



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR

ANA PAULA SANTOS DO CARMO

Estudo da influência dos polimorfismos genéticos das citocinas IL-8, IL-17 e TGF beta e dos receptores DC-SIGN e CTLA-4 na susceptibilidade à infecção por Dengue.

Fortaleza-CE

2016

ANA PAULA SANTOS DO CARMO

Estudo da influência dos polimorfismos genéticos das citocinas IL-8, IL-17 e TGF beta e dos receptores DC-SIGN e CTLA-4 na susceptibilidade à infecção por Dengue.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica

Orientadora: Professora Dr^a. Sílvia Helena Barem Rabenhorst

**Fortaleza-CE
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D1e DO CARMO, ANA PAULA SANTOS DO CARMO.

Estudo da influência dos polimorfismos genéticos das citocinas IL-8, IL-17 e TGF beta e dos Receptores DC-SIGN e CTLA-4 na susceptibilidade à infecção por Dengue. / ANA PAULA SANTOS DO CARMO. – 2018.

116 f.: il. Color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Professora Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst.

1. Polimorfismos. 2. dengue. 3. IL8, IL17,. 4. TGFβ;. 5. CTLA-4, DC-SIGN. I. Título.

CDD 616.9

ANA PAULA SANTOS DO CARMO

Estudo da influência dos polimorfismos genéticos das citocinas IL-8, IL-17 e TGF beta e dos receptores DC-SIGN e CTLA-4 na susceptibilidade à infecção por Dengue.

Aprovada em: 26/02/2016

Banca Examinadora

Profª Drª Sílvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profª Dra Paula Rahal
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
São José do Rio Preto- SP

Profª. Drª. Raimunda Sâmia Brilhante
Universidade Federal do Ceará – UFC

Drª. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo
Laboratório Central de Saúde Pública - LACEN

Prof Dr Anastácio de Queiroz Sousa
Universidade Federal do Ceará – UFC

*Aos meus pais, ao meu
esposo, minha filha, e minha
família, que sempre me
apoiaram, incentivaram e
entenderam todas as minhas
ausências.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo sublime dom da vida, minha força, minha luz, meu guia e meu caminho;

Aos meus pais, Antonio Paixão e Maria Socorro, por todo apoio, incentivo e amor incondicional;

À minha filha Ana Beatriz, pela sua doçura, compreensão e cooperação, minha companheirinha. Filha você é um presente de Deus, uma benção muito grande que recebi do senhor, te amo pra sempre;

A toda a minha família, meus irmãos (Júnior, Patrícia, Carlos, Perpétua e Marta) que amo muito, pelo apoio, carinho, incentivo e colaboração;

Aos meus sobrinhos, amo-os como filhos, sempre torceram por mim;

Ao meu esposo Iranmar por seu apoio e incentivo, você é muito especial pra mim, sempre amarei você;

Aos meus cunhados e cunhadas pelo apoio e cooperação, e a todos os familiares e amigos que participaram direta ou indiretamente da realização deste projeto na minha vida;

A Maria Juraci Gois da Silva, por seu profissionalismo, apoio e amizade, sua ajuda foi fundamental;

A professora Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst, pelos ensinamentos, orientação, dedicação e paciência. Sua ajuda foi fundamental para a minha formação como Doutora e a realização deste trabalho, agradeço de coração, que Deus a abençoe sempre.

Ao programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica representado pelos professores e demais funcionários pelo empenho na formação científica dos pós-graduandos;

Aos Hospitais, Universitário Walter Cantídeo, São José de Doenças Infecciosas e ao Hospital Distrital Evandro Ayres De Moura, por nos permitir acesso para a execução desse estudo;

Aos pacientes incluídos nesse estudo e seus familiares, pela atenção concedida;

Dr^a. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo, pela parceria juntamente com o LACEN-Ce que nos forneceram os resultados das sorologias dos pacientes do estudo;

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

Aos participantes da banca, por aceitar o convite para participar da avaliação deste trabalho, pelas valiosas contribuições;

Ao Dr Robério Leite, médico parceiro que nos apoiou juntamente com o Hospital São José na captação de pacientes para o estudo;

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital São José de Doenças Infecciosas, pela contribuição no desenvolvimento desse estudo;

As doutoras e amigas Valeska Portela Lima, Markênia Kélia Santos Alves, Isabelle Joyce de Lima Silva Fernandes e Eliane dos Santos Pereira pelo apoio em todos os momentos, ensinamentos, presteza, incentivo e por acreditar em mim;

A doutoranda Débora Menezes Costa, por sua amizade, sempre estar disponível a ajudar e por seu profissionalismo;

A Doutoranda Emanuele, pela colaboração, apoio e convivência, você é um exemplo de profissional e de pessoa;

Ao Professor e agora Doutor Isaac Farias Cansanção meu parceiro de projeto, por seu companheirismo, apoio, cooperação nas análises e discussão de dados do nosso trabalho, sua ajuda foi muito importante para mim, agradeço pela sua amizade;

Aos alunos de iniciação científica, Márcio, Mayara, Sâmia e Marcus que nos ajudaram no início do projeto;

As alunas, de iniciação científica Beatriz e Rosana companheiras neste projeto, pela cooperação, dedicação e presteza;

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular-LABGEM, Morgana, Aline, Paulo Ricardo, Icaelle, Fabiane, Bruno e Helder pela tão agradável convivência e ensinamentos compartilhados, que tornaram este trabalho menos árduo;

A minha colega e chefe Dra Liduína Braga, por sua compreensão, paciência e apoio nas horas em que muito precisei, agradeço de coração;

A todos os amigos do hospital das clínicas que me apoiaram e incentivaram para que eu pudesse vencer mais esta etapa da minha vida;

A todas as pessoas que torceram por mim e que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho;

Resumo

A dengue é a arbovirose mais comum que afeta o homem, representa um grave problema de saúde pública principalmente em regiões tropicais e subtropicais. A infecção conduz a uma variedade de sinais e sintomas da doença, e pode variar de uma infecção assintomática a formas graves, sendo a doença associada a uma exacerbação da resposta inflamatória, a qual parece ter relação com componente genético do hospedeiro. Assim, polimorfismos em genes da resposta inflamatória são interessantes alvos para estudo da susceptibilidade a infecção por DENV. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos dos genes das citocinas *IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G), *TGFβ* (-509 C/T) e receptores *CTLA-4* (+49 A/G) e *DC-SIGN* (-336 A/G) na susceptibilidade à infecção por DENV em 196 pacientes com sinais e sintomas de dengue, atendidos em três hospitais de Fortaleza-Ceará. A confirmação de dengue foi realizada por sorologia para detecção de anticorpo IgM, pesquisa de antígeno NS1, isolamento viral e RT-PCR. A determinação genotípica dos SNPs estudados foi realizada por PCR-RFLP e PCR em tempo real. Os resultados das análises de risco considerando os genes *IL8*, *IL17* e *TGFβ* mostraram que o alelo A de *IL17* está associado ao risco para dengue enquanto que o homocigoto polimórfico *IL17* (GG) foi associado com a proteção para desenvolvimento da doença. Quando os genes foram associados, observou-se proteção nas combinações de *IL8* (AA) com (AG) e (GG) de *IL17*. Por outro lado nas análises de risco dos polimorfismos *CTLA-4* e *DC-SIGN*, foi observado um risco para o desenvolvimento da dengue associado ao gene *CTLA-4* com o modelo no *overdominante*. Por outro lado, a proteção para a dengue foi observada nas combinações *DC-SIGN* (AG) + *CTLA-4* (AA) e *DC-SIGN* (AA) + *IL17* (GG). Na análise haplotípica foi observada uma proteção para os haplotipos [AGCAA] e [AGTAG] na sequência dos respectivos genes *IL8*, *IL17*, *TGFβ*, *DC-SIGN* e *CTLA-4*. A relação entre os polimorfismos e achados clínicos mostrou uma proteção para manifestações hemorrágicas com o alelo G de *IL17* e na presença do heterocigoto (CT) de *TGFβ* no modelo *overdominante*. Observou-se uma associação do *DC-SIGN* (AA) com a ausência de manifestações hemorrágicas e do genótipo *CTLA-4* (AG) associados à contagem de plaquetas normal. Esses dados revelam a importância de *CTLA-4* (AG) associado ao risco de dengue, já que o polimorfismo alteraria sua função reguladora. Uma proteção para a dengue com alelo G de *IL17*, que também foi observada na presença da *IL8* (AA). Assim podendo sugerir a *IL17F* como potencial alvo para o desenvolvimento de terapêuticas para a dengue e outros *Flavivirus*.

