



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – RENORBIO**

**ANÁLISE INVESTIGATIVA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS**  
**ASSOCIADOS À SUSCETIBILIDADE DA INFECÇÃO DA DENGUE**  
**EM PACIENTES DO BRASIL**

**ISAAC FARIAS CANSANÇÃO**

**FORTALEZA - CE**

**2015**



**ISAAC FARIAS CANSANÇÃO**

**ANÁLISE INVESTIGATIVA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS  
ASSOCIADOS À SUSCETIBILIDADE DA INFECÇÃO DA DENGUE  
EM PACIENTES DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biotecnologia - RENORBIO da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde

**Orientadora: Professora Dr<sup>a</sup>. Sílvia Helena Barem Rabenhorst**

**FORTALEZA – CE**

**2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- C23a Cansação, Isaac Farias.  
Análise investigativa de polimorfismos genéticos associados à suscetibilidade da infecção da dengue em pacientes do Brasil / Isaac Farias Cansação. – 2015.  
122 f. : il. color., ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2015.  
Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.  
Orientação: Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst.
1. Polimorfismo Genético. 2. Manifestações Clínicas. 3. Biotecnologia. I. Título.

---

CDD 660.6

**ISAAC FARIAS CANSANÇÃO**

**ANÁLISE INVESTIGATIVA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS  
ASSOCIADOS À SUSCETIBILIDADE DA INFECÇÃO DA DENGUE EM  
PACIENTES DO BRASIL**

**Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação Biotecnologia -  
RENORBIO da Universidade Federal  
do Ceará como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia. Área de concentração:  
Biotecnologia em Saúde**

---

**em: 31/08/2015**

**Banca Examinadora**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Izabel Florindo Guedes  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Anastácio de Queiroz Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ivo Castelo Branco Coelho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Sérgio Marcelo Rodríguez Málaga  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

**Aminha esposa Sãmia,  
meu filho Lucca, meus  
pais e meus irmãos, por  
compartilharem comigo  
toda esta empreitada...  
Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, por tudo que acontece e aconteceu na minha vida.

A minha esposa **Sâmia Régia Rocha**, agradeço de coração a toda paciência, ajuda e companheirismo no dia-a-dia. Acompanhou-me em diversas viagens entre São Raimundo Nonato/Paulo Afonso/Fortaleza, e por inúmeras vezes em viagens desgastantes e perigosas. Você merece também todos os louros desta vitória. Por último, e não menos importante, no momento mais sublime de nossas vidas com o nascimento do Lucca, soube compreender e ajudar nos momentos de maior aflição com a leitura e análise deste trabalho. Amo vocês eternamente...

Aos meus pais, **Antônio Teles Cansanção e Ana Farias Cansanção**, que são minhas estrelas referenciais e nos quais me espelho a cada dia. Eles plantaram sinceridade, paz, dignidade, sensibilidade e sabedoria. Por todos os momentos, juntos ou separadamente, mesmo com motivos de força maior, souberam colocar na hora certa palavras de paciência, ajuda, fraternidade, carinho e um grande amor, sendo os únicos que sabem o que significa este sentimento. Pelos momentos árduos e conflitantes da minha vida, onde souberam usar perfeitamente as palavras, seja para me confortar, seja para alertar-me sobre minha vida. A meus pais, deixo os mais sinceros e eternos agradecimentos por todos os momentos proporcionados em todas as fases da minha vida.

Aos meus irmãos, **Romero e Janaina**, pelo apoio, força e incentivo dados durante esta caminhada.

Aos meus cunhados, Sâmile e Tiago Rocha, pela inestimável ajuda e amizade.

À minha sogra, **Regina Lúcia**, agradeço imensamente a sua ajuda, seja em momentos conturbados ou alegres, pois sempre esteve prontificada a auxiliar na minha estada e dia-a-dia em Fortaleza. Agradeço de coração toda a assistência prestada.

À minha orientadora **Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst**, pela orientação, pela confiança, exemplo de dedicação e momentos de aprendizagem, os quais foram determinantes na execução deste trabalho e

para minha ascensão, tanto pessoal como também profissional. Dedico a ela toda minha gratidão.

Aos amigos, mestrandos, doutorandos, doutores e companheiros de bancada **Débora, Eliane, Emanuelle, Isabelle, Maíra, Morgana, Markênia, Rafael, Francivandi e Valeska** agradeço pela amizade, companheirismo, respeito, admiração, colaborações, incentivos, parcerias, momentos de descontrações tanto no laboratório como em diversos locais. Minha eterna saudade a todos.

As bolsistas Rosana e Beatriz, agradeço também por todo apoio dado a este projeto de pesquisa e a dedicação voltada às vezes que foram incumbidas a alguma tarefa convocada.

A super e inesquecível companheira **Ana Paula**, pelo companheirismo, transparência, profissionalismo, sinceridade e sensibilidade; pelas discussões, troca de ideias e apoio; bem como pela paciência e perseverança onde sempre se prontificou a me ajudar com plena firmeza e satisfação. A você dedico minha eterna gratidão em dividir comigo não só conversas profissionais, mas também pessoais, e sempre ajudando no que estivesse ao seu alcance.

Aos professores que lecionaram no período enquanto aluno no programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, muito grato pela participação na minha formação profissional.

Aos colegas do Doutorado/2011, obrigado também pelos ótimos momentos vividos juntos, pelo companheirismo em situações boas ou árduas e saibam que ficarão guardados sempre em minha mente.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí – FAPEPI** por viabilizar a realização deste trabalho, concedendo-me uma bolsa de auxílio.

Aos pacientes incluídos nesse estudo e seus familiares, obrigado pela atenção e compreensão concedida.

Aos Hospitais São José de Doenças Infeciosas, por nos permitir acesso para a execução desse estudo.

A professora Dr<sup>a</sup>. Maria Izabel Florindo Guedes, ao professor Dr. Anastácio de Queiroz Sousa e Dr<sup>a</sup>. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo que aceitaram prontamente participar da análise de qualificação desse estudo.

A professora Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Carvalho Barbosa, por sua doçura, alegria e grande auxílio numa parte importante inicial da pesquisa, além de analisar parte coleta laboratorial no Frotinha.

A todos os amigos, familiares e ex-professores que ajudaram direta e indiretamente na execução e realização deste trabalho, minha enorme gratidão.



## RESUMO

A dengue é uma doença infecciosa que detém altas taxas de morbidade e mortalidade em países tropicais e subtropicais do mundo. A infecção pode ser assintomática, possuir sinais de alerta ou levar à gravidade. A diversidade destas manifestações pode ser afetada, principalmente, pela relação sorotipo/genótipo do vírus. Diferentes interleucinas estão diretamente associadas com a infecção de dengue, e estas estão estreitamente relacionadas com a imunopatogênese da doença. Polimorfismos genéticos de citocinas podem ser responsáveis pelo desequilíbrio do processo inflamatório, sendo potenciais marcadores da susceptibilidade à dengue bem como responsáveis pelos sintomas a ela associados. Neste estudo, polimorfismos de nucleotídeo único (*SNP*) das interleucinas (*IL*)  $1\beta$  -511C>T, *IL1RN* VNTR 86 bp, *IL6* -174G>C, *IL10* -819C>T e *TNF $\alpha$*  -308G>A foram analisados em um grupo de 198 indivíduos com suspeita de infecção por dengue, durante agosto de 2011 a agosto de 2013. A dengue foi confirmada em 118 pacientes e o grupo controle consistiu em 80 indivíduos sem dengue. Os dados clínicos e epidemiológicos foram coletados de prontuário ou entrevista pessoal. As frequências genotípicas de todos os *SNPs* analisados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), exceto o gene *TNF $\alpha$* . A principal associação encontrada foi o alelo T do *IL1 $\beta$*  (-511C>T) para susceptibilidade a dengue ( $P < 0,05$ ). Análises de associação mostraram que a presença do alelo polimórfico de *IL6* (-174G>C) mostrou um aumento da susceptibilidade para dengue quando combinado com pelo menos um alelo polimórfico de *TNF $\alpha$*  e com o alelo polimórfico do *IL1 $\beta$*  (-511C>T). Além disso, o genótipo heterozigoto de *IL10* (-819 C>T) e *IL1 $\beta$*  (-511C>T) foram significativamente associados com *TNF $\alpha$*  (-308G>A) e com *IL1RN* com genótipos homozigotos polimórficos para ambos, respectivamente. Considerando os sintomas clínicos, apenas tontura foi encontrado associado com o alelo T do *IL1 $\beta$*  -511C>T ( $P = 0,01$ ). Nossos dados mostraram a importância do polimorfismo do *IL1 $\beta$*  (-511C>T) para a susceptibilidade de dengue e ressalta o efeito aditivo de algumas interleucinas. Também demonstrou que este polimorfismo pode ser um marcador para sintomas de dengue, o que pode ser relevante para abordagens terapêuticas.

Palavras-Chave: Infecção sintomática. Infecção Não-dengue. Polimorfismos de Interleucina. Características Clínicas.

## ABSTRACT

Dengue is an infectious disease that is associated with high morbidity and mortality rates in tropical and subtropical countries. Infection can be asymptomatic or have warning signs leading to severity. The diversity of these episodes can be affected mainly by the ratio of serotypes/genotypes of the virus. Different interleukins are directly associated with dengue infection, and they are closely related to the immunopathogenesis of the disease. Genetic polymorphisms of these cytokines may be responsible for the imbalance of the inflammatory process and markers for dengue susceptibility and may be related to dengue symptoms. In this study, single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the interleukins (IL) *IL1 $\beta$*  -511C>T, *IL1RN* bp VNTR 86, *IL6* -174G>C and *IL10* -819C>T and *TNF $\alpha$*  -308G>A were analyzed in a group of 198 individuals with suspected dengue infection, during August 2011 to August 2013. Dengue was confirmed in 118 patients, and the control group consisted of another 80 individuals without dengue. Clinical and epidemiological data were collected from medical records or personal interviews. The genotype frequencies of all SNPs analyzed were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), except for the *TNF $\alpha$*  gene. The major finding was the association of the *IL1 $\beta$* (-511C>T) T allele with dengue susceptibility ( $p < 0.05$ ). Analysis of association showed that the presence of the *IL6* (-174G>C) polymorphic allele showed an increase in dengue susceptibility combined with at least a polymorphic allele of *TNF $\alpha$*  and with *IL1 $\beta$* (-511C>T) polymorphic allele. Also, the heterozygous genotype of *IL10* (-819 C>T) was significantly associated with *TNF $\alpha$*  (-308G>A) and *IL1 $\beta$*  (-511C>T) with *IL1RN* homozygous polymorphic genotypes for both, respectively. Considering the clinical symptoms, only dizziness was found to be associated with the T allele *IL1 $\beta$* (-511C>T) ( $P = 0.01$ ). Our data showed the importance of *IL1 $\beta$* (-511C>T) polymorphism for dengue susceptibility and highlighted the additive effect of some interleukins. Also shown was that this polymorphism can be a marker for dengue symptoms, which may be relevant for therapeutic approaches.

Keywords: Symptomatic Infection. Non-dengue Infection. Interleukin Polymorphisms. Clinical Features.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nova Classificação de dengue. Adaptado de World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control .....	36
--	----

### Manuscrito 1

Tabela 1. Série de <i>Primers</i> de <i>PCR</i> utilizados para polimorfismos de genotipagem das interleucinas.....	89
Tabela 2. Características demográficas em pacientes Dengue (casos) e Não Dengue (controle) .....	91
Tabela 3. Associação dos polimorfismos <i>IL1<math>\beta</math></i> (-511 C>T), <i>IL1RN</i> (VNTR 86 pb), <i>IL6</i> (-174 G>C) e <i>TNF<math>\alpha</math></i> (-308G>A) entre pacientes do grupo Dengue e Não-Dengue .....	92
Tabela 4. Distribuição genotípica dos polimorfismos de <i>IL6</i> (-174G> C) e <i>TNF</i> (-308G> A) em indivíduos com e sem dengue.....	94
Tabela 5. Distribuição genotípica dos polimorfismos de <i>IL6</i> (-174G> C) e <i>IL1<math>\beta</math></i> (-511C>T) em indivíduos com e sem dengue.....	95

### Manuscrito 2

Tabela 1. Características clínicas em pacientes sintomáticos e não-dengue.	112
Tabela 2. Frequência de manifestações clínicas e medicação em portadores indivíduos de <i>IL1<math>\beta</math></i> .....	113

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de risco de transmissão mundial. ....	17
Figura 2. Distribuição Epidêmica da Dengue nas Américas.....	19
Figura 3. Incidência de sorotipos da dengue através de Isolamento Viral no Brasil .....	21
Figura 4. Incidência de dengue por sorotipo viral no Ceará de 2001 a 2015 .....	22
Figura 5. Estimativa de casos e incidência de dengue no Ceará, entre 1986 e 2015 .....	23
Figura 6. Incidência de casos confirmados de dengue por faixa etária, 2015 .....	24
Figura 7. Transmissão do vírus da dengue através do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	27
Figura 8. Morfologia do vírus da dengue.....	28
Figura 9. Representação esquemática das proteínas virais da dengue e suas funções .....	29
Figura 10. Organização genômica do vírus da dengue.....	30
Figura 11. Árvore filogenética demonstrando os sorotipos analisados e suas variações virais encontradas entre os continentes endêmicos (cepas da Ásia/Oceania: vermelho, América do Sul: verde; e África: azul) .....	32
Figura 12. Quadro evolutivo da dengue nas Américas.....	33
Figura 13. Incidência de dengue com sinais alarme (FD) e dengue grave (FHD) no Brasil após a reintrodução viral em 1986.....	34
Figura 14. Exantema petequial dos membros inferiores.....	38
Figura 15. Mecanismo de ação de combate ao vírus da dengue através do sistema ADE ( <i>Antibody-Dependent Enhanced</i> ).....	39
Figura 16. Mecanismo de imunopatogênese da doença da dengue .....	41
Figura 17. Progressão da doença da dengue X métodos de diagnóstico .	43
Figura 18. Fluxograma de classificação de risco de dengue em unidades específicas para tratamento e suas respectivas condutas clínicas. ....	48
Figura 19. Sinalização e inibição dos receptores da família IL-1 .....	52

Figura 20. Organização gênica da <i>IL-1A</i> , <i>IL-1β</i> e do <i>IL-1RN</i> e seus respectivos <i>SNPs</i> .....	57
Figura 21. Diagrama esquemático do gene <i>IL1RN</i> mostrando a posição do polimorfismo VNTR juntamente com vários alelos.....	58
Figura 22.Representação esquemática do <i>IL-6</i> .....	58
Figura 23.Polimorfismos existentes no gene <i>IL-10</i> associados a doenças .....	59
Figura 24. Representação esquemática de localização do <i>TNF</i> no interior do complexo MHC, com seus princípios polimorfismos da região promotora.....	60

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	15
2. Revisão de Literatura .....	16
2.1. Perfil Histórico e Epidemiológico .....	16
2.1.1. Dengue no Mundo .....	16
2.1.2. Dengue nas Américas .....	18
2.1.3. Dengue no Brasil .....	19
2.1.4. Dengue no Ceará .....	21
2.2. Agente Etiológico .....	25
2.2.1. Vetores .....	25
2.2.2. Transmissão da doença .....	27
2.2.3. Morfologia Viral .....	27
2.2.4. Genoma DENV .....	30
2.2.5. Variação genômica do vírus dengue .....	31
2.3. A Dengue .....	34
2.3.1. Classificação .....	34
2.3.2. Manifestações clínicas da dengue .....	36
2.3.2.1. Sintomatologia da dengue .....	37
2.3.2.2. Dengue com sinais de alarme .....	37
2.3.2.3. Dengue Grave .....	38
2.3.3. Tipos de diagnóstico .....	42
2.3.3.1. Diagnóstico Diferencial .....	42
2.3.3.2. Diagnóstico Laboratorial .....	42
2.3.3.2.1. Isolamento Viral .....	43
2.3.3.2.2. Diagnóstico Molecular .....	43
2.3.3.2.3. Diagnóstico Sorológico .....	44
2.3.3.3. Diagnóstico Inespecífico .....	45
2.3.3.4. Tratamento da Dengue .....	46
2.4. Resposta inflamatória mediada pela dengue .....	49
2.4.1. Células Dendríticas .....	49
2.4.2. Citocinas .....	51
2.4.2.1. Interleucina 1 .....	52

2.4.2.2. Interleucina do Receptor Antagonista de IL-1 (IL-1Ra) ... ..	53
2.4.2.3. Interleucina 6.....	53
2.4.2.4. Interleucina 10.....	54
2.4.2.5. Fator de Necrose Tumoral.....	55
2.4.3. Polimorfismos genéticos.....	56
2.4.3.1. SNPs no gene <i>cluster IL-1<math>\beta</math></i> e seu antagonista ( <i>IL-1RN</i> ) .....	56
2.4.3.2. SNPs no gene <i>IL-6</i> .....	58
2.4.3.3. SNPs no gene <i>IL-10</i> .....	59
2.4.3.4. SNPs no gene <i>TNF-<math>\alpha</math></i> ... ..	60
3. Objetivos .....	61
4. Referências .....	62
5. Manuscrito 1 .....	83
6. Manuscrito 2 .....	106
7. Apêndice A - FICHA DE COLETA DE DADOS DO PACIENTE.....	120
8. Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas.....	121

## 1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença febril aguda causada por um arbovírus (gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*) transmitida através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Aedes* (principalmente o *Aedes aegypti*). Carolus Linnaeus, em 1762, foi quem primeiro identificou e descreveu o artrópode, seguido de outros do mesmo subgênero *Stegomyia*, como o *Aedes scutellaris*, por Walker, em 1859, *Aedes albopictus*, por Skuse, em 1894 e o *Aedes polynesiensis*, por Marks, em 1952. Estes estudos vieram também confirmar estes vetores como possíveis transmissores do vírus dengue (MARTINS et al., 2006; 2010; 2012).

Atualmente, esta arbovirose é a principal doença que acomete as populações dos países tropicais e subtropicais do mundo, e em mais de 100 destes países são endêmicos (BÄCK; LUNDKVIST, 2013). Por sua vez, o vírus dengue (DENV), transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, dividia-se em quatro sorotipos distintos, mas sorologicamente relacionados: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. No entanto, em 2013, foi divulgada a existência de um quinto sorotipo: DENV-5 (MUSTAFA et al., 2015). Estes sorotipos podem levar a infecção, de forma muito diversificada, variando desde a forma assintomática, até quadros mais graves, ou mesmo levar a morte (SILVA, 2013). De acordo com a classificação atualizada da Organização Mundial de Saúde (OMS), os casos são classificados em três categorias: 1) dengue provável, 2) dengue com sinais de alarme e 3) dengue grave (OMS, 2009).

A dengue é de origem pandêmica, expandindo-se inicialmente da África, para outras áreas tropicais do planeta, como sudeste asiático, Oceania e Américas. Com esta crescente disseminação, esta doença chega ao status de maior problema de saúde global, uma vez que nas últimas décadas só aumentaram os casos graves da doença (OSANAI, 1984; GUBLER; CLARCK, 1995; GUBLER, 1998, OMS, 2009).

A doença é caracterizada por uma reação fisiopatológica mediada pela resposta imune contra o vírus, a qual pode ser guiada por componentes da imunidade inata, como proteínas sinalizadoras, conhecidas por quimiocinas e seus receptores. Outros grupos proteicos podem ser estimulados, participando tanto da imunidade inata como adquirida (COSTA et al., 2013). Este estímulo pode ser desencadeado pela elevada produção de moléculas estimuladoras envolvidas na ativação dos linfócitos T. Estes, por sua vez, podem estimular proteínas conhecidas



como citocinas a propagar um quadro inflamatório com o intuito de combater este agente infeccioso (GREEN; ROTHMAN, 2006; KURANE, 2007; MARTINS et al., 2012).

Mesmo existindo diversos programas de prevenção e combate a esta doença no país, o Brasil ainda é conhecido como um dos países mais atingidos por diversas epidemias anualmente (OPAS, 2015). Embora o país seja acometido pela dengue todos os anos e existam diversas pesquisas que tentam entender a sua patogenia, ainda existe uma lacuna na imunopatogênese da população brasileira, bem como na relação genética hospedeiro/vírus. Por isso, o trabalho teve como objetivo avaliar os polimorfismos das interleucinas (ILs) 1, 6, 10 e TNF- $\alpha$  em pacientes residentes no Ceará evidenciando a relação genética na suscetibilidade com a doença.

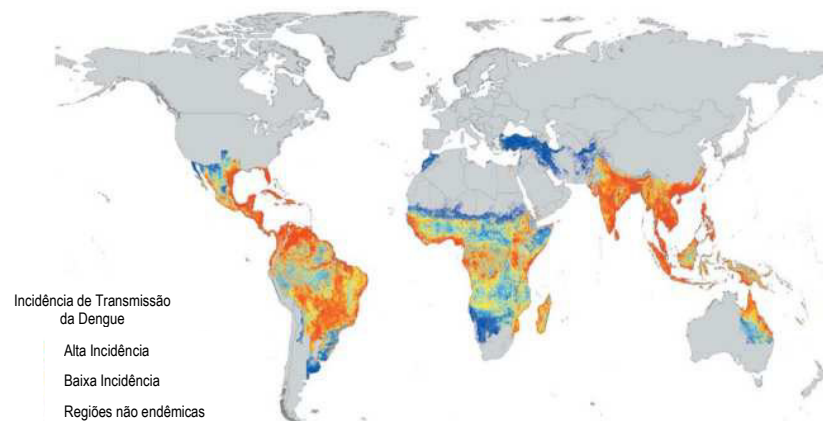
## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. PERFIL GLOBAL E EPIDEMIOLÓGICO**

#### **2.1.1. Dengue no Mundo**

A dengue atualmente é um problema de saúde pública, principalmente nas regiões tropicais do planeta. Cerca de dois bilhões e meio de pessoas habitam estas áreas as quais o vírus circula livremente (MENDONÇA et al., 2009). Aproximadamente 2/5 da população mundial tem o risco de contrair a doença e estima-se que ocorram mais de 50 milhões de novas infecções anualmente (Figura 1) (GUZMAN; KOURI, 2002; OMS, 2009).

Figura 1. Área de risco de transmissão mundial



Fonte: Modificado a partir de SIMMONS et al., 2012.

O principal mosquito transmissor é oriundo do Egito, tendo sido disseminado para outros continentes através das embarcações de navios negreiros a partir do século XV e meados do século XIX (IOC, 2015). Os primeiros surtos da doença aconteceram nas Antilhas francesas, em 1635, e no Panamá, no ano de 1699 (GUBLER, 1998).

No entanto, ainda não se chegou a um consenso relativo ao agente etiológico que provocou a doença nestes países, pois se assemelhava muito da sintomatologia clínica atual. Apenas no século XVIII, as primeiras documentações sobre a doença surgiram na Filadélfia, em 1778, e na Ilha de Java, em 1779 (GUBLER, 1997; 1998; BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

No século XX, durante e após a segunda guerra mundial, ocorreram diversas epidemias da doença devido, principalmente, ao clima e ambiente propício para sua transmissão em diversos países do sudeste asiático. Outros parâmetros que podem ser destacados foram a disseminação de diferentes sorotipos para novas áreas e o surgimento da dengue grave (febre hemorrágica, antiga classificação), como ocorreram nas Filipinas, em 1953. Anos depois, esta região já tinha alcançado números alarmantes de dengue grave (GUBLER, 1997; 1998, SIMMONS, 2012).

Décadas mais tarde, a doença propagou-se em regiões menos prevalentes, como a Europa. Em 2012 houve um surto na Ilha da Madeira, que registrou 2168 casos e que impôs risco de uma possível chegada a Portugal continental (PORTUGAL, 2013).

Embora já se conheça a presença de todos os DENV em todos os continentes, o mundo voltou a ficar em alerta quando, em outubro de 2013, foi

anunciado o quinto sorotipo circulante da dengue em um surto epidêmico na Malásia, país do sudeste asiático. O DENV-5 foi identificado através de uma triagem realizada numa amostra de um fazendeiro de 37 anos, hospitalizado na região de Sarawak em 2007. Primeiramente, imaginavam que ele teria sido acometido pelo DENV-4, sorotipo circulante comum entre os primatas e mosquitos do gênero *Aedes* nas florestas desta região. Entretanto, o vírus foi isolado, sequenciado e foi observado que era filogeneticamente diferente do DENV-4. Atualmente, este sorotipo está restrito a uma região silvestre do país malaio, mas com a facilidade de deslocamento das pessoas ao redor do planeta, a sua propagação não está descartada (MUSTAFA et al., 2015).

Segundo a estimativa de alguns pesquisadores, contrariando dados da OMS, anualmente há cerca de 100 milhões de casos graves e aproximadamente 300 milhões de casos moderados e assintomáticos no mundo (SIMMONS et al., 2012).

### 2.1.2. Dengue nas Américas

O primeiro surto das Américas foi no Golfo do México no século XIX. Entretanto, o status de pandemia deu-se apenas em 1850, atingindo diversas áreas geográficas da América do Sul. O primeiro sorotipo a entrar no continente foi o DENV-2, em Trinidad no ano de 1952. Décadas após, foram aparecendo os outros sorotipos, como o DENV-3 (Porto Rico, entre 1964-65) e o DENV-1 (Jamaica, 1977). O DENV-4 foi introduzido em 1981, acometendo pessoas na América Central e no norte da América do Sul, embora já existisse nesta época programas de controle para os vetores transmissores da dengue neste continente (WILSON; CHEN, 2002; OPAS, 2015).

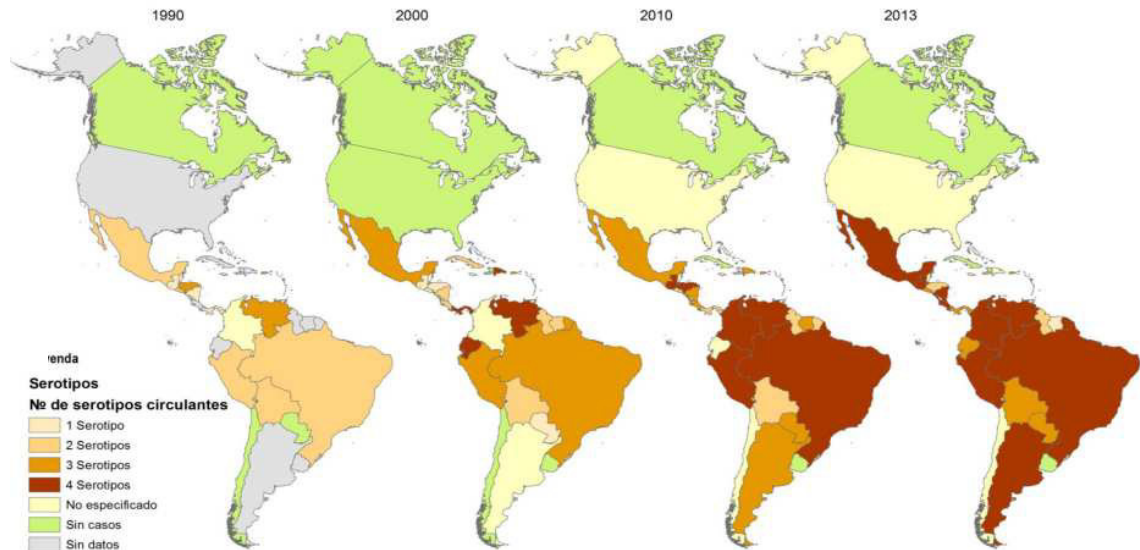
Com isso, na década de 70, a partir de falhas na vigilância epidemiológica e de mudanças sociais e ambientais decorrentes de crescimento urbano desordenado da época, as reintroduções do mosquito e dos sorotipos no continente foram se propagando no final desta década. (Figura 2) (NOBRE et al., 1994; BRASIL, 2014).

A partir da década de 80, começaram a ser observadas epidemias de dengue grave, como ocorrido na Venezuela entre 1989-90, e no Brasil, entre 1990-91 (OPAS, 1989; 1992).

Até 17 de julho, cerca de 1.500.000 pessoas foram notificadas com dengue no continente americano. Destas, 394.766 foram diagnosticadas com dengue, onde

3.584 foram classificadas com dengue grave e 648 culminaram em óbito (OPAS, 2015).

Figura 2. Distribuição Epidêmica da Dengue nas Américas



Fonte: Modificado a partir da OMS, 2014.

### 2.1.3. Dengue no Brasil

Não existem relatos de dengue até 1846 no Brasil. No século XX, os primeiros casos a terem registros foram no sudeste do país entre as décadas de 1910 e 1920, no entanto, sem comprovação laboratorial. A primeira epidemia clinicamente documentada foi no início da década de 80 em Roraima com a circulação de dois sorotipos (DENV-1 e DENV-4), mas como ocorreu numa região geograficamente isolada, não se disseminou para outras regiões brasileiras (OSANAI, 1984; FIGUEIREDO, 2012).

O primeiro surto epidêmico que atingiu diversas regiões do Brasil aconteceu em 1986 com a presença do DENV-1. Iniciou-se no Rio de Janeiro e expandiu-se para outras regiões como Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Ceará (HALSTEAD, 1988; SCHATZMAYR, 2000). Posteriormente, outros sorotipos circularam no estado fluminense, como o DENV-2 e DENV-3 na década de 90 (OPAS, 1992).

