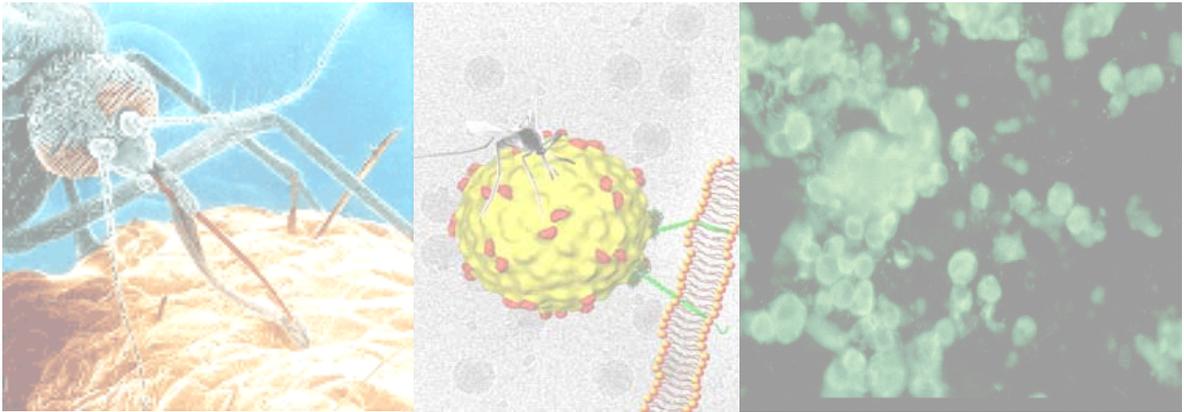
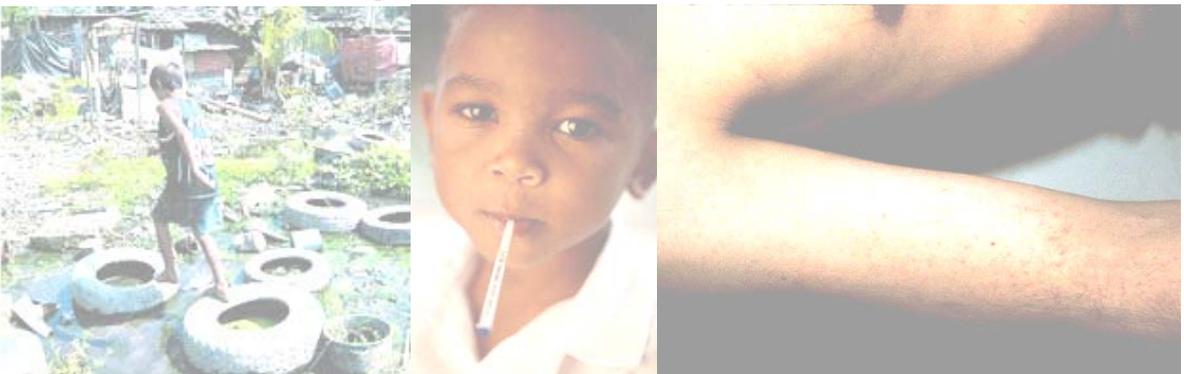


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

Bianca Bortolini Merlo



**PERFIL FENOTÍPICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO
SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES PORTADORES DE FEBRE
DO DENGUE EM DIFERENTES FASES DA DOENÇA**



**Vitória
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

BIANCA BORTOLINI MERLO

**PERFIL FENOTÍPICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES PORTADORES DE FEBRE DO DENGUE EM
DIFERENTES FASES DA DOENÇA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Moreira Lemos

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues

Vitória
2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M565p Merlo, Bianca Bortolini, 1982-
Perfil fenotípico de células mononucleares do sangue periférico de
pacientes portadores de febre do dengue em diferentes fases da doença /
Bianca Bortolini Merlo. – 2007.
93 f. : il.

Orientadora: Elenice Moreira Lemos.
Co-Orientador: Rodrigo Ribeiro Rodrigues.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, :
Centro de Ciências da Saúde.

1. Dengue. 2. Imunopatologia. 3. Células T. 4. Leucócitos. I. Lemos,
Elenice Moreira. II. Rodrigues, Rodrigo Ribeiro. III. Universidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Aos meus pais que revestiram minha existência de amor e carinho, privando-se dos seus sonhos em favor dos meus.

AGRADECIMENTOS

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

À Professora, Doutora Elenice Moreira Lemos, orientadora desta dissertação, agradeço o compromisso assumido, o empenho que colocou neste trabalho, os níveis de exigência dos desafios que me lançou e os suportes, formais e informais, que disponibilizou. Agradeço, ainda, porque foram mesmo muito importantes para mim, a análise rigorosa e afetuosa, as sugestões, os esclarecimentos e os comentários sempre oportunos e que espero ter sabido aproveitar. Para agradecer a aliança, a confiança e a amizade, as palavras serão sempre poucas.

Agradeço ao Professor, Doutor Rodrigo, a consideração de ter aceitado a co-orientação de minha dissertação, na esperança de retribuir, com a seriedade de meu trabalho, a confiança em mim depositada. Obrigada por suas considerações, por seu entusiasmo contagiante.

Ao Reynaldo Dietze, coordenador do Núcleo de Doenças Infecciosas, por permitir que eu fizesse parte deste respeitável centro de pesquisa e, também, pelo exame clínico dos pacientes.

À Dra. Alice Catarina M. Paiva, Farmacêutica-Bioquímica, pela supervisão dos ensaios de diagnósticos sorológicos dos pacientes.

Ao Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, coordenador da pós-graduação, meu respeito e admiração pela incansável vontade de aprender e ensinar.

Aos meus amigos, Jauber e Marcela, por mais de 7 anos de amizade, que espero seja eterna. Com muito carinho, quero agradecer-los pelos momentos de incentivo, cumplicidade, pela aliança, pelo respeito, por muito, muito mais. *"Só existe uma coisa melhor do que fazer novos amigos: conservar os velhos."*

Aos meus colegas do laboratório (Aretha, Bruna, Lucas, Fabiana, Fábio) pelo companheirismo e entusiasmo no desenvolvimento das tarefas. Obrigada também pelos momentos de descontração e amizade.

À Tatiana por sua vontade e seu prazer em ajudar, por sua amizade e generosidade, por responder às minhas várias perguntas e, por vezes, responder a mesma pergunta, várias vezes.

À Carlinha, pela doçura e pela companhia, sempre tão agradável. Obrigada, também, pelas incontáveis caronas!

Aos mestres da pós-graduação por todo incentivo e disposição.

Aos colegas do mestrado e do NDI: Christiane, Ketene, Gustavo, Renata, Fabíola, Solange, Fabrício, João Marcelo, Cristina, Tiago, Maria, Valéria, Eneida, Luíza, Juliana, Débora, Luciana e João que, muito intimamente, partilharam uma palavra amiga, uma história, uma graça, a alegria de um bom riso num momento de descontração que tanto apreciamos. Obrigada Rafael, pela ajuda com a estatística! Aproveito para dizer que *podem sempre contar comigo!*

A todos os funcionários do NDI por toda a força e carinho a mim dispensados e, claro, pela hora do café e da pipoca.

À Fátima Aparecida Pereira, secretária da pós-graduação, por todo apoio e pelo auxílio nas questões burocráticas.

Aos meus pais, pela sólida formação dada até a minha juventude, que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada a este mestrado, meus eternos agradecimentos.

Ao meu irmão, pela sua energia positiva e seu carinho.

Ao Tommy, por tudo, dito e não dito. E como não há muitas maneiras de dizer o indizível, digo apenas – o que não é pouco – que por tudo.

A Deus, por iluminar minha vida, me guiando sempre em busca dos melhores e nem sempre fáceis caminhos, e por ter colocado neles pessoas tão valorosas e especiais.

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos se não fora
A presença distante das estrelas!”
(Mário Quintana)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos da resposta imune celular em pacientes portadores de FD em diferentes estágios da doença. Amostras de sangue periférico de 22 pacientes, portadores de FD, foram coletadas em três fases da doença: fase aguda, Dia 0 (até 48 horas após o início dos sintomas), fase de convalescença, Dia 7 (uma semana após a primeira coleta) e fase pós-cura, Dia 60 (60 dias após a primeira coleta). As células mononucleares do sangue periférico foram marcadas com anticorpos específicos para diferentes populações e subpopulações celulares, e marcadores de ativação, CD25, CD69 e HLA-DR. Os resultados revelaram que os pacientes portadores de FD em todas as fases da doença, mas principalmente na fase aguda, apresentaram menor número de plaquetas. Foi também observado, na fase aguda da doença, um menor número de leucócitos circulantes, com diminuição do número de neutrófilos, monócitos e linfócitos. A análise de subpopulações de linfócitos revelou que a diminuição do número dessas células era devido ao menor número de linfócitos B, T CD4⁺ e T CD8⁺. A análise de células NK mostrou que pacientes, na fase aguda da doença, apresentaram um menor número destas células mas, com uma maior porcentagem de células NK na população de linfócitos totais. Com relação ao estado de ativação das células os dados revelaram que, na fase aguda da doença, os pacientes apresentaram maior porcentagem de T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando CD69, com aumento mais pronunciado em linfócitos T CD8⁺. Além disso, foi demonstrada uma maior porcentagem de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e TCD4⁺CD25⁺, na fase aguda da doença e uma maior porcentagem de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ na fase de convalescença. A análise de associação, entre parâmetros hematológicos e o fenótipo das células mononucleares do sangue periférico com a presença de sinais e sintomas, da doença revelou que pacientes com doença mais grave apresentaram um menor percentual de linfócitos CD8⁺HLA-DR⁺ em relação aos pacientes com doença branda. Em relação aos demais parâmetros avaliados, não encontrou-se nenhuma diferença entre os dois grupos avaliados. Em suma, os dados sugerem que a resposta imune do hospedeiro é importante para a eliminação do vírus. Entretanto, estudos adicionais ainda são necessários para avaliar a influência da resposta imune na patogênese da infecção pelo vírus Dengue.

ABSTRACT

The objective of the present study was to examine the PBMC immunological status of patients with Dengue Fever during different stages of disease. Blood samples from 22 patients with Dengue Fever, were collected at three different stages of the disease: at acute phase, Day 0 (1-2 days after disease onset), convalescent phase, Day 7 (7 days after the first sample) and post-cure phase, Day 60 (60 days after the first sample). Peripheral blood mononuclear cells were stained using fluorescein-labeled monoclonal antibodies to both PBMC subset markers and the activation markers, such as CD69, CD25 and HLA-DR, and analyzed using flow cytometry. The results have showed lower platelets count compared to control group, on the different stages of Dengue Fever. In acute phase, the white blood cells counts in patients with Dengue Fever were lower, with decreased numbers of monocytes, neutrophils and lymphocytes. The same was observed for absolute numbers of B cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The results show a lower number of NK cells on acute phase of Dengue Fever, but an increase was observed on percentage of NK cells in total lymphocytes. Concerning the activation status of the peripheral blood cells, our results have demonstrated that the percentage of CD8⁺ T and CD4⁺T cells expressing CD69 was significantly higher, and this increased was more evidenced on CD8⁺ T cells. Moreover was demonstrated a higher percentage of T CD4⁺HLA-DR⁺ and CD4⁺CD25⁺, on acute phase of the disease and a higher percentage of T CD8⁺HLA-DR⁺ on convalescent phase. The association analysis between the hematological parameters and the immunological status of the peripheral blood mononuclear cells with the presence of clinical manifestations of the disease has revealed that severe Dengue Fever patients presented a lower percentage of CD8⁺HLA-DR⁺ T lymphocytes, compared with the mild Dengue Fever patients. Therefore, data presented here suggest that host immune response is important to clearance viral. However, additional studies were needed to evaluate the role of immune response in the immunopathological mechanism during Dengue virus infection.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Manifestações clínicas das infecções pelo vírus dengue..... 22
- Figura 2.** Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) utilizado para seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 versus FL2 utilizado para quantificar o percentual das populações e subpopulações celulares específicas em R1..... 41
- Figura 3.** Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T reguladoras (CD4⁺CD25HIGH) por citometria de fluxo. A) Gráfico de distribuição pontual Tamanho versus Granulosidade utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso os linfócitos – R1. B) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD4 versus FL2/CD25 utilizado para quantificar o percentual de células T reguladoras (CD4⁺CD25HIGH) em R4..... 42
- Figura 4.** Seqüência de procedimentos utilizados para avaliar a expressão das moléculas HLA-DR em monócitos no sangue periférico. A) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD4 versus SSC utilizado para seleção da população de monócitos em R, considerando o fenótipo CD4LOW+SSCIntermediário. B) Histograma unidimensional de fluorescência FL2/HLA-DR, contendo as células selecionadas na região R1, utilizado para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de HLA-DR por monócitos..... 43
- Figura 5.** Número absoluto de leucócitos totais (A), linfócitos (B), monócitos (C) e neutrófilos (D) no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes estágios da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (Controle). Os resultados estão expressos como valores individuais (pontos) e a média (barra) para cada grupo avaliado. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras a, c e d em relação aos grupos Controle, Dia 7 e Dia 60, respectivamente..... 47

- Figura 6.** Número absoluto (A, C e E) e porcentagem (B, D e F) de linfócitos T, B e células NK no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes estágios da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (Grupo controle). Os resultados estão apresentados como valores individuais (pontos) e a média (barras) para cada grupo avaliado. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas pelas letras a, c e d, em comparação aos grupos Controle, Dia 7 e Dia 60, respectivamente..... 49
- Figura 7.** Número absoluto (A e C) e porcentagem (B e D) de células NK maduras e pré-NK na população de células NK circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes estágios da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (Grupo controle). Os resultados estão apresentados como valores individuais (pontos) e a média (barras) para cada grupo avaliado. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas pela letra a, c e d, em relação aos grupos Controle, Dia 7 e Dia 60, respectivamente..... 51
- Figura 8.** Número absoluto de linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (C) e porcentagem de linfócitos T CD4⁺ (B) e CD8⁺ (D), no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes estágios da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle). Os resultados estão expressos como valores individuais (pontos) e a média (barras) para cada grupo avaliado. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras a, c e d em relação aos grupos Controle, Dia 7 e Dia 60, respectivamente..... 53
- Figura 9.** Número absoluto (A e C) e porcentagem (C e D) de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ expressando o marcador de ativação CD69, no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes estágios da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos saudáveis (grupo Controle). Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (pontos) e a média (barra) para cada grupo avaliado. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas pelas letras a, c e d, em relação aos grupos Controle, Dia 7 e Dia 60, respectivamente..... 55

- Figura 10.** Número absoluto (A e C) e Porcentagem de linfócitos (B e D) T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando o marcador HLA-DR, no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes estágios da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos saudáveis (Grupo controle). Os gráficos estão apresentados como dispersão dos valores individuais (pontos) e a média (barra) para cada grupo avaliado. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras a, c e d em comparação aos grupos Controle, Dia 7 e Dia 60, respectivamente..... 57
- Figura 11.** Número absoluto (A) e percentual (B) de células T CD4⁺ expressando o marcador CD25 no sangue periférico de indivíduos portadores de Febre do Dengue em três diferentes estágios da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (Controle). Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (pontos) e a média (barras). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras a, c e d, em comparação aos grupos Controle, Dia 7 e Dia 60, respectivamente..... 59
- Figura 12.** Porcentagem de células CD4⁺CD25^{HIGH} na população de linfócitos totais (A) e na população de células CD4⁺ de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes estágios da doença (Dia 0, 70 e 60) e indivíduos clinicamente saudáveis (Controle). Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (pontos) e a média (barras)..... 60
- Figura 13.** Análise da expressão da molécula HLA-DR em monócitos no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes estágios da doença (Dias 0, 7 e 60) e indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle). Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (pontos) e a média (barras)..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados demográficos dos pacientes portadores de dengue e dos indivíduos clinicamente saudáveis.....	36
Tabela 2.	Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.....	39
Tabela 3.	Perfil hematológico de indivíduos portadores de Febre do Dengue em três diferentes estágios da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos saudáveis (Controle).....	46
Tabela 4.	Parâmetros hematológicos e contagem diferencial de leucócitos de pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0, agrupados de acordo com a ausência (Grupo 1) ou presença (Grupo 2) de sinais e sintomas da doença no Dia 7.....	62
Tabela 5.	Perfil imunofenotípico dos linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0, agrupados de acordo com a ausência (Grupo 1) ou presença (Grupo 2) de sinais e sintomas da doença no Dia 7.....	63
Tabela 6.	Subpopulações de linfócitos e monócitos expressando diferentes marcadores de ativação em pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0, agrupados de acordo com a ausência (Grupo 1) e presença (Grupo 2) de sintomas da doença no Dia 7.....	65

LISTA DE SIGLAS

- ADCC:** citotoxicidade celular dependente de anticorpos (*antibody dependent cellular cytotoxicity*)
- ADE:** facilitação dependente de anticorpos (*antibody dependent enhancement*)
- CD:** cluster of differentiation
- DENV:** vírus Dengue
- EDTA:** ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA:** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- FACS:** Fluorescence Activated Cell Sorter
- FCS:** Forward Scatter
- FD:** Febre do Dengue
- FHD:** Febre Hemorrágica do Dengue
- FITC:** fluorescein isothiocyanate
- FL:** Fluorescência
- GM-CSF:** Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (*granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*)
- HLA:** antígeno leucocitário humano (*Human Leukocyte Antigen*)
- HLA-DP:** antígeno leucocitário humano – locus DP
- HLA-DQ:** antígeno leucocitário humano – locus DQ
- HLA-DR:** antígeno leucocitário humano – locus DR
- HUCAM:** Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes
- ICAM-1:** molécula de adesão intracelular 1 (*Intracellular adhesion molecule-1*)
- IFN- γ :** interferon-gama
- Ig:** imunoglobulina
- IL:** interleucina
- IMF:** Intensidade Média de Fluorescência
- iNOS:** óxido nítrico sintetase induzível
- LFA-1:** antígeno de função associada a linfócitos (*Lymphocyte Function Antigen 1*)
- NK:** natural killer
- NO:** óxido nítrico
- NS:** não estruturais (*nonstructural*)
- MHC:** complexo de histocompatibilidade principal