Palavras chave: Polimorfismos, dengue, *IL8*, *IL17*, *TGFβ*, *CTLA-4*, *DC-SIGN*.

Abstract

Dengue is the most common disease in humans caused by arboviruses and represents a serious public health problem in tropical and subtropical regions. The viral infection leads to a variety of symptoms that range from an asymptomatic infection to serious forms of the disease. It exacerbates the inflammatory response, which seems to be related to the genetic background of the host. Thus, polymorphisms in genes involved in the inflammatory response are potential targets in susceptibility studies to DENV infection. The aim of this study was to evaluate the influence of polymorphisms in genes of cytokines *IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G) and *TGFβ* (-509 C/T) and receptors *CTLA-4* (+49 A/G) and *DC-SIGN* (-336 A/G) in the susceptibility to the infection by DENV in 196 patients with dengue symptoms, received in hospitals in Fortaleza, Ceará. Confirmation of dengue was performed by IgM serology, NS1 antigen detection and viral isolation through RT-PCR. Genotypic determination of the studied SNPs was performed by PCR-RFLP and real time PCR. The results of the risk analyses, considering the genes *IL8*, *IL17* and *TGFβ*, showed that the allele A from *IL17* is associated with the risk of dengue ($p=0.029$), while the polymorphic homozygote *IL17* (GG) is associated with the protection against the disease ($p=0.0076$). On the contrary, when the genes were associated a protection against dengue was observed in the combinations *DC-SIGN* (AG) + *CTLA-4* (AA) and *DC-SIGN* (AA) + *IL17* (GG). In the haplotype analysis, a protection by the haplotypes [AGCAA e AGTAG] in the sequence of the respective genes *IL8*, *IL17*, *TGFβ*, *DC-SIGN* e *CTLA-4* was observed. The relation between the polymorphisms and the clinical findings showed a protection against hemorrhagic manifestations by the with G allele from *IL17* in the presence of the *TGFβ* heterozygote (CT) in the *overdominant* model. Additionally, we observed an association between *DC-SIGN* (AA) with absence of hemorrhagic manifestations and the *CTLA-4* (AA) genotype associated with normal platelet count. These data reveal the relevance of *CTLA-4* (AG) associated with the risk of dengue, since its polymorphism would change its regulatory function and a protective role for the G allele of *IL17*, which was also observed with *IL8* (AA). These data suggest *IL17F* as a potential target for the development of therapies against dengue and other *flavivirus*.

Keywords: Polymorphisms, dengue, *IL8*, *IL17*, *TGFβ*, *CTLA-4*, *DC-SIGN*.

Lista de figuras

Figura 1 - Países ou zonas de risco para dengue.

Figura 2 - Indicadores OMS de vigilância da dengue.

Figura 3 - Distribuição Epidêmica da dengue nas Américas.

Figura 4 - Municípios com casos notificados e confirmados de dengue até SE 05, Ceará 2015 e 2016*.

Figura 5 - Ciclo de transmissão da dengue.

Figura 6 - Estrutura da partícula de DENV.

Figura 7 - Esquema, Genoma e proteína do DENV.

Figura 8 - Mosquito *Aedes aegypti*.

Figura 9 - Mecanismo de entrada do vírus da dengue.

Figura 10 - Fases clínicas na evolução da dengue.

Figura 11- Representação esquemática do mecanismo de ADE.

Figura 12 - Mecanismo de imunopatogênese da dengue.

Figura 13 - Nova Classificação de dengue.

Figura 14 - Exantema máculo-papular causado pelo vírus da dengue.

Figura 15 - Manifestações clínicas da dengue com e sem sinais de alarme.

Figura 16 - Progressão da dengue X métodos de diagnóstico.

Figura 17 – Fluxograma de classificação de risco de dengue em unidades específicas para tratamento e suas condutas clínicas.

Figura 18- Visão geral dos eventos chave do sistema imune mostrando a entrada do DENV através de sua ligação ao DC-SIGN.

Figura 19- Receptor CTLA na célula T interagindo com outras moléculas.

Figura 20- Organização gênica do *TGFβ*.

Figura 21 Organização do gene *IL1*.

Figura 22 - - Estrutura das quimiocinas.

Figura 23 – Equilíbrio de ligação dos genes *IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G), *TGFβ* (-509 C/T), *CTLA-4* (+49 A/ G) e DC-SIGN (-336 A/G).

Lista de gráficos

Gráfico 1. Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2014^a, 2015^b e 2016^c.

Gráfico 2 - Série histórica dos casos confirmados de dengue e incidência, Ceará, 1986 à 2015*.

Gráfico 3 - Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, Ceará, 2015 e 2016*.

Lista de tabelas

Tabela 1 - Sequência dos primers e especificações para a realização da Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR).

Tabela 2 - Protocolos e especificações para a realização do PCR-RFLP.

Tabela 3 - Protocolos e especificações para a realização de restrição.

Tabela 4 - Associação dos polimorfismos dos genes *CTLA-4* (+49 A/G) e *DC-SIGN* (-336 A/G) pacientes com dengue (DE) and pacientes sem dengue (NDE).

Tabela 5 - Análises de risco, considerando as associações os polimorfismos dos genótipos *IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G), *TGFβ* (-509 C/T), *CTLA-4* (+49 A/G) e *DC-SIGN* (-336 A/G), estudados em pacientes com dengue (DE) e grupo sem dengue (NDE).

Tabela 6: Associação dos genótipos dos genes estudados com a presença ou ausência de manifestações hemorrágicas em pacientes com dengue.

Tabela 7: Associação dos genótipos dos genes estudados com o achado laboratorial de Hemoconcentração em pacientes com dengue.

Tabela 8: Associação dos genótipos dos genes estudados com a contagem de leucócitos em pacientes com dengue.

Tabela 9: Associação dos genótipos dos genes estudados com a contagem de plaquetas em pacientes com dengue.

Lista de tabelas Artigo

Table 1 - Primers and protocols used for performing PCR-RFLP.

Table 2 - Demographic characteristics in dengue patients and non-dengue patients.

Table 3 - Clinical presentations and laboratory findings in patients with e without dengue.