Com o agravamento da situação epidemiológica e da disseminação da doença no país em 1997, o Brasil, apoiado pela Organização Pan-americana de

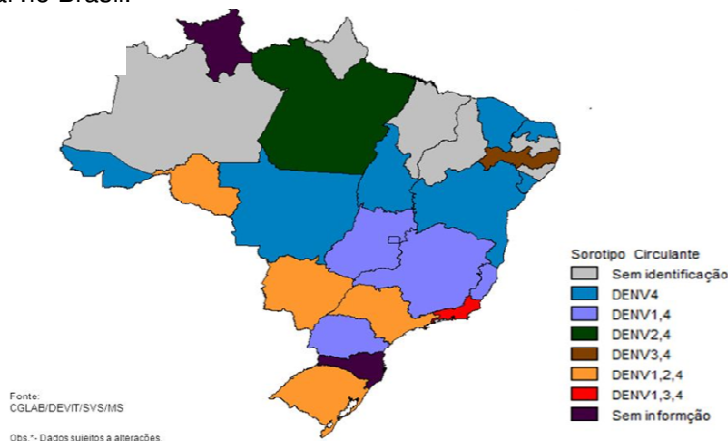
Saúde, lançou o Plano de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa), sistematizando todas as esferas governamentais e a sociedade, inserido com o intuito de melhorar os serviços de saneamento básico, educação e informação da população no combate ao mosquito. No entanto, este programa não obteve êxito, pois a descentralização das ações estaduais e municipais não foi efetiva no desenvolvimento de esforços no combate e controle da doença no Brasil (SCANDAR, 2007; BARBOSA, 2009; OLIVEIRA, 2011; RAMOS; MACHADO, 2014).

Entre 2002 e 2010 ocorreram registros de quase quatro milhões de casos prováveis de dengue, perfazendo um total de 2.383 óbitos devido ao agravamento da doença (RAMOS; MACHADO, 2014). Até 2007 só circulavam os sorotipos DENV-1, DENV-2 E DENV-3 no país.

Entretanto, em 2008, depois de mais de 20 anos sem DENV-4 circular no Brasil, este foi reintroduzido pelo estado do Amazonas, propagando-se anos mais tarde pelos estados do Pará, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro e São Paulo até meados do primeiro semestre de 2011. Posteriormente, este sorotipo ainda se disseminou para outros estados brasileiros (Figura 3) (BRASIL, 2005; BRASIL, 2010, OPAS, 2013; FIGUEIREDO et al., 2013).

Além disso, a incidência na faixa etária também vem sofrendo modificações ao longo dos últimos 13 anos, aumentando acentuadamente a proporção em crianças e adolescentes entre os anos de 2002 e 2008 relacionados com a forma mais grave da doença (SIQUEIRA JR, 2010).

Figura 3. Incidência de sorotipos da dengue através de Isolamento Viral no Brasil.



Dados sobre o Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN) apontou os estados de São Paulo e Minas Gerais como os de maior concentração de casos notificados de dengue até 06 de julho de 2015, e o Ceará ocupando o quinto lugar neste ranking neste mesmo ano (BRASIL, 2015).

#### 2.1.4. Dengue no Ceará

Desde os primeiros casos de Dengue registrados no Ceará em 1986, o ápice da epidemia ocorreu entre março e junho de 1987. Até 1993, apenas o DENV-1 foi isolado no Ceará (cerca de 16% dos casos diagnosticados no país) (VASCONCELOS et al., 1995; PINHEIRO; CORBER, 1997).

A introdução de DENV-2 em 1994 ocasionou um aumento da gravidade, manifestando casos com quadro hemorrágico e aumentando o número de óbitos no mesmo ano. Adicionado a estes números, apenas o estado do Ceará respondeu a 84% de casos registrados quando comparado com outros estados brasileiros (SOUZA et al., 1995).

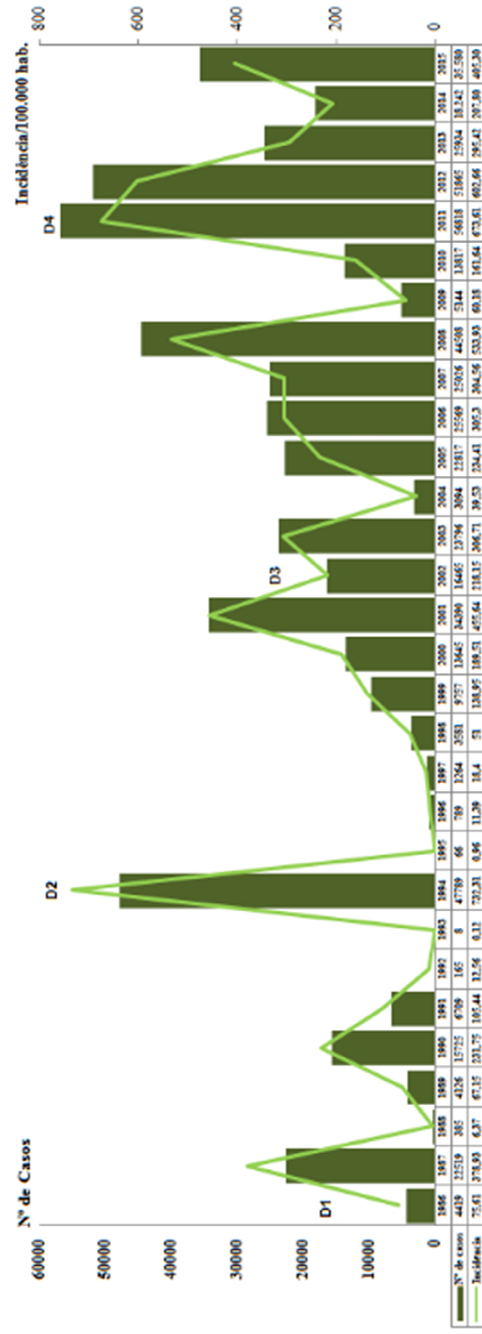
O DENV-3 foi isolado pela primeira vez em 2002, pelo Laboratório de Saúde Pública do Estado do Ceará – LACEN. Por causa de uma circulação simultânea no mesmo ano com outros dois sorotipos (DENV-1, DENV-2), o estado foi vítima de mais uma epidemia e com uma alta prevalência de casos graves entre adultos no ano seguinte [ano de 2003] (ARAÚJO et al., 2006; CAVALCANTI et al., 2010). Outras epidemias foram registradas ainda em anos posteriores (Figuras 4 e 5) (CEARÁ, 2015).

Figura 4. Incidência de dengue por sorotipo viral no Ceará de 2001 a 2015.



FONTE: SESA/ COMPROM/ NUVEP, 2015.

Figura 5. Estimativa de casos e incidência de dengue no Ceará, entre 1986 e 2015.\*



FONTE: SESA/ COMPROM/ NUVER, 2015.\*Dados sujeitos a revisão.

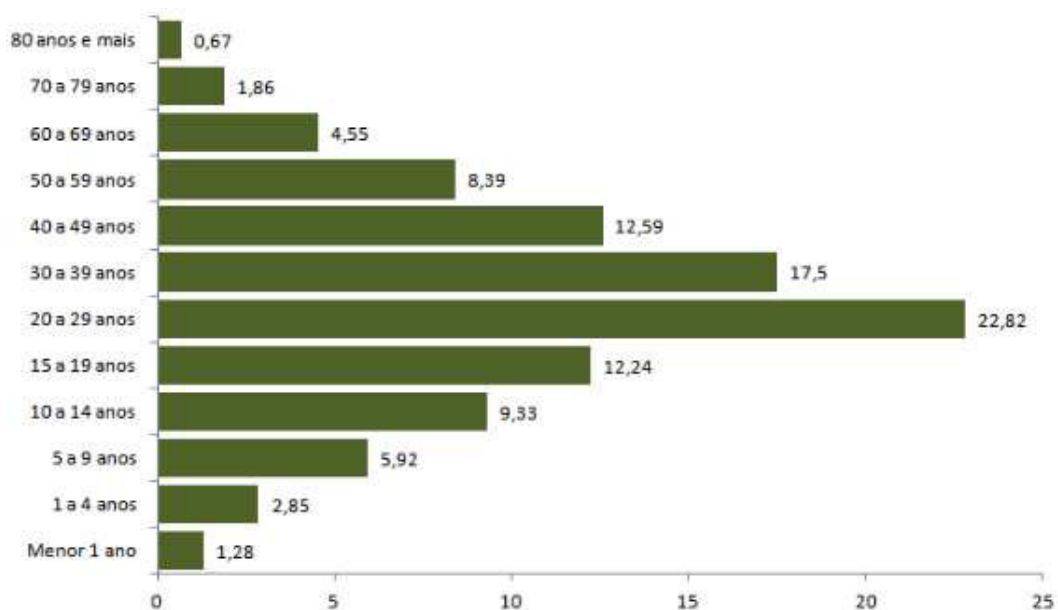


Normalmente, um sorotipo predomina de 2 a 4 anos, quando decresce e ressurgem sorotipos diferentes de substituição (WHITEHORN; SIMMONS, 2011). Este padrão também foi encontrado no Ceará, embora tenha sido isolado mais de um tipo circulante por temporada epidêmica (Figuras 4 e 5). No geral, foram verificados seis picos epidêmicos no estado (1987, 1994, 2002, 2008, 2011 e 2012) (VASCONCELOS et al., 1998; CEARÁ, 2015).

Um destes ressurgimentos ocorreu em 2010, onde o DENV-1 voltou a circular com taxa de isolamento de mais de 98%, registrando notificações de casos graves, aumentando os óbitos no Ceará. Embora este sorotipo tenha sido registrado com maior prevalência, a entrada do DENV-4 nos últimos anos aumentou consideravelmente o risco de gravidade entre a população cearense, principalmente em crianças e adolescentes (CEARÁ, 2013).

Nos últimos anos, houve uma maior predominância entre indivíduos do sexo feminino com casos confirmados (SILVA, 2014). Em 2014, foram registrados quase 100% dos municípios com casos de dengue. Dentre estes municípios, cerca de 80% foram confirmados com a doença. Houve ainda um aumento de 50% de casos graves confirmados, comparados com 2013, mas ocorreu uma redução de 35% dos óbitos quando comparados com o mesmo ano. Quanto a faixa etária, a maior prevalência está nos indivíduos até 29 anos, e um decréscimo nos adultos com idade maior e em idosos cearenses (Figura 6) (CEARÁ, 2015).

Figura 6. Incidência de casos confirmados de dengue no Ceará por faixa etária, 2015\*.



FONTE: SESA/ COMPROM/ NUVEP, 2015.\*Dados sujeitos a revisão.

## 2.2. Agente Etiológico

### 2.2.1. Vetores

O *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é originário da África sob duas formas de habitat: predominantemente silvestre e urbana. A forma urbana foi a que mais se expandiu e com maior rapidez (MACORIS, 2011). O mosquito está intimamente relacionado com os seres humanos e suas habitações e é o principal mosquito vetor de transmissão da dengue (IOC, 2015).

Este artrópode teve sua disseminação ampliada desde a década de 80 em diversas regiões do mundo, e no Brasil atingiu quase todos os estados (ALVES et al., 2008; BARBOSA, 2009). O tempo médio de vida do *A. aegypti* é de 30-35 dias. Eles conseguem completar seu ciclo até mesmo em ambientes impróprios, uma vez que as fêmeas se alimentam de sangue no período diurno (SILVA et al., 2004).

O crescimento antrópico, econômico e industrial podem ter contribuído com o aumento do mosquito no mundo, bem como a diversificação das cepas virais. Um fator desencadeante de disseminação foi o fluxo de pessoas infectadas transitando de uma região a outra por via aérea (SILVA et al., 2004).

Indivíduos infectados contraíam o vírus em locais epidêmicos e transportavam esta cepa para o local onde residiam, introduzindo um novo sorotipo ou genótipo nesta região (GUBLER, 1998). Isto reforça a hipótese da dispersão global da dengue, onde sua disseminação ocorreu em um curto espaço de tempo, sendo desencadeado através deste mecanismo propagador de fluxo (SIMMONS et al., 2012).

Outro fator de propagação ocorrido nas últimas décadas são as alterações climáticas, verificadas pelas altas temperaturas em diversas regiões do planeta, aumentando a facilidade de migração do vetor (*Aedes aegypti*) para áreas pouco prováveis de infecção que eram as regiões temperadas (RADKE et al, 2012; BOUZID et al., 2014; ROGERS et al., 2014). Com isso, este mosquito ascendia ao posto de inseto com maior transmissão de cepa viral do mundo (SHOPE, 1992).

Outra forma de dispersão do vírus, e mais abundante, é através do transporte passivo do ovo tanto do *A. aegypti* quanto do *Aedes albopictus*, promovido pelo transporte de humanos e mercadorias entre os países (HAWLEY et al. 1987, REITER 1998, RAMASAMY et al. 2011). Esta forma predominante de expansão de forma de

vida é viável devido, principalmente, a habilidade de seus ovos em entrar em quiescência ou diapausa, permanecendo neste tipo de comportamento por longos períodos em ambientes quase secos e com baixa temperatura (SILVA; SILVA, 1999; POELCHAU et al., 2013). Diante desta capacidade, os ovos dos culicídeos podem ser considerados como o principal tipo de dispersão devido à habilidade de se propagar em diferentes lugares ou artefatos, tornando-se, com isso, difícil o controle e o combate destes vetores (SILVA; SILVA, 1999; PESSOA et al., 2013).

Associado a isto, vem a falta de cuidado do ser humano, descartando resíduos de forma inadequada, além da carência de programas de prevenção contra o mosquito e a resistência aos inseticidas (SILVA, 2013).

Outra espécie vetor de transmissão é a *Aedes albopictus* (vetor secundário), que também é antropofílica, onde seu desenvolvimento mais rápido ocorre em recipientes ou reservatórios domiciliares ou peridomiciliares (BRAGA; VALLE, 2007). Um dos primeiros registros do *A. albopictus* foram datados em 1986 nos estados de Minas Gerais e no Rio de Janeiro (FORATTINI, 2002).

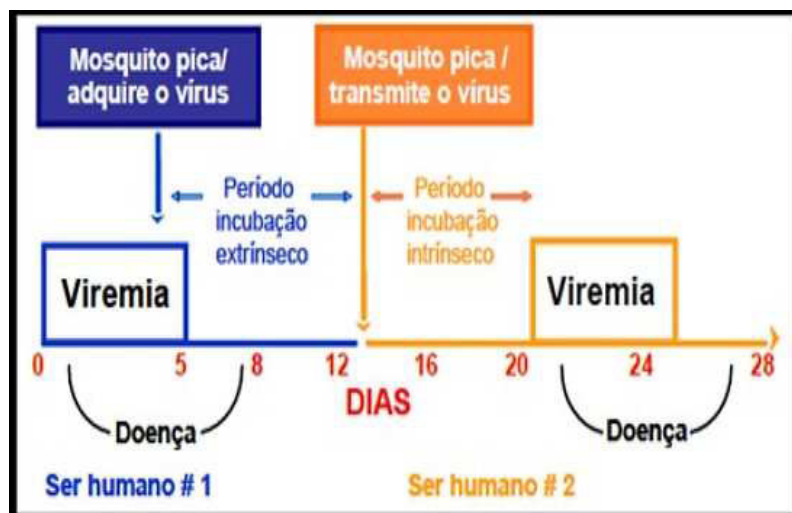
Embora esta espécie tenha sido relatada em diversos estados brasileiros, ainda não foi encontrada nenhuma epidemia causada por este mosquito. Desde sua introdução, este mosquito conseguiu uma expansão bem difundida em todas as regiões brasileiras, com exceção dos estados do Acre, Amapá, Piauí e Sergipe (BALESTRA et al. 2008, AGUIAR et al. 2008; PESSOA et al., 2013). Um dos estados introduzido foi o Ceará, onde em 2005 foi relatada a ocorrência no bairro do Montese, em Fortaleza (MARTINS et al., 2006).

Mesmo que o *A. albopictus* seja considerado um vetor menos eficiente na transmissão do DENV, quando comparado com *A. aegypti* (LAMBRECHTS et al. 2010), esse pode transmitir quatro sorotipos da dengue (DENV1-4), como ocorreu nos países asiáticos na segunda guerra mundial e em ilhas do oceano pacífico, e até ser vetor do vírus Chikungunya em países africanos e europeus (QIU et al. 1993; PAUPY et al. 2010; BONILAURI et al. 2008; PAGES et al. 2009). Por mais que se tenha diversos relatos de transmissão do DENV pelo *A. albopictus*, sua participação pode estar sendo negligenciada em surtos epidêmicos no país (DEGALLIER et al. 2003; MARTINS et al., 2013).

### 2.2.2. Transmissão da doença

O DENV se mantém na natureza em ciclos de transmissão homem-mosquito-homem (ROSS, 2010). A transmissão ocorre através da picada da fêmea do mosquito transmissor que, nutrindo-se de indivíduos virêmicos, inicia o período de incubação extrínseca, que leva em média 10 dias. No interior do mosquito o vírus multiplica-se no aparelho digestivo e dissemina-se para os diferentes tecidos do animal. Posteriormente, durante novo repasto sanguíneo, o vírus é transmitido a um novo indivíduo. Ao sofrer a picada deste inseto, é iniciado o período de incubação intrínseca, que perfaz um período de 3 a 14 dias, e logo depois surgem os sintomas da dengue (Figuras 7) (GUBLER, 1998).

Figura 7. Transmissão do vírus da dengue através do mosquito *Aedes aegypti*.



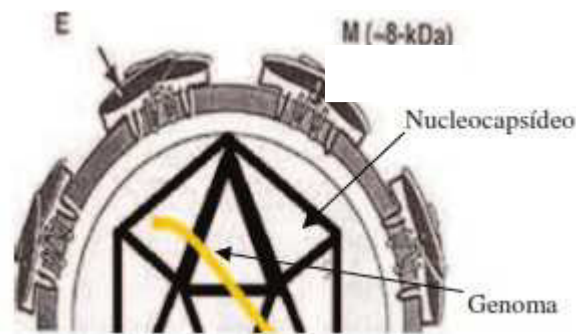
Fonte: Modificado a partir do *Center of Disease Control*, 2013.

### 2.2.3. Morfologia Viral

O gênero *Flavivirus* agrupa cerca de 39 espécies e 70 tipos virais, sendo, na sua grande maioria, transmitido por artrópodes (LOPES et al., 2014). A estrutura do DENV é simples, constituída por partículas esféricas de 40 a 50 nm de diâmetro e composto por um envoltório lipídico envolvendo um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica de aproximadamente 30 nm de diâmetro (LINDENBACH et al., 2007), e um genoma viral de RNA de fita simples de polaridade positiva. Envolto a este capsídeo, encontra-se um envelope protéico (E) e uma proteína membranosa (M),

sendo a glicoproteína E o principal determinante antigênico viral (Figura 8) (GUBLER, 1998; TOMLINSON et al., 2009; ROSS, 2010).

Figura 8. Morfologia do vírus da dengue.



Fonte: Modificado de LINDENBACH et al., 2007.

O vírus é composto pela cápsula proteica (Capsídeo) e pelas proteínas MeE. Estas duas últimas partículas formam a estrutura externa do vírus. O capsídeo reveste o *RNA* genômico promovendo a construção do nucleocapsídeo viral, recoberto por uma camada bilipídica (NUNES, 2011). Além destas três proteínas ditas estruturais, ainda existem sete proteínas não estruturais, designadas como: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B E NS5 (HENCHAL, PUTNAK, 1990).

As proteínas estruturais (PE) são responsáveis pelo reconhecimento e adsorção do vírus (proteína E) com as células do hospedeiro. A proteína C, de característica altamente básica, é a primeira macromolécula a ser traduzida e quando está associada ao RNA viral, gera o nucleocapsídeo (Figura 8). Sua função principal é neutralizar a carga negativa do RNA genômico ao qual está associado (VELANDIA; CASTELLANOS, 2011). As proteínas prM e E são responsáveis pelo envelopamento proteico e participam da interação vírus-hospedeiro aumentando a superfície de infecção, devido a exposição do domínio de ligação E. Esta proteína ainda atua em eventos importantes do ciclo biológico do vírus, mediando a fusão e um maior alvo de neutralização de anticorpos (GUZMAN; KOURI, 2004). Por sua vez, a proteína M está envolvida na morfogênese viral, reorganizando a superfície do vírus para a exposição do domínio de ligação da glicoproteína E e consequente aumento da infectividade (MUKHOPADHYAY et al., 2005).

Enquanto as PE estão envolvidas no processo de formação e metabolismo viral bem como na interação vírus-hospedeiro, as proteínas não estruturais (PNE)

participam do processo de replicação e regulação de transcrição do genoma viral (ROSS, 2010).

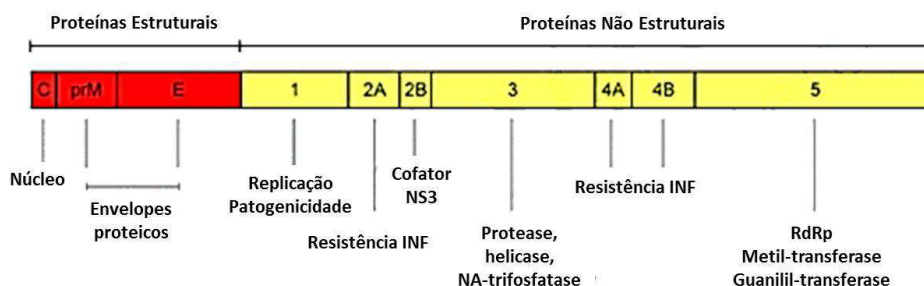
Estas PNE não possuem todas as funções definidas, embora tenham uma participação efetiva no processo metabólico do vírus (ROSS, 2010). Algumas têm a função de polimerase (NS5), outras de helicase/protease (NS3) ou de indução na produção de anticorpos com atividade fixadora de complemento (Figura 9) (HALSTEAD, 2003).

O gene que codifica a proteína NS1, por exemplo, tem sua participação essencial na replicação viral. É encontrado tanto no interior do vírus quanto na superfície da célula hospedeira, provocando resposta humoral contra as células infectadas através da lise celular (ROSS, 2010). Esta proteína serve também como diagnóstico de dengue, pois se apresenta em grande volume nas células do hospedeiro na fase aguda da doença (MACDONALD et al., 2005).

As proteínas NS2A, NS4A e NS4B, além de participar do processo de replicação viral, também possuem uma função importante no papel de bloqueio de Interferon (INF) (ALVAREZ et al., 2005; ROSS, 2010).

As proteínas NS3 e NS5 atuam no processo de produção poliproteica e na replicação viral, respectivamente. A NS3 ainda tem função de helicase e protease, utilizando como cofator a NS2B. Por sua vez, a NS5 codifica uma metiltransferase que tem função de RNA polimerase, além de envolver-se na transcrição e na secreção de IL-8 (MEDIN et al., 2005; ROSS, 2010).

Figura 9. Representação esquemática das proteínas virais do dengue e suas funções.

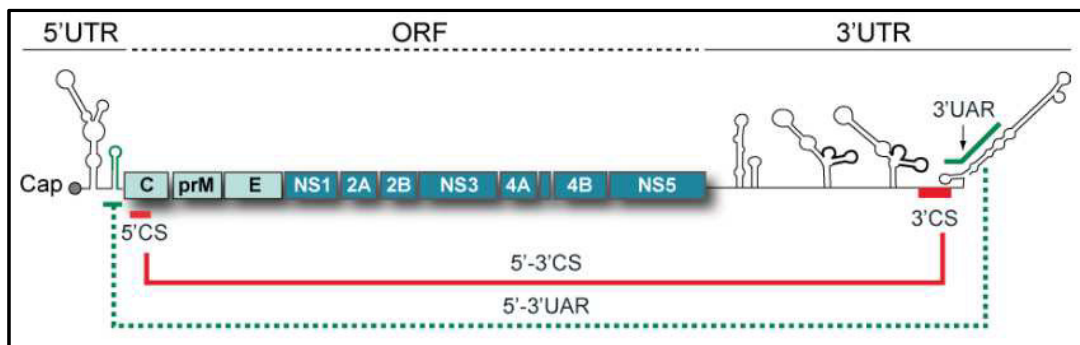


Fonte: Modificado a partir de Departamento de Virologia de Klinikum, 2014

#### 2.2.4. Genoma DENV

O vírus do dengue é constituído por RNA (Ácido Ribonucleico) de fita simples de aproximadamente 11kb. Uma única matriz de leitura ORF (do inglês *Open Reading Frame*) codifica a poliproteína viral a qual é clivada posteriormente em proteínas estruturais e não estruturais. Flaqueando a ORF existem as regiões não codificantes (RNC) nas extremidades 5', com cerca de 100 nucleotídeos (nt), constituído por *cap* tipo I ( $m^7GpppAmpN_2$ ) e a região 3', com aproximadamente de 500 nt e uma cauda poliadenilada ausente (Figura 10) (GUZMAN; KOURI, 2004; LINDENBACH et al., 2007; TOMLINSON et al., 2009; ROSS, 2010).

Figura 10. Organização genômica do vírus da dengue.



Fonte: Modificado a partir de Gebhard et al., 2011.

A função da região 5' é auxiliar na tradução do genoma, e tem um papel extremamente importante na replicação devido a uma região de complementaridade com a fita de RNA. Já a região 3' aumenta a eficiência nos processos de tradução e replicação viral (CLYDE et al., 2006).

Os primeiros 50 a 400 nt demonstram uma baixa taxa de conservação, sendo designados de região variável e não são essenciais no processo de replicação viral do sorotipo I. Entretanto, as regiões conservadas (CS) e suas sequências de término de ciclização são extremamente necessárias para os processos de replicação e tradução do vírus do tipo II da dengue (TAJIMA et al., 2006; LINDENBACH et al., 2007).

### 2.2.5. Variação genômica do vírus dengue

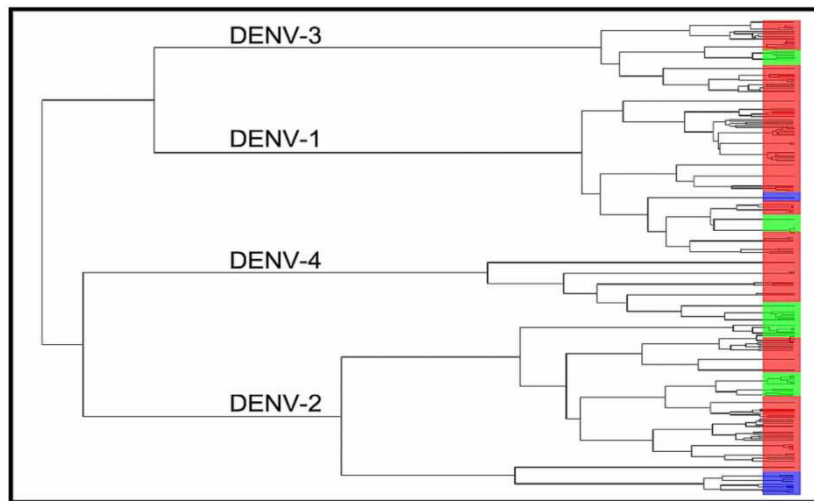
Vírus constituídos de RNA são mais propensos a mutações devido a falhas de correção da polimerase, demonstrando uma maior variabilidade genética. Isto também se reflete a diversas adaptações que estes vírus sofrem nas mais variadas mudanças ambientais no nosso planeta (ELENA; SANJUÁN, 2005). Prova desta diversidade genética é a existência de mais de um sorotipo para este vírus, muito embora esteja abaixo da taxa de substituições relativo aos Flavivirus (HOLLAND et al., 1982).

Com o avanço da biologia molecular, foram identificadas diversas cepas dentre os sorotipos existentes. Na teoria, esta diversificação poderia causar uma maior gravidade da doença devido ao acúmulo de mutações que alterariam mais ainda as funções biológicas nos vírus (LANCIOTTI et al., 1994; HOLMES; BRUNCH, 2000).

Nos últimos anos, foram evidenciadas análises de sequências genômicas e de filogenia molecular que auxiliaram na elucidação do padrão da variação de cepas de diferentes regiões endêmicas dos trópicos e subtropicais do planeta, entre isolados selecionados de 1944 a 2008. Uma árvore filogenética de compilação foi gerada a partir destes dados, demonstrando um alinhamento de cepas de diferentes regiões ou uma separação de isolados conservados geneticamente em diferentes ramos filogenéticos. Este padrão de variação viral foi encontrado para todos os sorotipos de DENV selecionados para este estudo molecular (Figura 11).



Figura 11. Árvore filogenética demonstrando os sorotipos analisados e suas variações virais encontradas entre os continentes endêmicos (cepas da Ásia/Oceania: vermelho, América do Sul: verde; e África: azul).



Fonte: NIH/NCBI, Virus Variation Database, 2009.

Na década de 80, genótipos virais da dengue tinham sido identificados pela técnica de *fingerprint*. Com o advento do sequenciamento, mais genótipos foram sendo descobertos e identificados em diversas regiões endêmicas dos trópicos e subtropicais (RICO-HESSE, 1990).