PBMC: células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PE: phicoeritrin

PerCP: peridinin-chlorophyll-protein

RNA: ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

SCD: Síndrome de Choque de Dengue

sIL-2R: molécula solúvel do receptor de IL-2

SSC: Side Scatter

SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde

Th1: T helper

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

VLA-4: Antígenos de ativação muito tardia (*very late antigen-4*)

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1	Introdução	19
1.1	Dengue	19
1.2	Epidemiologia.....	20
1.3	Manifestações clínicas	22
1.4	Resposta imune e patogênese do Dengue.....	25
2	Objetivos	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	Materiais e métodos	35
3.1	Pacientes.....	35
3.2	Avaliação hematológica.....	37
3.3	Avaliação imunofenotípica dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.....	38
3.3.1	Ensaio de imunofenotipagem.....	38
3.3.2	Aquisição e análise dos dados.....	39
3.4	Análises estatísticas.....	43
4	Resultados	45
4.1	Alterações hematológicas.....	45
4.2	Análise dos leucócitos circulantes.....	46
4.3	Análise dos linfócitos T, B e células NK.....	47
4.4	Análise das subpopulações de células NK.....	50
4.5	Análise de subpopulações de linfócitos T.....	52
4.6	Análise de linfócitos T ativados.....	54

4.6.1	Linfócitos T CD4+ e T CD8+ expressando CD69	54
4.6.2	Linfócitos T CD4+ e CD8+ expressando HLA-DR.....	56
4.6.3	Linfócitos T CD4+ expressando CD25.....	58
4.7	Análise de Células T reguladoras (CD4 ⁺ CD25 ^{HIGH}).....	59
4.8	Análise da expressão de HLA-DR em monócitos.....	60
4.9	Análise da associação entre parâmetros hematológicos e fenótipo das células mononucleares do sangue periférico com a presença de sinais e sintomas da doença.....	61
5	Discussão	67
6	Conclusões	75
7	Referências	78
8	Anexo	90

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue

Durante o século XIX, o Dengue foi considerado uma doença esporádica, responsável por epidemias com longos intervalos. Entretanto, mudanças dramáticas ocorreram nesse padrão. Atualmente, o Dengue é considerada a arbovirose de maior incidência no mundo, endêmica em todos os continentes, com exceção da Europa. Cerca de dois terços da população mundial vivem em áreas infestadas de mosquitos vetores do Dengue, especialmente o *Aedes aegypti*. Esse vetor encontra, nas áreas residenciais humanas, urbanas e peri-urbanas, todas as condições ambientais favoráveis para seu desenvolvimento e proliferação (ROTHMAN, 2003; MALAVIGE et al., 2004).

Os vírus Dengue (DENV) são *Flavivirus* de genoma RNA de fita simples e polaridade positiva (CHAMBRES et al., 1990). A partícula viral é caracterizada por um “core” icosaédrico, de 40-50 nm de diâmetro, com a proteína C encapsulando o genoma viral. Circundando esse “core” há um envelope lipídico, com duas proteínas virais, M e E. O vírus Dengue contém, ainda, sete proteínas não-estruturais - NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (MONATH e HEINZ, 1996). A proteína E, localizada nas espículas do envelope dos vírus Dengue, é fundamental para a ligação do vírus ao receptor de membrana e possui os mais importantes domínios antigênicos desses microorganismos (ALLISON et al., 1995).

São conhecidos 4 sorotipos distintos, os quais podem ser diferenciados sorologicamente, denominados vírus Dengue 1 (DEN-1), Dengue 2 (DEN-2), Dengue 3 (DEN-3), Dengue 4 (DEN-4) (BURKE et al, 1988). Os sorotipos podem ser identificados através da utilização de anticorpos, neutralizantes, específicos para o vírus. Por outro lado, anticorpos específicos para a proteína E e as proteínas não-estruturais NS1 e NS3 de um sorotipo reagem, cruzadamente, com os demais sorotipos não servindo, portanto, para o diagnóstico diferencial dos sorotipos (STEPHENSON, 2005).

As formas anatomo-clínicas causadas pelo vírus Dengue são classificadas em diferentes categorias: Febre do Dengue (FD), Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) e a Síndrome do Choque do Dengue (SCD). A infecção por um sorotipo produz imunidade duradoura contra uma segunda infecção pelo mesmo sorotipo, mas somente parcial e temporária, contra um sorotipo diferente, sendo possível a ocorrência de infecções secundárias por outros sorotipos (ROTHMAN, 2003).

Apesar do *Aedes aegypti* ser considerado o mosquito vetor mais importante do Dengue, outros mosquitos, *A. albopictus* e *A. polynesiensis*, também podem atuar como vetores, dependendo da localização geográfica (WHO, 1999). Considerando que o *Aedes aegypti* pode sobreviver em água poluída ou em pequenas coleções de água, o manejo inapropriado do lixo, típico de urbanização não-planejada, levando ao acúmulo de água, é o principal responsável pela alta densidade de mosquitos em áreas endêmicas para o Dengue (VEZZANI E SCHWEIGMANN, 2002). Aumentos significativos na população larvária são observados durante a estação chuvosa, razão pela qual a grande maioria das epidemias coincidem com o período chuvoso. (THAVARA et al., 2001).

1.2 Epidemiologia

O Dengue é, atualmente, a arbovirose humana de maior magnitude epidemiológica e com distribuição geográfica mais ampla, afetando 56 países. Estimativas internacionais indicam que 50 milhões de indivíduos são infectados com o Dengue por ano sendo que 500.000 indivíduos desenvolvem Dengue Hemorrágico e, pelo menos, 12.000 indivíduos vão a óbito (WHO, 2002). Além disso, o aumento da incidência de dengue hemorrágico e a circulação simultânea de mais de um sorotipo viral são suficientes para incluir o Dengue entre os mais sérios problemas atuais de saúde pública, envolvendo doenças transmissíveis.

No Brasil, o primeiro relato de uma epidemia de Dengue, confirmada através de isolamento viral ocorreu em 1981, em Boa Vista, Roraima, tendo sido identificados os sorotipos DEN-1 e DEN-4 (OSANAI et al, 1983). Entretanto, a disseminação do sorotipo DEN-1, pelo território nacional, iniciou-se somente em 1986, durante a epidemia ocorrida no Rio de Janeiro e em algumas áreas urbanas do Nordeste. Em 1990 foi introduzido o sorotipo 2, também no Rio de Janeiro, onde produziu uma epidemia que se propagou afetando, principalmente, a região Sudeste. No ano de 1998 a epidemia adquiriu proporções catastróficas, com mais de 500 mil casos notificados. Porém, em 1999, foi relatado um importante declínio na incidência da doença, muito provavelmente, devido à redução no número de indivíduos susceptíveis aos sorotipos circulantes em grandes áreas urbanas e, em parte, pelas medidas de controle adotadas pelos Governos Federal, Estaduais e Municipais (TEIXEIRA et al., 2005).

Em dezembro de 2000 foi confirmado o isolamento do sorotipo DEN-3, pela primeira vez no Brasil, na cidade do Rio de Janeiro. A introdução do sorotipo 3 foi responsável por uma grande epidemia nessa cidade, onde as taxas de incidência, nos dois anos subseqüentes, aumentaram de 470,1 para 1.735,2 casos por 100.000 habitantes (NOGUEIRA et al, 2001). Diferentemente das outras, a epidemia DEN-3 expandiu-se mais rapidamente, atingindo inúmeras cidades de pequeno porte e os estados do Sul considerados, até então, livres do Dengue (TEIXEIRA et al., 2005).

Os primeiros casos de dengue no Espírito Santo foram registrados em 1995 com 2669 ocorrências de infecção por um único sorotipo, o DEN 2. De 1996 a 2000 várias epidemias foram registradas, levando a um crescimento significativo no número de casos, atingindo 20.165 registros no ano de 2000. Em janeiro de 2002 foi introduzido o sorotipo DEN-3, uma epidemia que atingiu 28.666 registros e, em 2003, foram cadastrados 34.373 casos. Nos anos seguintes, a incidência de Dengue no Espírito Santo apresentou uma tendência à redução, com 5.295 casos registrados em 2004 e 6.752 em 2005 (SVS-MS, 2006).

A Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde registrou, até dezembro de 2006, 345.922 casos de dengue, dos quais 263.984 (76%), ocorreram entre os meses de janeiro a maio. O Espírito Santo foi o estado do Sudeste com a maior taxa de incidência, tendo sido notificadas 14.281 ocorrências. Em 2006 foram confirmados 628 casos de FHD e a ocorrência de 67 óbitos em todo Território Nacional.

1.3 Manifestações Clínicas

A infecção pelo vírus Dengue provoca uma doença com um amplo espectro, variando desde uma infecção assintomática, febre indiferenciada, dengue clássico ou Febre do Dengue chegando, até, a suas formas mais graves: Febre Hemorrágica do Dengue e Síndrome do Choque do Dengue, as quais apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade (WHO, 1997). A figura 1 apresenta as manifestações clínicas do Dengue.

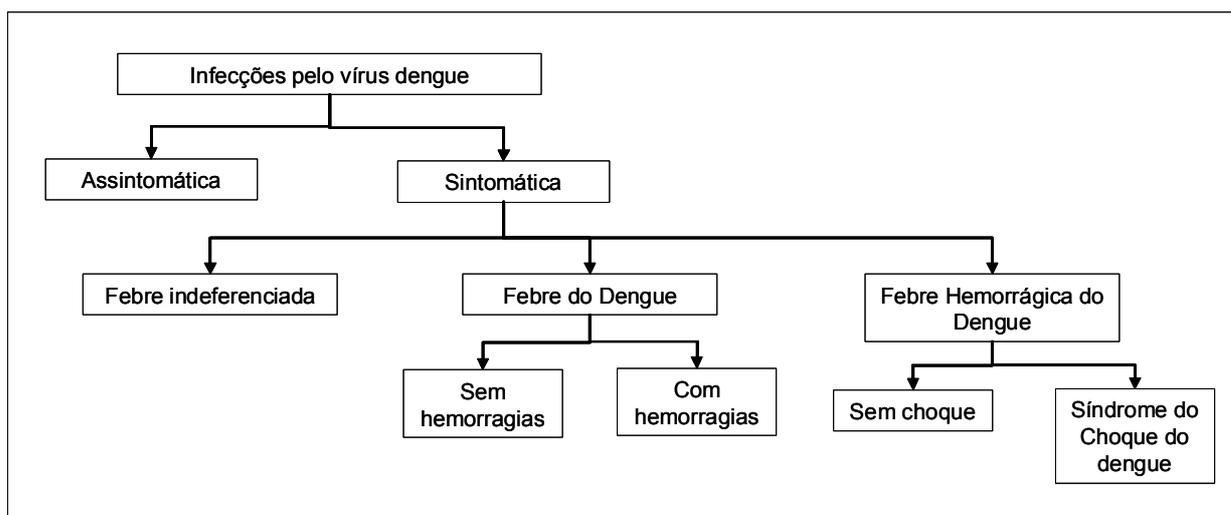


Figura 1. Manifestações clínicas das infecções pelo vírus dengue. Fonte: WHO, 1997.

A FD é mais comum em crianças acima de 1 ano de idade, adolescentes e adultos, podendo ocorrer, tanto na infecção primária como na secundária (GUBLER, 1998). É caracterizada por febre alta, abrupta, e seguida de uma variedade de sinais e sintomas não-específicos, dentre eles, cefaléia frontal, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, desconforto abdominal e “rash” cutâneo (WHO, 2002). Embora manifestações hemorrágicas sejam incomuns nos casos de Dengue Clássico, petéquias/púrpura, sangramento gastrointestinal, epistaxe, bem como sangramento gengival, têm sido relatados. Alguns sintomas incomuns incluem encefalopatia e hepatite, podendo levar à falência do fígado (GUBLER, 1998).

Os sintomas gerais do Dengue, como febre e mal-estar, surgem após um período de incubação que varia de 7 a 10 dias. Segue-se, então, uma fase de viremia, na qual o paciente se torna febril e infectivo (MALAVIGE et al., 2004). A FD, apesar de bastante debilitante é, geralmente, auto-limitada e, raramente, fatal. A fase aguda da doença tem duração de 3 a 7 dias; entretanto, a fase convalescente pode prolongar-se por semanas e pode estar associada à fraqueza e depressão, especialmente em adultos (GUBLER, 1998).

Na maioria dos casos de FD, a contagem de plaquetas e as dosagens bioquímicas do soro estão normais. Porém, leucopenia e trombocitopenia, além de um aumento das enzimas hepáticas no soro, podem ocorrer (KALAYANAROOJ et al., 1997).

A FHD, normalmente associada à infecções secundárias, pode ocorrer também durante infecções primárias, especialmente em recém-nascidos (MALAVIGE et al., 2004). A FHD é caracterizada por febre alta, alterações na hemostasia e aumento da permeabilidade vascular, levando a fenômenos hemorrágicos e, em casos mais graves, à falência circulatória (WHO, 2002). Quando há agravamento da perda de plasma, caracterizada, inicialmente, por taquicardia e hipotensão, os pacientes podem desenvolver outros sinais de distúrbios circulatórios como, ausência de pulso e choque (MALAVIGE et al., 2004). As anormalidades laboratoriais incluem hematócrito elevado devido à hemoconcentração. Nesse caso, a trombocitopenia é

considerável, sendo a contagem de plaquetas igual, ou menor, que 100.000/mm³ (GIBBONS; VAUGHN, 2002).

A evolução da FHD, sem a conduta terapêutica adequada, leva o paciente a um quadro de choque, denominado Síndrome do Choque do Dengue (SCD), que está associado a altas taxas de mortalidade, podendo chegar a 47% nos casos de choque profundo. O choque é decorrente do aumento da permeabilidade vascular, seguida de hemoconcentração e falência circulatória. Dor abdominal aguda e vômitos persistentes podem ser sinais iniciais da progressão para a SCD, podendo estar acompanhadas de encefalopatia, devido a distúrbios metabólicos e eletrolíticos (KABRA et al., 1999; GUZMAN et al., 1999; MALAVIGE et al., 2004).

As alterações laboratoriais, como trombocitopenia e hemoconcentração, decorrentes da infecção pelo vírus Dengue são importantes marcadores, pois possibilitam a diferenciação da FD e da FHD em suas formas mais benignas. Ocorrendo hemoconcentração e plaquetopenia, o paciente será considerado como acometido de FHD/SCD, definidos de acordo com o grau de gravidade, segundo a OMS (MALAVIGE et al, 2004).

O tratamento nas infecções pelo vírus Dengue é, normalmente, sintomático pois não há terapia antiviral efetiva para o tratamento de pacientes portadores de Dengue. A reposição de fluidos e eletrólitos é uma medida eficaz nos casos graves. O reconhecimento precoce dos sinais de alerta para as formas mais graves da doença (intensa dor abdominal, persistência de vômitos, letargia e inquietação) e o tratamento são fundamentais na redução da taxa de mortalidade (MALAVIGE et al., 2004).

1.4 Resposta imunológica e patogênese do Dengue

Na tentativa de esclarecer a patogênese do Dengue, a identificação dos sítios de replicação do vírus, em seres humanos, é de grande relevância. Os monócitos têm sido descritos como as células mais permissivas dentre as células mononucleares do sangue periférico (Peripheral Blood Mononuclear Cells – PBMC) para infecção *in vitro* pelo vírus Dengue (HALSTEAD et al., 1977b). Scott e colaboradores (1980) demonstraram, através da análise de PBMC de pacientes portadores de dengue, que a detecção do vírus era mais freqüente, e em maior intensidade, na população de células aderentes do que na população não-aderente. Com base nesses achados acredita-se, então, que monócitos e macrófagos teciduais sejam, predominantemente, as células-alvo para infecção pelo vírus Dengue *in vivo* (ROTHMAN; ENNIS, 1999).

Enquanto alguns autores têm relatado a detecção de antígenos do vírus Dengue em linfócitos periféricos de pacientes (JESSIE et al., 2004; LIN et al., 2002a), outros autores não foram capazes de detectar linfócitos circulantes infectados. No intuito de determinar a freqüência de leucócitos mononucleares infectados em pacientes portadores de FD, Neves-Souza e colaboradores (2005), utilizando citometria de fluxo, encontraram antígenos do vírus apenas em monócitos.

As células dendríticas (CD) também parecem ser capazes de serem infectadas pelo vírus Dengue. Após a infecção, as células dendríticas secretam citocinas que culminam em sua maturação. Através da infecção e da ativação das CDs, os linfócitos T podem ser ativados, iniciando as respostas imunes adaptativas (HO et al., 2001).

Paralelamente às células do sistema imune, os hepatócitos, os neurônios e as células endoteliais têm sido descritas como potenciais células hospedeiras para o vírus Dengue (MARIANNEAU et al., 1997; AVIRUTNAN et al., 1998; DESPRES et al., 1998). Huang e colaboradores (2000) demonstraram que o vírus Dengue é capaz de infectar células endoteliais humanas e induzir a produção de IL-6 e IL-8, o que pode contribuir para a patogênese do Dengue. Outros estudos têm

demonstrado, também, que o vírus Dengue pode infectar células hematopoiéticas podendo, assim, afetar a capacidade replicativa destas células (NAKAO et al., 1989).