Table 4 - Distribution of the *IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G), and *TGFβ* (-509 C/T) genotypes and alleles frequencies according to patients with dengue and non dengue.

Table 5 - Risk analysis considering the genotypes associations between the polymorphisms studied in patients dengue (DE) and non dengue group (NDE).

Lista de abreviaturas

CTLA-4 – antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico

DCSA – dengue com sinais de alarme

DC-SIGN – célula dendrítica específica de adesão intracelular da molécula ICAM-3

DE – grupo dengue

NDE – grupo não dengue

DENV- Vírus da dengue

DG – dengue grave

DSSA – dengue sem sinais de alarme

FD – febre da dengue

FHD – Febre dengue com hemorragia

GM-CSF – fator estimulador de colônia, granulócitos e monócitos.

HLA – antígeno leucocitário humano

IFN – interferon

IL – interleucina

NK – células assassinas naturais

OR – risco relativo (Odds ratio)

SCD – Síndrome de choque da dengue

SNPs – Polimorfismo de único nucleotídeo

TGF β – fator de crescimento transformador

TLRs- receptor “Toll –like”

TNF – fator de necrose tumoral

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. ASPECTOS HISTÓRICOS	13
2.1. HISTÓRICO DA DENGUE NO MUNDO.....	13
2.2. HISTÓRICO DA DENGUE NO BRASIL	15
2.3. HISTÓRICO DA DENGUE NO CEARÁ.....	15
3. EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE	16
3.1. DENGUE NO MUNDO	17
3.2. DENGUE NO BRASIL.....	19
3.3. DENGUE NO CEARÁ.....	21
4. AGENTE ETIOLÓGICO	23
4.1. CICLO BIOLÓGICO DE DENV.....	23
4.1.1. ESTRUTURA DENV.....	24
4.1.2. SOROTIPOS E GENÓTIPOS.....	26
4.2. CICLO BIOLÓGICO DO MOSQUITO.....	27
5. INFECÇÃO POR DENV	28
5.1. RESPOSTA IMUNE.....	30
5.2. CLASSIFICAÇÃO DA DENGUE	34
5.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	36
5.4. DIAGNÓSTICO.....	39
5.4.1. Tipos de diagnóstico.....	39
5.4.1.1. Diagnóstico diferencial.....	39
5.4.1.2. Diagnóstico laboratorial.....	40
5.4.1.2.1. Isolamento viral.....	40
5.4.1.2.2. Diagnóstico molecular.....	41
5.4.1.2.3. Diagnóstico sorológico.....	41
5.4.1.3. Outros exames para diagnóstico inespecíficos.....	42
6. Tratamento	44
7. Polimorfismos genéticos	46
7.1. Gene <i>DC-SIGN</i>	46
7.2. Gene <i>CTLA-4</i>	46
7.3. Gene <i>TG β</i>	51
7.4. Gene <i>IL17</i>	53
7.5. Gene <i>IL8</i>	55
8. PERGUNTA DE PARTIDA	56
9. HIPÓTESE	56
10. OBJETIVOS	56
10.1. OBJETIVO GERAL	56
10.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
11. MATERIAIS E MÉTODOS	56
11.1. CASUÍSTICA E COLETA DE DADOS.....	56
11.2. ASPECTOS ÉTICOS.....	57
11.3. CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA E CLASSIFICAÇÃO DA DENGUE	57
11.3.1. DETERMINAÇÃO DOS SOROTIPOS VIRAIS	59
11.4. GENOTIPAGEM.....	59
12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	62
13. RESULTADOS	63
14. DISCUSSÃO	86
15. CONCLUSÃO	89
16. CONCLUSÃO FINAL DA TESE	90
17. DIFICULDADES NA EXECUÇÃO DO TRABALHO	91
18. REFERÊNCIAS	91
19. ANEXOS	105
20. TABELAS COMPLEMENTARES	111

1. Introdução

A dengue é a mais comum arbovirose (Arthropod-borne viruses) que afeta o homem, é largamente distribuída no mundo, principalmente nas regiões subtropicais e tropicais, representando um problema de saúde pública em mais de 100 países. O vírus da dengue (DENV) é um Flavivírus, o qual é transmitido ao homem através da picada de mosquitos hematófagos fêmeas do gênero *Aedes*, particularmente o *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) (HALSTEAD SB. 2007, MCCONNELL 2012) que causa uma doença febril.

A dengue pode ser uma doença assintomática, ou se apresentar de forma benigna e autolimitada, porém pode evoluir para um quadro hemorrágico seguido ou não de choque, conhecidos respectivamente como, dengue com sinais de alarme ou dengue grave (LOEB, 2013).

2. Aspectos históricos

2.1. Histórico da dengue no mundo

De acordo com dados históricos, os primeiros registros de uma doença com sintomas similares à dengue estão descritos na enciclopédia chinesa de sintomas, doenças e remédios, publicada durante a Dinastia Chin (265 a 420 a.C.) e formalmente editada na dinastia Tang (610 a.C.). Uma doença semelhante à dengue foi chamada de “água envenenada” e associada a insetos voadores (GUBLER 2005).

Surtos da doença foram reportados nas Antilhas Francesas em 1635 e no Panamá em 1699. Desde o final do século 18, já eram registradas epidemias com descrição semelhante à da dengue na América do Norte e na Ásia. Relatos de epidemias em Batávia (Jacarta), Indonésia, Cairo e Egito em 1779 e na Filadélfia em 1780, quando uma epidemia varreu a Ásia, África e América do Norte (HENCHAL, PUTNAK 1990).

A primeira pandemia com ampla distribuição geográfica atribuída à dengue ou uma doença similar foi posterior ao século XVIII (GUBLER 2005). Entre 1780 e 1940 foram relatadas várias epidemias que se tornaram frequentes. Pandemias de dengue espalharam-se ao longo do globo, da África para a Índia e da Oceania para a América, tendo como origem o vetor africano *Aedes aegypti* que se espalhou para fora da África, em parte devido ao aumento do comércio de escravos (FARRAR et al. 2012).

A incidência das epidemias, como se pode constatar ao longo da história, está geralmente associada à introdução de novos sorotipos. Os longos intervalos existentes entre as epidemias foram provavelmente devido à dificuldade de introdução de novos sorotipos do vírus causador da doença em decorrência do lento transporte marítimo. O termo “dengue” foi utilizado pela primeira vez em 1827, no Caribe, para designar a epidemia de uma doença febril que cursava com exantema e artralgias. A palavra dengue é um homônimo espanhol da expressão “Ki denga pepo”, usada pelos nativos da região e que significava “cãimbra súbita causada por maus espíritos”. Contudo, a primeira descrição clínica da doença é atribuída a Benjamim Rush em 1789, na Filadélfia (EUA) (VERONESI,1991).

Em 1906, a transmissão por mosquitos do gênero *Aedes* foi confirmada. No ano seguinte, em 1907, foi demonstrado que a dengue é causada por um vírus, tornando-a a segunda doença de etiologia viral confirmada na história, depois da febre amarela, transmitida por mosquito. Posteriormente, pesquisas de John Burton Cleland e Joseph Franklin Siler completaram a compreensão básica da transmissão da dengue (HENCHAL, PUTNAK 1990).