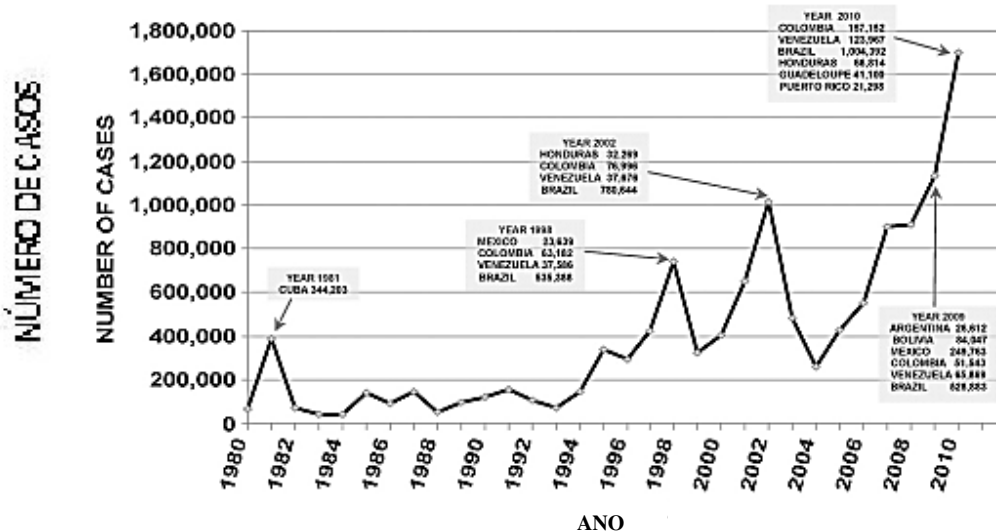
Um dos relatos sobre a ampla diversidade do sorotipo 1 veio provavelmente com o aumento de viagens aéreas na década de 60. Sua diversificação só aumentou, apoiando ainda mais a ideia de meio de adaptação a novos ambientes, como revelado pela diferença de aminoácidos em amostras isoladas (RICO-HESSE, 1990).

Com a acurácia do sequenciamento e das análises evolutivas e com o aperfeiçoamento do banco de dados, a classificação de genótipos dentro dos sorotipos foi reorganizada (RICO-HESSE, 2003). Novos genótipos foram propostos para DENV-3 e DENV-4, enquanto outros genótipos, como os do DENV-2 foram reduzidos (WANG et al., 2000; RICO-HESSE, 2003; KING et al., 2008; ARAÚJO et al., 2006).

Análises filogenéticas realizadas com o novo sorotipo (DENV-5) revelaram que este é geneticamente similar aos outros já existentes, compartilhando de um único ancestral comum. Entretanto, são necessárias outras análises para se saber a exatidão de qual sorotipo o DENV-5 foi derivado (MUSTAFA et al., 2015).

Com o surgimento de novas variações de cepas virais, os surtos epidêmicos também aumentaram consideravelmente nos últimos 20 anos no continente americano (Figura 12). Embora alguns países o surto tenha diminuído, a crise epidêmica ainda permanece estabelecida nas Américas (DICK et al., 2012; OPAS, 2012).

Figura 12. Quadro evolutivo da dengue nas Américas.



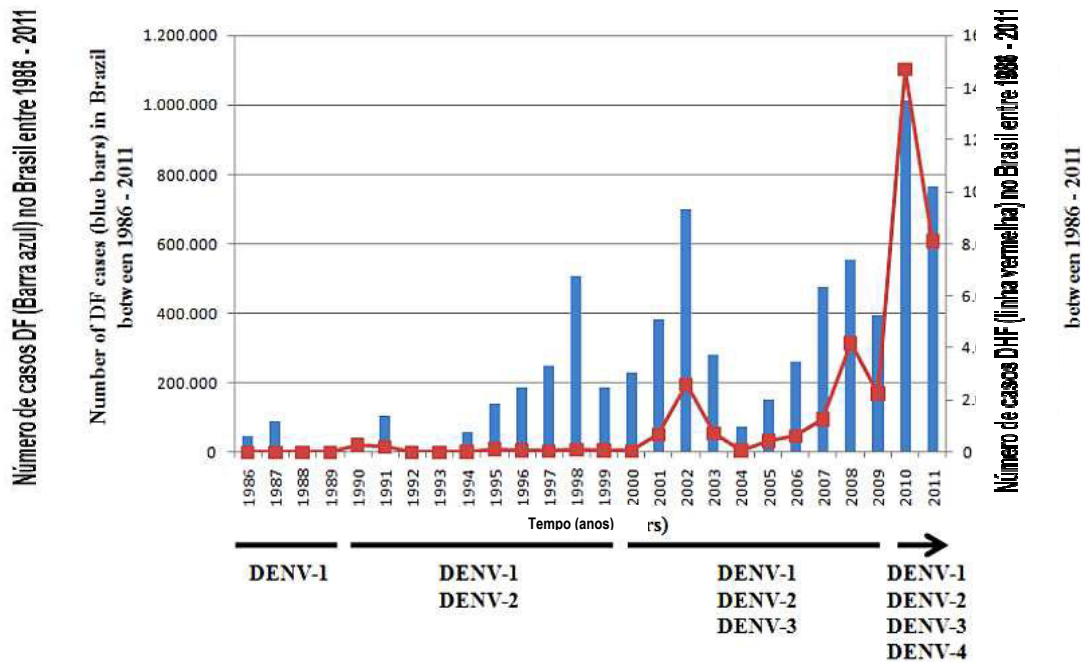
Fonte: Adaptado de Dick et al., 2012.

O aumento da diversidade genética demonstrou, ao longo dos últimos anos, que vem sendo acompanhado pelo aparecimento de novas cepas, sugerindo que nos próximos anos a exposição a vírus com maior patogenicidade seja ampliada (HOLMES; BURCH, 2000).

O principal mecanismo de identificar maiores variações do vírus dengue são as mutações pontuais e seleção de grupos (clado/linhagens) (COLOGNA et al., 2005). Mutações silenciosas e substituições conservativas são geralmente encontradas em estudos genéticos do vírus (ZHANG et al., 2005).

Concomitante a esta diversificação mundial, o Brasil também tem uma diversidade considerável em quase todas as regiões endêmicas, onde os sorotipos circulantes vieram diversificando-se ao longo da última década, com picos epidêmicos de mais de um sorotipo circulando no mesmo ano (Figura 13) (BARBOZA, 2013; SILVA, 2013).

Figura 13. Incidência de dengue com sinais alarme (FD) e dengue grave(FHD) no Brasil após a reintrodução viral em 1986.



Fonte: Adaptado de MARTINS et al., 2012.

## 2.3. A Dengue

### 2.3.1. Classificação

A dengue é caracterizada por quadro febril agudo, ocasionada pela presença de um dos cinco sorotipos virais existentes ao entrarem em contato com o hospedeiro. Entretanto, o padrão de infecção do novo sorotipo (DENV-5) ainda é alvo de estudos mais detalhados, uma vez que não se sabe exatamente quais sintomas este novo padrão viral pode manifestar em humanos (MUSTAFA et al., 2015).

O perfil infeccioso possui um amplo espectro clínico, variando desde uma infecção inaparente até um quadro clássico febril, ou evoluindo para formas mais graves da doença (GUBLER, 1998; ROSS, 2010; WRIGHT; PITT, 2012).

A OMS seguia uma classificação (1997) que dividia o quadro hemorrágico em quatro graus de gravidade: I, II, III e IV. No grau I, além dos sintomas iniciais, a prova do laço é positiva. No grau II estão presentes as características do grau anterior acompanhadas de hemorragias espontâneas, como sangramento de pele, gengivas entre outros. No grau III, o quadro é agravado pelo colapso circulatório com pulso fraco e rápido, hipotensão, pele pegajosa e fria, bem como inquietação. O grau IV

além de apresentar todos os sintomas dos graus anteriores, ainda há choque profundo, com queda de pressão arterial e pulso imperceptível (os dois últimos graus equivalem a sintomatologia de quadro choque), onde o paciente pode vir a óbito de 12 a 24 horas ou ter recuperação após terapia (WHO, 1997; 2009; BRASIL, 2011).

Devido a algumas dificuldades na antiga classificação quanto à distinção do quadro simples à variabilidade das formas mais graves, a OMS realizou uma mudança modificando alguns critérios médicos e laboratoriais na definição da doença e suas variações. Com isso, foi desenvolvido um estudo multicêntrico com a finalidade de promover uma nova classificação, gerando menos dúvidas no diagnóstico clínico do paciente acometido pelo vírus (SRIKIATKHACHORN et al., 2011). Enfim, em 2009 a OMS gerou uma nova proposta de classificação que é a mais atual (Tabela 1) (WHO, 1997; 2009).

Em especial, no Brasil, utilizando a epidemiologia local e em resultados de programas governamentais, como o Sentinela, qualquer caso de dengue não é mais enquadrado na antiga classificação (WHO, 1997). Desde 01 de março de 2014, o Ministério da Saúde incorporou dados da nova classificação no SINAN, embora dados de 2013 precisassem ter sido inseridos/atualizados para esta nova classificação até 28 de fevereiro de 2014 (BRASIL, 2014).

Tabela 1. Nova Classificação de dengue. Adaptado da Organização Mundial da Saúde. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.

Dengue com/sem sinais de alarme		Dengue Grave
<p><b>Dengue provável</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Morar ou viajar para área endêmica de dengue</li> <li>• Febre com mais 2 dos seguintes critérios:               <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Náuseas/vômito</li> <li>✓ Exantema</li> <li>✓ Artralgia e mialgia</li> <li>✓ Prova do laço+</li> <li>✓ Leucopenia</li> <li>✓ Algum sinal de alarme</li> <li>✓ Exame laboratorial (específico) confirmado</li> </ul> </li> </ul>	<p><b>Com sinais de alarme*</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dor abdominal</li> <li>• Vômito persistente</li> <li>• Evidência clínica de acúmulo de fluido</li> <li>• Sangramento em mucosa</li> <li>• Letargia/irritabilidade</li> <li>• Aumento do fígado &gt;2cm</li> <li>• Exame laboratorial inespecífico:               <ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Hematócrito simultâneo com</li> <li>↓ Plaquetas</li> </ul> </li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>*Exige observação rigorosa e intervenção médica</b></p>	<p><b>Extravasamento plasmático grave</b> evoluindo para:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Choque</li> <li>• Acúmulo de fluido com desconforto respiratório</li> </ul> <p><b>Hemorragia grave</b> (definido pelo médico)</p> <p><b>Envolvimento grave de órgãos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fígado: AST/ALT ≥ 1000</li> <li>• SNC: alteração da consciência</li> <li>• Coração e outros órgãos</li> </ul>

Fonte: Modificado a partir de WHO/TDR, 2009.

### 2.3.2. Manifestações clínicas da dengue

Os sintomas clínicos são similares, mas de gravidade variável, dependendo do sorotipo presente e de seu poder de patogenicidade. Outros aspectos inerentes a esta variabilidade são o estado imunológico do paciente, a idade e a carga genética do hospedeiro (GUBLER, 1998; TASSANEETRITHEP et al., 2003; MARTINS et al., 2012).

De acordo com a literatura, a infecção causada por um sorotipo confere uma memória imunológica contra os outros sorotipos, parcial ou temporária (três a seis meses), protegendo o paciente contra uma infecção cruzada (MURREL et al., 2011).

Os fatores individuais têm sido alvo de estudos em diversos grupos populacionais. Simmons (2007) reforça que crianças nascidas de mães que contrariam o vírus tem uma tendência de desenvolver a doença grave em infecções primárias. Outros pesquisadores afirmam que a raça negra tem uma proteção maior que a raça caucasóide em situações epidêmicas, como descritos em Cuba e na África (GUZMAN et al., 2000). Já Guha-Sapir; Schimmer (2005) suportam a ideia

que o sexo feminino tem se mostrado mais suscetível a desenvolver a forma grave da doença.

#### 2.3.2.1. Sintomatologia da Dengue

Qualquer paciente suspeito de dengue pode apresentar doença febril aguda, com duração de até sete dias, acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retro-orbitária, mialgias, artralgia, prostração ou exantema que podem estar vinculados ou não à presença de hemorragias (BRASIL, 2011).

#### 2.3.2.2. Dengue com sinais de alarme

Caracteriza-se por uma enfermidade aguda, com duração de 2 a 10 dias, com médias de cinco dias. Além dos sintomas já mencionados que podem se manifestar, ainda podem ocorrer complicações digestivas, como cólicas e dores abdominais (HENCHAL; PUTNAK, 1990; BRASIL, 2014).

Na infecção primária, a manifestação mais comum é o exantema (Figura 14). Pode vir acompanhada com erupção precoce, coincidindo com a fase virêmica e febril, estendendo-se do tronco até as extremidades, ou na erupção secundária a qual coincide com o reaparecimento da febre ou durante a defervescência. Este sintoma é caracterizado por um eritema difuso, formado por ilhotas de pele sã ou por uma erupção morbiliforme (CAUMES et al., 1995; KAUTNER et al., 1997).

O diagnóstico é realizado laboratorialmente, através de critérios clínicos e/ou epidemiológicos. No entanto, os primeiros casos a surgirem de uma epidemia numa determinada área deverão ter confirmação laboratorial (BRASIL, 2011). Manifestações hemorrágicas podem se apresentar neste tipo de situação através de sintomas como epistaxe, gengivorragia e hematúria (HENCHAL; PUTNAK, 1990, BRASIL, 2014).

Figura 14. Exantema petequial dos membros inferiores.



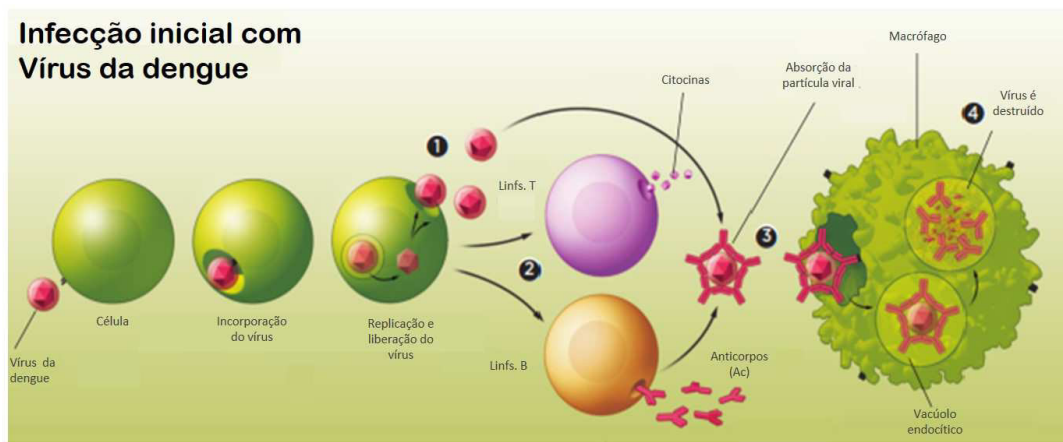
Fonte: Figura de paciente sobre relato de caso. Adaptado de OLIVEIRA et al., 2010.

#### 2.3.2.3. Dengue Grave

A partir do século XX, os cientistas têm observado que alguns indivíduos herdaram características as quais diferem em sua memória imunológica de acordo com a suscetibilidade ou não a algumas doenças, principalmente em algumas viroses.

Um único indivíduo pode ser acometido por todos os sorotipos virais, a partir do aparecimento de infecções sequenciais e/ou coinfeções, culminando na gravidade desta doença. A explicação pode estar na interação imunomediada de resposta do hospedeiro no combate ao vírus (WHITEHORN; SIMMONS, 2011), em que a presença de anticorpos não neutralizantes pode induzir ainda mais o processo de adsorção e sua replicação viral. Este processo foi chamado por Halstead (1970) de ADE, do inglês *antibody-dependent enhancement*, ou anticorpos potencializadores da infecção (Figura 15).

Figura 15. Mecanismo de ação de combate ao vírus da dengue através do sistema ADE (*Antibody-Dependent Enhanced*).



Fonte: Adaptado de *The Scientist*, 2013. *The method to the dengue virus maddening infectiousness.*

A teoria propôs que quando o paciente sofre uma segunda infecção por um sorotipo viral diferente pode apresentar uma maior probabilidade de desenvolver dengue grave. Halstead (1988) sugere que os anticorpos adquiridos de uma infecção prévia, sejam de forma ativa ou passiva (através da placenta), não neutralizariam o segundo sorotipo infectante, aumentando a facilidade de uma resposta cruzada com maior intensidade imunológica ou inflamatória.

A resposta interativa antígeno/anticorpo ainda pode desencadear uma resposta adaptativa e uma consequente permanência de células T de memória, aumentando a chance de internalização viral com consequente aumento de carga viral e mais inflamação (MCBRIDE; BIELFELDT-OHMANN, 2000; MONGKOLSAPAYA et al., 2003; MARTINS et al., 2012). Dentre outras teorias existentes que tentaram explicar a gravidade da doença, Rosen (1977) propôs associar a gravidade da doença à virulência da cepa adquirida com a infecção, devido a mutações ocorrentes em seu genótipo.

Desde a Teoria de Halstead, vários pesquisadores têm buscado compreender melhor os mecanismos moleculares que envolvem as respostas imunológicas de acordo com a etnia ou grupos populacionais, que reagem diferentemente a diversos agentes infecciosos. Embora a biotecnologia e outras áreas tecnológicas tenham auxiliado a produzir novas ferramentas que possibilitem analisar esta suscetibilidade, a maioria dos patógenos que estão envolvidos



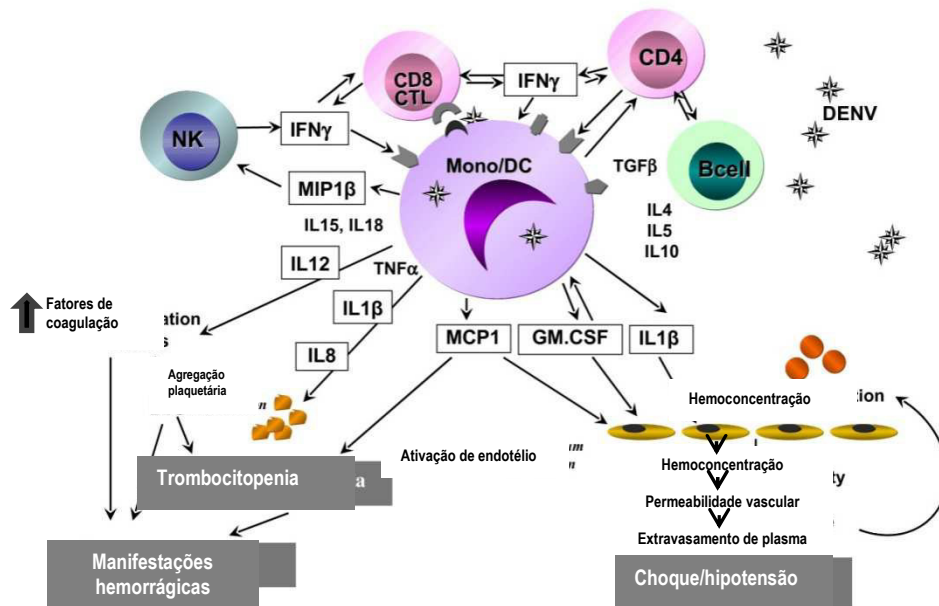
diretamente ou indiretamente a alguns genes humanos ainda não se encontram totalmente definidos (COFFEY et al., 2009).

A teoria mais atual, designada de multicasualidade apoia a ideia que a gravidade do quadro hemorrágico esteja relacionada não apenas a virulência da cepa, mas também ao hospedeiro e a fatores epidemiológicos. A variação viral está também relacionada com o sorotipo bem como a mutações no genótipo do vírus. Por sua vez, as características do hospedeiro humano variam como idade, sexo, raça, infecção secundária e imunocompetência, além da alta densidade vetorial, cocirculação de sorotipos diferentes e a hiperendemicidade intensificarem ainda mais a gravidade do quadro (GUZMAN; KOURI, 2002).

A suspeita de agravamento da forma hemorrágica ocorre entre o quarto e o sexto dia de enfermidade, associado a dores abdominais, hipotensão, tonturas, sangramento, entre outros (BRASIL, 2011). A confirmação pode ser realizada após o acompanhamento da doença por sete dias ou menos de febre, seguido da redução do número de plaquetas que podem desencadear a trombocitopenia ( $<100.000/\text{mm}^3$ ) (BRASIL, 2011).

A dengue grave se dá pela cascata de sinalização através dos linfócitos T e da exacerbação da liberação de citocinas, sobretudo as pró-inflamatórias, como as IL-1, IL-2, IL-6 e TNF (Fator de Necrose Tumoral) e de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13 (MCBRIDE; BIELFELDT-OHMANN, 2000; OLIVEIRA, 2011). O efeito sinérgico das citocinas no endotélio pode facilitar o extravasamento do plasma (Figura 16) (MCBRIDE; BIELFELDT-OHMANN, 2000).

Figura 16. Mecanismo de imunopatogênese da doença da dengue.



Fonte: Adaptado de BOZZA et al., 2008.

É visto também que o agravamento da doença não se dá apenas com a segunda infecção, uma vez que foi observado em pacientes com dengue grave durante a infecção primária. Isto pode ser ocasionado pela evolução genética do vírus, a qual desencadeia uma virulência maior em suas cepas, infectando mais células e causando uma maior inflamação alterando a resposta imunológica do hospedeiro (ROSEN, 1977; SINGHI et al., 2007).

Além dos sintomas já citados, podem aparecer ainda alterações neurológicas, insuficiência hepática, hemorragia digestiva volumosa, disfunção cardiorrespiratória, derrame pleural, pericárdico e ascite; índice de plaquetas inferior a  $20.000/\text{mm}^3$  ou de leucócitos menor ou igual a  $1.000/\text{mm}^3$  (BRASIL, 2011). Demais complicações severas podem ocorrer com comprometimento grave dos órgãos, como: dano hepático (AST e ALT > 1000), sistema nervoso central (alteração de consciência), coração (miocardite), entre outros órgãos (BRASIL, 2014).

### 2.3.3. Tipos de diagnóstico

#### 2.3.3.1. Diagnóstico diferencial

A clínica da dengue tem uma gama de manifestações de sinais e sintomas, a qual pode assemelhar-se a algumas viroses, como gripe, hepatites virais, rubéola, sarampo, malária, citomegalovirose, mononucleoses, entre outras. Nas formas mais agressivas (dengue grave), podem manifestar-se similarmente como doença de Kawasaki, febre tifoide, hantavirose, febre amarela, leptospirose, septicemia, meningite por influenza tipo B, miocardites, entre outras. (BRASIL, 2011). Por isso, faz-se necessário o diagnóstico para servir de auxílio no tratamento mais adequado para a doença da dengue.

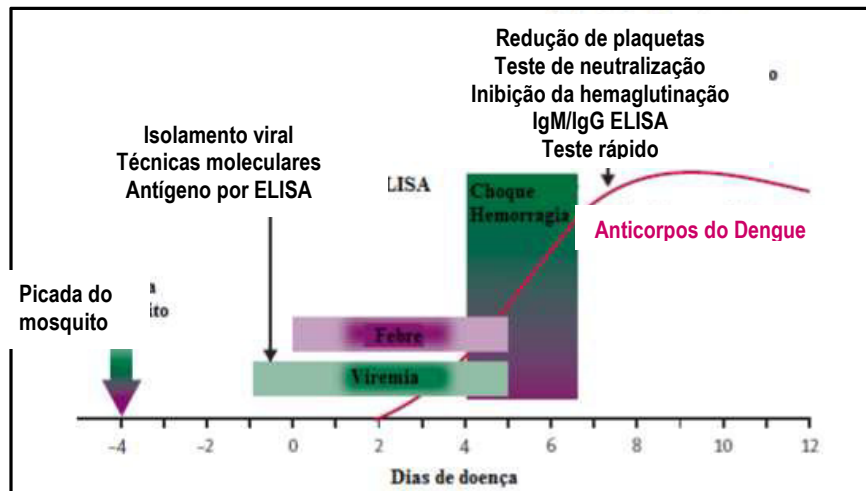
#### 2.3.3.2. Diagnóstico laboratorial

Este diagnóstico para a dengue pode ser realizado através de técnicas virológicas, sorológicas e moleculares (GUZMAN; KOURI, 1996; SHU; HUANG, 2004; VELATHANTHIRIA et al., 2006).

O vírus após entrar em contato com o hospedeiro infecta o plasma, sangue e tecidos, principalmente o sistema imune, entre 1-2 dias, e em até 5-7 dias, ingressa no período compreendido da fase febril (WHO, 2009; GUZMAN; KOURI, 2002; HALSTEAD, 2007).

Na fase inicial da doença, o diagnóstico pode ser realizado pelo isolamento viral, genoma viral ou pela detecção do antígeno. Já na fase final da doença, a sorologia é a escolha mais utilizada no diagnóstico (Figura 17) (GUZMAN; KOURI, 2004; HALSTEAD, 2007; WHO, 2009).

Figura 17. Progressão da doença da dengue X métodos de diagnóstico.



Fonte: Adaptado de Halstead, 2007.

#### 2.3.3.2.1. Isolamento viral

Esta técnica é realizada pela inoculação das amostras de soro em culturas celulares do mosquito *A. albopictus* (C6/36), seguida de imunoflorescência indireta, apresentando alta especificidade (GUZMAN; KOURI, 1996). A desvantagem é a demora do resultado, necessitando de 1-2 semanas para que seja concluído (SHU; HUANG, 2004; GUZMAN; KOURI, 2004).

#### 2.3.3.2.2. Diagnóstico molecular

Metodologias como RT-PCR ou PCR em tempo real, são largamente utilizadas para a detecção dos genes virais bem como a diferenciação dos sorotipos em amostras de soro na fase aguda da doença, acontecendo durante a viremia, nos cinco primeiros dias de sintomas (GUZMAN; KOURI, 2002; SHU; HUANG, 2004). A PCR ainda auxilia na análise do genoma viral, utilizando-se ainda de enzimas de restrição e sequenciamento de regiões deste genoma na finalidade de detecção de cepas virais e até de subgrupos geográficos (VORNDAM, KUNO, 1997). Teste de alta especificidade e sensibilidade, também tem um resultado rápido (entre 24 e 48h). A desvantagem é o alto custo dos equipamentos e reagentes, bem como de experiência técnica a fim de ter ótimo controle de qualidade “zero” de contaminação (SHU; HUANG, 2004, HALSTEAD, 2007). A PCR em tempo Real permitiu a

amplificação de regiões genômicas, através da detecção do fragmento amplificado por fluoróforos. A rapidez no diagnóstico e o menor risco de contaminação são as principais vantagens encontradas nesta técnica (NIESTERS, 2001).

#### *2.3.3.2.3. Diagnóstico sorológico*

Ainda é o mais utilizado por ser mais barato e de fácil execução, comparado com as técnicas citadas anteriormente (GUZMAN et al., 2010). Podem-se citar: inibição de hemaglutinação (IH),afixação de complemento (FC) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). A IH é realizada para diagnosticar uma infecção a partir de reações de amostras pareadas com a finalidade de inibir a aglutinação de eritrócitos pela neutralização do vírus com anticorpos presentes no soro do paciente(GUZMAN; KOURI, 1996).

O método FC tem por finalidade detectar moléculas de complemento que são consumidas em uma reação antígeno-anticorpo impedindo a lise de hemácias por este complemento. Este teste é mais específico em infecções primárias, colaborando na determinação do sorotipo da dengue (GUBLER, 1998).

A detecção de anticorpos IgM pode ser realizada na primeira semana da doença, os quais persistem ainda durante dois meses. Já os anticorpos IgG, são produzidos a partir do 4º dia após a infecção, atingindo altos níveis em duas semanas, mantendo-se detectáveis por décadas, os quais conferem imunidade para toda a vida deste sorotipo (HALSTEAD, 1970; GUZMAN; KOURI, 2002; GUZMAN; KOURI, 2004). Entretanto, a detecção pelo método em questão é mais utilizada quando a doença está em sua fase aguda e tardia (do 5º dia da sintomatologia em diante) (GUBLER, 1998; GUZMAN; KOURI, 2004). Estes anticorpos são visualizados a partir do sétimo dia de infecção primária, embora seja detectado antes desta data quando a infecção é recorrente (GUBLER, 1998).

Outro procedimento é a visualização da presença de antígenos virais, no sangue, nos tecidos humanos ou no mosquito. O antígeno NS1 é uma glicoproteína não estrutural do vírus altamente conservada, cuja expressão fica amplamente nítida em células infectadas, desde o primeiro ao nono dia após o aparecimento da febre (fase aguda da infecção). É considerado um importante agente causador de reação imunológica, estando presente em altas concentrações em soro de pacientes infectados com o vírus (ALCON et al., 2002). A técnica mais utilizada para sua

detecção é a ELISA, possuindo alta sensibilidade, baixo custo e pouca complexidade para realizá-la, e seu resultado sai relativamente rápido. Centros especializados em saúde, laboratórios públicos e hospitais são os que mais realizam este procedimento (SILVA et al., 2011). A técnica de NS1 é realizada durante a viremia, diferentemente dos outros métodos que podem ser realizados após este quadro virêmico.