Estudos da resposta imune ao vírus Dengue têm demonstrado que células Natural Killer (NK) agem eliminando células infectadas pelo vírus Dengue. De acordo com Kurane e colaboradores (1986), variações nessa atividade lítica podem contribuir para diferenças na susceptibilidade à infecção e na gravidade dos sintomas, observada em diferentes indivíduos infectados. As células NK podem eliminar células infectadas, tanto por citotoxicidade direta, como por citotoxicidade celular dependente de anticorpos. Recentemente, Azeredo e colaboradores (2006a) observaram em pacientes portadores de Febre do Dengue, na fase aguda, uma elevação na frequência de células NK circulantes, associada a um aumento significativo na expressão dos marcadores de superfície CD69 (ativação) e Tia-1 (citotoxicidade). Estes autores sugerem que a resposta imune inata, mediada por células NK, estaria contribuindo para um bom prognóstico da doença.

Neves-Souza e colaboradores (2005) observaram a expressão de iNOS em monócitos infectados de pacientes portadores de FD na fase aguda da doença demonstrando, assim, ativação dessas células. Estes autores sugerem que o NO teria um importante papel no controle da replicação do vírus nessas células.

Com relação ao papel dos anticorpos na resposta imune da infecção pelo vírus Dengue, estudos têm demonstrado que anticorpos específicos para o vírus Dengue desempenham diferentes funções *in vitro*, tais como: neutralização do vírus, lise mediada pelo complemento, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e facilitação da infecção dependente de anticorpo (ADE) (GENTRY et al., 1982; KURANE et al., 1986; FALGOUT et al., 1990). Essas observações indicam que anticorpos contra o vírus Dengue podem prevenir, ou mediar, a recuperação da infecção pela neutralização do vírus Dengue ou por lise de células infectadas via ativação do complemento ou ADCC (KURANE; ENNIS, 1992).

Por outro lado, acredita-se que o papel da facilitação dependente de anticorpos na patogênese de infecções secundárias pelo vírus Dengue seria de facilitar a entrada do vírus nas células, a infecção de um grande número de células do hospedeiro reduzindo, assim, o tempo de incubação e aumentando a gravidade da doença (GREEN; ROTHMAN, 2006; STEPHENSON, 2005)

O papel de linfócitos T, específicos contra o vírus Dengue, tem sido estudado *in vitro*. Demonstra-se que células T CD4⁺ vírus específicas produzem IFN- γ , IL-2 e GM-CSF após estimulação com antígenos do vírus Dengue, via MHC-II. Esses estudos também revelaram que células T CD8⁺ específicas lisam células infectadas via MHC-I (BUKOWSKY et al., 1989; KURANE et al., 1989).

Durante a fase aguda da doença, tanto na Febre do Dengue quanto na FHD, há uma redução no número de células T circulantes com diminuição do número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (MATHEW et al., 1999; AZEREDO et al., 2001). Embora essa redução seja um resultado surpreendente, uma vez que as células T seriam responsáveis pela eliminação do vírus, acredita-se que essa eliminação não seja devida ao aumento do número de células T, e sim, ao seu estado de ativação.

Nesse contexto, vários estudos têm revelado que apesar da redução no seu número absoluto, linfócitos T CD8⁺ e TCD4⁺, de pacientes portadores de Dengue, apresentam-se altamente ativados, principalmente nas fases iniciais da doença.

Kurane e colaboradores (1991) observaram que pacientes portadores de Febre do Dengue apresentavam níveis elevados de receptor solúvel de IL-2 (sIL-2R), molécula solúvel CD4 (sCD4), IL-2 e IFN- γ , na fase aguda da doença demonstrando, assim, a presença de células T ativadas (KURANE et al., 1991; LIBRATY et al., 2002).

Green e colaboradores (1999) encontraram níveis elevados de CD69 em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, em pacientes com FD nas fases iniciais quando comparados a

indivíduos saudáveis. Recentemente, Azeredo e colaboradores (2006b) encontraram uma maior porcentagem de células T CD8⁺ expressando HLA-DR, DQ, DP e o marcador de citotoxicidade Tia-1 em pacientes portadores de Febre do Dengue, quando comparados a controles saudáveis. Embora estes autores não tenham apresentado evidência direta de que os linfócitos T ativados sejam vírus específicos, a elevação na frequência de células ativadas coincidiu com o pico de viremia. Com base nesses achados, estes autores sugeriram que a presença de células ativadas, durante a fase inicial da infecção, poderia desempenhar um papel na eliminação do vírus.

A infecção primária pelo vírus Dengue em humanos é, geralmente, limitada a uma semana, o que sugere que a resposta imune é capaz de eliminar o vírus eficientemente. Entretanto, essa mesma resposta imune, quando exacerbada, tem sido descrita, também, como responsável pela imunopatologia das formas graves da doença. O exame de lesões de pele de pacientes com FD mostrou a presença de edema tecidual, infiltração de células mononucleares e tumefação das células endoteliais. Entretanto, nenhuma partícula ou antígeno viral pôde ser detectado nesses tecidos, sugerindo que o “rash” cutâneo, associado à Febre do Dengue, seria mediado pela resposta imune, e não um efeito direto do vírus (DE ANDINO et al., 1985).

Na tentativa de explicar os mecanismos pelos quais a infecção pelo vírus Dengue evolui para as formas mais graves, várias teorias têm sido propostas. Dentre elas uma teoria, bastante difundida, baseia-se no fenômeno de facilitação dependente de anticorpo (*Antibody-Dependent Enhancement-ADE*), defendida por Halstead (HALSTEAD, 1977a). A teoria da facilitação dependente de anticorpos (*Antibody-Dependent Enhancement-ADE*) foi descrita para explicar as graves manifestações de FHD/SCD ocorridas em crianças com infecção secundária por um sorotipo heterólogo de vírus Dengue (HALSTEAD, 1988; NOGUEIRA et al., 1993, ZAGNE et al., 1994) Acredita-se que o papel da facilitação dependente de anticorpos, na patogênese de infecções secundárias pelo vírus Dengue, seria de facilitar a entrada do vírus nas células, permitindo a infecção do hospedeiro, reduzindo o tempo de incubação e aumentando a gravidade da doença (GREEN; ROTHMAN, 2006;

STEPHENSON, 2005). O mecanismo específico, entretanto, não está comprovado e, como não há um modelo animal de FHD/SCD, a relação causal entre ADE e o desenvolvimento das formas graves do Dengue permanece, ainda, não estabelecida.

Outra teoria proposta sugere que a ativação de linfócitos T vírus-específicos resultaria no aumento da permeabilidade capilar por vários mecanismos. (KURANE e ENNIS, 1994). O primeiro mecanismo envolve produção de citocinas por linfócitos T vírus-específicos. Linfócitos T CD4⁺ de pacientes com infecção prévia pelo vírus dengue proliferam e produzem citocinas pró-inflamatórias como INF- γ e TNF- α após estimulação com antígeno do vírus. Essas citocinas podem afetar, diretamente, as células endoteliais levando à perda de plasma (STEPHENSON, 2005). O INF- γ aumenta o número de receptores Fc γ nos monócitos e, conseqüentemente, aumenta infecção dessas células na presença de anticorpos específicos contra o vírus. Além disso, o INF- γ aumenta a expressão dos Antígenos Leucocitários Humanos de Classe II (*Human Leukocyte Antigen* ou HLA), ativando a capacidade dos monócitos em produzir mediadores que podem contribuir para o desenvolvimento das formas mais graves do Dengue (KURANE et al, 1989).

A participação de células do sistema imune inato e adaptativo, nas infecções pelos diferentes sorotipos do vírus Dengue, também poderia contribuir para o desenvolvimento de casos de FHD e SCD (KURANE et al., 1991; Green et al., 1999). Vários grupos têm estudado os efeitos da infecção pelo vírus Dengue na função dos monócitos, com atenção particular à produção de citocinas. Hober e colaboradores (1996) relataram a produção TNF- α por monócitos infectados com vírus Dengue ou expostos ao vírus inativado. Esses estudos demonstraram que a infecção de monócitos humanos, pelo vírus Dengue, pode induzir a produção de fatores vasoativos e, portanto, desempenhar papel na patogênese do Dengue (ROTHMAN; ENNIS, 1999). Outros autores sugerem que, em altas concentrações, o NO, secretado por monócitos infectados, poderia causar hipotensão e depressão miocárdica exercendo, assim, um papel prejudicial ao hospedeiro (NEVES-SOUZA et al 2005).

Alguns grupos têm estudado o efeito do polimorfismo do *locus* do complexo de histocompatibilidade principal na susceptibilidade à FHD. Loke e colaboradores (2001) realizaram um estudo de tipagem molecular do HLA de pacientes com FHD no Vietnã. Estes autores demonstraram que o polimorfismo no *loci* do HLA de classe I está, significativamente, associado à susceptibilidade à FHD. Além disso, essa associação esteve limitada ao polimorfismo da região do HLA-A, mas não no gene do HLA-B. Fatores como idade, estado nutricional e doenças crônicas também parecem contribuir para o desenvolvimento da FHD. Entretanto, essas associações ainda estão pouco esclarecidas.

Não apenas a resposta imune e as características próprias do indivíduo infectado têm sido associadas aos quadros graves de Dengue. Alguns autores acreditam que diferentes manifestações de FD, FHD e SCD podem ser causadas por variantes do vírus Dengue com diferentes graus de virulência (LEITMEYER et al., 1999).

Um mecanismo alternativo para explicar a patogênese do Dengue é o mimetismo molecular, que propõe que a progressão da doença para a FHD é resultado de uma reação auto-imune. Anticorpos contra uma proteína estrutural do vírus Dengue, denominada NS1, apresentam reação cruzada contra plaquetas humanas e células endoteliais, levando um dano às plaquetas e ao endotélio e ativação de um processo inflamatório (LIN et al, 2006).

Tendo em vista a importância do Dengue como um problema de saúde pública no Brasil, o entendimento da interação do vírus com a resposta imunológica nas infecções é essencial para a compreensão dos mecanismos imunopatogênicos. A inexistência de um modelo animal, experimental, que reflita as formas graves do Dengue observadas no homem, torna o estudo envolvendo amostras de pacientes, de grande relevância. A análise de parâmetros imunológicos desencadeados durante uma infecção por vírus Dengue, em diferentes fases da doença, pode ajudar a revelar o papel da interação entre o vírus e o hospedeiro. Informações adicionais sobre a resposta imune, induzida nos pacientes, são fundamentais para o desenvolvimento de uma vacina segura, como também, imunoterapias ou

medicamentos que possam combater a doença. Nesse contexto, nós nos propusemos a realizar um estudo longitudinal para avaliar a resposta imune celular de pacientes portadores de Febre do Dengue, em diferentes fases da doença, no intuito de compreender os mecanismos envolvidos na resposta imune ao vírus Dengue.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil fenotípico das células mononucleares do sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em diferentes fases da doença.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar hemograma completo de pacientes portadores de Febre do Dengue em diferentes fases da doença e comparar com valores encontrados em indivíduos saudáveis.
- Avaliar o número absoluto e relativo de linfócitos B, linfócitos T e suas subpopulações, células NK e suas subpopulações, em pacientes portadores de Febre do Dengue em diferentes fases da doença e relacionar com valores encontrados em indivíduos saudáveis.
- Avaliar o estado de ativação das subpopulações de linfócitos e monócitos através da expressão de marcadores de ativação em pacientes portadores de Febre do Dengue em diferentes fases da doença e relacionar com valores encontrados em indivíduos saudáveis.
- Avaliar a correlação entre os parâmetros hematológicos e fenótipo das células mononucleares do sangue periférico com a presença de sinais e sintomas da doença.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Todos os indivíduos que participaram desse estudo foram voluntários e provenientes da região da Grande Vitória/ES. O estudo foi, previamente, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Espírito Santo. Os indivíduos foram esclarecidos quanto ao estudo e, aqueles que concordaram em participar, assinaram o Termo de Consentimento (Anexo 1). Um questionário para avaliação dos sinais e sintomas foi aplicado, nas três fases da doença, para todos os pacientes incluídos no estudo (Anexo 2).

Amostras de sangue periférico de 22 pacientes, portadores de infecção pelo vírus do Dengue, foram coletadas em tubos de coleta, a vácuo, contendo anticoagulante EDTA (Vacuntainer, BD). Pacientes com suspeita de Dengue foram encaminhados e atendidos no ambulatório do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, no período de abril a junho de 2000, sob a supervisão do Dr. Reynaldo Dietze. O diagnóstico clínico da Febre do Dengue foi realizado através de anamnese e achados clínicos como febre, cefaléia, dor retro-orbital, mialgia, artralgia e “rash” cutâneo. Todos os diagnósticos clínicos de Febre do Dengue foram confirmados através de diagnóstico sorológico. Portanto, todos os pacientes incluídos nesse estudo apresentavam diagnóstico sorológico positivo para Dengue e não relataram história prévia da doença.

O diagnóstico sorológico da infecção pelo vírus do Dengue foi realizado através de dois ensaios imunoenzimáticos (ELISA) - PanBio Dengue e BioManguinhos IgM. De acordo com os fabricantes, os referidos testes apresentam sensibilidade de 94,7% e 96,4% e especificidade de 100% e 87,9%, respectivamente. Os ensaios de ELISA foram realizados no Laboratório de Imunologia III do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Espírito Santo (LACEN-ES), sob a supervisão da Farmacêutica-Bioquímica, Dra. Alice Catarina M. Paiva.

As amostras de sangue periférico foram coletadas de todos os pacientes, em três diferentes fases da doença.

Dia 0 – Até 48 horas após o início da febre.

Dia 7 – Sete dias após a 1º coleta.

Dia 60 – 60 dias após a 1º coleta.

As diferentes fases da doença foram definidos como:

- a) Fase aguda - correspondente ao início dos sintomas, denominada nesse estudo como Dia 0;
- b) Fase de convalescença - correspondente à fase de desaparecimento dos sinais e sintomas da doença, denominada Dia 7;
- c) Fase pós-cura, denominada Dia 60.

Como controle, foram incluídas amostras de sangue periférico de 15 indivíduos clinicamente saudáveis e sem história prévia de doença febril nos últimos 3 meses.

A Tabela 1 demonstra os dados demográficos dos pacientes e dos controles.

Tabela 1 – Dados demográficos dos pacientes portadores de dengue e dos indivíduos clinicamente saudáveis.

	N	Sexo		Idade
		Feminino	Masculino	
Grupo Dengue	22	9	13	15 - 53
Grupo Controle	15	7	8	20 - 46

As amostras coletadas dos pacientes portadores de Dengue, nas três diferentes fases da doença e dos indivíduos saudáveis, foram submetidas à avaliação hematológica e a ensaios de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.

Para verificar a existência de diferença no fenótipo das células avaliadas entre pacientes que apresentavam, ou não, sinais e sintomas da doença, os pacientes portadores de Febre do Dengue foram divididos em dois grupos de acordo com a presença de sinais e sintomas no Dia 7, ou seja, na fase de convalescença. No Grupo 1 foram incluídos pacientes que não apresentavam nenhum dos sinais e sintomas avaliados e, no Grupo 2, apresentavam, pelo menos, um dos sinais e sintomas avaliados. Os sinais e sintomas utilizados para a separação dos grupos foram: artralgia, mialgia e “rash” cutâneo.

3.2 Avaliação hematológica

A avaliação hematológica consistiu na realização do hemograma, contagem global e diferencial de leucócitos, incluindo neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. Essas avaliações foram realizadas no Laboratório Henrique Tommasi Netto Análises Clínicas LTDA. Para realização do procedimento, amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de 5ml contendo anticoagulante EDTA (BD Vacutainer) e os parâmetros hematológicos foram avaliados em contador automático de células (Coulter STKS).

3.3 Avaliação imunofenotípica dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

3.3.1. Ensaios de imunofenotipagem

A determinação do fenótipo das células circulantes do sangue periférico foi realizada através de reação de imunofluorescência por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais para identificação e quantificação de células T e suas subpopulações, células B, células NK, marcadores de ativação celular: CD69, HLA-DR e CD25 e expressão de HLA-DR em monócitos (Tabela 2).

Os ensaios de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram realizados segundo o protocolo proposto pelo fabricante Becton Dickinson, modificado conforme descrito a seguir. Alíquotas de 100µl de sangue periférico, coletados em tubos contendo EDTA, foram transferidas para tubos de poliestireno 12x75 cm contendo 5µl do anticorpo monoclonal específico para o marcador de superfície celular de interesse, conjugados com fluorocromos, de acordo com a Tabela 2. Após homogeneização em vórtex, a mistura reacional foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, utilizando 2ml de solução de lise comercial diluída 10 vezes em água deionizada (FACS™ Lysing Solution – Becton Dickinson). As amostras foram homogeneizadas e, novamente, incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 400 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 2ml de tampão fosfato (0,0015M pH 7.4), sob as mesmas condições de centrifugação. Após a lavagem, as células foram fixadas com 500µl de solução fixadora (10g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/l de cloreto de sódio, pH 7.2) e foram mantidas a 4°C até o momento da leitura. A leitura da fluorescência foi realizada, no máximo, 24 horas após a marcação.

Tabela 2– Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.