A segunda guerra mundial (1939-1945) proporcionou alterações na epidemiologia global e na dinâmica de transmissão do vírus do dengue, e levou a difusão do *Aedes aegypti* entre os centros populacionais provocando grandes epidemias no Sudeste Asiático e Pacífico. O fim da guerra levou a um aumento incontrolável da urbanização, com moradias inadequadas, água não potável, bem como precária gestão de esgotos e resíduos, permitindo assim um aumento da propagação do vetor e uma dispersão dos sorotipos para diversas regiões geográficas, a partir do Sudeste Asiático (GUBLER 2005). Durante a 2ª Guerra Mundial, Sabin e Schesinger isolaram os sorotipos 1 e 2, sendo que os sorotipos 3 e 4 foram identificados em 1956 após uma epidemia em Manila, Filipinas. (HENCHAL, PUTNAK 1990; GUBLER 2005).

Em 1953, o vírus do tipo 2 foi isolado na América, na ilha de Trinidad. O sorotipo 1 apareceu em 1977, na Jamaica, vindo provavelmente da África. O sorotipo 2, vindo do sudeste asiático, causou um surto em Cuba (1981). O sorotipo 4, identificado no ano de 1981, foi proveniente das ilhas do Pacífico, A primeira epidemia confirmada em laboratório foi associada ao sorotipo 3, isolado no Caribe e na Venezuela em 1963-1964, que voltou a ser detectado na Nicarágua (1978) e no Panamá (1994). Em 1995, a dengue já era a mais importante doença viral transmitida por mosquito no mundo (HENCHAL, PUTNAK 1990, GUBLER 2005).

A dengue hemorrágica e a síndrome do choque da dengue foram observadas pela primeira vez na América do Sul e Central em 1981, tendo ocorrido em Manila, nas Filipinas,

entre 1953-1954, seguido por Bangkok, Tailândia e Malásia em 1958, e Singapura e Vietnam em 1960 (HENCHAL, PUTNAK 1990).

A epidemia do dengue foi circunscrita no continente americano durante os anos 50, 60 e 70, quando da realização de uma campanha para erradicação do *Aedes aegypti* cujo objetivo era combater a febre-amarela, o que erradicou efetivamente a doença da América Central e do Sul. Porém, essa campanha foi descontinuada, originando nova infestação do mosquito nas áreas em que já havia ocorrido a erradicação (GUBLER 2005).

No início do século XXI, a Dengue tornou-se uma das principais arboviroses nos seres humanos, e mais de 100 países tropicais são endêmicos para a dengue. Destes, 60 países têm relatado casos de FHD. Estima-se que ocorreram por ano entre 50 e 100 milhões de casos de FD e centenas de milhares de casos de FHD, com uma taxa de letalidade em alguns países tão elevada chegando a 10 - 15%. (OMS, 2010).

2.2. Histórico da dengue no Brasil

Não existem relatos de dengue até 1846, no Brasil. No começo do século XX, o Rio de Janeiro vivia uma crise de febre amarela, doença também transmitida pelo *Aedes aegypti*. Oswaldo Cruz iniciou então uma campanha para a erradicação do mosquito. Apesar de ter sua população reduzida drasticamente, ele não chegou a ser erradicado e voltou a se espalhar. No Brasil, há referências de epidemias de dengue em São Paulo (1916), e em Niterói (RJ, 1923), mas 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 et al. 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).

2.3. História da dengue no Ceará

Em relação ao estado do Ceará há casos de dengue notificados desde 1986, daí até 1993, apenas o DENV-1 foi isolado no Ceará (correspondendo a cerca de 16% dos casos

diagnosticados no país) (VASCONCELOS et al., 1995). Nesses últimos 29 anos o dengue se manifestou de forma endêmica, com o registro de, pelo menos, seis epidemias nos anos de 1987, 1994, 2001, 2008, 2011 e 2012. Destacam-se as epidemias de 1994, com a introdução de DENV-2 ocasionou um aumento de casos mais graves, e a confirmação dos primeiros casos hemorrágicos, e aumentando o número de óbitos no mesmo ano. Adicionado a estes números, apenas o estado do Ceará respondeu por 84% dos casos registrados quando comparado com outros estados brasileiros (SOUZA, 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, 2003 (ARAÚJO et al., 2006; CAVALCANTI et al., 2010). A epidemia de 2008 se destacou pelo maior número de casos graves, e a do ano de 2011 pelo maior número de casos clássicos confirmados. A circulação simultânea de vários sorotipos aumenta o risco da ocorrência de casos graves de dengue nos municípios infestados pelo *Aedes aegypti*. Normalmente, um sorotipo predomina de 2 a 4 anos, quando decresce e ressurgem um sorotipo diferente (WHITEHORN; SIMMONS, 2011). Este padrão também foi encontrado no Ceará, embora tenha sido isolado mais de um tipo circulante por temporada epidêmica (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, 2012).

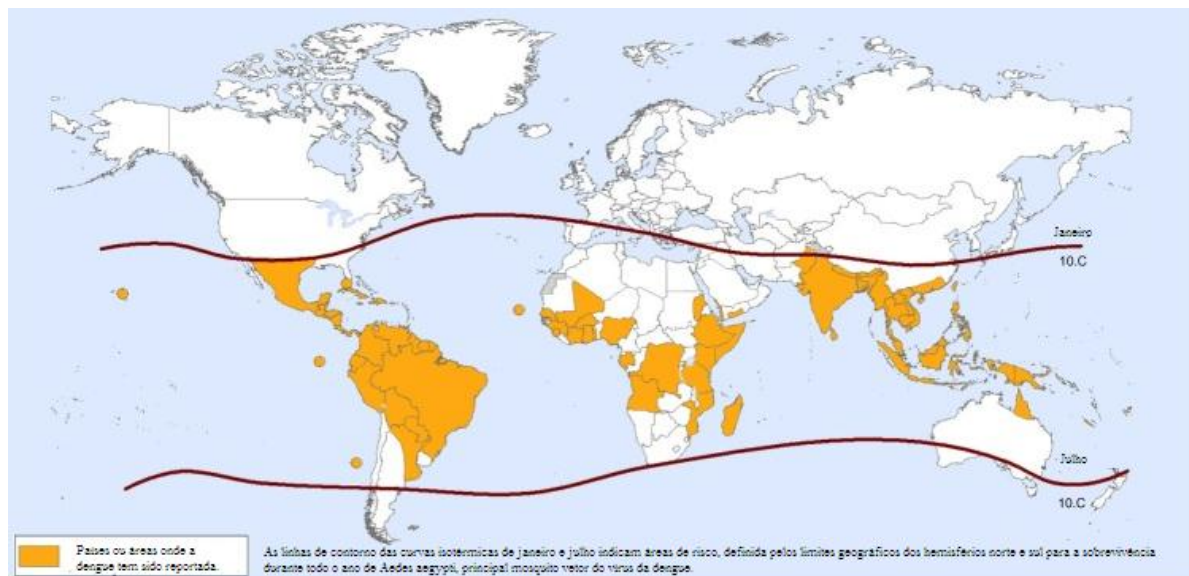
Destacamos ainda que, nos últimos doze anos, foram registrados casos da doença em todos os meses do ano, sempre com um predomínio no primeiro semestre, devido a fatores como o aumento da pluviosidade, temperatura e umidade.

3. Epidemiologia da dengue.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), nos últimos 50 anos, a incidência de casos de dengue aumentou 30 vezes, principalmente devido à expansão geográfica para novos países. Atualmente, estima-se que ocorram anualmente 50 milhões de infecções e que aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivam em risco de contrair a doença nos países endêmicos (GUZMAN, KOURI 2004).