#### 2.3.3.3. Diagnóstico inespecífico

Os métodos inespecíficos são utilizados com a finalidade de monitorar a forma mais grave da doença. Embora ainda se dê uma importância coletiva maior deste tipo de diagnóstico como forma de medida de controle e de tratamento diante do perfil epidemiológico desta doença (OLIVEIRA et al., 2009; BRASIL, 2011).

#### Hemograma

Os pacientes diagnosticados por dengue com complicações (DCC) apresentam geralmente leucopenia, com observações de linfocitose com atipia linfocitária, bem como frequente presença de trombocitopenia (plaquetas abaixo de  $100.000/\text{mm}^3$ ) (VERONESI; FOCACCIA, 2010).

Os pacientes com quadro grave apresentam algumas diferenças, variando desde uma leucopenia a uma leucocitose leve. A linfocitose com atipia linfocitária é presença marcante nos exames destes pacientes. Ainda há um aumento de 20% de hematócrito do valor basal (valor de referência anterior a doença), ou até valores absolutos superiores a 38% em crianças, 40% em mulheres e 45% em homens, com possibilidade de ocorrência de trombocitopenia associada. A contagem de plaquetas, o hematócrito e a albumina são utilizadas como marcadores de gravidade (BRITO et al., 2007; VERONESI; FOCACCIA, 2010).

As transaminases e as aminotransferases são enzimas necessárias à conversão de aminoácidos. É um indicador de dano hepatocelular devido, principalmente, a infecção viral. A ureia também sintetizada no fígado a partir da amônia, também é outro indicador de gravidade, uma vez que quando a infecção está presente, seus níveis estão aumentados. A albumina e a creatinina também

podem ser utilizadas para detectar a gravidade da infecção (NEMER; NEVES, 2010).

O coagulograma é outro exame que avalia os diferentes níveis de coagulação do sangue. É constituído pelo tempo de sangria, contagem de plaquetas, tempo de protrombina e tempo parcial de tromboplastina ativado. O tempo de sangramento é analisado através do método de Ivy, que ao se fazer uma incisão na pele, as plaquetas irão agir no local da lesão formando um coágulo através da adesão, agregação e secreção de substâncias que auxiliam na manutenção do equilíbrio do sistema hemostático do sangue, medindo qualitativamente as plaquetas do indivíduo. O tempo de protrombina é a medida de tempo, em segundos, para que haja a formação de coágulo de fibrina após a adição de tromboplastina cálcica, em plasma citratado, para posteriormente determinar o tempo de formação do coágulo (WILLIAMSON; SNYDER, 2003). Estes parâmetros podem ter seus valores aumentados consideravelmente na dengue (OLIVEIRA et al., 2009).

#### Prova do laço

A prova do laço (PL) deve ser realizada em todos os casos suspeitos de dengue. Esta técnica é importante para triar pacientes suspeitos de dengue, pois é a principal característica hemorrágica do quadro grave devido à fragilidade capilar. A PL além de reforçar o diagnóstico de dengue, deve servir de alarme ao médico a realizar testes laboratoriais a fim de auxiliar no monitoramento de casos mais graves da dengue. Verifica-se a pressão arterial (PA), medindo o valor médio, seguindo os passos adiante: insufla o manguito até o valor médio obtido e se esperam 5 minutos em adultos e 3 minutos em crianças. Posteriormente desenha-se um quadrado de 2,5 cm no antebraço do paciente e conta o número de petéquias apresentadas dentro da marca. Caso haja 20 ou mais petéquias, o resultado é positivo. Em pessoas obesas, esta prova pode ser negativa durante o choque (BRASIL, 2011).

#### 2.3.3.4. Tratamento da dengue

A dengue é uma doença com graus variados de gravidade, o qual o paciente pode evoluir rapidamente de um estágio para outro. O diagnóstico precoce dos sinais de alarme, o monitoramento contínuo e a reposição hídrica constante

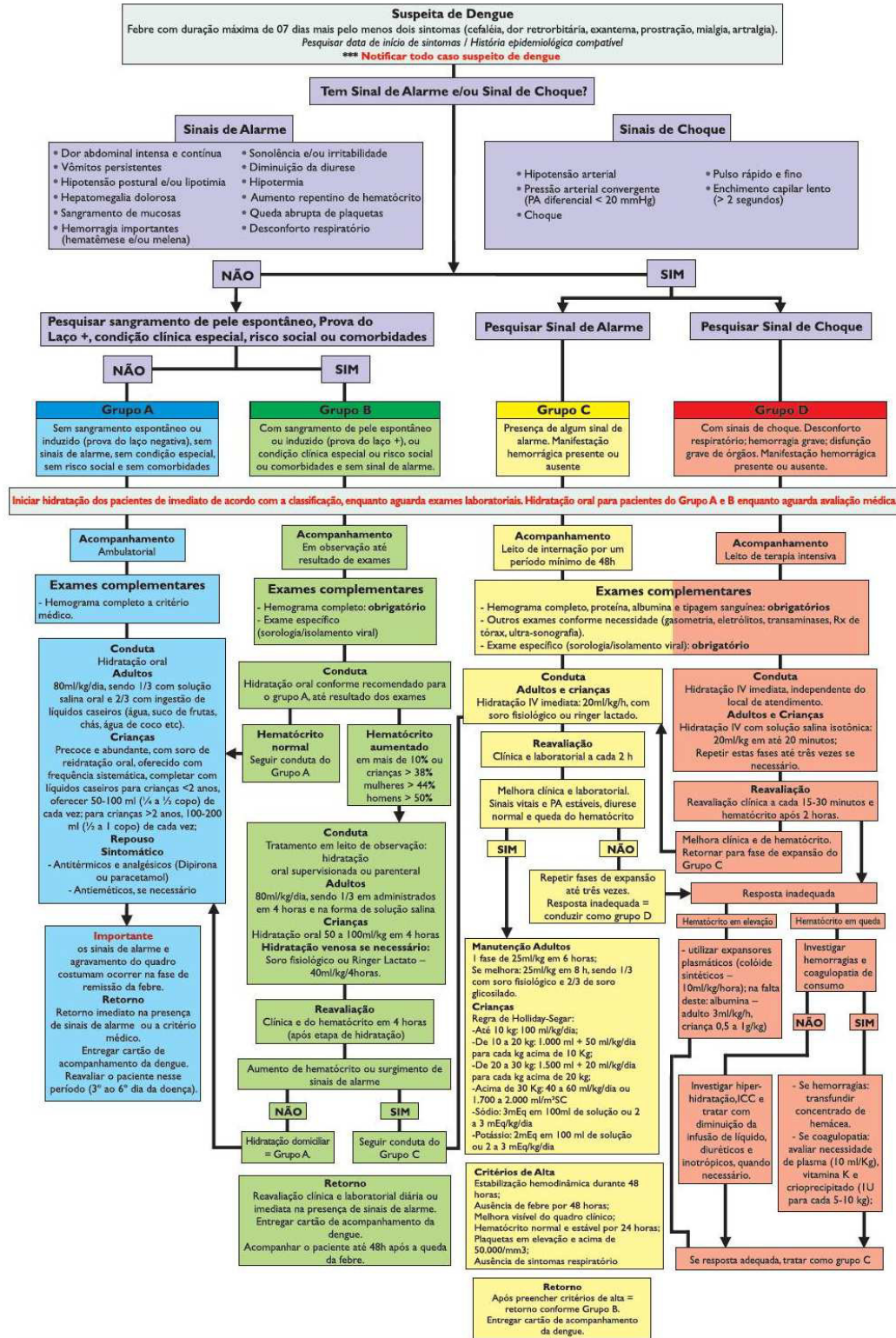
favorecem a redução dos graus de severidade, diminuindo o risco de óbito (BRASIL, 2011).

O tratamento sintomático é através de antitérmicos e analgésicos, evitando-se os salicilatos e os anti-inflamatórios não hormonais com o intuito de combater manifestações hemorrágicas e acidose. O paciente deve hidratar-se e ter repouso. Desde 2002, o Brasil adota o estadiamento clínico, com a finalidade de induzir uma intervenção correta para cada sintomatologia, evitando a mortalidade do paciente (SINGHI et al., 2007; BRASIL, 2011).

A conduta de tratamento para pacientes dos grupos A e B (com/sem sinais de alarme) é realizada ambulatoriamente, adicionado de hidratação oral, antipiréticos e analgésicos. Já os pacientes dos grupos C e D (sinais de choque) devem ser acompanhados em unidades de urgência e emergência, com supervisão médica contínua e hidratação venosa (Figura 18) (BRASIL, 2011).



Figura 18. Fluxograma de classificação de risco de dengue em unidades específicas para tratamento e suas respectivas condutas clínicas.



Fonte: Adaptado de Classificação de Risco e Manejo do paciente, Ministério da Saúde (BRASIL, 2014).

## 2.4. Resposta inflamatória mediada pela dengue

### 2.4.1. Células Dendríticas

A ocorrência da doença surge através da infecção primária e/ou secundária pelo vírus da dengue. A resposta primária acontece quando o indivíduo nunca foi exposto ao vírus e o combate ao mesmo dá-se de forma lenta e graduada. Já na resposta secundária, os anticorpos quantitativamente elevam-se rapidamente como resposta de memória quanto ao vírus acometido anteriormente (ABE ET AL., 2012; GARCÍA-MARQUEZ et al., 2013).

A competência das células dendríticas (CDs) na captura, processamento e transporte de antígeno até os linfonodos é exequível quando entra em contato com o antígeno. Uma vez nos linfonodos, estas células irão apresentar aos linfócitos T, via complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*: MHC) de classe I ou II, os antígenos dos microrganismos invasores. É através deste reconhecimento que é constituído a resposta imune adaptativa (DEJNIRATTISAI et al., 2008).

A resposta imune inata é induzida rapidamente e atua como o primeiro mecanismo de defesa até que a resposta imune adaptativa específica comece a produzir seu papel. De acordo com alguns estudos, foi demonstrado que existem diferenças imunológicas mediadas por anticorpos, por linfócitos T e por citocinas através de pacientes infectados com DENV e suas associações (SENEVIRATNE; MALAVIGE et al., 2006).

Já as células imune adaptativas, incluem os linfócitos B e T (MAYER, 2014). O processo de maturação dos linfócitos T envolve a expressão de um receptor de célula T (do inglês, TCR- *T cell receptor*) funcional e das moléculas CD4 e CD8. Estas moléculas são ativadas quando o antígeno é apresentado. Dentre as formas existentes de respostas auxiliares (Th, sigla do inglês *T helper*) envolvidas em processos infecciosos são os do tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2) (LORENZI et al., 2012).

Alguns pesquisadores demonstraram que pacientes quando infectados por DENV, as células Th elaboram uma resposta com padrão Th1 no começo da

infecção e sustentam até o desenvolvimento da doença. A manifestação é mais branda do que as que mudam o padrão para Th2 ao longo de sua infecção, apresentando um maior risco à evolução da gravidade da doença (quadros hemorrágicos e choque) (LIBRATY et al., 2001).

O desenvolvimento diferenciado da sintomatologia da dengue pode estar relacionado à diferença morfofisiológica das CDs em reprimir a infecção, fazendo com que ocorra uma maior severidade a doença. Outra forma de desenvolvimento da doença está também associada no bloqueio da Interferon tipo I (INF-I, sigla em inglês), desencadeando uma ativação da replicação viral concomitantemente a uma limitação do sistema imune inato em combater este vírus (NAVARRO-SÁNCHEZ et al., 2005).

As formas mais graves da doença podem estar associadas tanto nas infecções primárias como nas secundárias e devem-se ao fato de uma resposta imune atípica de ativação de linfócitos T, de produção de citocinas e por problemas homeostáticos (NAVARRO-SÁNCHEZ et al., 2005). Por exemplo, indivíduos com dengue grave possuem macrófagos totalmente infectados e com produção de viremia aumentada. O aumento das células de defesa pode ocorrer através do estímulo da proteína conhecida como Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), que é ativada pelos linfócitos tipo CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ao entrarem em contato com os epítopos virais do dengue. O intuito desta proteína é induzir a eliminação de macrófagos infectados ou aumentar a produção exacerbadamente de outras proteínas, como as citocinas.

Outro exemplo é a citocina conhecida como Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ , sigla do inglês, *Tumor Necrosis Factor*), que em níveis altos, induz a produção de CXCL8 (precursora da Interleucina-8) e acaba afetando as células endoteliais, liberando histamina dos basófilos, bem como aumentando e contribuindo com a trombocitopenia, através do aumento da permeabilidade vascular. Todo este processo causa uma síndrome de extravasamento capilar sem destruição endotelial, causando hipotensão e graves hemorragias (FONSECA et al., 2006).

O DENV consegue ser um grande indutor de INF-I, mediado pelo reconhecimento viral via padrão de reconhecimento dos receptores, combatendo, com isso, o vírus na fase aguda da doença. Entretanto, algumas CDs não conseguem efetuar com êxito este processo, bloqueando a produção INF-I pelo DENV, e contribuindo com o agravamento da doença (RODRIGUEZ-MADOZ et al., 2010).

As células Th1 e Th2, com atividades imunossupressoras específicas, são mediadas por citocinas. Estas são proteínas solúveis secretadas pelas Th, compreendidas em uma única cadeia polipeptídica. São controladas e liberadas por inibidores e receptores, onde são rapidamente secretadas. Estas ainda podem atuar sobre as células que as produziram, autoestimulando sua própria produção e auxiliando na produção de outras citocinas (ABBAS, 2012).

As Th1 produzem as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , as quais são responsáveis pela manutenção da resposta imune celular. A IL-2 ativa os receptores dos linfócitos CD4<sup>+</sup>, estimulando a formação de células clonais, cuja responsabilidade é à manutenção da produção de citocinas e, paralelamente, exibe o aumento da produção das células NK (sigla em inglês, *natural killer*), potencializando a produção de IFN- $\gamma$ . Este, por sua vez, aumenta a produção de TNF- $\alpha$ , que maximiza a ação macrófágica, atuando através de um efeito sinérgico cíclico (ANTAS et al., 2004).

Já as Th2 são responsáveis pela síntese das IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e a IL-13, estando associadas com a produção de anticorpos dos linfócitos B. Estas células auxiliares estão ligadas a uma alta expressão de citocinas, enquanto as Th1 têm um efeito de resposta mais retardado. Em infecções virais, como dengue, herpes simples e influenza, a resposta Th1 está mais ligada à recuperação da viremia, enquanto a Th2 está associada à severidade da doença (GUPTA; CHATUVERDI, 2009).

#### 2.4.2. Citocinas

As citocinas são subdivididas em pró-inflamatórias, aumentando a produção e a atividade de outras citocinas na resposta inflamatória, como IL-1, IL-2, IL-6 e TNF, e as anti-inflamatórias, que atenuam esta resposta inflamatória, como a IL-4, IL-10, IL-13 e FTC- $\beta$  (Fator transformador de crescimento  $\beta$ ) (LIN et al., 2000).

Estas citocinas podem ser liberadas tanto de monócitos como de macrófagos na infecção de DENV. As concentrações séricas de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$  são muito elevados nos primeiros três dias de infecção, enquanto IL-10, IL-4, IL-5 manifestam-se tardiamente. Contudo, foram vistos níveis de IL-13 e IL-18 mais altos em estudos de indivíduos com dengue grave (MALAVIGE et al., 2004).

Entre estas citocinas, cinco foram selecionadas para o presente estudo pelos seus respectivos genes (*IL-1 $\beta$*  -511C>T, *IL-1RN* 86 pb VNTR, *IL-6* -174 G>C, *IL-10* -

819C>T e *TNF- $\alpha$*  -308G>A), sendo analisadas isoladamente e em associações quanto ao risco de desenvolver a dengue nos pacientes inseridos na pesquisa.

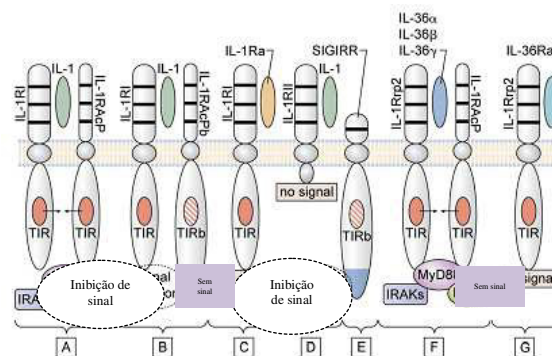
#### 2.4.2.1. Interleucina 1

A família IL-1 é constituída por citocinas multifuncionais atuando na inflamação e na resposta imunológica (TAYLOR et al., 2004). São produzidas por monócitos, macrófagos e neutrófilos, bem como células epiteliais, CDs, queratinócitos da pele, fibroblastos gengivais e dérmicos, como também células B (DELALEU; BICKEL, 2004).

É constituído por três membros, sendo dois polipeptídios, *IL-1 $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$* , e sintetizados sob a forma de uma pró-proteína de 31 kDa, que posteriormente é clivada por enzimas específicas em proteínas maduras e ativas com aproximadamente 17 kDa (DELALEU; BICKEL, 2004). O terceiro membro da família é denominado de antagonista do receptor IL-1 (IL-1Ra), proteína de 18kDa, e que compete com os demais receptores das outras interleucinas, interferindo em suas funções (BERDELLI et al., 2006).

O gene *IL-1* está presente no braço longo do cromossomo 2 humano, formado por um peptídeo precursor e pode ser ativado por processamento proteolítico (Figura 19) (EL-OMAR et al., 2001; DINARELLO, 2009).

Figura 19. Sinalização e inibição dos receptores da família IL-1.



Fonte: Adaptado de DINARELLO, 2009.

A IL-1 $\beta$  é produzida por monócitos, macrófagos e neutrófilos, podendo também ser produzida pelas células B e NK. Diferentemente da *IL-1 $\alpha$* , a *IL-1 $\beta$*  é sintetizada na forma inativa e posteriormente ativada pela caspase-1 e secretada por

via não convencional de proteína, agindo de forma parácrina ou sistêmica (WEBER et al., 2011).

Existe uma grande associação de *IL-1 $\beta$*  em pacientes com febre na primeira semana da doença. Na severidade da doença estes níveis mostram-se mais elevados tanto desta IL, como *TNF- $\alpha$*  e *IFN- $\alpha$*  (FIGUEIREDO, 1999; CHATUVERDI; NAGAR, 2009).

#### 2.4.2.2. Interleucina de receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra)

É um receptor pró-inflamatório, produzida pelo gene *IL-1RN*, que se liga competitivamente ao receptor da IL-1 impedindo a ativação de células-alvo. Então, a proteína IL-1Ra produzida age modulando negativamente os efeitos dos IL-1a e IL-1B (AL-MOUNDHRI et al., 2006).

A IL-1Ra é produzida pelas mesmas células que sintetizam as outras heteroformas da IL-1 (Figura 19). A IL-1Ra apresenta três isoformas intracelulares e uma isoforma que é secretada (sIL-1Ra). Esta inibe as respostas mediadas pelas IL-1a e IL-1B, atuando, com isso, como uma anti-inflamatória (AREND, 2002).

Estudos afirmam que concentrações plasmáticas de IL-1Ra em doenças infecciosas são amplamente elevadas, chegando até 100 vezes do quantitativo da IL-1B. A taxa de IL-1B/IL-1Ra é suportada de forma crítica a fim de determinar a gravidade da reação inflamatória (SANTILLA et al., 1998).

#### 2.4.2.3. Interleucina 6

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica produzida pelas respostas imunes inata e adaptativa dos linfócitos B e T, macrófagos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais bem como entre células tumorais (VAN SNICK, 1990).

Esta IL não é constitutivamente expressa, embora ative a resposta de outras citocinas inflamatórias, como IL-1 e *TNF- $\alpha$*  nas infecções virais. O gene que produz a *IL-6* está presente no cromossomo 7p21 (TERRY et al., 2000; JUFFRIE et al., 2001).

A atividade biológica normal desta IL está associada a respostas imunológicas, hematopoese e reações de fase aguda. Falhas de expressão de *IL-6* têm sido também associadas à mielomas, plasmocitomas e doenças inflamatórias crônicas (NAKA et al., 2002).

Esta é uma das citocinas que mais estimula a síntese de proteínas na fase aguda da inflamação, como a proteína C reativa, mesmo em resposta a diferentes estímulos (GABAY; KUSHNER, 1999).

A IL-6 está envolvida com outras citocinas pró-inflamatórias, potencializando o processo de ativação da coagulação, e auxiliando na diminuição da expressão de outras citocinas, como a TNF- $\alpha$  e seus receptores, como também induzindo a febre (MARTINA et al., 2009). Têm sido encontradas altas concentrações desta IL no extravasamento de plasma e no desenvolvimento de choque hipovolêmico (OGAWA; GRANT, 2007).

#### 2.4.2.4. Interleucina 10

Esta IL também tem um efeito pleiotrópico, no que diz respeito à imunorregulação e a inflamação. Também pode ter uma função imunossupressora que pode ocasionar uma maior resistência ao bloqueio de IFN, demonstrando um aumento na infecção e na febre aguda da dengue (TSAI et al., 2013).

O gene *IL-10* está presente no cromossomo 1q31-32 e alguns estudos relataram que os níveis de IL-10 são elevados quando comparados em diferentes idades (crianças, adultos e idosos), obtendo uma correlação positiva ao agravamento da doença da dengue (AZEREDO et al., 2001; LIN et al., 2003; BUTTHEP et al., 2012).

Esta gravidade está associada ao extravasamento de plasma e até culminando em derrames pleurais, bem como a diminuição de plaquetas ocasionando a trombocitopenia (GREEN et al., 1999; AZEREDO et al., 2001; LIBRATY et al., 2002; BRASIER et al., 2012). Embora alguns casos tivessem sido mais relatado sem estudos após a viremia, o aumento da IL-10 auxilia também na redução do quadro febril de alguns pacientes (LIBRATY et al., 2002).

O nível de IL-10 é bem maior nas infecções secundárias do que em infecções primárias, e devido ao fato de estar ligado diretamente a reinfecções, esta IL é considerada um bom marcador para estudos de severidade da doença da dengue (BRASIER et al.; BUTTHEP et al., 2012).

#### 2.4.2.5. Fator de Necrose Tumoral (TNF)

A TNF é a citocina mais estudada em estudos de associação com doenças infecciosas, sendo produzida pelos monócitos, macrófagos ativados e células T (HIRANO et al., 1989). O locus é formado por quatro genes em *tandem*: Linfotóxina alfa ( $LTA-\alpha$  ou  $LTA$ ), Linfotóxina beta ( $LT-\beta$ ), Fator de Necrose Tumoral ( $TNF$ ) e o gene de transcrição específica de leucócitos ( $LST1$ ). O gene  $TNF$  encontra-se ainda localizado na classe III do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) no braço curto do cromossomo 6, região 21 (Figura 23) (BAYLEY et al., 2004; VALENTE et al., 2009).

A  $TNF-\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória com propriedades imunomoduladoras, onde mediam resposta imunológica compartilhando inúmeras atividades biológicas (MEENAGH et al., 2002). Sinergicamente, o  $TNF-\alpha$  participa com a IL-1 dos processos de inflamação aguda, de coagulação intravascular, estímulo de adesão de neutrófilos e monócitos em células endoteliais, auxiliando na formação de trombos que ocorrem na atividade de pró-coagulante de  $TNF-\alpha$ . Esta inibe a proteína C e a proteína anticoagulante (trombomodulina), atingindo o bloqueio de dissolução da fibrina (MANTOVANI et al., 1997).

Esta IL pode elevar seus níveis de expressão, uma vez que esta exacerbação pode desencadear um risco maior no desenvolvimento de doenças inflamatórias graves ocasionando danos teciduais intensos (BOMBELL; MCGUIRE, 2008). No entanto, não existe um padrão definido para qualificar níveis elevados de  $TNF$ , pois em alguns casos depende da etnicidade e de associações com outras citocinas para diagnosticar o grau de risco deste gene e suas respostas metabólicas (MEENAGH et al., 2002).

Por isso, o  $TNF-\alpha$  é crucial ao entendimento, diagnóstico e suscetibilidade de algumas doenças infecciosas como a dengue. Alguns pesquisadores também demonstraram níveis elevados desta citocina e da  $LTA$  no plasma de indivíduos com malária grave, bem como a suscetibilidade à gravidade da dengue em pacientes de diferentes grupos étnicos da Tailândia (BETHELL et al., 1998; GAGNON et al., 2002; CLARK et al., 2009).



### 2.4.3. Polimorfismos genéticos

A exposição ao vírus da dengue gera uma variedade de respostas imunológicas controladas geneticamente no ser humano. Estudos recentes confirmam que Polimorfismos de Nucleotídeo Único (do inglês, *single nucleotide polymorphism* - *SNP*) de genes responsáveis pela imunomodulação e envolvidos pela entrada e replicação viral podem ter um importante papel na suscetibilidade e resistência à dengue ou levar a severidade da doença (MOREIRA et al., 2008; HARAPAN et al., 2013; XAVIER-CARVALHO et al., 2013).

Além desta doença, outras arboviroses são investigadas por *SNPs*, mas com menor intensidade quando comparado com a dengue. Algumas citocinas foram associadas ao risco de desenvolver doenças como a febre chikungunya, febre do Nilo ocidental, encefalite japonesa, entre outras. Na grande maioria, o envolvimento de alguns polimorfismos é maior em estudos de associações a severidade para estas enfermidades (ARJONA et al., 2011; PUJHARI et al., 2012; CHIRATHAWORN et al., 2013; LOEB, 2013; VENUGOPALAN et al., 2014)

Quando se trata de dengue, a presença de alguns genótipos de citocinas que codificam moléculas envolvidas na resposta imune influencia diretamente no combate à infecção do DENV (STEPHENS, 2010; TUMANGGER; JAMIL, 2010). A variação polimórfica pode culminar na diferenciação sintomatológica da doença, demonstrando uma flexibilidade maior na resposta imune do hospedeiro (SWAMINATHAN; KHANNA, 2009).

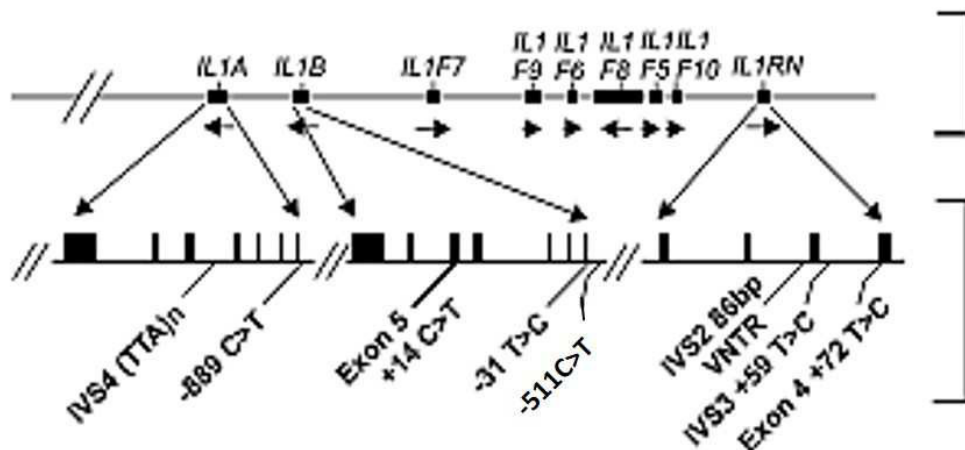
Com isso, o estudo de *SNPs* associados a citocinas podem auxiliar no desenvolvimento de práticas intervencionistas na terapia e na prevenção contra doenças como a dengue em diversos países endêmicos, como no Brasil.

#### 2.4.3.1. *SNPs* no gene *cluster IL-1 $\beta$* e seu antagonista (*IL-1RN*)

O gene *IL-1 $\beta$*  apresenta dois *SNPs* bastante estudados na região promotora, posição -511 e -31 (PEREZ-PEREZ et al., 2005). Apresentam ainda um forte desequilíbrio de ligação, embora tenham demonstrado resultados similares em alguns estudos de associação (SMITH; HUMPHRIES, 2009). Entre estes, o mais estudado é o -511 (rs16944), onde o alelo T está relacionado ao polimorfismo deste gene e a produção aumentada da proteína IL-1B (Figura 20) (MARTINA et al., 2009).

Estudos como o de Sa-Ngasang e colaboradores (2014) investigando o gene *IL-1 $\beta$*  (-31 C>T) associado ao gene *IL-1RN* VNTR de 86 pb (do inglês, *Variable Number Tandem Repeat*) em pacientes tailandeses com dengue, encontraram risco de desenvolver dengue grave quando os pacientes portavam o alelo C e o genótipo heterozigoto \*2/L.

Figura 20. Organização gênica da *IL1A*, *IL1 $\beta$*  e do *IL-1RN* e seus respectivos SNPs.