Anticorpos	Fluorocromo	Clone	Células Alvo
Anti-IgG1	PE	MOPC-21	Controle Isotópico
Anti-IgG2	FITC	G155-178	Controle Isotópico
Anti-CD3	FITC, PerCP	SK7	Linfócitos T
Anti-CD4	FITC, PE	SK3	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	FITC, PE	SK1	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD16	PE	B73.1	Células NK
Anti-CD19	FITC, PE	4G7	Linfócitos B
Anti-CD25	PE	2A3	Linfócitos T ativados
Anti-CD56	FITC	NCAM16.2	Células NK
Anti-CD69	PE	L78	Linfócitos T ativados
Anti-HLA-DR	PE	L243	Linfócitos T ativados

3.3.2. Aquisição e análise dos dados.

A citometria de fluxo permite a análise de diferentes parâmetros: tamanho (FSC-Forward Scatter), granulosidade (SSC-Side Scatter) e fluorescência. Estas características são detectadas utilizando um sistema óptico-eletrônico que avalia a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula e a emissão de fluorescência. O estudo dos diferentes componentes ou elementos celulares pode ser realizado, simultaneamente, empregando-se fluorocromos diferentes.

A aquisição e análise dos dados foram realizadas utilizando um citômetro de fluxo (FACSort – Becton Dickinson) e o programa CELLQuest™. Este programa fornece um gráfico de dispersão das células de acordo com o tamanho e granulosidade (Figura 2A).

Utilizando este gráfico pode-se fazer a seleção da população de interesse baseada em aspectos morfométricos (R1). Após a seleção da região de interesse (R1), o percentual das populações ou subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência (Figura 2B). O perfil fornecido pela fluorescência emitida por diferentes fluorocromos é delimitado em quadrantes, cuja definição é feita com base na distribuição obtida pelas células marcadas com anticorpos controles isotípicos (controle negativo de fluorescência) estabelecendo-se, dessa maneira, o quadrante contendo as células negativas (Quadrante 3). Os quadrantes 1 e 4 representam as populações ou subpopulações celulares expressando os marcadores, separadamente. O quadrante 2 representa a população celular que expressa os marcadores, simultaneamente, população duplo-marcada.

Os resultados foram expressos em porcentagem e em número absoluto. Para a obtenção do número absoluto, a porcentagem de cada população ou subpopulação celular foi multiplicada pelo número total de linfócitos de cada indivíduo determinado através da contagem diferencial de leucócitos.

Para análise da expressão de marcadores de ativação, os resultados foram representados em proporção, que significa a porcentagem de uma população expressando um determinado marcador dentro da população total. Por exemplo: porcentagem de células T $CD4^+CD69^+$ dentro da população de linfócitos T $CD4^+$, ou seja, a porcentagem de linfócitos T $CD4^+$ que expressam o marcador CD69 ($\%CD4^+CD69^+$ dividida pela % de células T $CD4^+$ multiplicado por 100).

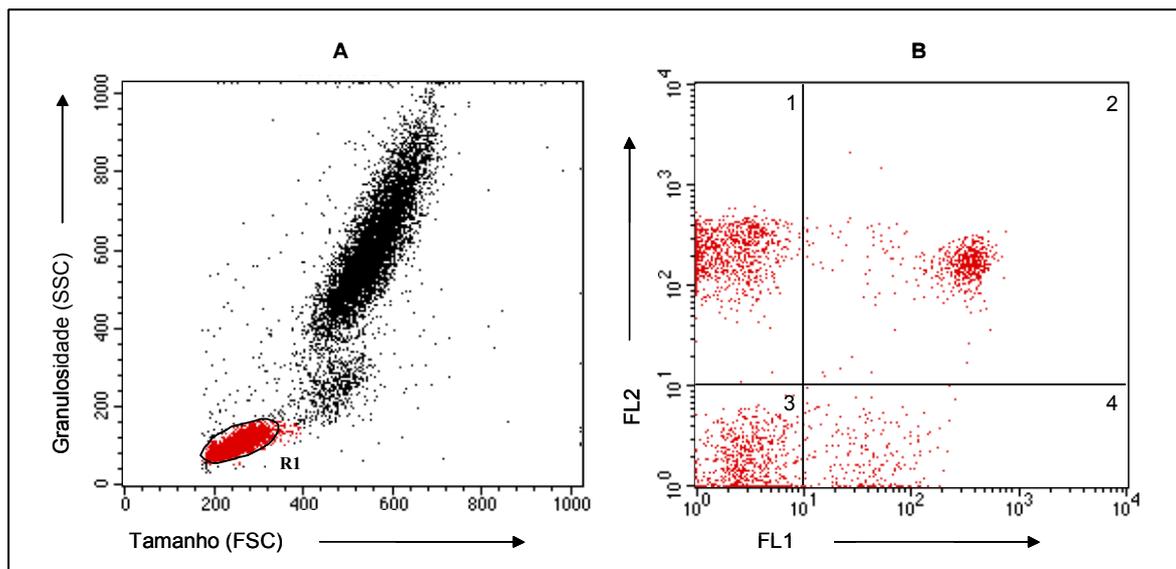


Figura 2 – Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) utilizado para seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 versus FL2 utilizado para quantificar o percentual das populações e subpopulações celulares específicas em R1.

A análise de células T reguladoras foi realizada segundo protocolo proposto por BAECHER-ALLAN et al (2001). A figura 2 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise de células T reguladoras com fenótipo $CD4^+CD25^{HIGH}$. Após seleção da população de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) figura 3A, gráficos de FL1/CD4 versus FL2/CD25 foram construídos, permitindo identificação de 3 subpopulações: $CD4^+CD25^-$, $CD4^+CD25^{LOW}$ e $CD4^+CD25^{HIGH}$. A fração celular em R4 representa o valor de células T reguladoras na população de linfócitos totais (Figura 3B).

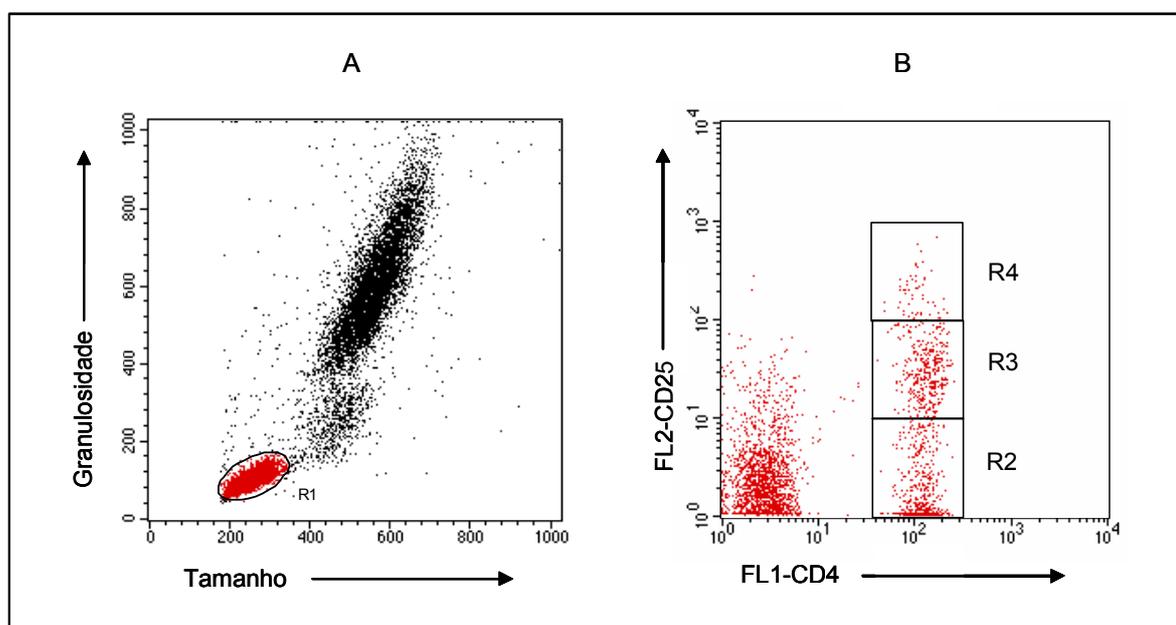


Figura 3 – Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T reguladoras ($CD4+CD25^{HIGH}$) por citometria de fluxo. A) Gráfico de distribuição pontual Tamanho versus Granulosidade utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso os linfócitos – R1. B) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD4 versus FL2/CD25 utilizado para quantificar o percentual de células T reguladoras ($CD4+CD25^{HIGH}$) em R4.

A expressão da molécula HLA-DR na população de monócitos foi determinada através da análise semi-quantitativa por intensidade média de fluorescência (IMF) conforme descrito a seguir: a seleção da região R1, em gráficos de distribuição pontual de FL1/CD4 *versus* granulosidade (SSC), foi baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos da população celular de interesse – monócitos apresentando-se $CD4^{LOW+}SSC^{Intermediário}$ (Figura 4A). Em seguida, foram construídos histogramas unidimensionais de intensidade de fluorescência FL2/HLA-DR, a fim de determinar a intensidade média de fluorescência da expressão de HLA-DR pela população de monócitos, previamente selecionada em R1 (Figura 4B).

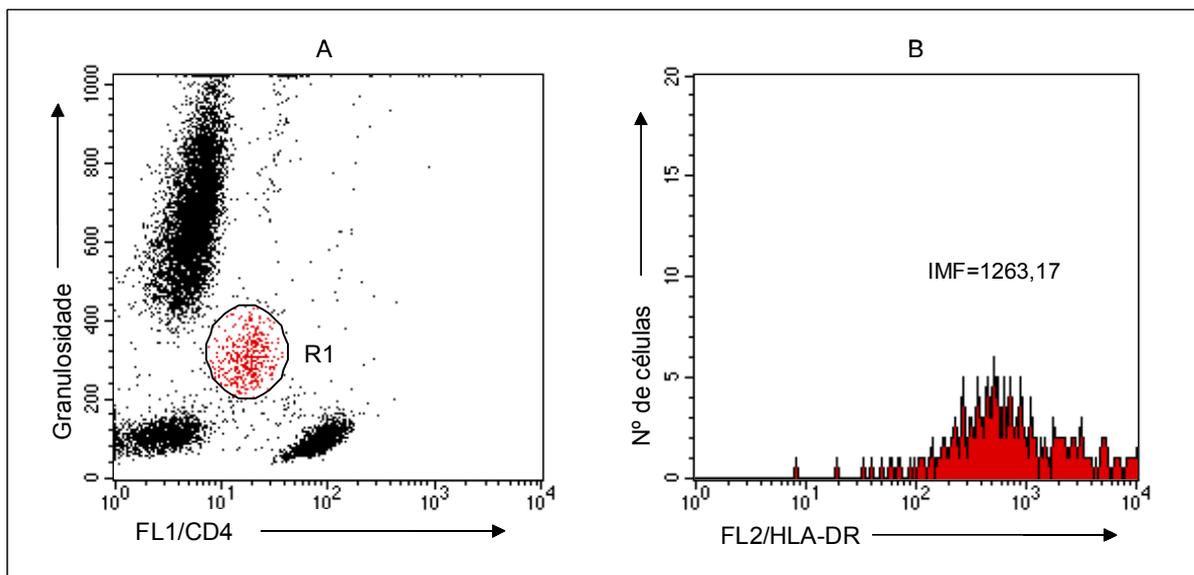


Figura 4. Seqüência de procedimentos utilizados para avaliar a expressão das moléculas HLA-DR em monócitos no sangue periférico. A) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD4 versus SSC utilizado para seleção da população de monócitos em R, considerando o fenótipo $CD4^{LOW+}SSC^{Intermediário}$. B) Histograma unidimensional de fluorescência FL2/HLA-DR, contendo as células selecionadas na região R1, utilizado para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de HLA-DR por monócitos.

3.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 10.0 para Windows (SPSS Inc, USA). Todos os resultados foram testados para a normalidade e apresentaram distribuição gaussiana. A análise de Medidas Repetidas foi utilizada para comparação entre os grupos dos pacientes portadores de Dengue (Dia 0, 7 e 60). Para comparação entre os grupos dos pacientes e o grupo Controle, utilizou-se teste-T para amostras independentes. A associação entre as manifestações clínicas e os resultados da imunofenotipagem foi verificada através do teste de Mann-Whitney.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Alterações hematológicas

Os perfis hematológicos dos pacientes portadores de Febre do Dengue nas três fases da doença (Dias 0, 7 e 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle) estão representados na Tabela 3.

Em relação ao número de eritrócitos, a análise dos resultados revelou que os pacientes portadores de Dengue apresentavam contagem de eritrócitos, significativamente menor no Dia 7, quando comparados aos pacientes no Dia 0.

A análise dos resultados revelou, também, que os pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 7 apresentaram um menor teor de hemoglobina no sangue em relação ao Dia 0 e ao grupo Controle.

Os pacientes portadores de Febre do Dengue apresentaram valores de hematócrito mais elevados no Dia 0, quando comparados aos grupos de pacientes nos demais dias de coleta. Os valores de hematócrito no Dia 7 foram, significativamente, menores em relação aos valores obtidos no grupo Controle.

Nenhuma diferença nos valores de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foi encontrada entre os grupos analisados.

A análise dos resultados revelou, ainda, que os pacientes portadores de Febre do Dengue apresentaram uma contagem de plaquetas, significativamente, menor nos diferentes dias de coleta quando comparados aos indivíduos saudáveis. Quando foram comparados os pacientes portadores de Dengue entre si, observou-se no Dia 0 um menor número de plaquetas em relação aos Dias 7 e 60.

Tabela 3. Perfil hematológico de indivíduos portadores de Febre do Dengue em três diferentes fases da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos saudáveis (Controle).

Parâmetro hematológico	Controle	Dia 0	Dia 7	Dia 60
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	4,85±0,4	4,86±0,5	4,57±0,4 ^b	4,71±0,5
Hemoglobina (g/dl)	14,5±1,4	14,4±1,6	13,5±1,29 ^{a,b}	14,1±1,3
Hematócrito (%)	43,7±4	43±4,8	40±3,7 ^{a,b}	41,3±3,6 ^b
VCM (fl)	89,9±5	88,7±6,3	87,7±6,1	87,1±6
HCM (pg)	29,8±1,3	29,7±2,4	29,7±2,4	30,1±2,8
CHCM (g/dl)	33,2±1,2	33,5±0,7	33,8±1	34,2±1,5
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	277,7±58,8	177,6±44,4 ^{a,c,d}	234,5±65,8 ^a	235,1±42,8 ^a

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão dos valores de cada parâmetro. As letras **a**, **b**, **c** e **d** representam as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) em relação aos grupos Controle, Dia 0, Dia 7 e Dia 60, respectivamente.

VCM = volume corpuscular médio

HCM = hemoglobina corpuscular média

CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média

4.2 Análise dos leucócitos circulantes.

Na figura 5 estão representados os valores absolutos dos leucócitos totais, neutrófilos, monócitos e linfócitos circulantes no sangue periférico dos pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes fases da doença (Dia 0, 7 e 60) e de indivíduos saudáveis (grupo Controle).

Indivíduos portadores de Febre do Dengue apresentaram um número de leucócitos totais, significativamente menor no Dia 0, quando comparados aos demais dias de coleta e em relação aos indivíduos saudáveis (Figura 5A). O mesmo resultado foi observado para a contagem de monócitos e linfócitos (Figuras 5B e 5C).

Com relação ao número de neutrófilos, os pacientes portadores de Febre do Dengue nos Dias 0 e 7 apresentaram valores semelhantes entre si e, significativamente, menores em relação ao grupo Controle e ao Dia 60 (Figura 5D).

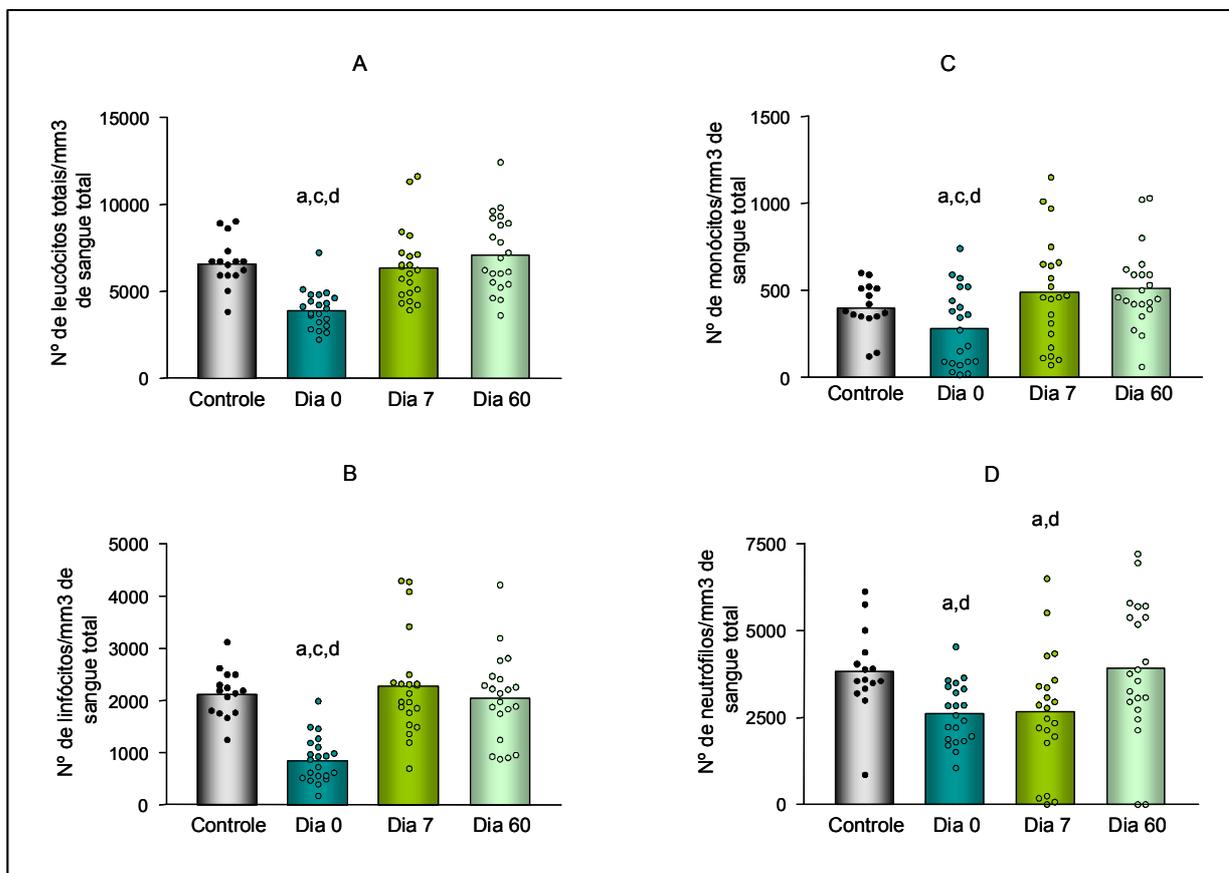


Figura 5. Número absoluto de leucócitos totais (A), linfócitos (B), monócitos (C) e neutrófilos (D) no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes fases da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (Controle). Os resultados estão expressos como valores individuais (pontos) e a média (barra) para cada grupo avaliado. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras **a**, **c** e **d** em relação aos grupos Controle, Dia 7 e Dia 60, respectivamente.