A doença está disseminada em todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta, com uma crescente incidência nas regiões da Ásia, África e Américas Central e do Sul, constituindo um sério problema de saúde pública a nível mundial (PINHEIRO, CORBER 1997; NOBLE et al.,2010). Estudos epidemiológicos associam a expansão da doença nos últimos 50 anos ao processo de desenvolvimento urbano, ocasionado principalmente, pelo fluxo migratório desenfreado da população do campo para os centros urbanos. A falta de infraestrutura e saneamento básico em áreas ocupadas de forma não planejada contribuiu na formação de focos de criadouros do vetor (OMS, 2009). Segundo a estimativa de alguns pesquisadores, contrariando dados da OMS, ocorrem anualmente cerca de 100 milhões de casos graves e aproximadamente 300 milhões de casos moderados e assintomáticos no mundo (SIMMONS et al., 2007).

Figura 1. Países ou zonas de risco para a dengue



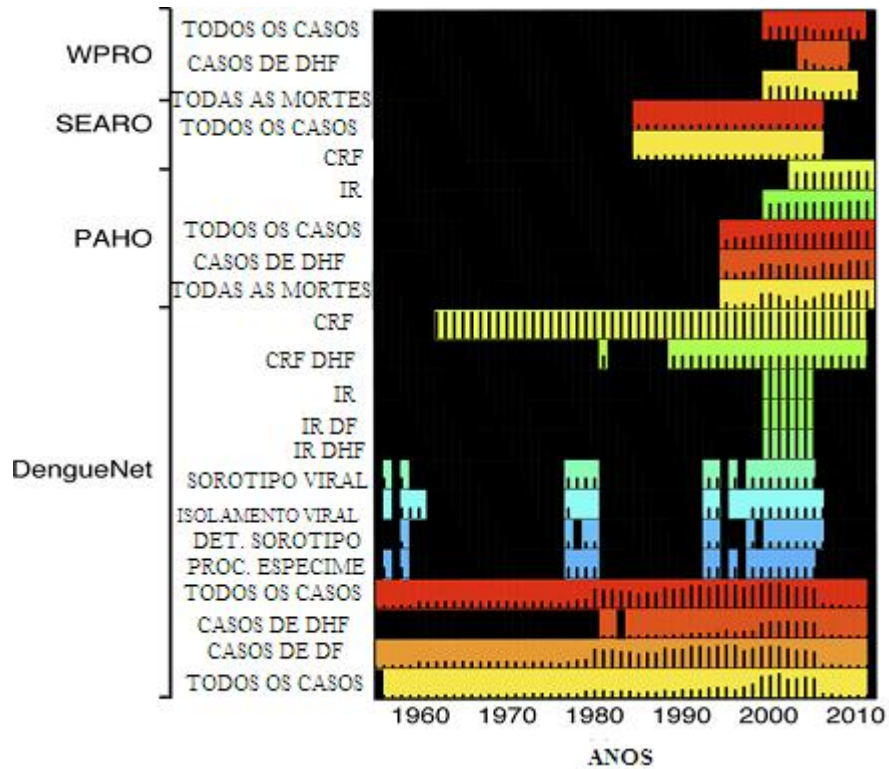
Fonte: WHO 2010.

3.1. Dengue no mundo

No mundo os dados eram disponíveis a partir da OMS para 100 países desde 1955 a 2012 representando um total de 23 milhões de casos de dengue e 82 mil mortes já relatadas à OMS. Destes, 13 milhões de casos (56%) com aproximadamente 20.000 mortes (24%) foram registrados entre 2000 e 2012. Um total de aproximadamente 4,6 milhões de casos (20%), foi relatado por WPRO – Escritório OMS do pacífico ocidental, aproximadamente 3,2 milhões

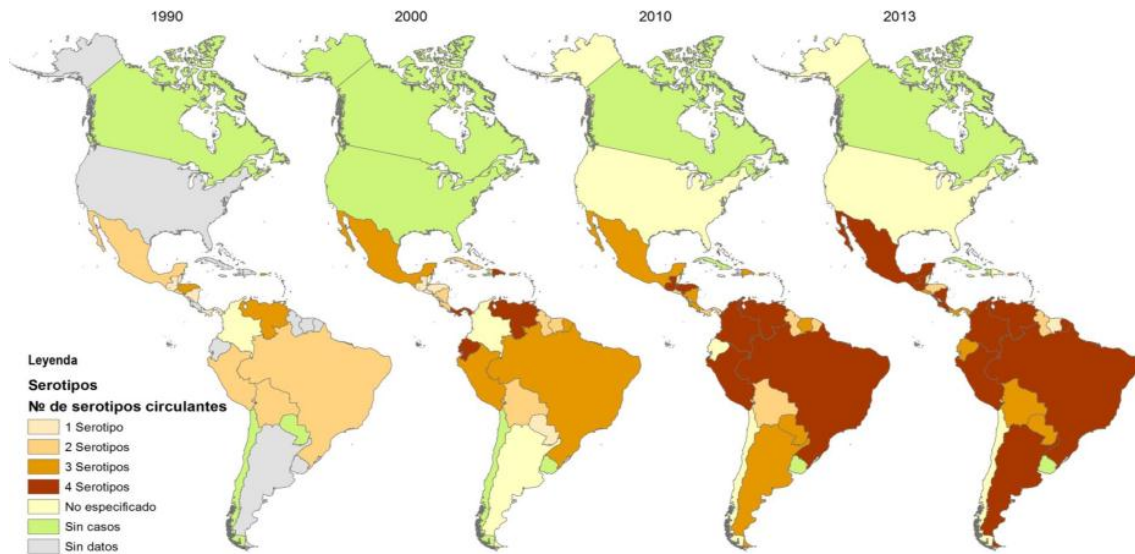
(14%) por SEARO - Escritório regional da OMS da Ásia, e aproximadamente 15 milhões (66%) por PAHO (Organização Pan Americana de Saúde). A maioria das mortes de dengue foi relatada por SEARO (49%) e WPRO (44%). (RUBERTO et al. 2015).

Figura 2. Indicadores OMS de vigilância da dengue.



Legenda: Indicadores disponíveis da OMS DengueNet e RO's (1955-2012) de vigilância da dengue. Cada indicador foi reportado por um certo número de países diferentes ao longo do tempo (representado por barras pretas que variam de 0 (parte inferior) a 83 países (em cima). DHF: Febre Hemorrágica da dengue, DF: Dengue Fever, Todos os casos: DF + DHF casos; CFR: de letalidade; IR: Taxa de incidência. Diferentes cores representam cada indicador único (Fonte: Ruberto et al. 2015).

Figura 3. Distribuição Epidêmica da dengue nas Américas



Fonte: OMS, 2015.

Até setembro de 2015, cerca de 1.836.509 pessoas foram notificadas com dengue no continente americano e ilhas do mar do caribe. Destas, 455.811 foram diagnosticadas com dengue, onde 6.004 foram classificadas com dengue grave e 851 culminaram em óbito (OPAS, 2015).