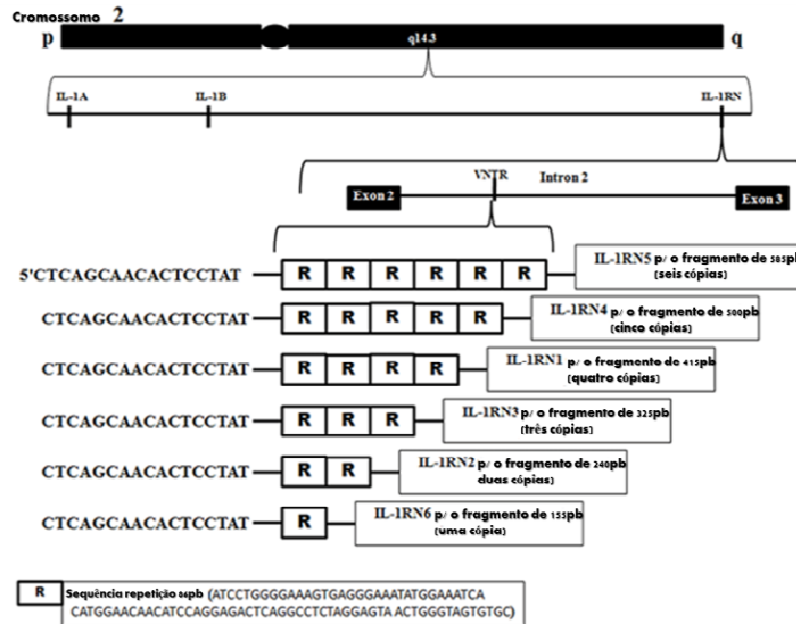
Fonte: Adaptado de Smith et al., 2004.

Por sua vez, o *IL-1RN* possui umas das regiões polimórficas mais utilizadas em estudos de associação. Está localizado no íntron 2, a qual tem número variável em repetições em tandem (VNTR, sigla em inglês, *Variable Number Tandem Repeat*) de 86 pb, onde cinco alelos foram relatados correspondente a 2, 3, 4, 5 e 6 cópias de alelos.

O alelo com 2 repetições está associado com o aumento de níveis plasmáticos (TUMANGGER; JAMIL, 2010). Portanto, indivíduos com este polimorfismo possui uma resposta pró-inflamatória mais severa do que outro polimorfismo deste mesmo gene. Alguns estudos ainda têm mostrado que o polimorfismo com 2 alelos demonstra associações negativas com doenças infecciosas (Figura 21) (WITKIN et al., 2002).

Entretanto, em estudos realizados no Vietnã, não foi encontrado nenhuma diferença em alguma frequência alélica em relação a estes polimorfismos entre pacientes com dengue grave e controle (LOKE et al., 2002).

Figura 21. Diagrama esquemático do gene *IL1RN* mostrando a posição do polimorfismo VNTR juntamente com vários alelos.

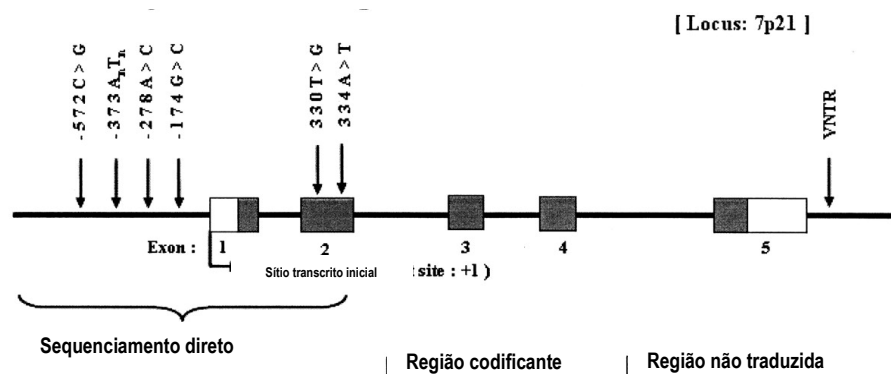


Fonte: Adaptado de Jaiswal et al., 2012.

#### 2.4.3.2. SNPs no gene *IL-6*

O gene *IL-6* é detentor de sete *SNPs*, onde quatro encontram-se em sua região promotora (-597, -572, -373 e -174). Dentre estes polimorfismos, o último é o que se encontra mais associado a doenças infecciosas (Figura 22) (HOLLEGAARD; BIDWELL, 2006).

Figura 22. Representação esquemática do *IL-6*



Fonte: Adaptado de BOIARDI et al., 2006.

Em alguns estudos, o *IL-6* (-174G>C) tem sido observado em associações de severidade da doença (PINTO et al., 1999; RESTREPO et al., 2008; XAVIER-

CARVALHO et al., 2013). Entretanto, alguns trabalhos envolveram este polimorfismo como marcador de proteção para dengue com complicações (RESTREPO et al., 2008; MOREIRA et al., 2008). Não se sabe ainda como ocorre esta proteção contra a doença, visto que a prevalência é de associação ao risco de desenvolver dengue ou levar a sua severidade (PINTO et al., 1999; RESTREPO et al., 2008; PEREZ et al., 2010; XAVIER-CARVALHO et al., 2013).

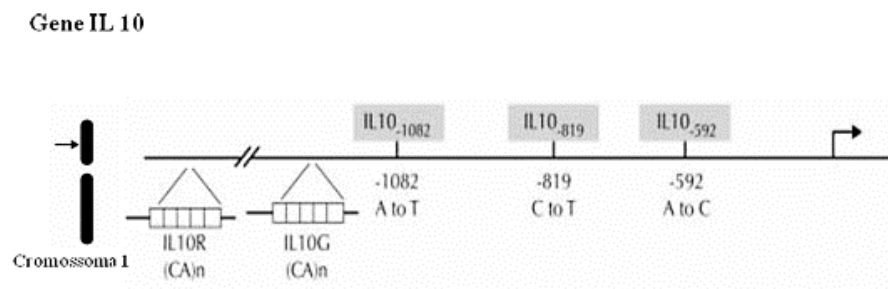
Níveis polimórficos da *IL-6* -174G>C também foram associados a diversas doenças inflamatórias e outras doenças humanas (VISENTAINER et al., 2008), como aterosclerose (LIMA, 2012), doenças cardiovasculares (HUMPHRIES et al., 2001), doenças infecciosas (MOREIRA et al., 2008), cânceres (COZEN et al., 2004), dentre outras.

#### 2.4.3.3. SNPs no gene *IL-10*

O gene *IL-10* possui vários polimorfismos descritos, principalmente os que estão na região promotora (por exemplo, -1082, -819, -592), e entre estes o mais associado a infecções virais é o -819 C>T, como também em alguns estudos epidemiológicos (Figura 23) (AZEREDO et al., 2001; LIBRATY et al., 2002; LIN et al., 2003; SOUSA, 2010; BUTTHEP et al., 2012; BRASIER et al., 2012).

Um destes estudos é o de Perez e colaboradores (2010) onde encontraram o alelo A do *TNF- $\alpha$*  (-308G>A) associado com diferentes haplótipos de três polimorfismos de *IL-10* (-1082G>A / -819C>T / -592C>A) e que foram relacionados ao risco de desenvolver dengue grave em pacientes cubanos.

Figura 23. Polimorfismos existentes no gene *IL-10* associados a doenças.



Fonte: Adaptado de KNIGHT, 2001.

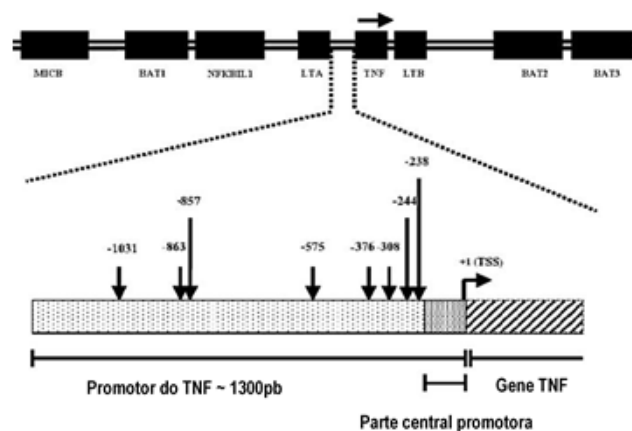
#### 2.4.3.4. SNPs no gene *TNF- $\alpha$*

O gene *TNF* possui oito SNPs localizados na região promotora deste gene (Figura 24) e caracterizam-se, na sua grande maioria, pela substituição de guanina (G) por adenina (A) (KNIGHT, 2001). Dois destes polimorfismos influenciam os níveis de produção desta citocina, a primeira compondo a troca de G>A na região promotora do *TNF* (-308) e o outro de mesma troca, mas na posição intrônica do gene LTA (+252) (MEENAGH et al., 2002).

Em muitos estudos, o alelo *TNF- $\alpha$*  -308 é encontrado com menor frequência e associado a uma elevada produção desta citocina, podendo aumentar em até seis vezes seus produtos metabólicos (WILSON et al., 1997). Por isso, algumas pesquisas têm suportado que pacientes com genótipo AA detêm de níveis elevados de *TNF- $\alpha$*  no plasma, e que geralmente podem conferir uma maior resistência a infecções.

O *SNP* -308G>A é o mais estudado em dengue, embora a maioria em pacientes com dengue grave (MOREIRA et al., 2008; PEREZ et al., 2010; XAVIER-CARVALHO et al., 2013; SAM et al., 2015). Entretanto, García-Trejo e colaboradores (2011) investigando a suscetibilidade em pacientes mexicanos não encontraram resultados significativos no -308G>A, mas evidenciaram um papel protetor na presença do alelo A do *SNP* -238G>A no desenvolvimento da dengue.

Figura 24. Representação esquemática de localização do *TNF* no interior do complexo MHC, com seus princípios polimorfismos da região promotora.



Fonte: Adaptado de Bayley, 2004.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

Verificar os polimorfismos das citocinas selecionadas para o estudo (*IL-1 $\beta$* , *IL-1RN*, *IL-6*, *IL-10* e *TNF- $\alpha$* ) associados ao desenvolvimento da dengue.

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- Confirmar através da sorologia se os pacientes selecionados com suspeita de dengue estavam com a doença;
- Identificar se os polimorfismos das *IL-1 $\beta$* , *IL-1RN*, *IL-6*, *IL-10* e *TNF- $\alpha$*  estão ligados ao risco de desenvolver a dengue;
- Detectar as frequências dos polimorfismos entre os pacientes detectados com dengue e não dengue (outras infecções);
- Associar as características clínicas aos indivíduos portadores do alelo T do gene *IL-1 $\beta$* .

#### 4. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K. **Cellular and molecular immunology**, 7th Edition, Saunders/Elsevier, 2012.
- ABE, M.; HIASA, Y.; ONJI, M. Dendritic Cells in Autoimmune Liver Diseases. **Current Immunology Reviews**, v.8, n.1, p. 23-27, 2012.
- AGUIAR, D.B.; FONTÃO, A.; RUFINO, P.; MACEDO, V.A.; RÍOS-VELÁSQUEZ, C.M.; CASTRO, M.G.; HONÓRIO, N.A. Primeiro registro de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em Roraima, Brasil. **Acta Amazon.**, v.38, p. 357-360, 2008.
- ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p. 376–381, 2002.
- AL-MOUNDHRI, M.S.; AL-NABHANI, M.; AL-BAHRANI, B.; BURNEY, I.A.; ALMADHANI, A.; GANGULY, S.S.; AL-YAHYAE, S.A.; GRANT, C.S. Interleukin-1beta gene (IL-1B) and interleukin1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphisms and gastric cancer risk in an Omani Arab population. **Gastric Cancer**, v.9, n.4, p. 284-90, 2006.
- ALVAREZ, M.; RODRIGUEZ-ROCHE, R.; BERNARDO, L.; MORIER, L.; GUZ-MAN, G. Improved dengue virus plaque formation on BHK21 and LLCMK2 cells: evaluation of some factors. **Dengue Bull.**, v.29, p. 1–9, 2005.
- ALVES, J.R.C.; ALENCAR, J.; COSTA, J.M. Ocorrência de larvas de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera, Culicidae), em recipiente artificial, na ilha de Marambaia, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.37, n.2, p. 177-180, 2008.
- ANTAS, P. R.; SALES, J. S.; PEREIRA, K. C.; OLIVEIRA, E. B.; CUNHA, K. S.; SARNO, E. N.; SAMPAIO, E. P. Patterns of intracellular cytokines in CD4 and CD8 T cells from patients with mycobacterial infections. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.37, p. 1119-1129, 2004.
- ARAÚJO, F.M.C.; NOGUEIRA, R.M.R.; ARAÚJO, J.M.G.; RAMALHO, I.L.C.; RORIZ, M.L.F.; MELO, M.E.L. et al. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, p.925-928, 2006.

- AREND, W.P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. **Cytokine Growth Factor Rev.**,v.13, p. 323-340, 2002.
- ARJONA, A.; WANG, P.; MONTGOMERY, R.R.; FIKRIG, E. Innate immune control of West Nile virus infection. **Cell. Microbiol.**,v.13, p.1648–1658, 2011.
- AZEREDO, E. L.; ZAGNE, S. M. O.; SANTIAGO, M.A. et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. **Immunobiology**, v. 204, n. 4, p. 494-507, 2001.
- BÄCK, A.T.; LUNDKVIST, A. Dengue viroses - an overview. **Infection Ecology and Epidemiology**, v.3, p.19839, 2013
- BALESTRA, R.A.M.; PEREIRA, R.O.; RIBEIRO, M.J.S.; SILVA J.S.; ALENCAR, J. Ocorrência de Aedes (Stegomyia) albopictus(Skuse) em Área Urbana do Estado do Tocantins. **Neotropical Entomology**, v.37, p. 233 – 235, 2008.
- BARBOSA, G.L. **Análise da distribuição espaço-temporal de dengue e da infestação larvária no município de Tupã, SP.**2009.72f. [s.n.] Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2009.
- BARBOZA, M. M. O. **Caracterização genômica do sorotipo 1 do vírus dengue isolados no Ceará no ano de 2011.** 2013. 72f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2013.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v.22, n.64,p. 53-72, 2008.
- BAYLEY, J.P.; OTTENHOFF, T.H. and VERWEIJ, C.L. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? **Genes and Immunity**, v.5, p. 315, 2004.
- BERDELLI, A.; EMINGIL, G.; GÜRKAN, A.; ATILLA, G.; KÖSE, T. Association of the IL-1RN2 allele with periodontal diseases. **Clinical Biochemistry**, v.39,p. 357-362, 2006.
- BETHELL, D.B.; FLOBBE, K.; PHUONG, C.X.; DAY, N.P.; PHUONG, P.T.; BUURMAN, W.A.; et al. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. **J. Infect. Dis.**, v.177, p.778–82, 1998.
- BOIARDI, L.; CASALI, B.; FARNETTI, E.; PIPITONE, N.; NICOLI, D.; et al. Relationship between interleukin 6 promoter polymorphism at position -174, IL-6 serum levels, and the risk of relapse/recurrence in polymyalgia rheumatica. **J. Rheumatol.** v.33,p.703–708, 2006.



- BOMBELL, S.; MCGUIRE, W. Tumour necrosis factor (-308A) polymorphism in pre-eclampsia: meta-analysis of 16 case-control studies. **Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.**v.48, n.6, p.547-51, 2008.
- BONILAURI, P.; BELLINI, R.; CALZOLARI, M.; ANGELINI, R.; VENTURI, L.; FALLACARA, F.; CORDIOLI, P.; ANGELINI, P.; VENTURELLI, C.; MERIALDI, G.; DOTTORI, M. Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. **Emerging Infectious Diseases**,v.14, n.5,p. 852-853, 2008.
- BOUZID,M.; COLÓN-GONZÁLEZ, F.J.; LUNG, T.; LAKE, I.R.; HUNTER, P.R. Climate change and the emergence of vector-borne diseases in Europe: case study of dengue fever. **BMC Public Health**, v.14, p.781, 2014.
- BOZZA, F.A.; CRUZ, O.G.; ZAGNE, S.M.; AZEREDO, E.L.; NOGUEIRA, R.M.; ASSIS, E.F.; BOZZA, P.T.; KUBELKA, C.F. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC Infect Dis**,v.8,p.86, 2008.
- BRAGA, I.A.; VALLE, D.*Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**,v.16,n.2,p. 113-118, 2007.
- BRASIER, A.R.; JU, H.; GARCIA, J.; ET AL. A three-component biomarker panel for prediction of dengue hemorrhagic fever. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.86, n.2, p. 341–348, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. 2014.**Nova classificação de dengue**. Disponível em: < [http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/Download/Nova\\_classificacao\\_de\\_caso\\_de\\_dengue\\_OMS.pdf](http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/Download/Nova_classificacao_de_caso_de_dengue_OMS.pdf)> Acesso em: 29 jun 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. 2015.**Boletim Epidemiológico nº. 20**. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/27/2015-027---Dengue-SE-26---.pdf> > Acesso em: 24 jul 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança**. 2ª ed. Brasília, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança**. 4ª ed. Brasília, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.**Doenças infecciosas e parasitárias**. – 8. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em:

<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas\\_infecciosas\\_parasitaria\\_guia\\_bolso.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guia_bolso.pdf)> Acesso em: 27 jul. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Dengue no Brasil: tendências de mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010**. Brasília-DF, 2010.

BRITO, C.A.A.; ALBUQUERQUE, M.F.M.P.; LUCENA-SILVA, N. Evidência de alterações de permeabilidade vascular na dengue: quando a dosagem de albumina sérica define o quadro? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.2, p. 220-223, março-abril, 2007.

BUTTHEP, P.; CHUNHAKAN, S.; YOKSAN, S.; TANGNARARATCHAKIT, K.; CHUANSUMRIT, A. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.31, n.12, e232–e238, 2012.

CAUMES, E.; CARRIERE, J.; GUERMONPREZ, G et al. Dermatoses associated with travel to tropical countries: a prospective study of the diagnosis and management of 269 patients presenting to a tropical disease unit. **Clin. Infect. Dis.**, v.20, p.542-548, 1995.

CAVALCANTI, L.P.G.; COELHO, I.C.B.; VILAR, D.C.L.F.; HOLANDA, S.G.S.; ESCÓSSIA, K.N.; SOUZA-SANTOS, R. Clinical and epidemiological characterization of dengue haemorrhagic fever cases in northeastern, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.43, p. 355-358, 2010.

CEARÁ. Secretaria de Saúde do Estado. **Dengue Informe Semanal 29**. Fortaleza. Disponível em:

<<http://www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins?download=825%3Aboletim-da-dengue>> Acessado em: 27 jul 2015.

CEARÁ. Secretaria de Saúde do Estado. **Dengue Informe Semanal**. Fortaleza. Disponível em: <<http://www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins>>. Acessado em: 29 mar. de 2013.

CHATUVERDI, U. C. et al. Cytotoxic factor-autoantibodies: possible role in the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.30, n.3, p.181-186, 2001.

CHATUVERDI, U.C.; AGARWAL, R.; ELBISHBISHI, E.A.; MUSTAFA, A.S. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 183-188, 2000.

- CHATUVERDI, U.C.; NAGAR, R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 9-24, 2009.
- CHIRATHAWORN, C.; et al. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 631-634, 2013.
- CLARK T.G.; DIAKITE, M.; AUBURN, S.; CAMPINO, S.; FRY, A.E.; GREEN, A.; RICHARDSON, A.; SMALL, K.; TEO, Y.Y.; WILSON, J.; JALLOW, M.; SISAY-JOOF, F.; PINDER, M.; GRIFFITHS, M.J.; PESHU, M.; WILLIAMS, T.N.; MARSH, K.; MOLYNEUX, M.E.; TAYLOR, T.E.; ROCKETT, K.A.; KWIATKOWSKI, D.P. Tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha polymorphisms and severe malaria in African populations. **J. Infect. Dis.**, v.199, p. 569-575, 2009.
- CLYDE, K.; KYLE, J.L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of virology**, v.80, n.23, p.11418–11431, 2006.
- COFFEY, L.L. et al. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes Infect.**, v.11, p.143–156, 2009.
- COLOGNA, R.; ARMSTRONG, P.M.; RICO-HESSE, R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *Virology*, 79:853–859, 2005.
- COSTA, V.V.; FAGUNDES, C.T.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M. Inflammatory 2005 and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction. **Am. J. Pathol.**, v.182, p.1950–1961, 2013.
- COZEN, W.; GILL, P.S.; INGLES, S.A.; MASOOD, R.; MARTINEZ-MAZA, O.; COCKBURN, M.G.; GAUDERMAN, W.J.; PIKE, M.C.; BERNSTEIN, L.; NATHWANI, B.N.; SALAM, M.T.; DANLEY, K.L.; WANG, W.; GAGE, J.; GUNDELL-MILLER, S.; MACK, T.M. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. **Blood**, v.103, p. 3216–3221, 2004.
- DEGALLIER, N.; TEIXEIRA, J.M.; SOARES, S.S.; PEREIRA, R.D.; PINTO, S.C.; CHAIB, A.J.; VASCONCELOS, P.F.; OLIVEIRA, E. *Aedes albopictus* may not be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.37, n.3, p.386-387, 2003.
- DEJNIRATTISAI, W.; DUANGCHINDA, T.; LIN, C-LS.; et al. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. **J. Immunol.**, v.181, p.5865–5874, 2008.

- DELALEU, N.; BICKEL, M. Interleukin-1 beta and interleukin-18: Regulation and activity in local inflammation. **Periodontol.**2000, v.35, p. 42-52, 2004.
- DEWI, B. E.; et al. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. **J. Virol. Methods**, v. 121, n. 2, p. 171-180, 2004.
- DICK, O.B.; SAN-MARTÍN, J.L.; MONTOYA, R.H.; DIEGO, J.D.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G.H. Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, p. 584-593, 2012.
- DINARELLO, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 519-550, 2009.
- ELENA, S.F. and SANJUÁN, R. On the adaptive value of high mutation rates in RNA viruses: separating causes from consequences. **Journal of Virology**, v. 79, p. 11555–11558, 2005.
- EL-OMAR, E.M. The importance of interleukin 1beta in Helicobacter pylori associated disease. **Gut**. v. 48, n.6, 743-747, 2001.
- FIGUEIREDO, L.T. Dengue in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n.3, p. 285, 2012.
- FIGUEIREDO, L.T. M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 2, p. 203-10, 2006.
- FIGUEIREDO, L.T. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. **Virology Journal**, v. 7: p. 152, 2010.
- FIGUEIREDO, L.T. Patogenia das infecções pelos vírus dengue. Medicina, Ribeirão Preto, Medicina, Ribeirão Preto, **Simpósio: VIROLOGIA MÉDICA I**, 32: 15-20, 1999.
- FIGUEIREDO, M.L.; ALFONSO, H.L.; AMARILLA, A.A.; FIGUEIREDO, L.T.; AQUINO, V.H.; COSTA, C.A.; LUZ, S.L. Detection of DENV-4 genotype I from mosquitoes collected in the city of Manaus, **Brazil. Virol. J.**, v.19, n.10, p. 60, 2013.
- FIGUEIREDO, M.L.; GOMES, A.C.; AMARILLA, A.A.; LEANDRO, A.S.; ORRICO, A.S.; ARAUJO, R.F.; CASTRO, J.S.; DURIGON, E.L.; AQUINO, V.H.;
- FONSECA, B.; FIGUEIREDO, L.; FOCACCIA, R. et al. **Dengue. Tratado de Infectologia**, 2ª edição, Atheneu, São Paulo, 2006. p. 343-356.
- FORATTINI, O.P. **Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia**. EDUSP, v.2, p. 860, 2002.
- GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 448 – 454, 1999.

- GAGNON, S.J.; MORI, M.; KURANE, I.; GREEN, S.; VAUGHN, D.W.; KALAYANAROOJ, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENNIS, F.A.; ROTHMAN, A.L. Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. **J. Med. Virol.**, v. 67, n.1, p. 41–46, 2002.
- GARCÍA-MARQUEZ, M.; SHIMABUKURO-VORNHAGEN, A.; BERGWELT-BAILDON, M. Complex interactions between B cells and dendritic cells. **Blood**, v. 121, p. 2367-2368, 2013.
- GARCÍA-TREJO, A.R.; FALCÓN-LEZAMA, J.A.; JUÁREZ-PALMA, L.; GRANADOS, J.; ZÚNIGA-RAMOS, J.; RANGELA, H.; et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with dengue fever. **Acta Tropica**, v. 120, p. 67–71, 2011.
- GEBHARD, L.G.; FILOMATORI, C.V.; GAMARNIK, A.V. Functional RNA elements in the dengue virus genome. **Viruses**, v. 3, p. 1739–1756, 2011.
- GOMES, A.M.M. **Avaliação dos aspectos clínicos e laboratoriais no diagnóstico de pacientes com suspeita de dengue em Fortaleza – Ceará**. 2012. 99f. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2012.
- GREEN, S., VAUGHN, D.W., KALAYANAROOJ, S., NIMMANNITYA, S., SUNTAYAKORN, S., NISALAK, A., ROTHMAN, A.L., ENNIS, F.A. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. **J. Med. Virol.**, v. 59, n.3, 329–334, 1999.
- GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 19, n. 5, p. 429-436, 2006.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 480–496, 1998.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever; its history and resurgence as a global public health problem. In *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* (Gubler, D.J. and Kuno, G., eds), **CAB International Press**, p. 1–22, 1997.
- GUBLER, D.J.; CLARK, G.G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 1, n. 2, 55–57, Apr-Jun; 1995.
- GUHA-SAPIR, D. & SCHIMMER, B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. **Emerg. Themes Epidemiol.**, v. 2, n.1, p. 1, 2005.
- GUPTA, N.; CHATURVEDI, U.C. Can helper T-17 cells play a role in dengue haemorrhagic fever? **Indian J. Med. Res.**, v. 130, p. 5–8, 2009.

- GUZMAN, M.G. and KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 8, p. 69–80, 2004.
- GUZMAN, M.G. and KOURI, G. Dengue: An Update. **Lancet Infectious Disease**, v. 2, p. 33 – 42, 2002.
- GUZMAN, M.G.; HALSTEAD, S.B.; ARTSOB, H.; *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8 (12 Suppl), p. S7–S16, 2010.
- GUZMAN, M.G.; KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, p. 621–627, 1996.
- GUZMAN, M.G.; KOURI, G.; HALSTEAD, S.B. Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? **Lancet**, v. 355, p. 1902–1903, 2000.
- HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 42, p. 350-362, 1970.
- HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476-481, 1988.
- HALSTEAD, S.B. Controversies in dengue pathogenesis. **Paediatr. Int. Child Health.**, v. 32, Suppl 1, p. 5-9, 2012.
- HALSTEAD, S.B. Dengue. **Lancet**, v. 370, p. 1644–1652, 2007.
- HALSTEAD, S.B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Adv. Virus Res.**, v. 60, p. 421–467, 2003.
- HARAPAN, H. *et al.* Non-HLA gene polymorphisms and their implications on denguevirus infection. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 14, p. 1-11, 2013.
- HENCHAL, F.A.; PUTNAK, J.R. The dengue viruses. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 3, p. 376-396, 1990.
- HIRANO, K.; YAMAMOTO, K.; KOBAYASHI, Y.; AND OSAWA, T. J. **Biochem.** v. 105, p. 120-126. 1989.
- HOLLAND, J.J.; SPINDLER, K.; HORODYSKI, F. *et al.* Rapid evolution of RNA genomes. **Science**, v. 215, p. 1577–1585, 1982.
- HOLLEGAARD, M.V. and BIDWELL, J.L. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. **Genes and Immunity**, v. 7, (Suppl. 3), p. 269, 2006.

- HOLMES, E. C., AND S. S. BURCH. The Causes and Consequences of Genetic Variation in Dengue Virus. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 74–77, 2000.
- HUMPHRIES, S.E., LUONG, L.A., OGG, M.S., HAWES, E., MILLER, G.J. The interleukin-6-174G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. **Eur. Heart J.**, v. 22, p. 2243 – 2252, 2001.
- INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC). **Dengue: Vírus e o vetor**. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html>> Acesso em: 24 jul 2015.
- JAISWAL, D.; TRIVEDI, S.; SINGH, R.; DADA, R.; SINGH, K. Association of the IL1RN gene VNTR polymorphism with human male infertility. **PLoS One**, v. 7, e51899, 2012.
- JUFFRIE, M.; MEER, G.M.; HACK, C.E.; HAASNOOT, K.; SUTARYO, VEERMAN, A.J.; THIJS, L.G. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 65 (1), 70–75. 2001.
- KAUTNER, I.; ROBINSON, M.J.; KUHNLE, U. Dengue virus infection: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. **Journal of Paediatrics**, v. 131, p. 516–524, 1997.
- KING, C.; CHAO, D.; CHIEN, L.; CHANG, G. J.; LIN, T.; WU, Y.; et al. Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3. **Virology Journal**, v. 5, p. 63, 2008.
- KNIGHT, J. Polymorphisms in tumor necrosis factor and other cytokines as risks or infectious diseases and the septic syndrome. **Curr. Infect. Dis.**, v. 3, p. 427–439, 2001.
- KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 30, n. 6, p. 329-340, 2007.
- LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T.W.; GUBLER, D.J. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 45, n. 5, e646, 2010.
- LANCIOTTI, R.S.; LEWIS, J.G.; GUBLER, D.J.; TRENT, D.W. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. **J. Gen. Virol.**, v. 75, p. 65-75, 1994.
- LIBRATY, D.H.; PICHYANGKUL, S.; AJARIYAKHAJORN, C. et al. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and

implications for disease pathogenesis. **Journal of virology**,v. 75, n. 8, p. 3501-3508, 2001.