4.3 Análise dos linfócitos T, B e células NK

O número absoluto e o percentual de linfócitos T (CD3⁺), B (CD19⁺) e células NK (CD16⁺CD56^{+/-}) do sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue, em três diferentes fases da doença e de indivíduos, clinicamente saudáveis, estão representados na figura 6.

Apesar da porcentagem de células T dentro da população de linfócitos totais não apresentar diferença entre os grupos analisados (Figura 6B), o número absoluto de linfócitos T no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0 foi, significativamente, menor quando comparados, tanto aos indivíduos clinicamente saudáveis, quanto aos demais dias de coleta (Dia 7 e Dia60) (Figura 6A).

Um padrão semelhante ao apresentado por linfócitos T foi também observado para os linfócitos B, cuja análise dos números absolutos nos pacientes portadores de Febre do Dengue revelou uma concentração, significativamente, menor destas células no Dia 0, quando comparados ao grupo Controle e aos demais dias de coleta (Figura 6C). Por outro lado, a análise da porcentagem de células B, dentro da população de linfócitos totais demonstrou que pacientes portadores de Dengue, no Dia 0, apresentaram redução significativa na porcentagem destas células quando comparados ao Dia 60 (Figura 6D).

Em relação ao número absoluto de células NK, os resultados demonstraram que pacientes portadores de Febre do Dengue apresentaram um número, significativamente, menor destas células no Dia 0, quando comparados aos demais pontos de coleta e ao grupo Controle (Figura 6E). Entretanto, pacientes portadores de Dengue no Dia 0, apresentaram um aumento na porcentagem destas células quando comparados aos indivíduos saudáveis (Figura 6F).

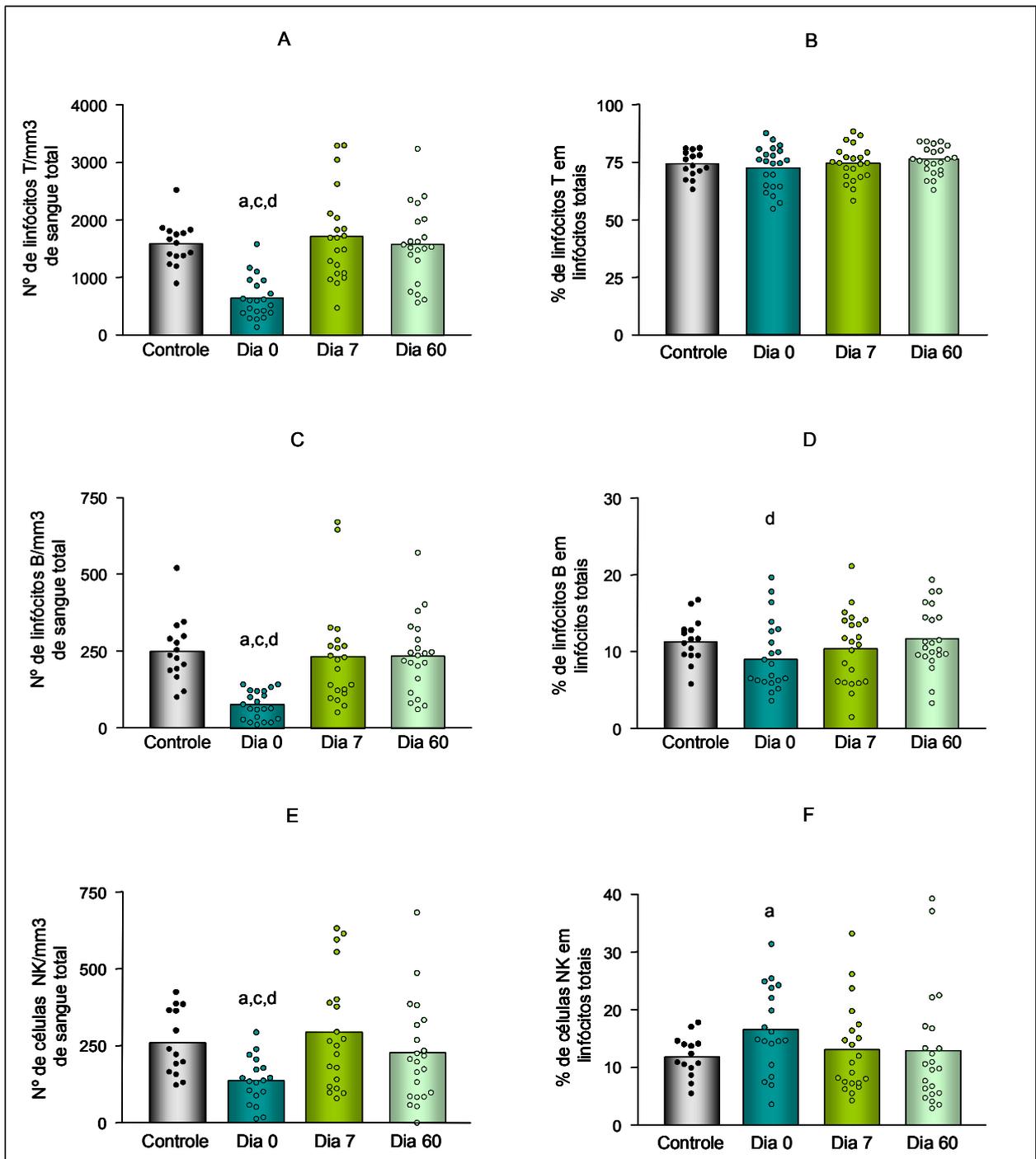


Figura 6. Número absoluto (A, C e E) e porcentagem (B, D e F) de linfócitos T, B e células NK no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes fases da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (Grupo controle). Os resultados estão apresentados como valores individuais (pontos) e a média (barras) para cada grupo avaliado. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas pelas letras **a**, **c** e **d**, em comparação aos grupos Controle, Dia 7 e Dia 60, respectivamente.

4.4 Análise das subpopulações de células NK

O número absoluto de células NK ($CD16^+CD56^+$) e células pré-NK ($CD16^+CD56^-$) e a porcentagem destas células na população de células NK totais no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue, em três diferentes fases da doença (Dias 0, 7 e 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle) são apresentados na Figura 7.

A análise dos dados revelou que o número absoluto de células NK com fenótipo de células maduras ($CD16^+CD56^+$) foi, significativamente, menor nos pacientes portadores de Dengue no Dia 0, quando comparados aos demais dias de coleta e aos indivíduos saudáveis (Figura 7A). O número de células com fenótipo pré-NK foi, significativamente, menor nos pacientes portadores de Dengue no Dia 0 em relação aos Dias 7 e 60. Além disso, no Dia 7, pacientes portadores de Dengue, apresentaram um número destas células, significativamente, maior em relação ao grupo Controle (Figura 7C).

A porcentagem de células NK com o fenótipo de células maduras foi, significativamente, menor entre os pacientes portadores de Febre do Dengue nos Dias 0, 7 e 60 quando comparados a indivíduos saudáveis (Figura 7B). Paralelamente, observou-se um aumento na porcentagem de células com o fenótipo pré-NK nos pacientes portadores de Dengue, em todas as fases da doença, quando comparados ao grupo Controle (Figura 7D).

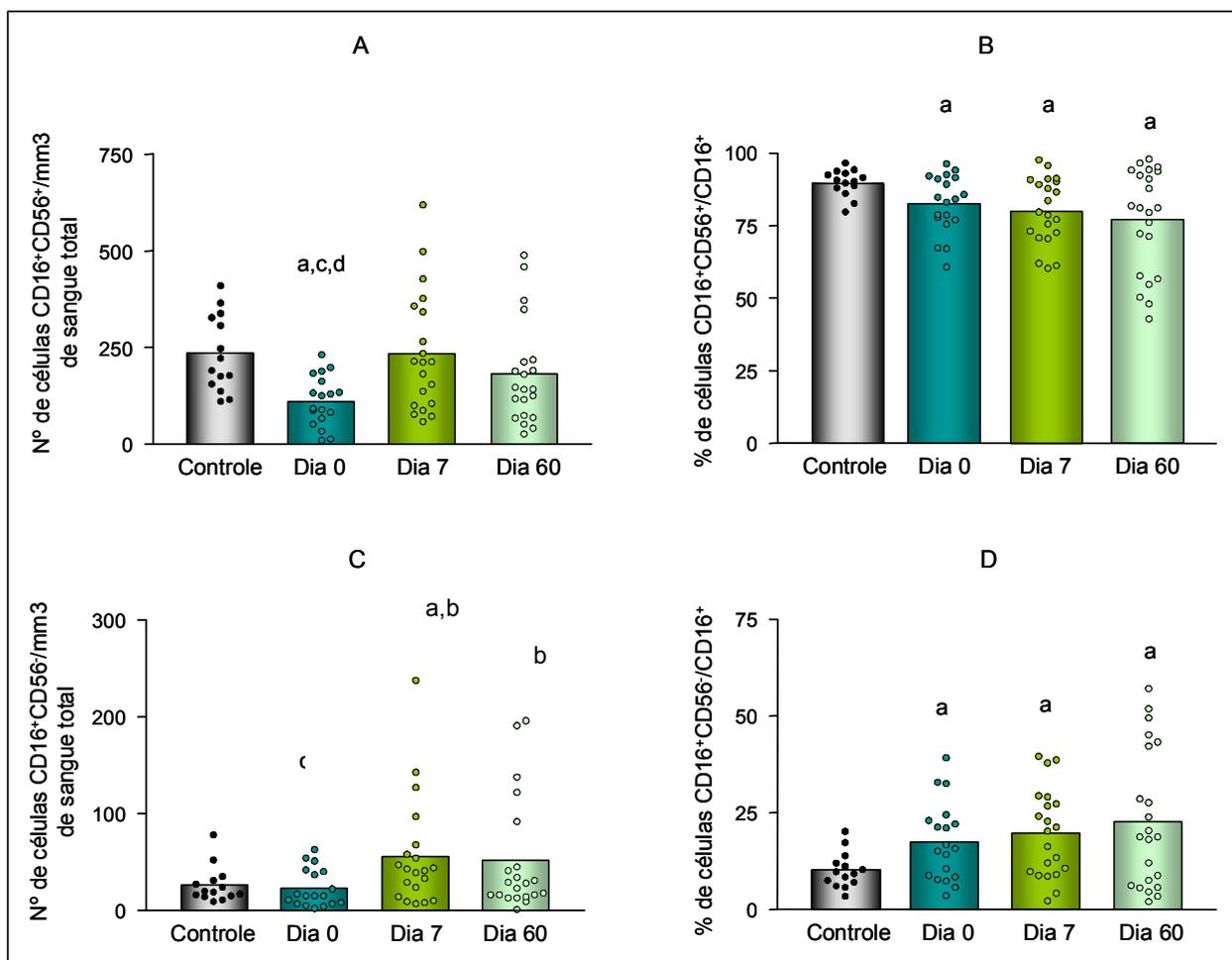


Figura 7. Número absoluto (A e C) e porcentagem (B e D) de células NK maduras e pré-NK na população de células NK circulantes no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes fases da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (Grupo controle). Os resultados estão apresentados como valores individuais (pontos) e a média (barras) para cada grupo avaliado. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas pela letra **a**, **b**, **c** e **d**, em relação aos grupos Controle, Dia 0, Dia 7 e Dia 60, respectivamente.

4.5 Análise de subpopulações de linfócitos T

Na figura 8 estão representados o número absoluto de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e a porcentagem destas células na população de linfócitos totais no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue, em diferentes fases da doença (Dias 0, 7 e 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle).

O número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0 foi, significativamente, menor em relação aos dias 7 e 60 e em relação ao grupo Controle (Figura 8A e 8C). A análise da porcentagem de células T CD4⁺, dentro da população de linfócitos totais, não revelou diferença entre os grupos estudados. (Figura 8B). Por outro lado, a porcentagem de células T CD8⁺ foi menor nos pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0, quando comparados aos dias 7 e 60 (Figura 8D).

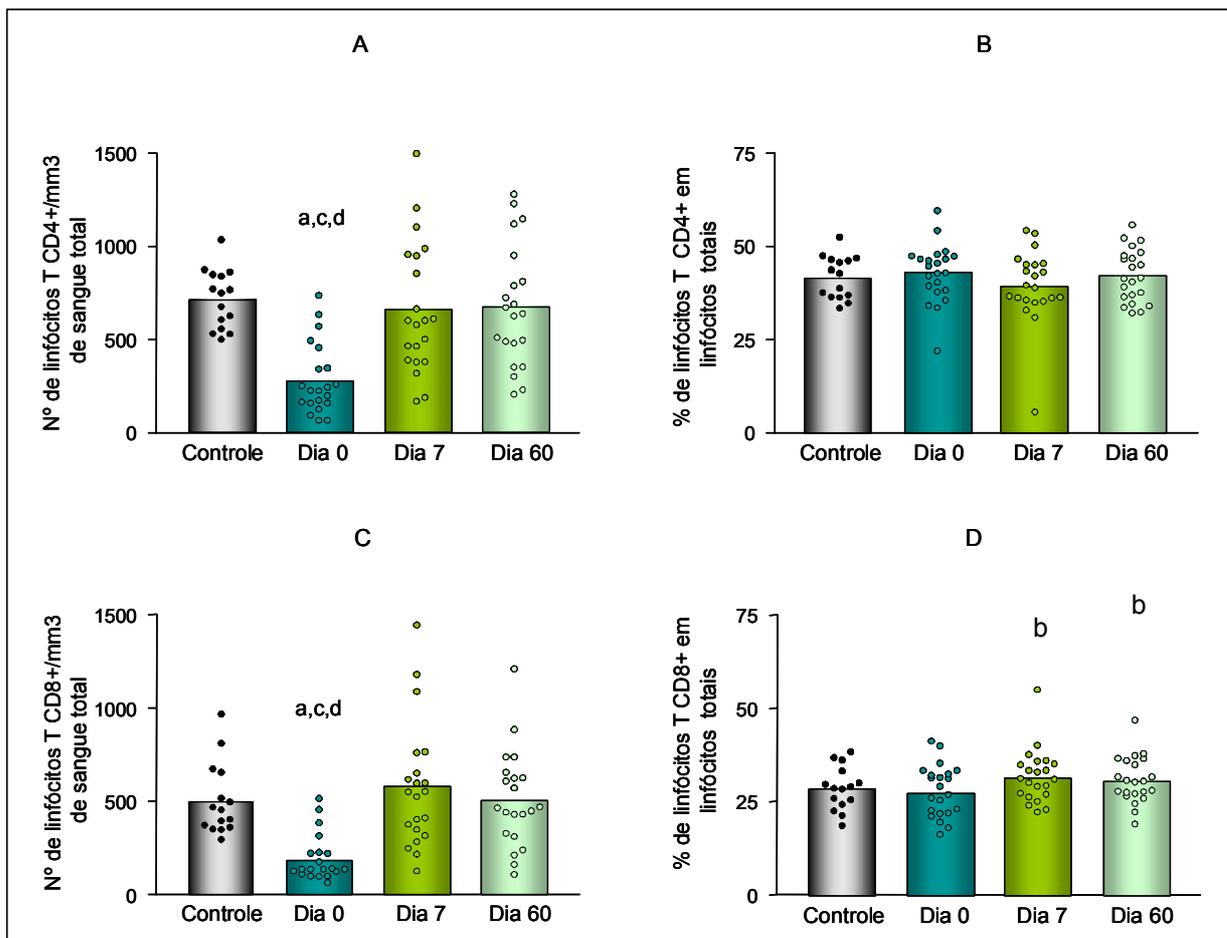


Figura 8. Número absoluto de linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (C) e porcentagem de linfócitos T CD4⁺ (B) e CD8⁺ (D), no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes fases da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle). Os resultados estão expressos como valores individuais (pontos) e a média (barras) para cada grupo avaliado. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d** em relação aos grupos Controle, Dia 0, Dia 7 e Dia 60, respectivamente.

4.6 Análise de linfócitos T ativados

4.6.1 Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando CD69

O número absoluto de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ e T CD8⁺CD69⁺ e o percentual de células T CD4⁺CD69⁺/CD4⁺ e T CD8⁺CD69⁺/CD8⁺ no sangue periférico de indivíduos portadores de Febre do Dengue, nas três diferentes fases doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle) estão representados na figura 9.