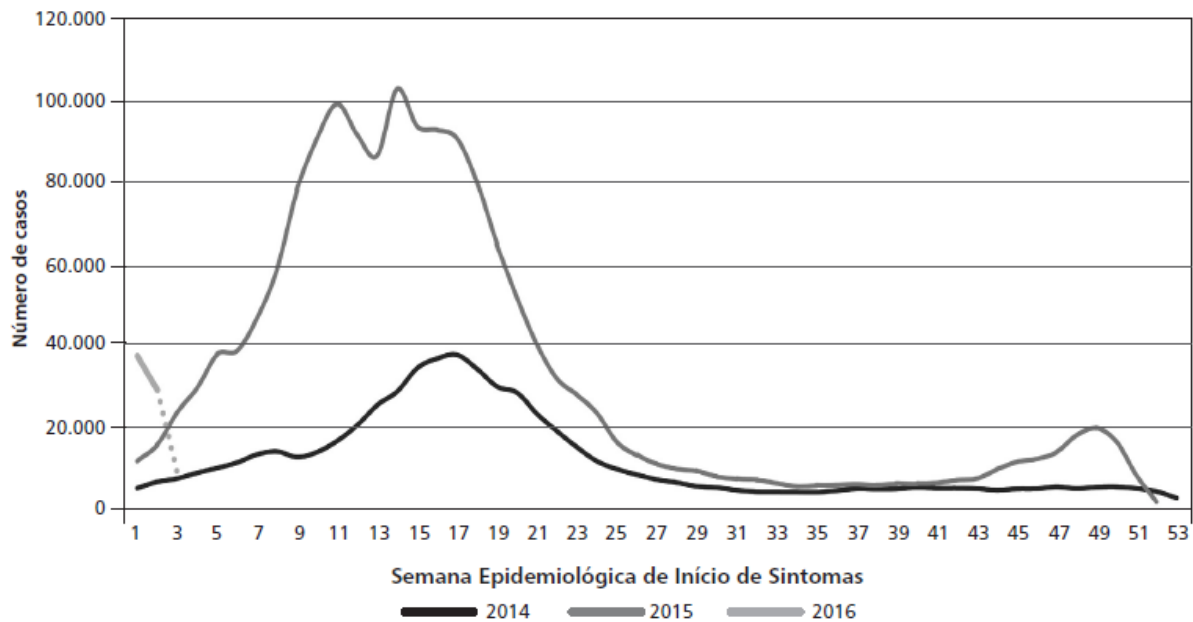
3.2. Dengue no Brasil

A dengue continua sendo um sério problema de saúde pública, especialmente nos centros urbanos do país. Em 2015, o número de casos de dengue voltou a subir em relação ao mesmo período de 2014, 1.587.080 casos prováveis de dengue no país – casos notificados, incluindo todas as classificações, exceto descartados –, até a semana epidemiológica (SE) 48 (04/01/15 a 05/12/15). Nesse período, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (997.268 casos; 62,8%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (293.567 casos; 18,5%), Centro-Oeste (211.450 casos; 13,3%), Sul (53.106 casos; 3,3%) e Norte (31.689 casos; 2,0%).

A análise da incidência de casos prováveis de dengue (número de casos/100 mil hab.), segundo regiões geográficas, demonstra que as regiões Centro-Oeste e Sudeste apresentam as maiores incidências. Entre os estados, destacam-se Goiás e São Paulo.

Quando analisada a distribuição mensal no país, observa-se que o pico da incidência ocorreu no mês de abril, seguido de uma redução no mês de maio tendência que é observada nos meses subsequentes (BRASIL, 2015).

Gráfico 1. Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2014^a, 2015^b e 2016^c

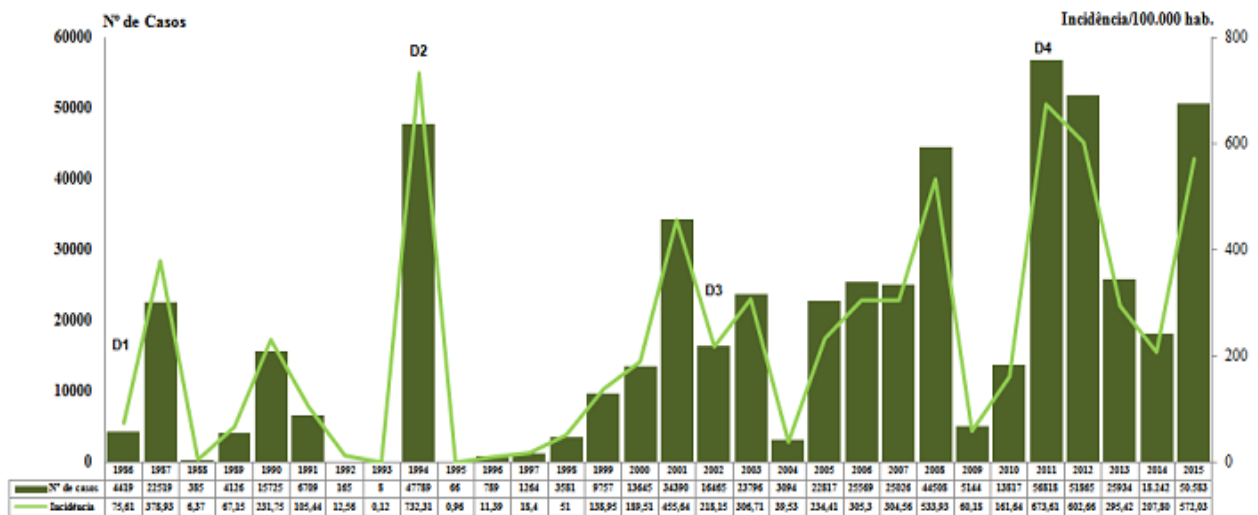


Além do aumento dos casos de dengue em geral, foi registrado no ano de 2015 também um aumento de casos mais graves e número de óbitos em decorrência da dengue, com um aumento de 70% de óbitos em relação ao ano de 2014. Em 2015, até a SE 48, foram confirmados 1.529 casos de dengue grave e 19.738 casos de dengue com sinais de alarme. No mesmo período de 2014, foram confirmados 752 casos de dengue grave e 8.330 casos de dengue com sinais de alarme. A região com maior número de registros de casos de dengue grave e dengue com sinais de alarme é a região Sudeste, com a seguinte distribuição entre seus estados: São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Foram confirmados 839 óbitos por dengue, o que representa um aumento no país de 80,4% em comparação com o mesmo período de 2014, quando foram confirmados 465 óbitos. A região Sudeste concentra 66,4% dos óbitos do país, com o maior número de óbitos registrados no estado de São Paulo. As proporções dos sorotipos virais identificados foram: DENV1 (93,7%), seguido de DENV4 (5,2%), DENV2 (0,7%) e DENV3 (0,4%). (BRASIL, 2015).

3.3. Dengue no Ceará

Na análise comparativa em relação ao ano de 2014, observa-se aumento em 2015 de 164% dos casos notificados no Ceará para o mesmo período. A circulação dos sorotipos DENV-1, DENV-3 e DENV-4, aliada a problemas na assistência médica prestada aos pacientes e a exposição a diferentes sorotipos virais, contribuíram para um aumento nas formas graves da dengue. Em 2015, as proporções dos sorotipos virais identificados foram: DENV1 (93,37%), seguido de DENV4 (5,43%), DENV2 (0,75%) e DENV3 (0,45%) (CEARÁ, 2015).