LIBRATY,D.H.; YOUNG,P.R.; PICKERING, D.; ENDY, T. P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; et al. High circulating levels of the dengue virus non-structural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue haemorrhagic fever. **J. Infect. Dis.**,v. 186, p. 1165–1168, 2002.

LIMA, A.A.G. **Estudo da correlação entre níveis séricos de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18BP, IL-33 e TNF- $\alpha$ ) e da mieloperoxidase com o grau de obstrução coronariana em pacientes com hipótese diagnóstica de doença isquêmica do miocárdio.** 2012. 126 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2012.

LIN, M.T.; STORER, B.; MARTIN, P.J.; TSENG, L.H.; GOOLEY, T.; CHEN, P.J.; HANSEN, J.A. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. **N. Engl. J. Med.**, v.349, p.2201-2210, 2003.

LIN, Y., H. LEE, A. H. BERG, M. P. LISANTI, L. SHAPIRO, AND P. E. SCHERER. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (tlr)-4 induces synthesis of the closely related receptor tlr-2 in adipocytes. **J. Biol. Chem.**,v. 275, p. 24255–24263, 2000.

LINDENBACH, B.; THIEL, H. & RICE, C. **Flavivirus: the virus and their replication.** In: Fields Virology, David Knipe, Peter Howley, Diane Griffin, Robert A Lamb, Malcolm Martin, Bernard Roizman, Stephen Straus, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 0781760607, Philadelphia, USA, 2007. pp. 1101-1152.

LOEB, M. Genetic Susceptibility to West Nile Virus and Dengue. **Public Health Genomics**, v. 16, p. 4–8, 2013.

LOKE, H.; BETHELL, D.; PHUONG, C.X.T.; DAY, N.; WHITE, N.; FARRAR, J.; HILL, A. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in Vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and Fc $\gamma$  receptor iia genes, **Am. J. Trop. Med. Hyg.**,v. 67, n.1,p. 102–106, 2002.

LOPES, F.H.A. **Níveis séricos de interleucina-6 e polimorfismo -174G→C do gene dessa citocina em infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*.** 2012. 70f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2012.



LORENZI, J.C., BRUM, D.G., ZANETTE, D.L., DE PAULA, A.S.A., BARBUZANO, F.G., DOS SANTOS, A.C., et al. miR-15a and 16-1 are downregulated in CD4+ T cells of multiple sclerosis relapsing patients. **Int. J. Neurosci.**,v. 122, p. 466–471, 2012.

MACDONALD, J.; TONRY, J.; HALL, R.A.; WILLIAMS, B.; PALACIOS, G.; ASHOK, M.S.; JABADO, O.; CLARK, D.; TESH, R.B.; BRIESE, T.; LIPKIN, W.I. NS1 protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection. **J. Virol.**,v. 79, p. 13924–13933, 2005.

MACORIS, M.L.G. **Mecanismos de resistência de Aedes aegypti a inseticidas**. 2011. 82 f. Tese (Doutorado em Biologia de Parasitas e Micro-organismos). Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2011.

MALAVIGE, G.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D. et al. Dengue viral infections. **Postgraduate medical journal**, v. 80, n. 948, p. 588-601, 2004.

MALAVIGE, G.N.; VELATHANTHIRI, V.G.; WIJEWICKRAMA, E.S.; FERNANDO, S.; JAYARATNE, S.D.; AASKOV, J.; SENEVIRATNE, S.L. Patterns of disease among adults hospitalized with dengue infections. **QJM**,v. 99, n. 5, p. 299-305, 2006.

MANTOVANI, A., F. BUSSOLINO, AND M. INTRONA. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. **Immunol-Today**,v. 18, p. 231-40, 1997.

MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 4, p. 564-581, 2009.

MARTINS, V.E.; ALENCAR, C.H.; FACÓ, P.E.; DUTRA, R.F.; ALVES, C.R.; PONTES, R.J.; GUEDES, M.I. Distribuição espacial e características dos criadouros de *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* em Fortaleza, Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**,v. 43, n. 1, p. 73-77, 2010.

MARTINS, V.E.; ALENCAR, C.H.; KAMIMURA, M.T.; DE CARVALHO ARAÚJO, F.M.; DE SIMONE, S.G.; DUTRA, R.F.; GUEDES, M.I. 2012. Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Plos One**,v. 7, n. 7, e41386, 2012.

MARTINS, V.E.P.; MARTINS, M.G.; ARAÚJO, J.M.P.; SILVA, L.O.R; MONTEIRO, H.A.O.; CASTRO, F.C.; VASCONCELOS, P.F.C.; GUEDES, M.I.F. Primeiro registro

de *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Estado do Ceará, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, n. 4, p. 737-739, 2006.

MAYER, G. **IMUNIDADE MEDIADA POR CÉLULAS: Interações célula-célula em respostas imunes específicas**. Tradução: Myres Hopkins. Disponível em: <<http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter9.htm>> Acesso em 20 abr. 2015.

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

HAWLEY, W.A.; REITER, P.; COPELAND, R.S.; PUMPINI, C.B.; CRAIG, G.B. *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. **Science**, 236: 114-116, 1987.

MEDIN, C.L.; FITZGERALD, K.A.; & ROTHMAN, A.L. Dengue vírus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. **J. Virol.**, v. 79, p. 11053–11061, 2005.

MEENAGH, A.; WILLIAMS, F.; ROSS, O.A.; PATTERSON, C.; GORODEZKY, C.; HAMMOND, M.; LEHENY, W.A.; MIDDLETON, D. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from Western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. **Hum. Immunol.**, v.63, p.1055-1061, 2002.

MENDONÇA, F.A.; SOUZA, A.V.; DUTRA, D.A. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. **Soc. Nat.**, v. 21, n.3, p. 257-269, 2009.

MONGKOLSAPAYA, J.; DEJNIRATTISAI, W.; XU, X. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature medicine**, v. 9, n. 7, p. 921-927, 2003.

MOREIRA, S.T.; CARDOSO, D.M.; VISENTAINER, J.E.; FONZAR, U.J.V.; MOLITERNO, R.A. The Possible Protective Role of the I16<sup>-174</sup>GC Genotype in Dengue Fever. **The Open Tropical Medicine Journal**, v. 1, p. 87-91, 2008.

MUKHOPADHYAY, S., KUHN, R.J. & ROSSMANN, M.G. A structural perspective of the *Flavivirus* life cycle. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 3, p. 13–22, 2005.

MURRELL, S.; WU, S-C.; BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 239-247, 2011.

MUSTAFA, M.S.; RASTOGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): a new public health dilemma in dengue control. **Med J. Armed Forces India**, v. 71, n. 67, 2015.

- NAKA, T., NISHIMOTO, N., KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthritis Res.**, v. 4, p. S233-S242, 2002.
- NAVARRO-SÁNCHEZ, E. DÈSPRES, P. CEDILLO-BARRÓN, L. Innate Immune Response to Dengue Virus. **Arch. Med. Res.**, v. 36, p. 425-435, 2005.
- NEMER, A.; NEVES, F. **Exames Laboratoriais**. Rio de Janeiro: Revinter, 2010.
- NIESTERS, H.G.M. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. **Methods**, v. 25, p. 419–429, 2001.
- NOBRE, A.; ANTEZANA, D.; TAUIL, PL. Febre Amarela e Dengue no Brasil: epidemiologia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27(Supl. III), p. 59-66, 1994
- NUNES, J.S. **Dengue: Etiologia, patogênese e suas implicações a nível global**. 2011. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Ciências da Saúde. Universidade de Beira Interior, Corvilhã, Portugal, 2011.
- OGAWA, Y., GRANT, J. A. Mediators of anaphylaxis. **Immunol. Allergy Clin. North Am.**, v. 27, p. 249–260, 2007.
- OLIVEIRA, E. de. **Caracterização da resposta imune citocínica na infecção humana pelo vírus oropouche e sua relação com o padrão de soroconversão e a presença de sintomas**. 2011. 116 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Belém, 2011. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais.
- OLIVEIRA, G.S.S. de; et al. Hepatite grave e icterícia durante a evolução de infecção pelo vírus da dengue: relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.43, n.3, p. 339-341, 2010.
- OLIVEIRA, E.C.L.DE; PONTES, E.R.J.C.; CUNHA, R.V. DA, FRÓES, I.B.; D, DO NASCIMENTO. Alterações hematológicas em pacientes com dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.6, p. 682-685, 2009.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Chapter 2: Clinical Diagnosis DF and DHF**. 1997.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control** - New edition. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2009. 148 p.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Dengue and severe dengue**. n. 117, 2012. Updated September 2013.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas by Country**. Disponível em: <

[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&Itemid=270&gid=30965&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&gid=30965&lang=en) > Acesso em: 27 jul 2015.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Dengue in the Americas: 1980-1987. **Epidemiol. Bull.**, v. 10, p. 1-8, 1989.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Dengue in the Americas: 2013**. Disponível em: <[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3168:dados-dengue-nas-americas2013&Itemid=777](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3168:dados-dengue-nas-americas2013&Itemid=777)> Acesso em: 03 mai. 2015.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Dengue in the Brazil: 2015**. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=1&Itemid=40734](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=1&Itemid=40734)> Acesso em: 27 jul 2015.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). El dengue y la fiebre hemorrágica de dengue en las Américas: una visión general del problema. **Bol. Epidemiol.** v. 13, n. 1, 1992.

OSANAI, C.H.; ROSA, A.P.A.T.; TANG, A.T.; AMARAL, R.E.; PASSOS, A.D.C.; TAUIL, P.L. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 25, p. 53-4, 1984.

PAGES, F.; PEYREFITTE, C.N.; MVE, M.T.; JARJAVAL, F.; BRISSE, S.; ITEMAN, I.; GRAVIER, P.; NKOGHE, D.; GRANDADAM, M. *Aedes albopictus* mosquito: the main vector of the 2007 Chikungunya outbreak in Gabon. **PLoS One**, v. 4, e4691, 2009.

PANG, T.; CARDOSA, M. J.; GUZMAN, M. G.. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Immunol. Cell Biol.**, v. 85, n. 1, p. 43-45, 2007.

PAUPY, C.; OLLOMO, B.; KAMGANG, B.; MOUTAILLER, S.; ROUSSET, D.; DEMANOU, M.; HERVÉ, J.P.; LEROY, E.; SIMARD, F. Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of Dengue and Chikungunya in central Africa. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 3, p. 259-266, 2010.

PEREZ, A.B.; SIERRA, B.; GARCIA, G.; AGUIRRE, E.; BABEL, N.; ALVAREZ, M.; SANCHEZ, L.; VALDES, L.; VOLK, H.D.; GUZMAN, M.G. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor- $\beta$ 1, and interleukin-10 gene polymorphisms:

implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. **Hum. Immunol.**, v. 71, p. 1135–1140, 2010.

PEREZ-PEREZ, G.I.; GARZA-GONZALEZ, E.; PORTAL, C.; OLIVARES, A.Z. Role of cytokine polymorphisms in the risk of distal gastric cancer development. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 14, n. 8, p. 1869-73, 2005.

PESSOA, M.V.E.; SILVEIRA, D.A.; CAVALCANTE, I.L.; FLORINDO, M.I. *Aedes albopictus* no Brasil: aspectos ecológicos e riscos de transmissão da dengue. **Entomotropica**, v. 28, p. 75-86, 2013.

PESSOA, M.V.E.; SILVEIRA, D.A.; CAVALCANTE, I.L.; FLORINDO, M.I. *Aedes albopictus* no Brasil: aspectos ecológicos e riscos de transmissão da dengue. **Entomotropica**, v. 28, p. 75-86, 2013.

PINHEIRO, F. P.; CORBER, S. J. Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever and its emergence in the Americas. **World Health Statistics Quarterly**, v. 50, p. 161-169, 1997.

PINTO, L.M.O.; OLIVEIRA, S.A.; BRAGA, E.L.A.; NOGUEIRA, R.M.R.; KUBELKA, C.F. Increased pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  And IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp75 and sTNFRp55) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94: p. 1-8. 1999.

POELCHAU, M.F.; REYNOLDS, J.A.; ELSIK, C.G.; DENLINGER, D.L.; ARMBRUSTER, P.A. Deep sequencing reveals complex mechanisms of diapause preparation in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. **Proc. R. Soc. B.**, 280, 2013.

PORTUGAL. Ministério da Saúde. **Surto de dengue na Ilha da Madeira**. Disponível em: <<http://www.dgs.pt/?cn=683368347243AAAAAAAAAAAAA>> Acesso em: 03 jul 2015.

PUJHARI, S.K.; et al. TNF- $\alpha$  promoter polymorphism: a factor contributing to the different immunological and clinical phenotypes in Japanese encephalitis. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 23. 2012.

QIU, F.X.; GUBLER, D.J.; LIU, J.C.; CHEN, Q.Q. Dengue in China: a clinical review. **Bulletin of the World Health Organization**, n. 71, p. 349-359, 1993.

RADKE, E.G.; GREGORY, C.J.; KINTZIGER, K.W.; SAUBER-SCHATZ, E.K.; HUNSPERGER, E.A.; GALLAGHER, G.R. Dengue outbreak in Key West, Florida, USA, 2009. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 18, p. 135–137, 2012.

RAMASAMY, R.; SURENDRAN, S.N.; JUDE, P.J.; DHARSHINI, S.; VINOBA, M. Larval development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in peri-urban

- brackishwater and its implications for transmission of arboviral diseases. **PLoS Neglected Tropical Disease**, 5(11): e1369, 2011.
- RAMOS, R.R.; MACHADO, C.J.S. Uma análise espaço-temporal dos grupos de pesquisa do cnpq: a dengue no brasil. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde (Uberlândia)**, v.10, n.18, p. 58-70,2014.
- REITER, P. *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come? **Journal of the American Mosquito Control Association**, 14: 83-94, 1998.
- RESTREPO, B.N. et al. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in infants with and without dengue. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 41, n.1, 2008.
- RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Adv. Virus Res.**, v. 59, p. 315–341, 2003.
- RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, v. 174, p. 479–493, 1990.
- RODRIGUEZ-MADOZ, J.R.; BELICHAVILLANUEVA, A.; BERNAL-RUBIO, D. et al. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. **Journal of virology**, v. 84, n. 19, p. 9760-9774, 2010.
- ROGERS, D.J.; SUK, J.E.; SEMENZA, J.C. Using global maps to predict the risk of dengue in Europe. **Acta Trop.**, v. 129, p. 1-14, 2014.
- ROSEN L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 26, p. 337–43, 1977.
- ROSS, T.M. Dengue virus. **Clin. Lab. Med.**, v. 30, p. 149-60, 2010.
- ROTHMAN, A.L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532-543, 2011.
- SANTILLA, S.; SAVINAINEN, K.; HURME, M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN\*2) is associated with enhanced IL-1 beta production in vitro. **Scandinavian Journal of Immunology**. v., n.47, p.195-198, 1998.
- SAM, S.S.; TEOH, B.T.; CHINNA, K.; ABUBAKAR, S. High Producing Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Alleles in Protection against Severe Manifestations of Dengue. **Int. J. Med. Sci.**, v. 12, n. 2, p. 177–186, 2015.
- SA-NGASANG, A.; OHASHI, J.; NAKA, I.; ANANTAPREECHA, S.; SAWANPANYALERT, P.; PATARAPOTIKUL, J. Association of IL1B -31C/T and IL-

RA variable number of an 86-bp tandem repeat with Dengue Shock Syndrome in Thailand. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210,n. 1,p. 138-145,2014.

SCANDAR, S.A.S. **Análise espacial da distribuição dos casos de dengue e a relação com fatores entomológicos, ambientais e socioeconômicos no município de São José do Rio Preto – SP – Brasil.**2007. 139p. Tese(Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. São Paulo, 2007.

SCHATZMAYR, H.G. Dengue in situation in Brazil by year 2000. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, supl. 1, p. 179-181, 2000.

SENEVIRATNE, S.L.; MALAVIGE, G.N.; DE SILVA, H.J. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**,v. 100,p. 608-614, 2006.

SHOPE, R.E. **Impacts of global climate change on human health: spread of infectious disease.** In: Global Climate Change: Implications, Challenges and Mitigation Measures. Majumdar, S.K., Kalkstein, L.S., Yarnal, B., Miller, E.W. and Rosenfeld, L.M. (eds). The Pennsylvania Academy of Science, Easton, PA, 1992.pp. 363-370.

SHU, P.Y.; HUANG, J.H. **Current Advances in Dengue Diagnosis.** Clin Diagn Lab Immunol. v. 11, n. 4, p. 642-50, jul.2004.

SILVA, A.A. **Avaliação de fatores de risco da dengue com interface no sistema ABO em pacientes internados com infecção no Hospital Universitário Lauro Wanderley-PB.** 2013. 72 f. Tese (Doutorado em Medicina e Saúde). Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2013.

SILVA, E.M.; DE JESUS, S.R.R.; FONSECA, I.S.S. Epidemiologia da dengue no Brasilno ano de 2012. **Ciências Biológicas e da Saúde, Aracaju**,v. 2,n. 2, p. 69-78, 2014.

SILVA, F.G.; SILVA, S.J.S.; ROCCO, I.M. et al. Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue - São Paulo. **BEPA, Bol. epidemiol. paul.**,v. 8, n. 91, p.14-26, 2011.

SILVA, H.H.G. DA; DA SILVA, I.G.; DOS SANTOS, R.M.G., FILHO, E.R. & ELIAS, C.N. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil.(Sapindaceae)against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**,v. 37, p. 396-399. 2004.

- SILVA, H.H.G.; SILVA. I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Rev. Soc. Brasil. Med. Tropical**, 32: 349-355, 1999.
- SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 1423–1432, 2012.
- SIMMONS, C.P. et al. Patterns of host genome -wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. **J. Infect. Dis.**, v. 195, p. 1097–1107, 2007.
- SINGHI, S.; KISSON, N.; BANSAL, A. Dengue e dengue hemorrágico: aspectos do manejo na unidade de terapia intensiva. **Jornal de Pediatria**. Rio de Janeiro, v.83, n.2, p.22-35, 2007.
- SIQUEIRA, J.R.; et al. **Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010**. In: Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde/MS. Mato Grosso do Sul, 2011.
- SMITH, A.J., HUMPHRIES, S.E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. **Cytokine Growth Factor Rev.**,v. 20,n. 1, p. 43–59, 2009.
- SOUSA, A. M. **Polimorfismos em genes de citocinas em doadores de sangue moçambicanos**. 2010, 66f.Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Instituto Oswaldo Cruz, Maputo, 2010.
- SOUZA, R.V.; DA CUNHA, R.V. MIAGOSTOVICH, M.P.; et al. An outbreak of dengue in state of Ceará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**.v. 90, p. 345-346, 1995.
- SRIKIATKHACHORN, A.; ROTHMAN, A. L.; GIBBONS, R. V. et al. Dengue—how best to classify it. **Clinical infectious diseases**, v. 53, n. 6, p. 563-567, 2011.
- STEPHENS, H.A. HLA and other gene associations with dengue disease severity.**Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 338, p. 99-114, 2010.
- SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Dengue: recent advances in biology and current status of translational research. **Curr. Mol. Med.**,v. 9, p. 152–173, 2009.
- TAIUL, P. L. Aspectos críticos de controle de dengue no Brasil. **Cad. Saúde Pública.**, v. 90, n. 3, p. 867-871, 2002.



- TAJIMA, S.; NUKUI, Y.; ITO, M.; TAKASAKI, T.; Kurane, I. Nineteen nucleotides in the variable region of 3' non-translated region are dispensable for the replication of dengue type 1 virus in vitro. **Virus Res.**, v. 116, p. 38–44, 2006.
- TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T.H.; GRANELLI-PIPERNO, A. et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 823-829, 2003.
- TAYLOR, R.S., BROWN, A. EBRAHIM, S. JOLLIFFE, I. NOORANI, H. REES, K. et al. Exercise based rehabilitation for patients with coronary heart disease: systemic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **American Journal of Medicine**, v. 116, n. 10, p. 682-692, 2004.
- TERRY, C. F., LOUKACI, V. AND GREEN, F. R. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 18138-18144, 2000.
- TOMLINSON, S.M., MALMSTROM, R.D., WATOWICH, S.J., New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. **Infect. Disord. Drug Targets**, v. 9, p. 327–343. 2009.
- TSAI, T.T. et al. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, n. 40, 2013.
- TUMANGGER, H. and JAMIL, K.F. Contribution of genes polymorphism to susceptibility and outcome of sepsis. **Egypt J. Med. Hum. Gen.**, v. 11, p. 97–103, 2010.
- VALENTE, F.P.; TAN, C.R.; TEMPLE, S.E.; PHIPPS, M.; WITT, C.S.; et al. The evolution and diversity of TNF block haplotypes in european, asian and australian aboriginal populations. **Genes Immun**. V. 10, p. 607–615, 2009.
- VAN SNICK, J. Interleukin-6: an overview. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 253–278, 1990.
- VASCONCELOS, P.F.C. et al. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: Inquérito soro – epidemiológico aleatório. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 447-454, 1998.
- VASCONCELOS, P.F.C.; MENEZES, D.B.; MELO, L.P.; PESSOA, E.T.F.; RODRIGUES, S.G.; TRAVASSOS DAROSA, E.S.; TIMBÓ, M.J.; COELHO, I.C.B.; MONTENEGRO, F.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; ANDRADE, F.M.O.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. A large epidemic of dengue fever with dengue

- hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1995. **Rev. Inst. Med. Trop.**,v. 37, p. 253-255, 1995.
- VELANDIA, M.L.; CASTELLANOS, J.E. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. **Infectio.**, v. 5, n. 1, p. 33-43, 2011.
- VELATHANTHIRIA, G.N.S.; FERNANDO, S.; FERNANDO, R.; MALAVIGE, A.G.N.; PEELAWATHHAGEA, M.; JAYARATNEE, S.D.; AASKOVF, J. Comparison of Serology, Virus Isolation and RT-PCR in the Diagnosis of Dengue Viral Infections in Sri Lanka. **Dengue Bull.**, v. 30, 2006.
- VENUGOPALAN, A.; GHORPADE, R.P.; Chopra, A. Cytokines in acute chikungunya. **PLoS One**, v. 9, n. 10, e111305, 2014.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado De Infectologia**. 2 Volumes. 4ª Ed. Editora Atheneu, 2010.
- VISENTAINER, J.E.; SELL, A.M.; DA SILVA, G.C.; CAVICHIOLI, A.D.; FRANCESCHI, D.S.; LIEBER, S.; et al. TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. **Int. J. Immunogenet.**,v. 35, n. 4-5, p. 287-293, 2008.
- VORNDAM, V.; KUNO, G. **Laboratory diagnosis of dengue virus infection**. In: Gubler DJ, KunoG, editors. Dengue and dengue hemorrhagic fever. New York: CAB International, 1997. p. 313-33.
- WANG, E. et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **J. Virol.**,v. 74, p. 3227–3234, 2000.
- WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Sci. Signal.**,V. 3, cm1, 2010.
- WHITEHORN, J. and SIMMONS, C.P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**,v. 29, p. 7221–7228, 2011.
- WILLIAMSON, M.A.; SNYDER, L.M.WALLACH **-Interpretação de Exames Laboratoriais**. Editora Medsi, 7ª edição, 2003.
- WILSON, A.G. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 3195-3199, 1997.
- WILSON, E.M; CHEN, L.H. Dengue in the Americas. **Dengue Bulletin**, Cambridge,v. 26, p. 44-61, 2002.

- WITKIN, S.S.; GERBER, S.; LEDGER, W.J. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 204–209, 2002.
- WRIGHT, W.F. PRITT, B.S. Update: The diagnosis and management of dengue virus infection in North America. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 215–220, 2012.
- XAVIER-CARVALHO, C.; GIBSON, G.; BRASIL, P.; FERREIRA, R.X.; SANTOS, R.S.; CRUZ, O.G.; OLIVEIRA, S.A.; CARVALHO, M.A.; PACHECO, A.G.; KUBELKA, C.F.; MORAES, M.O. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: A case–control, functional and meta-analysis study. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 20, p. 197–205, 2013.
- ZHANG. C.; et al. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. **J. Virol.**, v. 79, p. 15123–15130, 2005.

Manuscrito submetido à Revista Human Immunology

# Human Immunology



My EES Hub available for consolidated users .. [more](#)

home | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [logout](#) | [contact us](#) | [help](#) | [user name: isaciferns@univaf.edu.br](#) | [switch to: Author](#) | [Go to: \*\*Human Immunology\*\*](#) | [Version: EES 2015.0](#)

## Submissions Being Processed for Author Isaac Ferias Coimbra, Dr.

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">View Submission</a>	HTH-D-15-00269	Association of acylmorphems in interleukin related to the risk of dengue in Brazil.	Aug 30, 2015	Aug 25, 2015	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN INTERLEUKIN RELATED TO THE RISK  
OF DENGUE IN BRAZIL.

Isaac Farias Cansanção<sup>1#a\*</sup>, Ana Paula Santos Carmo<sup>2#b</sup>, Robério Dias Leite<sup>2,3#b</sup>, Rosana Deyse Ponte Portela<sup>2#b</sup>, Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior<sup>4#c</sup>, Valdir de Queiroz Balbino<sup>4#c</sup>, Silvia Helena Barem Rabenhorst<sup>2#b</sup>.

<sup>1</sup>Medicine Collegiate, Federal University of San Francisco Valley, Paulo Afonso, Bahia, Brazil

<sup>2</sup>Medical College, Department of pathology and forensic medicine, Microbiology medical postgraduate program, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>3</sup>São José Hospital of Infectious Diseases, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>3</sup>Genetics Department, Laboratory of Bioinformatics and Evolutionary Biology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>#a</sup>Centro de Treinamento Profissional de Paulo Afonso (CFPPA) –Rua Aurora, Bloco 27, Lote 3 –Bairro Alves de Souza, Postal Code: 48.607-190

<sup>#b</sup>Rua Coronel Nunes de Melo, 1315, Bairro Rodolfo Teófilo, Postal Code: 60.430-270

<sup>#c</sup>Avenida Professor Moraes Rego, S/N – Cidade Universitária, Postal Code: 50.732-970.

<sup>§</sup>Rua Nestor Barbosa, 315, Bairro Parquelândia, Postal Code: 60.455-610

\*Corresponding author

Prof. Isaac Farias Cansanção

Medicine Collegiate

Federal University of San Francisco Valley

Centro de Treinamento Profissional de Paulo Afonso (CFPPA)

Rua Aurora, Bloco 27, Lote 3 –Bairro Alves de Souza

Postal Code: 48.607-190

Paulo Afonso, Bahia, Brazil

## Abstract

Dengue infection is one of the most important viral diseases, affecting millions of people around the world. The infection may be asymptomatic, have warning signs and increase in severity, leading to death. Host genetic factors may be relevant in predisposing individuals to severity of infection. Several interleukins may be associated with the immunopathogenesis of dengue. In this study, single nucleotide polymorphisms (SNP) of interleukin (IL)  $1\beta$  -511C>T, *IL1RN* VNTR 86 bp, *IL6* -174G>C, *IL10* -819C>T and *TNF $\alpha$*  -308G>A were analyzed by PCR-RFLP in a group of 196 individuals with or without dengue. It was demonstrated that the presence T allele *IL1 $\beta$*  ( $p<0.05$ ) was associated with susceptibility to developing the disease. Other results also suggested that the polymorphism presence in combinations *IL6*x*IL1 $\beta$*  (C and T allele, respectively), *IL1 $\beta$*  (T allele) x *IL1RN* (\*2/\*2 genotype), *IL6* (C allele) x *TNF $\alpha$*  (A allele), *IL10* (C/T genotype) x *TNF $\alpha$*  (A/A genotype) ( $p<0.01$ ,  $p=0.01$ ,  $p<0.05$  and  $p=0.03$ , respectively) were associated with predisposition to developing the disease and its symptoms. In summary, the findings of this study in a Brazilian population it points out the importance of studies combinations of polymorphisms in the development of dengue, where can increase risk leading to symptoms dengue infection and the disease severity.

Keywords: Dengue, Non-dengue infection, Interleukin polymorphism, Risk.

## Introduction

Dengue fever is an acute febrile disease transmitted by the female *Aedes aegypti* mosquito; it is caused by dengue virus belonging to the genus *Flavivirus* of the family Flaviviridae. Currently it is the main arbovirus in tropical and subtropical countries, and over 100 of these are endemic, affecting around 2.5 billion people [1].

There are four distinct but antigenically related serotypes of dengue virus, dengue virus-1 (DENV-1), DENV-2, DENV-3 and DENV-4. According to the updated classification of the World Health Organization (WHO [2]), the clinical manifestations of dengue are divided into degrees of severity from 1-4. This system also divides cases into two categories: 1) dengue [with or without warning signs (DWS)] and 2) severe dengue (SD) [2]. The disease leads to infection of a highly diversified form, from an asymptomatic infection to severe forms [3].

Dengue host immune response is related primarily to the recognition of the virus by the host cell and its antiviral response. Th1 cells are mostly associated with uncomplicated acute fever and Th2 cells are involved over the length of the infection and results in the dysfunction of endothelial cells, causing plasma leakage [4]. The subsequent activation of T cells by infection is the cascade of cytokines, especially proinflammatory ones. In DENV infection, cytokines can be released by both monocytes and macrophages. Serum concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin 2 (IL2), IL6 and interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) are very high in the first three days of infection, while IL10, IL4, IL5 are manifested later [5]. Some associations between these cytokines can increase or decrease their production, unleashing inflammatory processes and various infectious diseases [6].