Em relação ao número absoluto de linfócitos T CD4⁺CD69⁺, os resultados mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos analisados (Figura 9A). Por outro lado, a porcentagem de células T CD4⁺ co-expressando CD69 foi, significativamente, maior nos pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0 em relação aos controles saudáveis e aos demais dias de coleta. Os pacientes portadores de Dengue apresentaram um percentual da subpopulação CD4⁺CD69⁺, significativamente, menor no Dia 60 em relação aos indivíduos saudáveis (Figura 9B)

A análise do número absoluto de linfócitos T CD8⁺CD69⁺ revelou que pacientes portadores de Dengue apresentaram um maior número destas células no Dia 0, em relação aos Dias 7 e 60 (Figura 9C). Observou-se, também, que pacientes portadores de Febre do Dengue apresentaram uma maior porcentagem de células T CD8⁺ co-expressando CD69 no Dia 0, quando comparados aos demais dias de coleta e ao controle (Figura 9D).

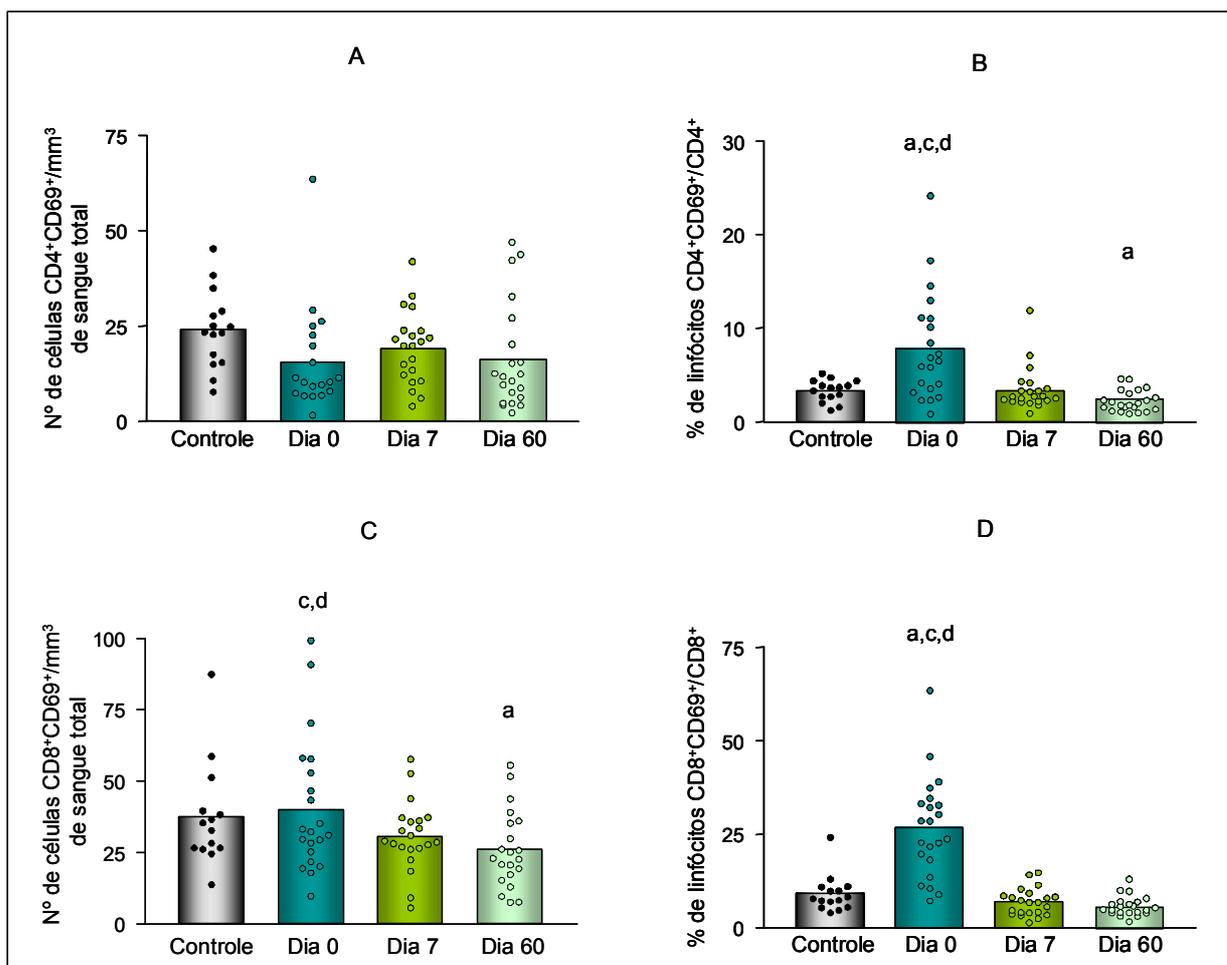


Figura 9. Número absoluto (A e C) e porcentagem (C e D) de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ expressando o marcador de ativação CD69, no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes fases da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos saudáveis (grupo Controle). Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (pontos) e a média (barra) para cada grupo avaliado. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas pelas letras **a**, **c** e **d**, em relação aos grupos Controle, Dia 7 e Dia 60, respectivamente.

4.6.2 Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ expressando HLA-DR

O número absoluto e o percentual de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺/CD4⁺ e TCD8⁺HLA-DR⁺/CD8⁺ no sangue periférico de indivíduos portadores de Febre do Dengue, nas três diferentes fases da doença (Dias 0, 7 e 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle) estão representados na figura 10.

Pacientes portadores de Dengue apresentaram, no Dia 0, um número de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺, significativamente, menor quando comparados ao grupo Controle e aos demais dias de coleta (Figura 10A). Apesar do percentual de células T CD4⁺ expressando o marcador HLA-DR no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0 não diferir do grupo Controle, esse percentual foi, significativamente, maior nesse dia do que nos demais dias de coleta (Figura 10B).

A análise dos resultados revelou que pacientes portadores de Dengue apresentaram um número de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺, significativamente, menor no Dia 0, quando comparados ao grupo Controle e aos diferentes dias de coleta (Figura 10C). A porcentagem de linfócitos T CD8⁺ co-expressando HLA-DR apresentou-se, significativamente, maior nos pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 7, em relação aos indivíduos saudáveis e aos demais dias de coleta (Figura 10D).

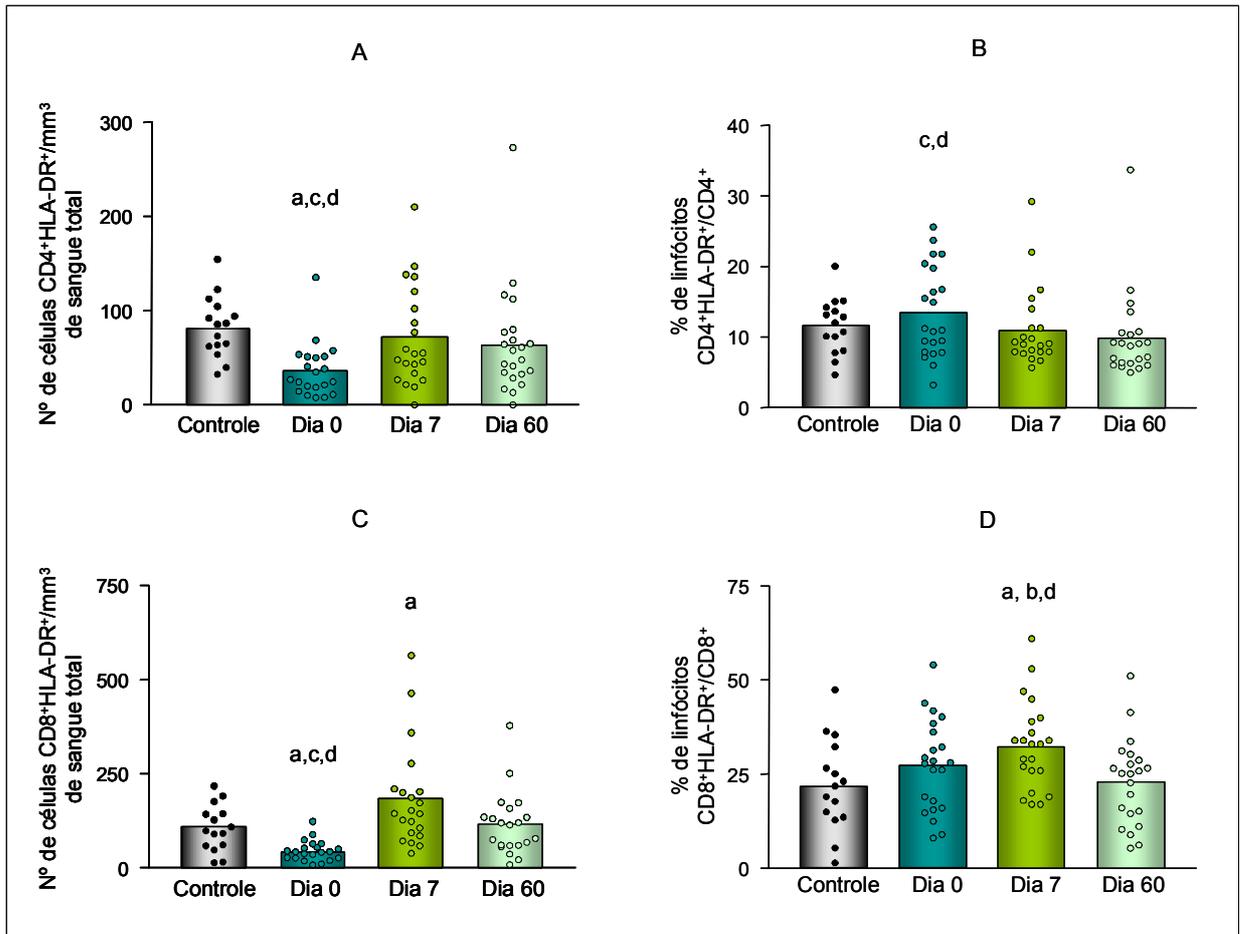


Figura 10. Número absoluto (A e C) e porcentagem (B e D) de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando o marcador HLA-DR, no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes fases da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos saudáveis (Grupo controle). Os gráficos estão apresentados como dispersão dos valores individuais (pontos) e a média (barra) para cada grupo avaliado. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d** em comparação aos grupos Controle, Dia 0, Dia 7 e Dia 60, respectivamente.

4.6.3 Linfócitos T CD4⁺ expressando CD25

As porcentagens de linfócitos T CD4⁺, que co-expressam CD25, no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue, nas três fases da doença (Dias 0, 7 e 60) e de indivíduos saudáveis (grupo Controle) estão representadas na Figura 11.

Com relação ao número absoluto de células CD4⁺CD25⁺ no sangue periférico, a análise dos resultados revelou que pacientes portadores de Dengue no Dia 0 apresentaram um número menor destas células no sangue periférico quando comparados ao grupo Controle e aos demais dias de coleta (Figura 11A).

A análise dos resultados não mostrou diferença na porcentagem de células T CD4⁺, co-expressando CD25, em pacientes portadores de Dengue no Dia 0 em relação aos controles saudáveis. Entretanto, quando foram comparados os pacientes com Dengue entre si, nas diferentes fases da doença, observou-se que a porcentagem de células T CD4⁺ expressando CD25, no Dia 0 foi, significativamente, maior em relação aos Dias 7 e 60 (Figura 11B).

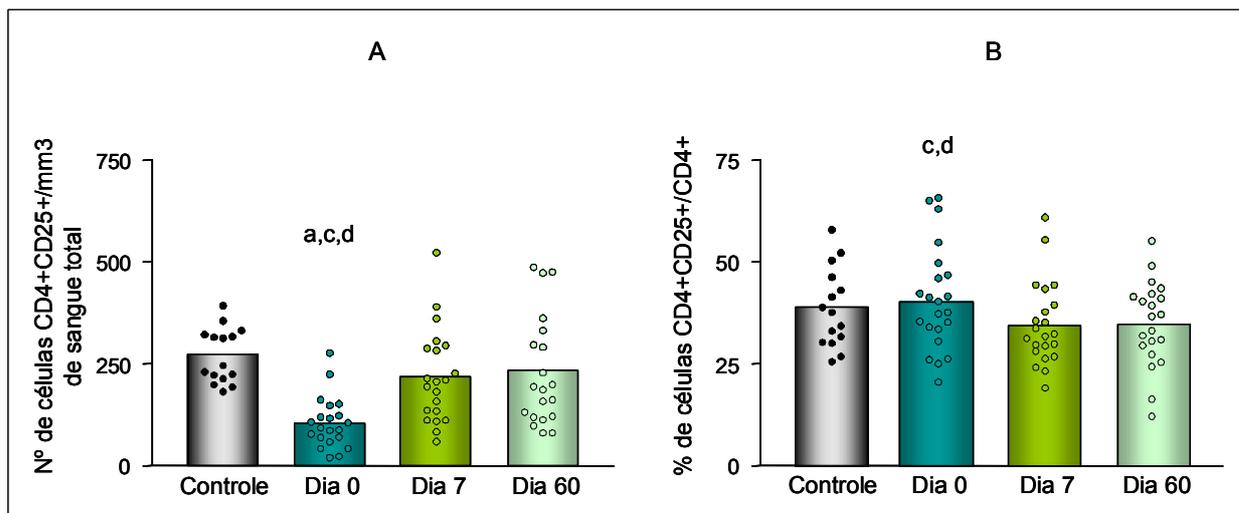


Figura 11. Número absoluto (A) e porcentagem (B) de células T CD4⁺ expressando o marcador CD25 no sangue periférico de indivíduos portadores de Febre do Dengue em três diferentes fases da doença (Dia 0, Dia 7 e Dia 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (Controle). Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (pontos) e a média (barras). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras **a**, **c** e **d**, em comparação aos grupos Controle, Dia 7 e Dia 60, respectivamente.

4.7 Análise de Células T reguladoras (CD4⁺CD25^{HIGH})

As porcentagens de células T CD4⁺CD25^{HIGH} na população de células CD4⁺ e na população de linfócitos totais dos pacientes portadores de Febre do Dengue, nas três fases da doença (Dias 0, 7 e 60) e de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle) estão representadas na Figura 12.

Nenhuma diferença foi encontrada na população de células T CD4⁺CD25^{HIGH}/CD4⁺ e na população de células CD4⁺CD25^{HIGH} na população de linfócitos totais, entre os grupos analisados.

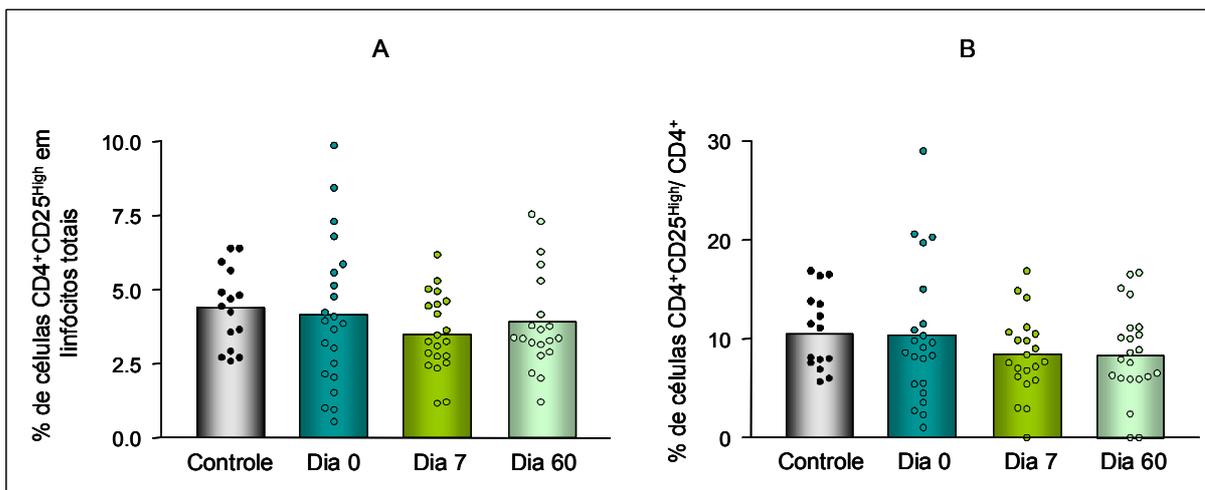


Figura 12. Porcentagem de células CD4⁺CD25^{HIGH} na população de linfócitos totais (A) e na população de células CD4⁺ de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes fases da doença (Dia 0, 7 e 60) e indivíduos clinicamente saudáveis (Controle). Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (pontos) e a média (barras).

4.8 Análise da expressão de HLA-DR em monócitos

A Figura 13 apresenta os resultados da densidade de expressão de HLA-DR em monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue nas três fases da doença (Dias 0, 7 e 60) e indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle). Os dados foram apresentados em intensidade média de fluorescência.

A análise dos resultados não revelou diferença estatística, significativa, entre os grupos analisados.

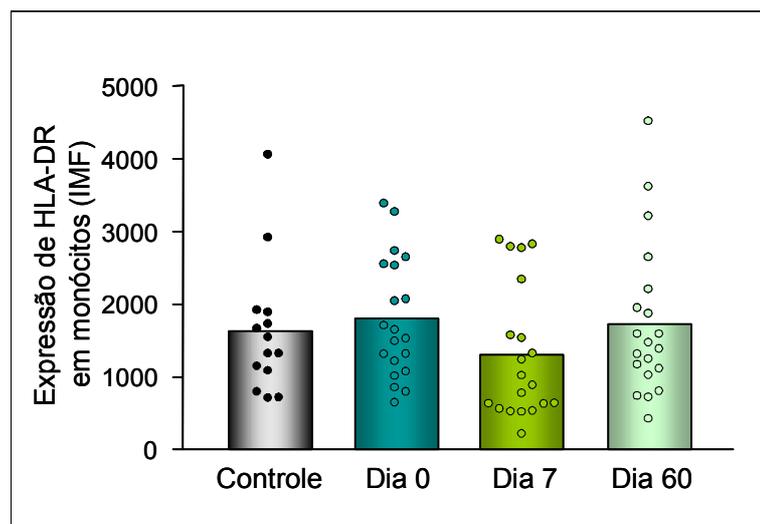


Figura 13. Análise da expressão da molécula HLA-DR em monócitos no sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue em três diferentes fases da doença (Dias 0, 7 e 60) e indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle). Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (pontos) e a média (barras).