Gráfico 2 - Série histórica dos casos confirmados de dengue e incidência, Ceará, 1986 à 2015*



Legenda: Semana Epidemiológica 01 a 40 (04/01/2015 à 10/10/2015) Fonte: SESA/COPROM/NUVEP

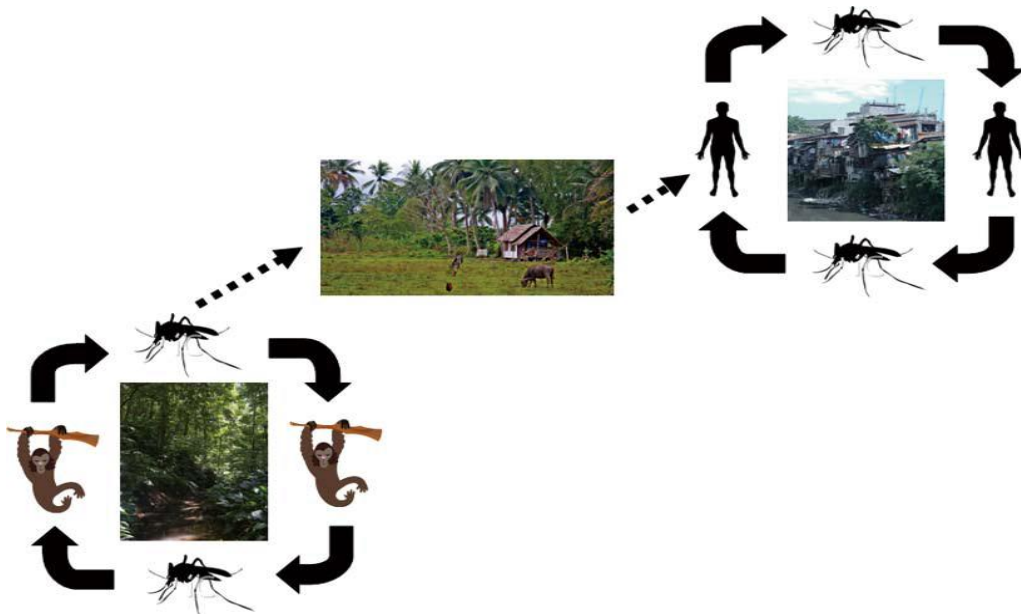
Dos casos notificados em 2015, foram confirmados 63.521 até a semana epidemiológica 52. Dos casos confirmados de dengue, a faixa etária de 20 a 29 anos predominou com 22,9% (Gráfico IV). Foram notificados 813 casos graves, destes 92,9% (756/813) foram confirmados. Do total de casos graves, 85% (643/756) foram de DCSA e 15% (113/756) de DG. Dentre os óbitos suspeitos, 66% (62/94) foram confirmados, o mês de maio apresentou o maior número de óbitos e casos graves confirmados. Até a SE 40, foram isolados três sorotipos, destas 97,6% foi de (DENV-1) e 1,2% (DENV-3) e 1,2% para o (DENV4) (CEARÁ, 2015). Em 2016, até a SE 06 (31/01/2016 a 13/02/2016), foram registrados 992 casos prováveis de dengue no Ceará, sendo 28,2% (280) confirmados. Para esta análise, consideram-se casos prováveis de dengue todas as classificações (dengue,

4. Agente etiológico

4.1. Ciclo biológico do DENV

A infecção pelo vírus da dengue não tem um efeito patogênico direto no mosquito vetor. Após a ingestão de sangue pela fêmea (hematófoga) do *A. aegypti* contendo o vírus, obtido a partir de um hospedeiro vertebrado virêmico (fase de viremia 4-12 dias), ocorre uma infecção das células epiteliais do intestino do mosquito, que se propaga através da lâmina basal do intestino para a circulação e infecta as glândulas salivares do mosquito vetor. O período de incubação intrínseco dentro do mosquito tem duração de 8-12 dias após o qual o mosquito pode infectar. A vida média do mosquito *Aedes aegypti* é de 45 dias e, nesse período, um único mosquito pode contaminar até 300 pessoas, ao picar o hospedeiro a fêmea do mosquito regurgita a saliva, na qual se encontram substâncias anticoagulantes que evitam a coagulação durante o repasto sanguíneo, assim os mosquitos infectados inoculam partículas virais no hospedeiro, inicialmente, próximo ao local da picada, daí para a corrente sanguínea da vítima (GUBLER 1998, POULIOT et al. 2010).

Figura 5: Ciclo de transmissão da dengue.



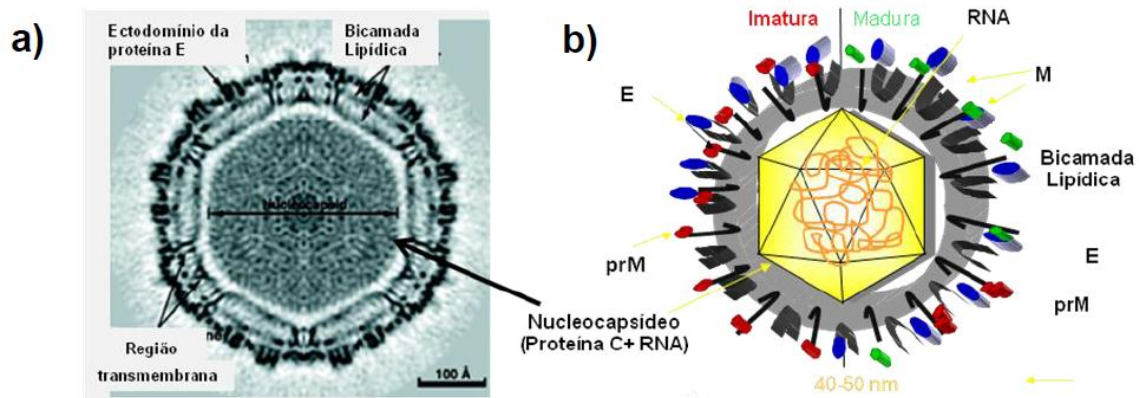
Legenda: Representação simplificada e ciclos silvestre / peri-urbano de dengue que modela a propagação natural do vírus da dengue por meio de picadas por mosquitos infectados Fonte: Pozzetto et al. 2015.

4.1.1. Estrutura do DENV

O vírus da dengue (DENV) é um arbovírus que pertence à família Flaviviridae, gênero Flavivirus. A maioria dos Flavivírus são arbovirus por serem essencialmente transmitidos por vetores artrópodes, como exemplo o mosquito (HALSTEAD, 1988). O gênero Flavivírus inclui mais de 70 vírus encontrados em todo o mundo (BIELEFELDT-OHMANN, 1997). Eles são importantes patógenos para o homem, tendo como exemplos: vírus da Febre-amarela, dengue, Encefalite Japonesa, Encefalite do Oeste do Nilo, Encefalite de St. Louis, entre outros (NEAL 2014)

O DENV é constituído por quatro sorotipos antigenicamente distintos. O DENV tem uma estrutura simples, as partículas virais são esféricas, com um diâmetro entre 50 a 55 nm. O genoma consiste de uma fita simples de RNA com aproximadamente 11 Kilobases (KDa), cujo RNA possui 5'cap, sem cauda de “poli A” e apresenta polaridade positiva. Nas extremidades 5' e 3' existem regiões não codificadoras. Possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de amplificação genômica, tradução e empacotamento viral. O RNA viral possui uma única fase de leitura (Open Reading Frame - ORF) a qual codifica uma grande poliproteína que posteriormente é clivada por proteases celulares e serinas codificadas pelo vírus em três proteínas estruturais, (C – capsídeo; M – proteína de membrana e E – glicoproteína de envelope) e 7 não-estruturais (NS: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (HALSTEAD, 1988; PERERA, KUHN 2008; MURREL et al. 2011).