Modulation of the inflammatory process seems important for the course of viral infections [7] since genetic polymorphism in interleukin genes that alters their expression, has been noted as one of the factors that drive different dengue outcomes [8,9]. However, few



studies have focused on dengue susceptibility. Therefore, this study was designed to investigate polymorphisms of five cytokines already described as being important for more severe dengue (*IL1RNVNTR* 86bp, *IL6* -174 G>C, *IL10* -819 C>T and *TNF $\alpha$*  -308 G>A) and one not yet studied (*IL1 $\beta$*  -511 C>T), and their associations with patients with dengue and without dengue (other viruses).

## **Methods**

### ***Subjects***

The study was approved by the Research Ethics Committee of São José Infectious Diseases Hospital, Fortaleza, Ceará, Brazil. The classification of dengue symptoms was according to the WHO criteria of 2009. This study included 196 patients suspected of having dengue infection admitted seen at the São José Infectious Diseases Hospital, a public referral hospital for infectious diseases. Patients were enrolled during August 2011 to August 2013, after they or their parent/guardian signed an informed consent form. Among the patients assessed, 111 were confirmed having dengue infection, by clinical and laboratory parameters [2] and designated the dengue group (DG). The control group consisted of the other cases (85 individuals), who had symptoms similar to dengue but were diagnosed another infection by negative laboratory tests for dengue; these patients were designated the non-dengue group (NDG). For all patients, clinical epidemiological data were collected: sex, age and race.

### ***Laboratory test for dengue diagnosis***

The selected patients (DG and NDG) were subjected to analysis in the Public Health Laboratory of the State of Ceará – LACEN/CE. Serum samples were used for four analyses (IgM, NS1 antigen, viral isolation and RT-PCR) to determine which of these suspected

patients had been exposed to dengue virus. DG included patients with at least one positive serology test. On the other hand, NDG consisted of patients with all serology tests negative. The criteria for the collection of suspect patients followed the standards set by WHO [2] and the Ministry of Health of Brazil [10], where blood and sera collected from patients up to the fifth day of infection for viral isolation, RT-PCR and NS1 and by the sixth day for IgM assays.

### ***Genotyping***

Genomic DNA was extracted from 5 mL of blood collected from all patients during routine full blood examinations, using the salting-out method as previously described [11]. DNA quality was determined by 1% agarose gel electrophoresis and the amount was determined using the NanoDrop 3300 fluorospectrometer (Wilmington, DE, USA).

### ***Polymorphisms of interleukins***

The genetic polymorphisms of *IL1 $\beta$*  (-511 C>T), *IL6* (-174 G>C), *IL10* (-819 C>T) and *TNF $\alpha$*  (-308 G>A) were detected by PCR-RFLP and *IL1RN* VNTR 86 bp polymorphism was detected by PCR (Table 1). PCR was done using Master Mix (1x) (Qiagen, USA) with the specific primers described in the literature (Table 1) and 25  $\mu$ g DNA samples.

Table 1. Series of PCR primers used for genotyping of polymorphic interleukins and *TNF- $\alpha$* .

SNP	Primer Sequence	Annealing (°C)	PCR Product Size (bp)	Reference
<i>IL1<math>\beta</math></i> (-511)	F 5'TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC3' R 5'GTT TAG GAA TCT TCC CACTT3'	55	304	12
<i>IL1RN</i> VNTR	F 5'CTC AGC AAC ACT CCTAT 3' R 5' TCC TGG TCT GCA GGT AA3'	58	240, 326, 412, 484, 498	12
<i>IL6</i> (-174)	F 5' TTG TCA AGA CAT GCC AAA GTG 3' R 5' TCA GAC ATC TCC AGT CCT ATA 3'	55	198	12
<i>IL10</i> (-819)	F 5'TCA TTC TAT GTG CTG GAG ATG G 3' R 5'TGG GGG AAG TGG GTA AGA GT3'	56	209	13
<i>TNF<math>\alpha</math></i> (-308)	F 5' AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3' R 5' TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG 3'	57	107	14

F - Forward; R - Reverse.

The fragments were analysed by 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining. The *VNTRILRN* fragments were visualized by 8% polyacrylamide gel electrophoresis after PCR, and the restriction products were visualized by 6% polyacrylamide gel electrophoresis. For all polymorphisms, 10% of samples were genotyped again on a random basis to confirm the results.

### ***Statistical analysis***

Data were analyzed using the statistical software *EpiInfo* Version 7 and *SNPStats* (<http://bioinfo.inconcolgia.net/snpstats/start.htm>). Significant differences were evaluated using the chi-square test ( $\chi^2$ ), Fisher's exact test and linkage disequilibrium.  $P < 0.05$  was considered significant and  $P < 0.01$  was considered very significant.

## **Results**

### ***Demographic characteristics***

The demographic data of all subjects are given in Table 2. DG patients had a median age of 30.1 years old, ranging from 2 to 80 ( $31.2 \pm 10.0$ ), and NDG patients, 28.9 years old, ranging from 6 months to 83 years ( $31.0 \pm 10.2$ ). Significant differences were found for age, sex and ethnicity (Table 2). Dengue was more frequent in patients 21 to 59 years old, and there were significantly more women in NDG. Mulattos weresignificantly more frequent in both groups, followed by Caucasians.

Table 2. Demographic characteristics in dengue patients (cases) and non-dengue patients (control).

CHARACTERISTIC	TOTAL N (%)	Patients with dengue N (%)	Patients without dengue N (%)	<i>P</i>
SEX				0.0027±
Male	69 (35.20)	49 (44.15)	20 (23.53)	
Female	127 (64.80)	62 (55.85)	65 (76.47)	
AGE				
0 to 20	44 (22.45)	05 (4.50)	39 (45.88)	0.0000±**
21 to 59	146 (74.48)	104 (93.69)	42 (49.41)	
> 60	6 (3.07)	02 (1.81)	04 (4.71)	
RACE				
Caucasian	79 (40.31)	52 (46.85)	27 (31.76)	0.00004± <sup>a</sup> 0.0056± <sup>b</sup>
Brown	34 (17.35)	18 (16.22)	16 (18.83)	
Mulatto	47 (23.98)	34 (30.63)	13 (15.29)	0.00002± <sup>d</sup> 0.0019± <sup>e</sup>
Black	19 (9.69)	02 (1.80)	17 (20.00)	
Unreported	17 (8.67)	05 (4.50)	12 (14.12)	

± *P* < 0.05 – statistically significant;

\*\* Compared to the age group 21-59;

*a, c d* - when compared to Black;

*b, e* - when compared to unreported.

***Genotyping of IL1β -511C>T, IL1RN VNTR L>\*2, IL10-819 C>T, IL6 -174 G>C and TNFα -308G>A polymorphisms***

The distribution of the genotypes and alleles of all patients, and considering DG and NDG, showed that all genotype frequencies were within Hardy–Weinberg equilibrium, except *TNFα* (*P*<0.05) (Table 3).

Table 3. Association of the polymorphisms *IL1 $\beta$* (-511C>T), *IL1RN* (VNTR L>\*2), *IL10* (-819 C>T), *IL6* (-174 G>C) and *TNF $\alpha$*  (-308 G>A) between patients of dengue and non-dengue groups.

	Genotype	DG	NDG	OR (95% CI)	<i>P</i>	Genotype	DG	NDG	OR (95% CI)	<i>P</i>	Genotype	DG	NDG	OR (95% CI)	<i>P</i>
	<i>IL1<math>\beta</math></i>	(%)	(%)			<i>IL1RN</i>	(%)	(%)			<i>IL10</i>	(%)	(%)		
Genotype frequencies	CC	22 (23.7)	33 (48.5)	Reference	0.043±	LL	50 (60.2)	41 (54.7)	Reference	0.78	CC	21 (25.3)	13 (28.3)	Reference	0.32
	CT	53 (57)	25 (36.8)	3.18 (1.55-6.53)		L*2	29 (34.9)	30 (40)	0.79 (0.41-1.53)		CT	45 (54.2)	19 (41.3)	1.47 (0.61-3.52)	
	TT	18 (19.4)	10 (14.7)	2.70 (1.05-6.93)		*2*2	4 (4.8)	4 (5.3)	0.82 (0.19-3.48)		TT	17 (20.6)	14 (30.4)	0.75 (0.28-2.02)	
Allele frequencies	C	97 (52)	89 (48)			L	129 (78)	112 (75)			C	87 (51)	45 (49)		
	T	91 (67)	45 (33)			*2	37 (22)	38 (25)			T	79 (48)	47 (51)		
Dominant	CC	22 (23.7)	33 (48.5)	Reference	0.001±	LL	50 (60.2)	41 (54.7)	Reference	0.48	CC	21 (25.3)	13 (28.3)	Reference	0.72
	CT/TT	33 (48.5)	35 (51.5)	3.04 (1.55-5.97)		L*2/*2*2	33 (39.8)	34 (45.3)	0.80 (0.42-1.50)		CT/TT	62 (74.7)	33 (71.7)	1.16 (0.52-2.62)	
Recessive	CC/CT	75 (80.7)	58 (85.3)	Reference	0.44	LL/L*2	79 (95.2)	71 (94.7)	Reference	0.88	CC/CT	66 (79.5)	32 (69.6)	Reference	0.21
	TT	18 (19.4)	10 (14.7)	1.39 (0.60-3.24)		*2*2	4 (4.8)	4 (5.3)	0.90 (0.22-3.73)		TT	17 (20.5)	14 (30.4)	0.59 (0.26-1.34)	
Overdominant	CC/TT	40 (43)	43 (63.2)	Reference	0.011±	LL/*2*2	54 (65.1)	45 (60%)	Reference	0.51	CC/TT	38 (45.8)	27 (58.7)	Reference	0.16
	CT	53 (57)	25 (36.8)	2.28 (1.20-4.33)/		L*2	29 (34.9)	30 (40)	0.81 (0.42-1.54)		CT	45 (54.2)	19 (41.3)	1.68 (0.81-3.49)	
Additive	---	---	---	1.88 (1.17-3.02)	0.007±	---	---	---	0.84 (0.50-1.43)	0.52	---	---	---	0.87 (0.52-1.45)	0.59

(Cont.)

Genotype <i>IL6</i>	DG (%)	NDG (%)	OR (95% CI)	<i>P</i>	Genotype <i>TNFα</i>	DG (%)	NDG (%)	OR (95% CI)	<i>P</i>
GG	31 (33.3)	33 (46.5)	Reference	0.17	GG	64 (65.3)	62 (77.5)	Reference	0.17
GC	52 (55.9)	34 (47.9)	1.63 (0.85-3.13)		GA	20 (20.4)	12 (15)	1.61 (0.73-3.58)	
CC	10 (10.8)	4 (5.6)	2.66 (0.76-9.37)		AA	14 (14.3)	6 (7.5)	2.26 (0.82-6.26)	
G	114 (61)	100 (7)			G	148 (76)	136 (85)		
C	72 (39)	42 (3)			A	48 (24)	24 (15)		
GG	31 (33.3)	33 (46.5)	Reference	0.088	GG	64 (65.3)	62 (77.5)	Reference	0.073
CG/CC	62 (66.7)	38 (53.5)	1.74 (0.92-3.28)		GA/ AA	34 (34.7)	18 (22.5)	1.83 (0.94-3.57)	
GG/GC	83 (89.2)	67 (94.4)	Reference		GG /GA	84 (85.7)	74 (92.5)	Reference	
CC	10 (10.8)	4 (5.6)	2.02 (0.61-6.72)	0.24	AA	14 (14.3)	6 (7.5)	2.06 (0.75-5.62)	0.15
GG/CC	41 (44.1)	37 (52.1)	Reference		GG/ AA	78 (79.6)	68 (85)	Reference	
GC	52 (55.9)	34 (47.9)	1.38 (0.74-2.57)	0.31	GA	20 (20.4)	12 (15)	1.45 (0.66-3.19)	0.35
---	---	---	1.63 (0.97-2.73)	0.059	---	---	---	1.53 (0.97-2.42)	0.062

±  $P < 0.05$  –statistically significant;

DG – Dengue Group;

NDG – Non-dengue Group;

OR – Odds Ratio

### *Dengue infection and interleukin polymorphisms*

Table 3 shows the risk analysis for the all polymorphisms studied. In this analysis, only *IL1β* showed a significant result, where patients carrying the *IL1β* C/T genotype were associated with risk of acquiring dengue [OR=3.18 (1.55-6.53);  $P=0.043$ ]. The importance of the *IL1β* T allele was validated for dengue risk from the significant results in the dominant, overdominant and additive model analysis.

Linkage disequilibrium (LD) analysis revealed that five SNPs displayed acceptable  $D$ ,  $D'$  (linkage disequilibrium analysis),  $r^2$ ,  $\chi^2$ ,  $P$ -value and  $n$ . From the haplotype distributions, we inferred a risk for dengue considering the polymorphism interaction. According to results, *IL6* concurrently inherited with *IL1β* and *TNFα* may increase the risk of people acquiring dengue more than interactions with other interleukins (data not shown). Also, there was a significant association between *IL6*, *IL1β* and *TNFα* ( $P=0.005$  and  $0.009$ , Figure 1).

### Interaction between *IL6*, *IL1 $\beta$* and *TNF $\alpha$* genotypes

On the basis of LD analysis, combinations of *IL6*, *IL1 $\beta$*  and *TNF $\alpha$*  genotypes were analyzed. The association between *IL6* and *TNF $\alpha$*  is shown in Table 4, where it is possible to observe a strong significant association between the *IL6* genotypes (G/C and C/C) and at least one *TNF $\alpha$*  polymorphic allele (A) for acquiring dengue. In other words, there are associations between *IL6* and *TNF $\alpha$*  polymorphic alleles for risk of dengue. Besides, *TNF $\alpha$*  A allele also it was associated with *IL6* wild-type genotype. It is interesting to note that the presence of the *IL6* and *TNF $\alpha$*  homozygous polymorphic genotypes was not associated with risk.

Table 4. Genotypic distribution of polymorphisms of *IL6*(-174G>C) and *TNF* (-308G>A) in individuals with and without dengue.

Genotypes	Total number of patients N=196 (%)	Number of DG n=111(%)	Number of NDG n=85 (%)	OR (95% CI)	P-value
<i>IL6</i> -174 G>C + <i>TNF</i> alpha-308G>A					
G/G + G/G	42 (21.4)	16 (14.4)	26 (30.5)	Reference	-
G/G + G/A	11 (5.61)	7 (6.3)	4 (4.7)	2.84 (0.71-11.2)	0.12
G/G + A/A	10 (5.1)	7 (6.3)	3 (3.5)	3.79 (0.85-16.8)	0.06
G/G + G/G + G/A	53 (27)	23 (20.7)	30 (35.3)	1.24 (0.54-2.84)	0.60
G/G + G/A + A/A	21 (10.7)	14 (12.6)	7 (8.2)	3.25 (1.08-9.76)	0.03±
G/C + G/G	41 (20.9)	16 (14.4)	25 (29.4)	1.04 (0.42-2.51)	0.93
G/C + G/A	17 (8.67)	10 (9)	7 (8.2)	2.32 (0.73-7.32)	0.14
G/C + A/A	8 (4.08)	6 (5.4)	2 (2.35)	4.87 (0.87-27.14)	0.05
G/C + G/G + G/A	76 (38.7)	44 (39.6)	32 (37.6)	2.23 (1.03-4.83)	0.04±
G/C + G/A + A/A	25 (12.7)	16 (14.4)	9 (10.6)	2.88 (1.03-8.06)	0.04±
C/C + G/G	14 (7.14)	10 (9)	4 (4.7)	4.06 (1.08-15.15)	0.03±
C/C + G/A	2 (1.02)	1 (0.9)	1 (1.17)	1.62 (0.09-27.83)	0.73
C/C + A/A	2 (1.02)	1 (0.9)	1 (1.17)	1.62 (0.09-27.83)	0.73
C/C + G/G + G/A	14 (7.14)	10 (9)	4 (4.7)	4.06 (1.08-15.15)	0.03±
C/C + G/A + A/A	3 (1.43)	2 (1.8)	1 (1.17)	3.25 (0.27-38.80)	0.32

±P< 0.05 – statistically significant

DG – dengue group

NDG – non-dengue group

The association between *IL6* and *IL1β* is shown in Table 5. A very significant association was observed between the polymorphic alleles of *IL6* and *IL1β*. The presence of the polymorphic allele (T) of *IL1β* -511 C>T seemed to be relevant since a risk was observed in presence of this polymorphic allele, combined with the *IL6* heterozygous genotype and homozygous polymorphic.

Table 5. Genotypic distribution of polymorphisms of *IL6*(-174G>C) and *IL1β*(-511C>T) in individuals with and without dengue.

Genotypes	Total number of patients n=196(%)	Number of DG n=111(%)	Number of NDG n=85(%)	OR (95% CI)	<i>P</i> -value
<i>IL6</i> -174 G>C					
+ <i>IL1β</i> -511 C>T					
G/G + C/C	21 (10.7)	7 (6.3)	14 (16.4)	Reference	
G/G + C/T	36 (18.3)	15 (13.5)	11 (12.9)	2.72 (0.82-9.01)	0.09
G/G + T/T	15 (7.6)	8 (7.2)	7 (8.2)	2.28 (0.58-8.91)	0.23
G/G + C/C + C/T	47 (23.9)	22 (19.8)	25 (29.4)	1.76 (0.60-5.14)	0.29
G/G + C/T + T/T	41 (20.9)	23 (20.7)	18 (21.1)	2.55 (0.85-7.65)	0.08
G/C + C/C	27 (13.7)	11 (9.9)	16 (18.8)	1.37 (0.41-4.51)	0.59
G/C + C/T	40 (20.4)	29 (26.1)	11 (12.9)	5.27 (1.68-16.5)	0.003±±
G/C + T/T	12 (6.1)	9 (8.1)	3 (3.5)	6.00 (1.22-29.4)	0.02±
G/C + C/C + C/T	67 (34.1)	40 (36)	27 (31.7)	2.96 (1.05-8.30)	0.03±
G/C + C/T + T/T	52 (26.5)	38 (34.2)	14 (16.4)	5.42 (1.81-16.2)	0.001±±
C/C + C/C	6 (3)	4 (3.6)	2 (2.3)	4.00 (0.58-27.4)	0.14
C/C + C/T	7 (3.5)	6 (5.4)	1 (1.1)	12.00 (1.19-120)	0.01±
C/C + T/T	2 (1)	1 (0.9)	1 (1.1)	2.00 (0.10-36.95)	0.63
C/C + C/C + C/T	13 (6.6)	10 (9)	3 (3.5)	6.66 (1.37-32.27)	0.01
C/C + C/T + T/T	2 (1)	1 (0.9)	1 (1.1)	2.00 (0.10-36.95)	0.63

±*P*< 0.05 – statistically significant

±±*P*< 0.01 – very statistically significant

DG – dengue group

GND – non-dengue group

Furthermore, *IL10* and *TNFα* polymorphisms were also associated since the same analyses found them both related to dengue risk, also *ILβ* and *ILRN* due to the physiological function between them. In both analyses the, heterozygous genotype of *IL10* and *IL1β* (C/T for both) were significantly associated with *TNFα* and *IL1RN* homozygous polymorphic



genotypes, respectively [C/T + A/A - OR: 8.40 (0.92-76.1),  $P=0.03$ ; C/T + \*2/\*2 - OR: 2.02 (1.16-3.50),  $P=0.01$ , respectively].

## Discussion

Currently, the development of dengue follows the same patterns at the demographic level. The prevalence among women found in some studies in Asia and in South America [15,16] was corroborated in our study, as well as the association with Caucasians<sup>17</sup>, and in our study, there was also a high incidence in mulatto patients. In fact, the ethnic differences for dengue predisposition suggested that genetic polymorphisms could be associated with the development dengue.

Taking into account that cytokines play an important role in immune mechanisms in different viral infections around the world [16], *IL* genetic polymorphisms are interesting targets for understanding genetic susceptibility. Still, there is a lack of information about the relation between development dengue and *IL* gene polymorphism, and also, most of studies have focused on the severity of the disease. The present study focused on the development of dengue considering *IL1 $\beta$*  -511 C>T, *IL1RN* VNTR 86 bp L>\*2, *IL6* -174 G>C, *IL10* -819 C>T and *TNF $\alpha$*  -308 G>A polymorphisms independently and in combination, where our results supported the hypothesis of their association with genetic susceptibility to dengue.

Among the interleukins studied, only the polymorphic allele of *IL1 $\beta$*  was strongly associated with development of dengue. The importance of this enzyme will be discussed later in the context of associations between polymorphisms. According to the Hardy-Weinberg results, the disequilibrium of *TNF*-308 G>A polymorphism was probably due of the genetic heterogeneity of the Brazilian population, as has been found in other admixed populations. The allelic mixture came from African, Amerindian and European inheritance [17,18]. All frequencies found in each interleukin studied in this paper corroborated the frequency found in Brazilian studies of dengue infection [19, 20].

The activity against dengue occurs through stimulation of Th1 immune response and by IL-6 expression, which is greatly induced in the presence of bacterial or viral products and in response to a number of other inflammatory stimuli such as *IL1 $\beta$*  and *TNF $\alpha$* [21]. Given this and linkage disequilibrium analysis, associations were carried out between *IL6* and *TNF $\alpha$*  and *IL1 $\beta$* .

*IL6* and *TNF $\alpha$*  are important mediators of the inflammation process, which play a pleiotropic role in the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory pathways [22]. Both ILs are released in dengue infection and associated with the more severe clinical manifestation of dengue [23]. The *IL6* -174 G>C polymorphism modulates production; the C allele has been associated with decreased *IL6* expression, while the A allele of *TNF $\alpha$*  -308 G>A is associated with a sixfold increase in transcription [24]. In this study, the association of the *IL6* polymorphic allele (C) together with presence of *TNF* A allele showed risk susceptibility to dengue infection. On the other hand, also has been found risk of developing the disease in the presence of wild-type alleles in both SNPs.

Studies on association of dengue with the *IL6* -174 G>C gene polymorphisms are rare in the literature. Only three papers involved this polymorphism and just one by Moreira et al. investigated dengue susceptibility in patients from southern Brazil [19]. This group suggested a protective effect for dengue. The other two works focused on the severity of dengue and did not find any significant association [3,20].

*TNF $\alpha$*  -308G>A is more studied in dengue, though mostly in patients with severe dengue [18,19,20,25]. García-trejo et al. involving susceptibility in Mexican patients did not find a significant result regarding *TNF $\alpha$*  -308G>A, although they found a protective role in the *TNF $\alpha$*  (-238G>A) A allele in the development of dengue [26].

On the other hand, in this study we found an increase in dengue susceptibility in the presence of *IL6* polymorphic allele combined with at least a polymorphic allele of *TNF $\alpha$* ,

suggesting that the modulation of the inflammatory response is important to the success of viral infection. Also, the presence of the C polymorphic allele (*IL6*) together with T polymorphic allele (*IL1 $\beta$* ) showed a very significant susceptibility dengue virus ( $P \leq 0.03$ ). On the other hand, with *TNF $\alpha$* , the *IL6* polymorphic allele showed significance to risk of developing dengue with the dominant model ( $P = 0.03$ ). *IL6* acts against microorganisms such as dengue inducing increased expression, and stimulates other ILs, as *IL1 $\beta$*  [21,27]. The *IL6* -174 G>C polymorphism also has the ability to modulate the expression of interleukin<sup>24</sup>. There are no studies in the literature with this polymorphism of *IL1 $\beta$*  (-511 C>T) or in combination with *IL6* (-174 G>C), which led to the analysis of *IL1 $\beta$*  with *IL1RN* which is the natural antagonist of *IL1 $\beta$* .

IL1 consists of three members: *IL1A* and *IL1 $\beta$* , which act as proinflammatory cytokines, and the competitive *IL1* receptor antagonist (*IL1RA*) [28]. This antagonist also appears in a few studies of dengue and none were combined with *IL1 $\beta$*  -511C>T. In this study, we found a significant interaction of C/T with \*2/\*2 genotypes that resulted in risk [OR=2.02, 95% CI (1.16 to 3.50),  $P = 0.01$ ]. This result indicates that the *IL1 $\beta$*  response pathway may not be effective for virus elimination.

Our data corroborate the studies of Sa-Ngasang et al., which despite investigating another *IL1 $\beta$*  polymorphism (-31C>T) together with *IL1RA* in Thai patients with dengue, found that patients carrying the *IL1 $\beta$*  C allele and *IL1RA* \*2/L genotype had a higher risk of severe dengue [29]. Another study focus in *IL1RN* expression carried out in pediatric patients in Indonesia, demonstrated that *IL1RN* levels were improved and might have been associated with characteristics of more severe dengue [30]. In an IL1 review, Dinarello concludes that *IL1B* contributes to the pathogenesis of severe dengue manifestations and that this polymorphism can also affect the expression of other interleukins, such as *IL1RN* [28]. These data added to the fact that in our study the only polymorphisms that were associated

individually with risk of dengue, confirm that the presence of this interleukin is not only effective in combating the virus but also helps ease disease severity, as reported by other studies.

*TNF* (-308G>A) was also analyzed with *IL10* (-819C>T). The results of this analysis corroborate the importance of this association in dengue. Perez et al. found that the *TNF*α(-308G>A)A allele associated with different haplotypes in three *IL10* polymorphisms(-1082G>A/-819C>T/-592C>A) were related to risk of developing severe dengue in Cuban patients [18]. Our study showed a risk for dengue development in the presence of the polymorphic allele of the *IL10* and the *TNF*α polymorphic homozygote genotype [C/T + A/A, OR: 8.40 95% CI(0.92-76.1), *P*=0.03].

In conclusion, this study showed that the additive effect of some interleukin genotypes can increase dengue risk. Polymorphisms mainly in *IL1β* -511C>T, and combinations between *IL6* -174 G>C, *IL1β* -511C>T, *TNF*α -308G>A and also *IL10* (-819C>T) were shown to be relevant in the development of dengue. Besides, the findings of this study in a Brazilian population were similar to those of worldwide studies [19,20,31]. Also, it points out the importance of studies of combinations of polymorphisms in the development of dengue.

Future studies involving a larger population is therefore relevant to studies of haplotype interactions and their frequencies, helping to better understand the symptoms of dengue patients in world.

### **Acknowledgments**

We thank the Public Health Laboratory of the State of Ceará for serological and viral genetic analyses of subjects in this study. We are very thankful to the doctoral student Marcus Vinícius Cardoso of the Laboratory of Bioinformatics and Evolutionary Biology –

LIBBE/UFPE for his assistance with statistical analyses, but also the Federal University of Ceará – UFC/Brazil and the Northeast Biotechnology Network – RENORBIO/Brazil to provide the most scientific training.

### **Potential Conflicts of interest**

There is no conflict of interest

### **Funding sources**

The principal author is grateful for the financial support from the Foundation for Research Support of the State of Piauí - FAPEPI throughout much of his doctorate work.

### **References**

1. Back AT, Lundkvist A. (2013) Dengue viruses—an overview. *Infect Ecol Epidemiol.* 3:19839.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2009) Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. New Edition;[Accessed 12 April 2014]. Available at: <http://www.who.int/rpc/guidelines/9789241547871/en/>.
3. Restrepo BN, Isaza DM, Salazar CL, Ramírez R, Ospina M, Alvarez LG. (2008) Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gama in infants with and without dengue. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 41(1):6-10.
4. Green S, Rothman A. (2006) Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis.*19: 429-36.
5. Malavige G, Fernando S, Fernando D, Seneviratne SL. (2004) Dengue viral infections. *Postgraduate medical journal.*80: 948: 588-601.

6. Kerkhof HJ, Doherty M, Arden NK, Abramson SB, et al. (2011) Large-scale meta-analysis of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms on risk of radiographic hip and knee osteoarthritis and severity of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 19(3): 265-71.
7. Levi M, Keller TT, Gorp VV, et al. (2003) Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovascular Research*. 60: 26–39.
8. Stephens H. (2010) HLA and other gene associations with dengue disease severity. *Dengue Virus*. 99-114.
9. Harapan H, Fajar JK, Wahyuniati N, Anand JR, Nambaru L, Jamil KF. (2013) Non-HLA gene polymorphisms and their implications on dengue virus infection, *Egypt J Med Hum Gen*. 14 1–11.
10. BRAZIL. Ministry of Health. Department of health surveillance. Department of Epidemiological Surveillance. Dengue in Brazil: trends and changes in epidemiology, with emphasis on epidemics of 2008 and 2010 Brasilia-DF, 2010. Accessed 27 June 2014. Available at: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude\\_brasil\\_2010.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2010.pdf).
11. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). 1982. Accessed 20 Feb 2015. Available at: <http://www.molecularcloning.com>.
12. Crusius JB, Canzian F, Capella G, Pena AS, Pera G, Sala N, et al. (2008) Cytokine gene polymorphisms and the risk of adenocarcinoma of the stomach in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Ann Oncol*. 19:1894-902.
13. Sun J, Madan R, Karp CL, Braciale T. (2009) Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat. Med*. 15:277-284.