4.9 Análise da associação entre parâmetros hematológicos e fenótipo das células mononucleares do sangue periférico com a presença de sinais e sintomas da doença

Na tabela 4 estão representados os valores de parâmetros hematológicos e da contagem diferencial de leucócitos dos pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0, agrupados de acordo com a ausência (Grupo 1) ou presença (Grupo 2) de sinais e sintomas da doença no Dia 7.

A análise dos resultados não revelou diferença entre grupos analisados, quanto aos parâmetros hematológicos e à contagem diferencial de leucócitos.

Tabela 4. Parâmetros hematológicos e contagem diferencial de leucócitos de pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0, agrupados de acordo com a ausência (Grupo 1) ou presença (Grupo 2) de sinais e sintomas da doença, no Dia 7.

Parâmetro hematológico	Grupo 1 (n=5)	Grupo 2 (n=16)	p
Eritrócitos (mil/mm ³)	4,96 ± 0,57	4,78 ± 0,47	0,458
Hemoglobina (g/dl)	14,7 ± 1,2	14,1 ± 1,6	0,458
Hematócrito (%)	44 ± 3	42 ± 4,8	0,662
Plaquetas (mil/mm ³)	156,4 ± 40,4	187,9 ± 43,5	0,206
Leucócitos Totais	3802 ± 1171	4075 ± 1147	0,896
Monócitos	159 ± 204	341 ± 211	0,106
Neutrófilos	2767 ± 1028	2610 ± 853	0,631
Linfócitos	642 ± 224	918 ± 478	0,295

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão.

Na tabela 5 estão representados os valores absolutos e percentuais de linfócitos T e suas subpopulações T CD4⁺ e T CD8⁺, linfócitos B, células NK e suas subpopulações NK madura e pré-NK de pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0, agrupados de acordo com a ausência (Grupo 1) e a presença (Grupo 2) de sinais e sintomas no Dia 7.

Nenhuma diferença estatística foi encontrada, entre os Grupos 1 e 2, quanto ao perfil fenotípico dos linfócitos do sangue periférico.

Tabela 5. Perfil imunofenotípico dos linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0, agrupados de acordo com a ausência (Grupo 1) ou presença (Grupo 2) de sinais e sintomas da doença no Dia 7

Tipo de Célula	Grupo 1 (n=5)	Grupo 2 (n=16)	p
Linfócitos T			
Número absoluto	486 ± 218	668 ± 388	0,359
% em linfócitos totais	74,5 ± 8,7	71,5 ± 9,6	0,741
T CD4⁺			
Número absoluto	198 ± 87	295 ± 202	0,315
% em linfócitos totais	41,2 ± 4,5	42,3 ± 7,7	0,457
T CD8⁺			
Número absoluto	135 ± 50	191 ± 138	0,315
% em linfócitos totais	28,7 ± 5,2	26,9 ± 6,9	0,509
Linfócitos B			
Número absoluto	69 ± 53	80 ± 43	0,631
% em linfócitos totais	10,5 ± 7,4	9,3 ± 3,6	0,804
Célula NK			
Número absoluto	97 ± 37	141 ± 83	0,313
% em linfócitos totais	18,2 ± 6,3	16,3 ± 8	0,678
Célula NK madura (% em NK total)	81,5 ± 12,5	83,2 ± 10,2	0,859
Célula pré-NK (% em NK total)	18,5 ± 12,5	16,8 ± 10,2	0,859

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão dos valores absolutos e percentuais das subpopulações de linfócitos.

Os valores percentuais de linfócitos T totais, T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados e a expressão de HLA-DR por monócitos, em pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0, agrupados de acordo com a ausência (Grupo 1) e presença (Grupo 2) de sinais e sintomas da doença no Dia 7, estão representados na tabela 6.

A análise dos resultados revelou que os pacientes pertencentes ao Grupo 2 apresentavam um menor percentual de linfócitos CD8⁺ expressando o marcador de ativação HLA-DR, em relação aos pacientes do Grupo 1.

Com relação aos demais fenótipos celulares avaliados, não foi encontrada diferença significativa entre os pacientes dos Grupos 1 e 2.

Tabela 6. Subpopulações de linfócitos e monócitos expressando diferentes marcadores de ativação em pacientes portadores de Febre do Dengue no Dia 0, agrupados de acordo com a ausência (Grupo 1) e presença (Grupo 2) de sintomas da doença no Dia 7.

Tipo de Célula	Marcador de ativação	Grupo 1 (n=5)	Grupo 2 (n=16)	p
Linfócito T	CD25 ^{HIGH}	5,5 ± 3,6	3,8 ± 2	0,315
T CD4 ⁺	CD25	45,2 ± 14,8	40,7 ± 11,7	0,563
	CD25 ^{HIGH}	13,9 ± 10,5	9,3 ± 5,6	0,457
	CD69	5 ± 2,8	12,8 ± 17,8	0,248
	HLA-DR	15,5 ± 7,9	12,3 ± 5,6	0,509
T CD8 ⁺	CD69	25 ± 10,7	27,3 ± 14,7	0,804
	HLA-DR	35,4 ± 7	24,3 ± 12,7	0,048
Monócitos	HLA-DR (IMF)	2306 ± 578	1607 ± 758	0,118

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão dos valores percentuais das subpopulações de linfócitos expressando os diferentes marcadores de ativação. A expressão de HLA-DR por monócitos está representada por média ± desvio padrão de intensidade média de fluorescência (IMF).

* p < 0,05 entre os Grupos 1 e 2.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Até o presente, a patogênese do Dengue não é completamente compreendida. O entendimento da interação entre o vírus e a indução da resposta imunológica do hospedeiro é essencial para a compreensão da imunopatologia da doença. Dessa forma, estudos das alterações imunofenotípicas, em diferentes fases da doença são de extrema importância, já que esses fenômenos ainda não estão totalmente esclarecidos.

Embora vários estudos tenham sido realizados no sentido de conhecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da Febre do Dengue, raros são os estudos que avaliaram, de forma longitudinal, a resposta imune de pacientes portadores de FD. Nesse contexto, foi desenvolvido um estudo longitudinal dos aspectos fenotípicos de células mononucleares do sangue periférico de pacientes, adultos, portadores de FD em diferentes fases da doença. Neste estudo foram avaliadas as alterações hematológicas que ocorrem durante o curso da infecção no que se refere à frequência de diferentes células do sistema imune no sangue periférico, bem como a expressão de marcadores de ativação, com o intuito de compreender as interações envolvidas na resposta ao vírus e o seu papel na proteção ou na patogênese da doença.

Este estudo foi iniciado avaliando os parâmetros hematológicos dos pacientes portadores de Febre do Dengue em diferentes fases da doença e comparando-os com indivíduos clinicamente saudáveis. A primeira observação foi que os pacientes portadores de FD, independente do estágio da doença, apresentaram uma redução do número de plaquetas em relação ao grupo Controle, sendo essa plaquetopenia mais pronunciada na fase aguda da doença. Entretanto, os valores observados ainda se encontravam dentro dos limites de referência descritos na literatura.

A ocorrência de plaquetopenia na Febre do Dengue é um marcador clássico da doença, já descrita por outros autores (LIU et al, 1989, DIETZ et al, 1996; SINNIAN e IGARASHI, 1995). Dentre as possíveis causas sugeridas para essa plaquetopenia

destacam-se a presença de anticorpos IgM anti-plaquetas, hipoplasia da medula óssea e/ou destruição de plaquetas no baço e no fígado (HATHIRAT et al, 1993).

Outra importante observação foi a redução do número de leucócitos nos pacientes portadores de FD na fase aguda da doença. Após a análise diferencial dos leucócitos, constatou-se que essa leucopenia era consequência da diminuição do número de monócitos, neutrófilos e linfócitos. Os dados demonstraram que essa redução era mais pronunciada no Dia 0 da infecção, retornando a valores comparáveis aos observados para o controle, a partir do Dia 7.

Quando as subpopulações de linfócitos B e T foram analisadas e comparadas com os dados obtidos para indivíduos saudáveis, observou-se que a diminuição de linfócitos totais foi devida à redução do número de linfócitos B e T. Neste estudo, confirmou-se que a redução no número de células T circulantes, é consequência da diminuição significativa de células T CD4⁺ e CD8⁺, corroborando dados de outros autores (GREEN et al, 1999; AZEREDO et al, 2001; AZEREDO et al, 2006b).

Acredita-se que no Dengue, a diminuição dessas células no sangue periférico, seja devida à migração de células T antígeno-específicas bem como outras células ativadas, para tecidos como linfonodos, fígado e baço com o objetivo de eliminar células infectadas pelo vírus e que, posteriormente, sofram apoptose nesses sítios distantes. Recentemente, Azeredo e colaboradores (2006b) demonstraram que linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de pacientes com FD expressam altos níveis de moléculas de adesão tais como VLA-4 (CD49dCD29), ICAM-1 (CD54) e LFA-1 (CD11a). Alterações na expressão destas moléculas em leucócitos podem resultar na migração dessas células e, assim, afetar o seu número no sangue periférico e nos tecidos (CHOI et al, 2004). Portanto, Azeredo e colaboradores (2006b) sugeriram que os linfócitos ativados observados em pacientes com Dengue, seriam recrutados para os sítios de infecção para exercer suas funções efetoras nesses locais. O discreto aumento nos níveis das enzimas, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, freqüentemente associado com a fase aguda do Dengue, pode refletir a infecção viral no fígado e a ação de células efetoras (KALAYANAROOJ et al, 1997; GREEN et al, 1999). Por outro lado, outros autores sugerem que a leucopenia observada na FD está relacionada a uma supressão da

atividade da medula óssea pelo vírus (DIETZ et al, 1996, KALAYNAROOJ et al, 1997; LA RUSSA e INNIS, 1995).

Tendo em vista a importância das células T CD4⁺ e T CD8⁺ na patogênese da infecção pelo vírus dengue, seja na produção de citocinas ou na supressão da replicação viral através da destruição das células infectadas, acredita-se que o estado de ativação seja mais importante que o número absoluto dessas populações celulares. Visando melhor compreender o estado de ativação das células mononucleares durante a FD, analisou-se a expressão dos marcadores de ativação CD69, CD25 e HLA-DR nas subpopulações de linfócitos T e a expressão de HLA-DR em monócitos dos pacientes nas diferentes fases da doença e comparou-se aos valores encontrados para indivíduos saudáveis.

O CD69 é um marcador de ativação precoce e é expresso em diversas células hematopoiéticas ativadas, incluindo linfócitos T, células NK e monócitos (TESTI, PHILLIPS E LANIER; 1989; LANIER et al, 1988; DE MARIA et al, 1994). A expressão de CD69 em linfócitos ativados *in vitro* está relacionada com a habilidade de induzir respostas proliferativas em células T (PRINCE e LAPE-NIXON, 1997). Os resultados demonstraram que pacientes portadores de FD apresentam um aumento na frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ co-expressando o marcador de ativação CD69. Um aumento significativo neste marcador foi encontrado nos pacientes na fase aguda da doença sendo mais pronunciado nas células T CD8⁺. Estes dados corroboram resultados encontrados por Green e colaboradores (1999), que demonstraram um aumento da expressão de CD69 em células TCD8⁺, em crianças, na fase aguda da FD e FHD. Entretanto, estes autores demonstraram que o aumento de células CD8⁺, expressando o marcador CD69, foi mais pronunciado em pacientes portadores de FHD, sugerindo que o nível de ativação celular durante as fases iniciais da doença pode estar relacionado à progressão para a forma grave da doença.

Analisou-se também a expressão do marcador de ativação HLA-DR em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. As moléculas de HLA-DR aparecem na superfície de linfócitos T após estímulo com antígeno, embora o pico máximo de expressão ocorra após alguns dias (MÜLLER-SUUR et al, 1997). A porcentagem de células T CD8⁺

expressando HLA-DR foi, significativamente, maior em pacientes portadores de FD na fase de convalescença da doença. Esses dados confirmam os resultados de Azeredo e colaboradores (2006b), que encontraram a predominância do fenótipo de células T CD8⁺ ativadas pela expressão do HLA-DP, DQ e DR em pacientes com Dengue durante as fases mais avançadas da doença (6-10 dias). Estes autores também demonstraram um aumento na frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando a proteína intracelular Tia-1 indicando a possível existência de uma atividade citotóxica *ex vivo* nesses pacientes.

Outro marcador de ativação avaliado neste estudo foi a expressão de CD25, a cadeia α do receptor da IL-2. Testi e colaboradores (1989) demonstraram que o aumento na expressão de CD25 em células T ocorre pouco tempo após o antígeno precoce CD69. Nesta pesquisa foi observado um discreto aumento na população de células CD4⁺CD25⁺, nos pacientes com FD na fase aguda da doença. Green e colaboradores (1999) não encontraram diferença significativa na porcentagem de células T CD4⁺ expressando o marcador CD25 entre crianças com FD e crianças saudáveis, embora em crianças com FD essa porcentagem foi, ligeiramente, maior.

Ampliando o estudo relacionado com ativação celular, avaliou-se a expressão de HLA-DR por monócitos. Os resultados não revelaram diferença, estatisticamente significativa, quanto à densidade de expressão de HLA-DR por monócitos entre os grupos analisados. Diferente dos nossos resultados, Neves-Souza et al (2005), utilizando outra abordagem, demonstraram a ativação dessas células através da expressão de iNOS em pacientes portadores de FD na fase aguda da doença e sugeriram seu papel na eliminação do vírus.

Em conjunto, os dados apresentados acima revelam que, embora haja uma diminuição do número de linfócitos T na fase aguda da FD, estas células se encontram altamente ativadas. Correlacionando estes dados com aqueles descritos por outros autores, pode-se sugerir que estas células estariam migrando para os sítios de infecção participando, assim, da eliminação dos vírus.

Outra população celular avaliada neste estudo, que poderia participar da eliminação do vírus Dengue, foi a população de células NK. É importante considerarmos no

âmbito da imunidade inata, o papel das células NK que são consideradas células citotóxicas não restritas ao MHC (JANEWAY et al, 2002). Estas células são importante fonte de IFN- γ durante eventos iniciais de processos infecciosos e favorecem a diferenciação de células T CD4⁺ para um perfil tipo 1 (KEMP et al, 1996). Foram analisadas subpopulações de NK, madura e pré-NK, e encontrou-se um número reduzido de células NK total e suas subpopulações no sangue periférico de pacientes na fase aguda da doença. Apesar da diminuição do número absoluto destas células, os pacientes na fase aguda, apresentaram uma maior porcentagem de células NK na população de linfócitos totais em relação aos controles saudáveis. Esses dados corroboram resultados encontrados anteriormente por Azeredo e colaboradores (2006a), que demonstraram um aumento da porcentagem de células NK (CD56⁺CD3⁻), bem como células T CD56⁺, nos primeiros dias de infecção. Estes autores sugerem que estas células apresentam importante papel nas primeiras fases da infecção pelo vírus Dengue, provavelmente pela produção de citocinas, como o IFN- γ , detectado em pacientes com Dengue. Essas citocinas amplificariam a resposta adaptativa e, conseqüentemente, auxiliariam na resolução da infecção.

Se, por um lado, acredita-se que a resposta imune do hospedeiro seria eficiente para a eliminação do vírus Dengue, por outro lado, alguns autores defendem a hipótese que a resposta imune exacerbada tem importante papel na patogênese e, portanto, contribuiriam para o desenvolvimento das formas mais graves da doença (GREEN et al, 1999; KURANE et al, 1991; LIU et al, 2002). Nesse sentido, paralelamente à análise fenotípica das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com Febre do Dengue, realizou-se uma análise comparativa entre pacientes que ainda apresentavam sinais e sintomas da doença na fase de convalescença com aqueles que não apresentavam nenhum sinal ou sintoma nessa fase, visando verificar a associação entre as alterações encontradas no perfil fenotípico das células do sangue periférico e as manifestações clínicas observadas nesses pacientes.

A análise dos dados não revelou diferença estatística entre esses dois grupos, para a maioria dos parâmetros hematológicos e imunofenotípicos analisados. Entretanto, observou-se uma maior porcentagem de células T CD8⁺ expressando a molécula HLA-DR em pacientes no grupo com doença branda. De forma contraditória, houve

uma tendência de maior porcentagem de células CD4⁺CD69⁺ no grupo de pacientes com doença mais grave.

No intuito de esclarecer o papel da resposta imune ao vírus Dengue, alguns estudos buscaram correlacionar as alterações imunofenotípicas e as manifestações clínicas ao período de viremia. Recentemente, Neves-Souza e colaboradores (2005), utilizando citometria de fluxo, detectaram antígenos do vírus Dengue em monócitos de pacientes com FD somente nas fases iniciais da doença. De forma semelhante, Green e colaboradores (1999) relataram que a viremia no Dengue ocorria durante o período febril, coincidindo com uma maior frequência de células T CD8⁺ e NK ativadas. Embora neste estudo não tenha sido avaliada a viremia, os dados corroboram a hipótese que a resposta imune do hospedeiro ao vírus Dengue é importante para a eliminação do vírus, uma vez que, as alterações hematológicas e imunofenotípicas observadas na fase aguda da doença, desapareceram na fase de convalescença que, de acordo com dados da literatura, coincidem com o término da viremia e o desaparecimento dos sinais e sintomas da doença.