14. Yea SS, Yang YI, Jang WH, Lee YJ, Bae HS, et al. (2001) Association between TNF- $\alpha$  promoter polymorphism and *Helicobacter pylori* cagA subtype infection. *J Clin Pathol.* 54: 703–06.
15. Vasconcelos PF, Travassos da Rosa ES, Travassos da Rosa JF, de Freitas RB, Dégallier N, Rodrigues SG, Travassos da Rosa AP. (1993) Outbreak of classical fever of dengue caused by serotype 2 in Araguaiana, Tocantins, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo;* 35(2):141-8.
16. Sun P, Kochel T J. (2013) The Battle between Infection and Host Immune Responses of Dengue Virus and Its Implication in Dengue Disease Pathogenesis. *The Scientific World Journal.* 11 pages.
17. Morens DM, Rigau-Pérez JG, López-Correa RH, Moore CG, Ruiz-Tibén EE, Sather GE, et al. (1986) Dengue in Puerto Rico, 1977: public health response to characterize and control an epidemic of multiple serotypes. *Am J Trop Med Hyg.* 35: 197–211.
18. Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, Sanchez L, Valdes L, Volk HD, Guzman MG. (2010) Tumor necrosis factor- $\alpha$ , transforming growth factor- $\beta$ 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* 71, 1135–1140.
19. Moreira ST, Cardoso DM, Visentainer JE, Fonzar UJV, Moliterno RA. (2008) The Possible Protective Role of the IL6<sup>-174</sup>GC Genotype in Dengue Fever. *The Open Tropical Medicine Journal.* 1:87-91.
20. Xavier-Carvalho C, Gibson G, Brasil P, Ferreira RX, Santos RS, Cruz OG, Oliveira SA, Carvalho MA, Pacheco AG, Kubelka CF, Moraes MO. (2013) Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: A case–control, functional and meta-analysis study. *Infection, Genetics and Evolution.* 20 197–205.

21. Terry CF, Loukaci V, Green FR. (2000) Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 275: 18138-144.
22. Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, et al. (1993) Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg*48: 324-31.
23. Castro JE, Vado-Solis I, Perez-Osorio C, Fredeking TM. (2011) Modulation of cytokine and cytokine receptor/antagonist by treatment with doxycycline and tetracycline in patients with dengue fever. *Clin Dev Immunol.*370872.
24. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff DW. (1997) Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor a promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:3195-9.
25. Cai B, Deitch EA, Ulloa L. (2009) Novel insights for systemic inflammation in sepsis and hemorrhage. *Mediators Inflamm;* 1-10.
26. García-Trejo AR, Falcón-Lezama JÁ, Juárez-Palma L, Granadosb J, Zúniga-Ramos J, Rangela H, et al. (2011) Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with dengue fever. *Acta Tropica.* 120: 67-71.
27. Chow, A., Her, Z., Ong, E.K., Chen, J.M., Dimatatac, F., Kwek, D.J., Barkham, T., Yang, H., Rénia, L., Leo, Y.S., Ng, L.F. 2011. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony stimulating factor. *J. Infect. Dis.* 203, 149-57.
28. Dinarello CA. (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117(14):3720-32.
29. Sa-Ngasang A, Ohashi J, Naka I, Anantapreecha S, Sawanpanyalert P and Patarapotikul J. (2014) Association of *IL1B* -31C/T and IL-RA variable number of an 86-bp



tandem repeat with Dengue Shock Syndrome in Thailand. *Journal of Infectious Diseases* 210 (1): 138-145.

30. Suharti C, van Gorp EC, Dolmans WM, Setiati TE, Hack CE, Djokomoeljanto R, van der Meer JW. (2003) Cytokine patterns during dengue shock syndrome. *Eur Cytokine Netw.* 14:172–177.

31. Trevilatto PC, de Souza Pardo AP, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Probst CM, Garlet GP, Sallum AW, Line SR. (2011) Association of IL1 gene polymorphisms with chronic periodontitis in Brazilians. *Arch Oral Biol.* 56(1):54-62.

Manuscrito submetido à Revista Viral Immunology

Dashboard

- To submit a new manuscript, click on the "Submit a Manuscript" link below.
- Clicking on the various manuscript status links under "My Manuscripts" will display a list of all the manuscripts in that status at the bottom of the screen.
- To continue a submission already in progress, click the "Continue Submission" link in the "Unsubmitted Manuscripts" list.

My Manuscripts	Author Resources
<ul style="list-style-type: none"> <li>0 <a href="#">Unsubmitted and Manuscripts in Draft</a></li> <li>0 <a href="#">Resubmitted Manuscripts in Draft</a></li> <li>0 <a href="#">Revised Manuscripts in Draft</a></li> <li>1 <a href="#">Submitted Manuscripts</a></li> <li>0 <a href="#">Manuscripts with Decisions</a></li> <li>0 <a href="#">Manuscripts I Have Co-Authored</a></li> <li>0 <a href="#">Withdrawn Manuscripts</a></li> <li>0 <a href="#">Manuscripts Accepted for First Look</a></li> <li>0 <a href="#">Invited Manuscripts</a></li> </ul>	<p><a href="#">Click here</a> to submit a new manuscript</p> <p><b>English Language Editing Service Available:</b> Click <a href="#">here</a> to send a manuscript for information regarding English-language editing. <b>NOTE:</b> This will <b>not</b> submit your manuscript to the Journal; this link opens an email window to enable communication with the Journal's editing services only. It is important to note that it also does <b>not</b> guarantee acceptance of the manuscript for publication.</p> <p>This section lists the subjects of the five most recent e-mails that have been sent to you regarding your submission(s). To view an e-mail, click on the link. To delete an e-mail from this list, click the delete link.</p> <p><a href="#">Viral Immunology - Manuscript ID VIM-2015-0082 (30-Sep-2015)</a> <a href="#">Delete</a></p> <p><a href="#">Viral Immunology - Manuscript ID VIM-2015-0082 (12-Aug-2015)</a> <a href="#">Delete</a></p>

Submitted Manuscripts

Manuscript ID	Manuscript Title	Date Created	Date Submitted	Status
VIM-2015-0082	Clinical signs in symptomatic patients of dengue in Brazil involving 1L18 polymorphism (-511C> T). <a href="#">[View Submission]</a>	12-Aug-2015	12-Aug-2015	ADM: <a href="#">Cloud-Hansen, Karen</a> • Under Review

[top](#)

**Clinical signs in symptomatic patients of dengue in Brazil involving *IL1 $\beta$*  polymorphism (-511C> T).**

Isaac Farias Cansanção<sup>1#a\*</sup>, Ana Paula Santosdo Carmo<sup>2#b</sup>, Robério Dias Leite<sup>2#b,3§</sup>, Silvia Helena Barem Rabenhorst<sup>2#b</sup>.

<sup>1</sup>Medicine Collegiate, Federal University of San Francisco Valley, Paulo Afonso, Bahia, Brazil

<sup>2</sup>Medical College, Department of pathology and forensic medicine, Microbiology medical postgraduate program, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>3</sup>São José Hospital of Infectious Diseases, Fortaleza, Ceará, Brazil. Email addresses: apaulinhaa\_sc@hotmail.com; roberiodias.leite@gmail.com; srabenhorst@hotmail.com

<sup>#b</sup>Rua Coronel Nunes de Melo, 1315, Bairro Rodolfo Teófilo, Postal Code: 60.430-270

<sup>§</sup>Rua Nestor Barbosa, 315, Bairro Parquelândia, Postal Code: 60.455-610

**\*Author for Correspondence:** I.F. Cansanção, Medicine Collegiate, Federal University of San Francisco Valley, Centro de Treinamento Profissional de Paulo Afonso (CFPPA) –Rua Aurora, Bloco 27, Lote 3 –Bairro Alves de Souza, Postal Code: 48.607-190

**Tel.:** +55 (75) 3282-5411

**E-mail:** isaac.farias@univasf.edu.br

**Running title:** Clinical characteristics in dengue symptomatic in Brazil.

## Abstract

Dengue is an important infectious disease that has high rates of morbidity and mortality in most tropical and subtropical areas of the world. The diversity of the clinical manifestations involved in the outcome of dengue virus (DENV) infection is affected by the relation between serotype/genotype of the virus, host immune status, host genetic background and environmental factors. Polymorphisms in interleukin genes have been associated with dengue risk and therefore could also be associated with dengue symptoms. This study aimed to determine the association of the SNP of interleukins (IL) *1β* -511C>T, *IL1RN* 86 bp VNTR and *IL6* -174G>C with the clinical features of 198 individuals admitted to the São José Infectious Diseases Hospital with suspected dengue infection. Dengue was confirmed in 118 of the patients. The control group consisted of 80 other individuals without dengue. A higher frequency of increased hematocrit ( $P=0.009$ ), leukopenia ( $P=0.000007$ ), neutropenia ( $P=0.0004$ ), lymphocytosis ( $P=0.00001$ ), monocytosis ( $P=0.004$ ), atypical lymphocytes ( $P=0.03$ ) and thrombocytopenia ( $P=0.0000009$ ) was observed in the dengue patients. Among the polymorphisms studied, only *IL1β* (-511C>T) T carriers were associated with dizziness, ( $P=0.01$ ), suggesting that *IL1β* may be related to hypotensive episodes and increased vascular permeability. These results point out the importance of the *IL1β* (-511C>T) polymorphism being involved in development of clinical symptoms of dengue symptomology. The restriction of the association with the polymorphism studied can be due to the few patients with severe symptoms included. More studies in this field must be conducted to determine other associations that could be relevant for therapeutic approaches.

**Keywords:** Symptoms, Thrombocytopenia, Dengue, Brazilian cases.

## 1. Introduction

Dengue is a disease caused by the arbovirus known as dengue virus (DENV), and it is one of the most serious infectious diseases due to the high rates of morbidity and mortality in most tropical and subtropical areas of the world<sup>1</sup>. The wide spectrum of dengue symptoms, ranging from an undifferentiated fever to sudden onset of fever, severe headache, dizziness, myalgia and arthralgia, leukopenia, thrombocytopenia and even bleeding<sup>2</sup>. Host immune response resulting from DENV infection has been shown to be the major contributor in disease pathogenesis, and the outcome of DENV infection is affected by the relation between serotype/genotype of the virus, host immune status, host genetic background and environmental factors. Some interleukin polymorphisms have been associated with dengue<sup>3</sup>, and as a consequence, the diversity of clinical features could also be due to polymorphisms of interleukins associated with this disease. This study was undertaken to evaluate clinical laboratory signs in symptomatic patients with and without (other infections) dengue, considering the *IL1 $\beta$*  (-511C>T), *IL1RN* 86bp VNTR and *IL6* -174 G> C polymorphisms.

## 2. Patients and Methods

### 2.1. Subjects

This study included 198 patients with suspected dengue infection who were admitted to the São José Infectious Diseases Hospital, a public referral hospital for infectious diseases, during August 2011 to August 2013. All patients or their parent/guardian signed an informed consent form. Diagnosis of dengue infection based on clinical and laboratory parameters according to WHO clinical classification<sup>2</sup> was confirmed in 118 of the patients, where 110 patients were classified as dengue without warning signs and 8 as dengue with warning signs. These patients were designated the symptomatic group (SG) and included 64 females and 54 males. The control group consisted of 80 other individuals who had symptoms similar to

dengue but negative for dengue according to the laboratory tests. These patients were designated the non-dengue group (NDG), which consisted of 43 females and 37 males.

Additional data were included as clinical information to evaluate the persistence of clinical symptoms such as fever, headache, retro-ocular pain, languidness, exanthema, petechiae, myalgia, arthralgia, asthenia, anorexia, dizziness or poor appetite, nausea, vomiting, cough, dyspnea, chest pain, looseness, mucosal bleeding (vaginal bleeding, gum bleeding), epistaxis, hematuria, and some medications used in these patients for susceptibility to the disease. The study was approved by the Research Ethics Committee of São José Infectious Diseases Hospital, Fortaleza, Ceará, Brazil.

## 2.2. Laboratory tests

All patients had a CBC and differential count. The selected patients (SG+NDG) underwent serological and molecular analysis in the Public Health Laboratory of the State of Ceará – LACEN/CE. The peripheral blood samples of all patients were subjected to viral isolation, RT-PCR and NS1 and IgM assays.

## 2.3. Genotype analysis

Genomic DNA was extracted from 5 mL blood, collected at the same time as the hospital routine for blood analysis, using the salting-out method as previously described<sup>4</sup>. DNA quality was determined by 1% agarose gel electrophoresis, and the amount was determined using the NanoDrop 3300 fluorospectrometer (Wilmington, DE, USA).

The sequences of the PCR primers were as follows: 5'- TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC-3' (sense) and 5'-GTT TAG GAA TCT TCC CACTT-3' (antisense) for *IL1 $\beta$*  (-511 C>T); 5'- CTC AGC AAC ACT CCTAT - 3'(sense) and 5' - TCC TGG TCT GCA GGT AA

- 3'(antisense) for *IL1RN* 86 bp VNTR; and 5' - TTG TCA AGA CAT GCC AAA GTG - 3' (sense) and 5' - TCA GAC ATC TCC AGT CCT ATA - 3' (antisense) for *IL6*(-174 G>C).

The genetic polymorphisms of *IL1 $\beta$*  (-511 C>T) and *IL6* (-174 G>C) were evaluated by PCR-RFLP and *IL1RN* 86 bp VNTR polymorphism by PCR. PCR was performed using Master Mix (1x) (Qiagen, USA) and 25  $\mu$ g DNA. Restriction digestion of PCR products was done using FastDigestAvaI restriction enzyme (Fermentas –Thermo, USA) for *IL-1 $\beta$*  (-511C>T) and FastDigest SfaNI restriction enzyme for *IL-6* (-174G>C). All PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining. After PCR, the *VNTRIL1RN* fragments were visualized by 8% polyacrylamide gel electrophoresis, and the restriction products were visualized by 6% polyacrylamide gel electrophoresis. For all polymorphisms, 10% of samples were genotyped again on a random basis to confirm the results.

#### 2.4. Statistical analysis

Data were analyzed using the statistical software *EpiInfo* version 7. Significant differences were evaluated using the chi-square test ( $\chi^2$ ) and Fisher's exact test.  $P < 0.05$  was considered significant, and  $P < 0.01$  was considered very significant.

### 3. Results

#### 3.1. Clinical characteristics

The main laboratory data of all subjects distributed according to the clinical characteristics of dengue are given in Table 1. The median age of SG patients was 28.7 years old, ranging from 2 to 81 years (mean of  $28.9 \pm 10.0$ ), and the median age of NDG patients was 26.7 years old, ranging from 1 to 83 years (mean of  $29.8 \pm 10.2$ ). No significant differences were found for age, sex and ethnicity. The main laboratory data of the NDG and



SG are given in Table 1. Almost all laboratory parameters, except leukocytosis and decreased hemoglobin level, were statistically more frequent in the SG group, especially thrombocytopenia. Also, no significant differences were found for other clinical findings (data not shown).

Table 1. Clinical characteristics in symptomatic dengue and non-dengue patients.

<b>CHARACTERISTIC</b>	<b>NDG 80 (%)</b>	<b>SG 118 (%)</b>	<b>P</b>
<b>Atypical lymphocytes</b>	2 (2.5)	13 (11.0)	0.03±
<b>Increased hematocrit (Ht)</b>	4 (5.0)	23 (19.5)	0.009±
<b>Decreased hemoglobin (Hb)</b>	0 (0.0)	2 (1.6)	0.24
<b>Leukocytosis</b>	0 (0.0)	4 (3.3)	0.10
<b>Lymphocytosis</b>	0 (0.0)	30 (25.4)	0.00001±
<b>Leukopenia</b>	0 (0.0)	45 (56.2)	0.000007±
<b>Monocytosis</b>	5 (6.2)	29 (24.5)	0.004±
<b>Neutropenia</b>	4 (5.0)	34 (28,8)	0.0004±
<b>Thrombocytopenia</b>	3 (3.7)	61 (51.6)	0.0000009±

±  $P < 0.05$  – statistically significant;

NDG – Non-Dengue Group;

SG – Symptomatic Group;

### 3.2. Clinical manifestations in symptomatic individuals and the SNP

According to the significant outcome of single-SNP analysis (data not shown), only *IL1 $\beta$*  (-511C>T) was associated with clinical symptoms. Table 2 displays the distribution of symptomatic dengue manifestation in T carriers and non-T carriers. A total of 25 symptoms were described in the symptomatic group, and of these, 22 symptoms had a higher prevalence in T carriers with a significant difference observed for dizziness ( $P = 0.01$ ).

Table 2. Frequency of clinical and medication manifestations versus *IL1 $\beta$*  genotype.

<i>Clinical manifestations (symptoms)</i>	<i>Frequency of IL1<math>\beta</math> genotypes (%)</i>			
	<b>Frequency</b>	<b><i>T</i> carriers (%)</b>	<b><i>Non-T</i> carriers (%)</b>	<b><i>P</i></b>
<i>Constitutional</i>				
<i>Headache</i>	80.8	83.3	75.9	0.67
<i>Retro-orbital pain</i>	60.5	65.7	50	0.23
<i>Fever</i>	89.5	92.6	83.3	0.58
<i>Languidness</i>	22.8	23.1	22.2	0.89
<i>Dermatological</i>				
<i>Exanthema</i>	35.2	30.5	44.4	0.20
<i>Petechiae</i>	11.1	12	9.3	0.53
<i>Gastrointestinal</i>				
<i>Diarrhea</i>	22.8	25.9	16.6	0.16
<i>Vomiting</i>	35.2	37	31.4	0.52
<i>Nausea</i>	53.7	58.3	44.4	0.25
<i>Anorexia</i>	0.61	1	0	0.31
<i>Abdominal pain</i>	3	3.7	1	0.18
<i>Hemorrhagic manifestations</i>				
<i>Mucosal bleeding</i>	5.5	6.5	3.7	0.37
<i>Metrorrhagia</i>	1.2	1	1	1.00
<i>Hematuria</i>	1.2	1	1	1.00
<i>Epistaxis</i>	1.2	1	1	1.00
<i>Musculoskeletal</i>				
<i>Myalgia</i>	62.3	63	61.1	0.88
<i>Arthralgia</i>	53	51.8	55.5	0.75
<i>Neurological and behavioral</i>				
<i>Dizziness</i>	3.7	5.5	0	0.01 <sup>±</sup>
<i>Fainting</i>	1.8	2.7	0	0.08
<i>Respiratory</i>				
<i>Cough</i>	1.2	1.8	0	0.15
<i>Dyspnea</i>	0.6	1	0	0.31
<i>Chest pain</i>	0.6	1	0	0.31
<i>Medications</i>				
<i>Paracetamol</i>	44.4	47.2	38.8	0.47

<i>Dypyrone</i>	26.5	25	29.6	0.55
<i>Other medications</i>	4.9	6.4	1	0.06

<sup>±</sup>*P* < 0.05

#### 4. Discussion

Initial symptoms are common in all dengue manifestations and other viral infections, making laboratory tests, along with a guided clinical examination, necessary to confirm a diagnosis, especially in endemic areas. As expected, our data were in agreement with the literature, showing a significantly higher frequency of increased hematocrit, leukopenia, neutropenia, lymphocytosis, monocytosis, atypical lymphocytes and thrombocytopenia ( $P < 0.05$ ) in the SG group and corroborating other studies involving DENV infection<sup>5,6</sup>. Other more common symptoms such as joint pain, retro-orbital pain and itching were found with higher significance in Indian patients with dengue fever. The lack of statistical significance for hemorrhagic manifestations, particularly mucosal bleeding, was probably due to the small number of patients with warning signs, in whom these symptoms are more common.

Some studies have reported a higher prevalence of leukopenia and thrombocytopenia in non-severe cases of dengue<sup>7,8</sup>. Evidence suggests that leucopenia and thrombocytopenia occur because of the destruction or growth-inhibition of myeloid progenitor cells, which may cause peripheral destruction of platelets or only their reduced production, resulting from the destruction of bone marrow megakaryocytes by the virus<sup>9</sup>. However, mechanisms underlying thrombocytopenia in DENV infection are not yet fully understood. Several other hypotheses have been suggested in the elucidation of mechanisms involving the immune response against the virus<sup>10</sup>. The virus may directly or indirectly inhibit the production of progenitor cells in bone marrow or reduce reproductive capacity of hematopoietic cells. In addition, DENV interferes with the platelet counts, destroying cells by apoptosis or lysis through the complement system or by the involvement of antiplatelet antibodies<sup>11,12</sup>.

Dengue fever is associated with an imbalance of inflammation and risk of acquiring the disease, and interleukin polymorphisms have been found to have an influence. Therefore, it is reasonable to infer that such polymorphisms can be linked to clinical symptoms. We did not find any significant results when the association of symptoms was studied only between SG and NDG patients. An association was explored between *IL-1 $\beta$*  and clinical parameters analyzed in the symptomatic group. There are no studies in the literature associating any of the polymorphisms analyzed (*IL1 $\beta$*  -511C>T, *IL1RN* 86 bp VNTR and *IL6* -174G>C) with clinical findings of dengue patients. Our results showed that dizziness was significantly associated with the group carrying the T allele ( $P=0.01$ ). This association suggests that IL1B may be related to hypotensive episodes and increased vascular permeability in patients infected with dengue, triggering thrombocytopenia and other severe conditions<sup>13</sup>. It is reasonable to hypothesize that no other associations were found due to the fact that the majority of cases had no warning signs.

In conclusion, this study showed that the polymorphic allele of *IL1 $\beta$*  -511C>T is important in the development of dengue symptoms such as dizziness. This result reveals a new potential marker for studies of susceptibility to dengue and host immune response.

## 5. Acknowledgments

We thank the Public Health Laboratory of the State of Ceará for immunoserological and viral genetic analyses of subjects in this study. We are very thankful to the Federal University of Ceará – UFC/Brazil and the Northeast Biotechnology Network – RENORBIO/Brazil for providing most of the scientific training. Dr. A. Leyva helped with English editing of the manuscript.

## 6. Potential conflicts of interest

There is no conflict of interest.

## 7. Funding sources

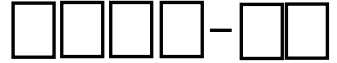
The principal author is grateful for the financial support from the Foundation for Research Support of the State of Piauí – FAPEPI, provided throughout much of his doctorate work.

## 8. References

1. World Health Organization. Dengue and severe dengue. (Fact sheet N°117): WHO Media Centre; 2015 (update May <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).
2. World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. Geneva: World Health Organization;2009.
3. Rodenhuis-Zybert IA. et al. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:2773–2786.
4. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). 1982. Available from: <http://www.molecularcloning.com>.
5. Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, et al. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS One* 2010;5:p. e8709
6. Azeredo EL, Monteiro QR, Pinto LMO. Thrombocytopenia in Dengue: Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators. *Mediators of Inflammation* 2015;313842, 16 pages.

7. Souza LJ. Dengue: diagnosis, treatment and prevention. 2nd ed. Rio de Janeiro: Rubio 2008. [in Portuguese].
8. Wang C, Lee I, Su M, et al. Differences in clinical and laboratory characteristics and disease severity between children and adults with dengue virus infection in Taiwan, 2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;103:871–7.
9. Souza LJ de, et al. Comparison of clinical and laboratory characteristics between children and adults with dengue. *Braz J Infect Dis* 2013;17(1).
10. Murgue B, Cassar O, Guigon M, Chungue E. Dengue virus inhibits human hematopoietic progenitor growth in vitro. *Journal of Infectious Diseases* 1997;175 (6):1497–1501.
11. Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection, *Viral Immunology* 2006;19(2):127–132.
12. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PCG, et al. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2013;11(5):951–962.
13. Hottz ED, Medeiros-de-Moraes IM, Assis EF, Vals-de-Souza R, Vieira-de-Abreu A, Castro-Faria-Neto HC, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza FA, Bozza PT. Platelet Activation and Apoptosis Modulate Monocyte Inflammatory Responses in Dengue. *The Journal of Immunology* 2014;193(4):1864-72.

## Apêndice A - FICHA DE COLETA DE DADOS DO PACIENTE



**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ **Nº Prontuário:** \_\_\_\_\_ **Local coleta** \_\_\_\_\_

### I – IDENTIFICAÇÃO:

Código de Identificação: \_\_\_\_\_ Sexo: F [ ] M [ ]  
 Endereço: \_\_\_\_\_ Tel: \_\_\_\_\_ Distrito: \_\_\_\_\_  
 Naturalidade: \_\_\_\_\_ Zona: [ ] urbana [ ] rural  
 Cor: [ ] caucasiano [ ] negro [ ] asiático [ ] índio [ ] mulato: \_\_\_\_\_  
 Idade: \_\_\_\_\_ Nasc: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ABO: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_  
 Grau de instrução: \_\_\_\_\_

### II-HISTÓRICO FAMILIAR/PESSOAL:

Familiares com história de dengue clássica \_\_\_\_\_  
 Familiares com história de dengue hemorrágica \_\_\_\_\_  
 Hábitos residenciais/circunvizinhos: [ ] objetos com água parada [ ] terrenos baldios  
 [ ] casas fechadas [ ] casas abandonadas

### III – HISTÓRIA CLÍNICA DA DOENÇA

Sinais e sintomas: [ ] febre [ ] cefaléia [ ] exantema [ ] dor retro-orbitária [ ] prostração [ ] mialgia  
 [ ] náuseas/vômitos [ ] artralgia [ ] diarreia [ ] outros: \_\_\_\_\_  
 Uso de medicamentos em casa quando apresentou os sintomas: \_\_\_\_\_

Manifestações hemorrágicas: [ ] epistaxe [ ] hematúria [ ] gengivorragia [ ] sangramento gastrointestinal  
 [ ] metrorragia [ ] petéquias [ ] prova de laço positiva

Caso de dengue com complicações: [ ] alterações neurológicas [ ] disfunção cardiorrespiratória [ ] insuficiência hepática  
 [ ] plaquetas < 50.000 mm<sup>3</sup> [ ] hemorragia digestiva [ ] leucometria < 1000  
 [ ] derrames cavitários [ ] não se enquadra nos critérios de FHD

Casos de FHD/SCD especificar: [ ] Grau I [ ] Grau II [ ] Grau III [ ] Grau IV

Ocorreu internação: [ ] sim [ ] não Data da internação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### IV - DADOS LABORATORIAIS RELATIVOS AO PACIENTE

HEMOGRAMA	1º exame	2º exame	3º exame	Último exame
Hemácias milhões/mm <sup>3</sup>				
Hemoglobina: g/dL				
Hematócrito: %				
Neutrófilos: ____/				
Eosinófilos: ____/				
Linfócitos: ____/				
Monócitos: ____/				
Basófilos: ____/				
Dosagem de albumina:				
Transaminases (AST/ALT):				
Nº de plaquetas: _____ mm <sup>3</sup>				

Diagnóstico final: [ ] dengue clássica [ ] dengue-complicações [ ] febre HD [ ] síndrome do choque de dengue – SCD

Critério de confirmação/descarte: [ ] Laboratório [ ] clínico-epidemiológico

Evolução do caso: [ ] Cura [ ] óbito por dengue [ ] óbito por outras causas [ ] ignorado -Data do óbito: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Médico responsável pelo atendimento/acompanhamento \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável pela Coleta: \_\_\_\_\_

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ  
SECRETARIA DA SAÚDE

HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS (1970-2010)  
40 anos promovendo a saúde e valorizando a vida



Fortaleza, 20 de setembro de 2011

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP-HSJ)**

PROTÓCOLO: 010/2011

C.A.A.E: 0013.0.042.000-11

**TÍTULO DO PROJETO:** "Análise investigativa de genes polimórficos ligados à suscetibilidade da infecção da dengue clássica e hemorrágica em pacientes do estado do Ceará"

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst

**INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS:** Hospital São José de Doenças Infecciosas – HSJ  
Universidade Federal do Ceará-UFC

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

Analisamos o projeto em questão na reunião ordinária de 19 de setembro de 2011 e entendemos que as pendências elencadas pelo parecer CEP/HSJ datado em 27 de agosto do corrente ano foram todas resolvidas. Trata-se de um estudo prospectivo a ser realizado no Hospital São José de Doenças Infecciosas, e no Hospital Santo Inácio em Juazeiro do Norte-HSN, referência na região metropolitana do Cariri, utilizado-se de dados clínicos epidemiológicos e laboratoriais. A triagem dos pacientes será realizada pelos médicos infectologistas envolvidos no projeto em estudo com pacientes, que chegarem aos citados hospitais.

Os Pesquisadores assumem compromisso formal quanto ao cumprimento da resolução 196/96 e tem uma revisão de literatura adequada ao assunto.

**CONCLUSÃO: APROVADO.**

Lembramos a necessidade do envio de relatório anual do andamento do projeto e de relatório final quando de sua conclusão, além de que qualquer mudança na proposta do estudo, deverá passar por uma prévia avaliação deste comitê. Outrossim, comunicamos que, mensalmente, o CEP-HSJ está monitorando pesquisas em execução no Hospital São José de Doenças Infecciosas escolhidas aleatoriamente.

*Alexandra Rodrigues Feijão*  
Dra. Alexandra Rodrigues Feijão  
Vice Coordenadora do CEP-HSJ