Dessa forma, os resultados mostram que a infecção pelo vírus Dengue é capaz de induzir uma resposta linfocitária eficiente na eliminação viral e na recuperação da infecção. Por outro lado, essa ativação de linfócitos na ausência de mecanismos imunorreguladores poderia ser responsável pelo desenvolvimento de respostas imunopatológicas durante a infecção. Entretanto, estudos adicionais ainda são necessários para a compreensão dos mecanismos imunopatológicos da infecção pelo vírus Dengue, o que permitirá o estabelecimento de um modelo *in vitro* que reproduza aspectos da imunopatologia da infecção *in vivo*, modelo esse que é essencial para o desenvolvimento de intervenções preventivas e terapêuticas contra o vírus Dengue e que, no futuro, poderão ser aplicadas na clínica.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

1. Em relação aos parâmetros hematológicos, os resultados mostraram que os pacientes portadores de Febre do Dengue apresentaram número reduzido de plaquetas em todas as fases da doença em relação aos indivíduos clinicamente saudáveis, com uma diminuição mais acentuada no Dia 0.
2. Os pacientes portadores de Febre do Dengue apresentaram menor número de leucócitos totais circulantes, no Dia 0, devido à diminuição do número de neutrófilos, monócitos e linfócitos totais.
3. Os pacientes portadores de Febre do Dengue apresentaram menor número de linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, no Dia 0.
4. A análise de células NK mostrou que os pacientes, no Dia 0, apresentaram um menor número destas células, entretanto, uma maior porcentagem de células NK na população de linfócitos totais.
5. Com relação ao estado de ativação das células, os dados revelaram que, no Dia 0, os pacientes portadores de Febre do Dengue apresentaram maior porcentagem de T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando o marcador CD69, sendo esse aumento mais pronunciado em linfócitos T CD8⁺. Além disso, foi demonstrada uma maior porcentagem de linfócitos T CD4⁺, co-expressando o marcador HLA-DR, no Dia 0 e maior porcentagem de linfócitos T CD8⁺, expressando o mesmo marcador no Dia 7.
6. Os pacientes no Dia 0 apresentaram uma maior porcentagem de células T CD4⁺ co-expressando o marcador CD25 em relação às demais fases da doença.
7. Nenhuma diferença foi encontrada nas freqüências de células T reguladoras entre os pacientes portadores de Febre do Dengue em diferentes fases e indivíduos clinicamente saudáveis.

8. Não houve diferença significativa quando compararam-se os resultados da densidade de expressão de HLA-DR em monócitos do sangue periférico entre pacientes portadores de Febre do Dengue nas diferentes fases e os indivíduos clinicamente saudáveis.

9. A análise de associação entre parâmetros hematológicos e o fenótipo das células mononucleares do sangue periférico com a presença de sinais e sintomas da doença revelou que pacientes do Grupo 2 apresentaram um menor percentual de linfócitos CD8⁺ expressando o marcador de ativação HLA-DR, em relação aos pacientes do Grupo 1. Em relação aos demais parâmetros avaliados, não foi encontrada diferença entre os dois grupos avaliados.

Referências

7. REFERÊNCIAS

Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol.* 1995 ;69(2):695-700.

Avirutnan, P., P. Malasit, B. Seliger, S. Bhakdi, and M. Husmann. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J. Immunol.* 1998; 161:6338.

Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, Nogueira RM, Miagostovich MP, Kubelka CF. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology.* 2001; 204(4):494-507.

Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol.* 2006a;143(2):345-56.

Azeredo EL, Zagne SM, Alvarenga AR, Nogueira RM, Kubelka CF, de Oliveira-Pinto LM. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006b;101(4):437-49.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001;167(3):1245-53.

Bukowski JF, Kurane I, Lai CJ, Bray M, Falgout B, Ennis FA. Dengue virus-specific cross-reactive CD8+ human cytotoxic T lymphocytes. *J Virol.* 1989 Dec;63(12):5086-91.

Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38(1):172-80.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990; 44:649-88.

Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:683-709.

de Andino RM, Botet MV, Gubler DJ, Garcia C, Laboy E, Espada F, Waterman SH. The absence of dengue virus in the skin lesions of dengue fever. *Int J Dermatol.* 1985; 24(1):48-51.

De Maria R, Cifone MG, Trotta R, Rippo MR, Festuccia C, Santoni A, Testi R. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *J Exp Med.* 1994; 180(5):1999-2004.

Despres, P., M. P. Frenkiel, P. E. Ceccaldi, C. Duarte Dos Santos, and V. Deubel.. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent Dengue viruses. *J. Virol.* 1998; 72:823

Dietz V, Gubler DJ, Ortiz S, Kuno G, Casta-Velez A, Sather GE, Gomez I, Vergne E. The 1986 dengue and dengue hemorrhagic fever epidemic in Puerto Rico: epidemiologic and clinical observations. *P R Health Sci J.* 1996;15(3):201-10.

Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai CJ. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J Virol*. 1990; 64(9):4356-63.

Gentry MK, Henchal EA, McCown JM, Brandt WE, Dalrymple JM. Identification of distinct antigenic determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg*. 1982; 31(3 Pt 1):548-55.

Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *BMJ*. 2002; 324(7353):1563-6.

Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Nisalak A, Kurane I, Rothman AL, Ennis FA. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 1999; 180(5):1429-35.

Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis*. 2006; 19(5):429-36.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(3):480-96.

Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez R, Rosario D, Vazquez S, Valdes L, Cabrera MV, Kouri G. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis*. 1999; 3(3):130-5.

Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med*. 1977a; 146(1):201-17.

Halstead SB, O'Rourke EJ, Allison AC. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. *J Exp Med.* 1977b; 146(1):218-29.

Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* 1988; 239(4839):476-81.

Hathirat P, Isarangkura P, Srichaikul T, Suvatte V, Mitrakul C. Abnormal hemostasis in dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1993;24 (1):80-5.

Ho LJ, Wang JJ, Shaio MF, Kao CL, Chang DM, Han SW, Lai JH. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol.* 2001; 166(3):1499-506.

Hober D, Shen L, Benyoucef S, De Groote D, Deubel V, Wattré P. Enhanced TNF alpha production by monocytic-like cells exposed to dengue virus antigens. *Immunol Lett.* 1996; 53(2-3):115-20.

Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 63(1-2):71-5.

Kabra SK, Jain Y, Pandey RM, Madhulika, Singhal T, Tripathi P, Broor S, Seth P, Seth V. Dengue haemorrhagic fever in children in the 1996 Delhi epidemic. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999; 93(3):294-8.

Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, Viramitrachai W, Ratanachu-ek S, Kiatpolpoj S, Innis BL, King CA, Marshall JS, Alshurafa H, Anderson R. Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced

dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. *J Virol.* 2000; 74(15):7146-50.

Kemp M, Theander TG, Kharazmi A. The contrasting roles of CD4+ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. *Immunol Today.* 1996; 17(1):13-6.

Kurane I, Hebblewaite D, Ennis FA. Characterization with monoclonal antibodies of human lymphocytes active in natural killing and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of dengue virus-infected cells. *Immunology.* 1986; 58(3):429-36.

Kurane I, Meager A, Ennis FA. Dengue virus-specific human T cell clones. Serotype crossreactive proliferation, interferon gamma production, and cytotoxic activity. *J Exp Med.* 1989; 170(3):763-75.

Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, Ennis FA. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Invest.* 1991; 88(5):1473-80.

Kurane I, Ennis FE. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol.* 1992; 4(2):121-7.

Kurane I, Ennis FA. Cytotoxic T lymphocytes in dengue virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994; 189:93-108.

Janeway CA, Travers P, Walport M, ShlomChik M. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença.* 5 ed Porto Alegre: Artmed, 2002. 767p.

Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis.* 2004; 189(8):1411-8.

La Russa VF, Innis BL. Mechanisms of dengue virus-induced bone marrow suppression. *Baillieres Clin Haematol.* 1995 Mar;8(1):249-70.

Lanier LL, Buck DW, Rhodes L, Ding A, Evans E, Barney C, Phillips JH. Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J Exp Med.* 1988; 167(5):1572-85.

Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 1999; 73(6):4738-47.

Libraty DH, Endy TP, Houg HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Chansiriwongs W, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis.* 2002 May 1;185(9):1213-21.

Lin YW, Wang KJ, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Liu CC, Chen SH. Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J Virol.* 2002; 76(23):12242-9.

Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol.* 2006; 19(2):127-32.

Liu HW, Ho TL, Hwang CS, Liao YH. Clinical observations of virologically confirmed dengue fever in the 1987 outbreak in southern Taiwan. *The Kaohsiung journal of medical medical sciences.* 1989; 5(1):42-9.

Liu CC, Huang KJ, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Lei HY. Transient CD4/CD8 ratio inversion and aberrant immune activation during dengue virus infection. *J Med Virol.* 2002; 68(2):241-52.

Loke H, Bethell DB, Phuong CX, Dung M, Schneider J, White NJ, Day NP, Farrar J, Hill AV. Strong HLA class I--restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis.* 2001; 184(11):1369-73.

Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgrad Med J.* 2004; 80(948):588-601.

Marianneau, P., A. Cardona, L. Edelman, V. Deubel, and P. Despres. Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kB which in turn induces apoptotic cell death. *J. Virol.* 1997; 71:3244.

Mathew A, Kurane I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Ennis FA, Rothman AL. Impaired T cell proliferation in acute dengue infection. *J Immunol.* 1999; 162(9):5609-15.

Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* 3 ed. Philadelphia: Lippincott & Raven, 1996; 961-1034.

Muller-Suur C, Larsson K, Malmberg P, Larsson PH. Increased number of activated lymphocytes in human lung following swine dust inhalation. *Eur Respir J.* 1997; 10(2):376-80.

Nakao S, Lai CJ, Young NS. Dengue virus, a flavivirus, propagates in human bone marrow progenitors and hematopoietic cell lines. *Blood.* 1989; 74(4):1235-40.

Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infect Dis.* 2005; 18: 5:64.

Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr G. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect.* 1993; 111(1):163-70.

Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96(7):925-6.

Osanaí CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil L. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1983; 25(1):53-4.

Prince HE, Lape-Nixon M. CD69 expression reliably predicts the anti-CD3-induced proliferative response of lymphocytes from human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997; 4(2):217-22.

Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology.* 1999; 257(1):1-6.

Rothman AL. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Virus Res.* 2003;60:397-419.

Scott RM, Nisalak A, Cheamudon U, Seridhoranakul S, Nimmannitya S. Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 1980; 141(1):1-6.

Sinniah, M & Igarashi, A. Dengue Haemorrhagic Fever. *Ver Med Virology*. 1995. 5: 1936-203.

Stephenson JR. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull World Health Organ*. 2005 Apr;83(4):308-14. Epub 2005; 25.

SVS-MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Tópicos de Saúde – Dengue. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=24845

Teixeira Mda G, Costa Mda C, Barreto ML, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad Saude Publica*. 2005; 21(5):1307-15.

Testi R, Phillips JH, Lanier LL. T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol*. 1989; 143(4):1123-8.

Thavara U, Tawatsin A, Chansang C, Kong-ngamsuk W, Paosriwong S, Boon-Long J, Rongsriyam Y, Komalamisra N. Larval occurrence, oviposition behavior and biting activity of potential mosquito vectors of dengue on Samui Island, Thailand. *J Vector Ecol*. 2001; 26(2):172-80.

Vezzani D, Schweigmann N. Suitability of containers from different sources as breeding sites of *Aedes aegypti* (L.) in a cemetery of Buenos Aires City, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(6):789-92.

World Health Organization. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1997

World Health Organisation. Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever: comprehensive guidelines. WHO Regional publication, SEARO, No 29, 1999.

World Health Organization. Communicable Disease Surveillance and Response (CSR) Disease Outbreaks Reported 8 May Dengue and Dengue Hemorrhagic fever in Brazil. 2002

Zagne SM, Alves VG, Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Tavares W. Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994; 88(6):677-9.

Anexo

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO

Instituição: Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo

Título: Avaliação do Perfil de Citocinas em pacientes com infecção primária pelo vírus do Dengue em Vitória, ES, Brasil.

Responsáveis: Rodrigo Ribeiro Rodrigues, Reynaldo Dietze

Nome do Paciente (Adulto):

1. Eu, _____ estou sendo convidado a participar como voluntário em um estudo realizado pelo Núcleo de Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde. Os coordenadores deste estudo são: Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues, Dr. Reynaldo Dietze, Fernando Neto Tavares e Rodrigo Heringer.
2. Este formulário de consentimento lhe dará as informações sobre o problema de saúde que está sendo estudado, quais os procedimentos, exames, benefícios e os riscos potenciais ao participar deste estudo. Você poderá decidir não participar, ou você poderá se retirar do estudo a qualquer momento sem que isso lhe traga qualquer prejuízo ao seu tratamento. Da mesma forma, você poderá ser retirado (a) do estudo a qualquer momento por questões técnicas ou médicas. Neste caso você será notificado (a) da decisão e continuará recebendo o tratamento para sua doença.
3. As informações resultantes deste estudo serão publicadas, mas sua identidade será mantida confidencial em todos os momentos, assim como nas futuras publicações que possam resultar desse estudo. Representantes das entidades participantes deste estudo poderão inspecionar os prontuários deste estudo. Você não terá despesas com os exames e procedimentos realizados neste estudo.
4. Antes de assinar este formulário você poderá fazer todas as perguntas que julgar necessárias para esclarecer dúvidas sobre qualquer aspecto deste estudo.

5. Objetivo do estudo: examinar o seu corpo, especialmente algumas células do seu sangue que são capazes de combater o vírus do Dengue. A sua participação neste estudo proporcionará informações essenciais sobre como prevenir complicações causadas pela doença. Os resultados deste estudo poderão auxiliar o desenvolvimento de uma vacina eficaz na prevenção do dengue.
6. Benefícios: Como parte dos benefícios por participar deste estudo, você receberá um acompanhamento mais próximo e um tratamento normalmente não dado às pessoas que não estão participando deste estudo. Caso surjam complicações desenvolvidas decorrentes da sua doença, poderemos detectá-las mais cedo e possivelmente evitar suas complicações.
7. Riscos potenciais: Entendo que a doação da amostra do meu sangue para a realização dos testes da doença poderá causar discreta dor e um possível edema no local da punção. Este procedimento será realizado por médicos ou por técnicos experientes do Núcleo de Doenças Infecciosas, que está conduzindo este estudo.
8. Para informações adicionais sobre este estudo, você poderá entrar em contato com o Dr. Reynaldo Dietze ou Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues no Núcleo de Doenças Infecciosas pelo telefone (27) 3335-7210 ou 3335-7207. Para obter informações sobre seus direitos na participação deste estudo, você poderá entrar em contato com O Dr. Paulo Roberto Merçon de Vargas, Presidente da Comissão de Ética do Centro de Ciências da Saúde, pelo telefone (27) 3335-7210.]

Declaro que estou ciente e de acordo com todas as informações contidas neste Termo de Consentimento Pós Informação. Decidi participar deste estudo após ter feito e obtido respostas satisfatórias a todas as minhas perguntas. Estou também ciente que poderei fazer quantas perguntas desejar a qualquer momento e que receberei uma cópia deste Termo de Consentimento Pós-Informação.

Eu, _____, CI _____, com _____ anos de idade e em pleno gozo de minhas faculdades físicas e mentais, concordo em participar como voluntário do estudo "*Avaliação das respostas das células T de defesa e produção de citocinas em pacientes com infecção aguda por Dengue*", com a direção do Núcleo de Doenças Infecciosas – Universidade Federal do Espírito Santo.

FORMULÁRIO DE TRIAGEM

Data: _____ Número do voluntário: _____
Número do soro: _____
Nome do voluntário: _____
Apelido: _____
Idade: _____ Sexo: _____
Endereço: _____

Referência: _____
Telefone: _____

- Por quantos dias você ficou com febre?
- Por quantos dias você faltou ao trabalho (ou escola)?

VISITAS		
DIA 0	DIA 7	DIA 60

- Por quantos dias você ficou acamado?

VISITAS		
DIA 0	DIA 7	DIA 60

- Você tomou alguma medicação?

VISITAS		
DIA 0	DIA 7	DIA 60

Se sim, POR QUE?

- Você procurou cuidados médicos?

VISITAS		
DIA 0	DIA 7	DIA 60

Se sim, POR QUE?

- Você recebeu alguma vacina nos últimos 30 dias ou pretende vacinar nos próximos 2 meses?

HISTÓRIA CLÍNICA E EXAME FÍSICO

Data: _____ Número do voluntário: _____
 Nome: _____
 Idade: _____ Sexo: _____

SINTOMAS	VISITAS		
	DIA 0	DIA 7	DIA 60
Cefaléia			
Náuseas			
Vômitos			
Diarréia			
Dor abdominal			
Sangramento anormal			
Artralgia			
Rash cutâneo			
Mialgia			

* 0 = sem sangramento, 1 = gengivas, 2 = nariz, 3 = hematêmese, 4 = melena, 5 = outros (nota)
 6 = incerto (nota)

Comentários:

AVALIAÇÃO MÉDICA

	VISITAS		
	DIA 0	DIA 7	DIA 60
Temperatura			
Sangramento (0 a 6)*			
Estado mental **			
Petéquias espontâneas (Y/N/U)			
Equimoses espontâneas			
Edema após venopunção (Y/N/U)			
Teste do tourniquete			
Ascites			
Erupções maculopapulares			
Erupções confluentes			
Rubor			
Voluntário hospitalizado nota			

* 0 = sem sangramento, 1 = gengivas, 2 = nariz, 3 = hematêmese, 4 = melena, 5 = outros (nota)
 6 = incerto (nota)

** 1 = alerta, 2 = sonolento, 3 = letárgico (mais sonolento ou moroso), 4 = obnubilado (acorda com estimulação vigorosa), 5 = comatoso

Comentários:

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)