Figura 6: Estrutura da partícula de DENV.

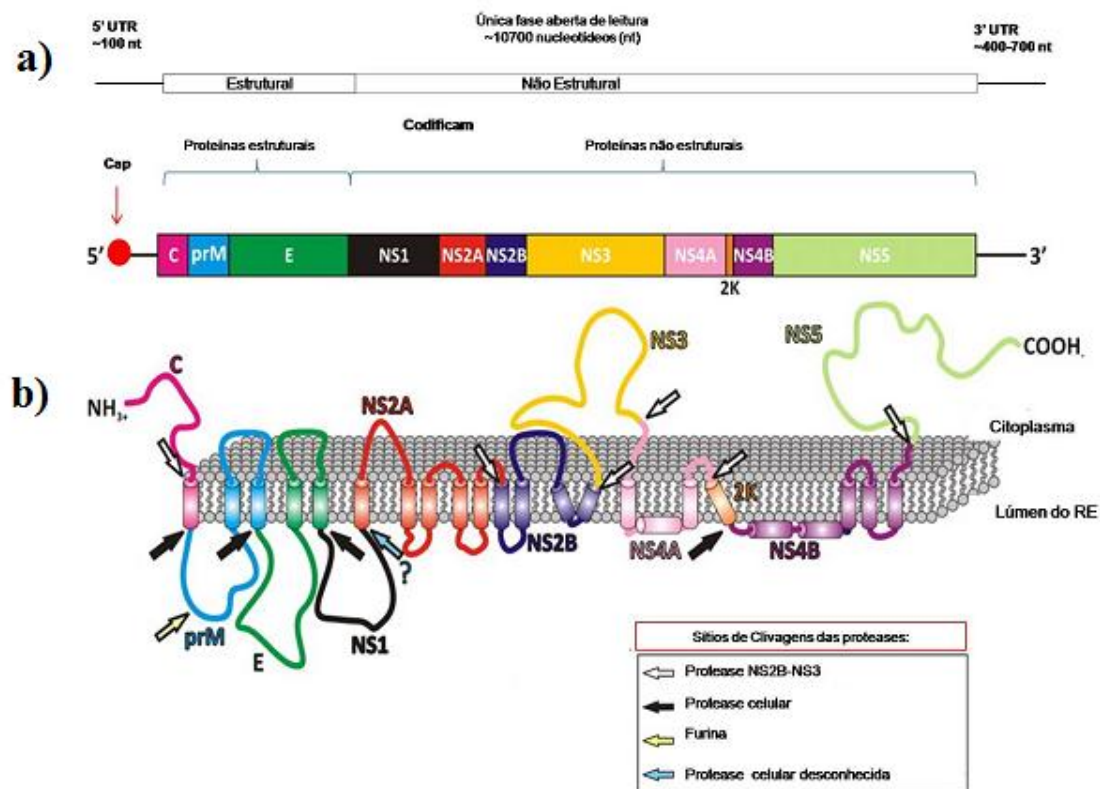


Legenda: Imagem do vírus da dengue obtida através da técnica de microscopia crioeletrônica (a). Representação esquemática da partícula dos flavivírus imatura e madura (b). (Adaptada de: Zhang et al., 2003).

Dentre as proteínas estruturais a cápsula proteica (Cápside C), que é responsável pela forma esférica da partícula viral. A proteína precursora de membrana (prM) é glicosilada, possui 26 kDa e é clivada durante a replicação viral por uma protease do tipo furina, gerando a proteína estrutural M de 8 kDa, que juntamente com a proteína de envelope (E) forma o revestimento externo da partícula viral. Várias cópias de proteína C (11 kDa) encapsulam o RNA genômico para formar o nucleocapsídeo viral, sendo este cercado por uma bicamada lipídica em que 180 exemplares das proteínas M e E estão ancoradas (MURREL et al.2011)

A proteína E (56 kDa) é fundamental para a ligação viral ao receptor de membrana e representa o principal componente antigênico do vírus, sendo a única capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes da infecção in vivo. As proteínas não estruturais são essenciais para a replicação do RNA viral. Os níveis de proteína NS1 circulante no soro de pacientes infectados têm sido correlacionados com a gravidade da doença. Enquanto as proteínas estruturais dispõem a arquitetura da partícula viral, as proteínas NS estão envolvidas nos processos de replicação e montagem dos novos vírions (CHAMBERS et al., 1990; KINNEY, HUANG 2001).

Figura 7: Esquema, Genoma e proteína do DENV.



Legenda: Esquemas de organização (a) genoma infeccioso do DENV (b) poliproteína precursora expressa nas membranas do RE. Fonte: Adaptada de Assenberg et al., 2009.

4.1.2. Sorotipos e genótipos do DENV

Existem quatro sorotipos do vírus distintos, mas intimamente relacionados, que causam a dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). Na recuperação da infecção por um sorotipo, adquire-se imunidade vitalícia contra esse sorotipo particular. No entanto, a imunidade cruzada para os outros sorotipos após a recuperação é apenas parcial e temporária. Infecções subsequentes por outros sorotipos podem aumentar o risco de desenvolvimento de dengue grave. (OMS, 2014).

Em cada sorotipo existem vírus com genótipos diferentes. Embora epidemiologicamente semelhantes, os quatro sorotipos são geneticamente e antigenicamente distintos. A infecção com um sorotipo leva a proteção permanente contra uma reinfeção homóloga e apenas parcial contra uma infecção heteróloga (LITTAUA et al. 1990).

Com o avanço da biologia molecular, foram identificadas diversas cepas dentre os sorotipos existentes. A variação genética entre genótipos pode ser responsável pelas diferenças na infecção celular, principalmente em macrófagos, sugerindo que certas cepas possuem mais virulência que outras e assim, apresentem uma alta taxa de replicação viral resultando em aumento da gravidade da doença. O papel das variações genéticas combinadas com a evolução epidemiológica viral indicou que, genótipos específicos pertencentes a certos sorotipos estariam associados a maior ou menor gravidade da doença causada pelo vírus da dengue. 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).

Análises filogenéticas com base na sequência de 240 nucleotídeos correspondentes à região de junção das proteínas E e NS1 de diferentes cepas de DENV-1 e DENV-2, têm indicado a existência de cinco genótipos para cada um destes sorotipos. (LANCIOTTI et al., 1994; HOLMES; BURCH, 2000).

Estudos mostraram que infecções primárias causadas por DENV-1, apresentaram uma taxa de morbidade alta e uma taxa de mortalidade baixa. A infecção pelo DENV-2 apresenta a maior variabilidade na patogenicidade. Alguns genótipos do DENV-2 parecem produzir pouca ou nenhuma doença, como é o caso do genótipo americano, e outros podem apresentar a doença grave como a dengue com sinais de alarme, relacionado aos dois ramos dos genótipos Asiáticos (HOLMES; BURCH, 2000).

As infecções causadas pelos genótipos do DENV-3 são similares ao DENV-1 e as infecções causadas pelo DENV-4 são semelhantes ao DENV-2. Em ambos, a resposta mais severa aparece quando de uma segunda infecção (HOLMES; BURCH, 2000).

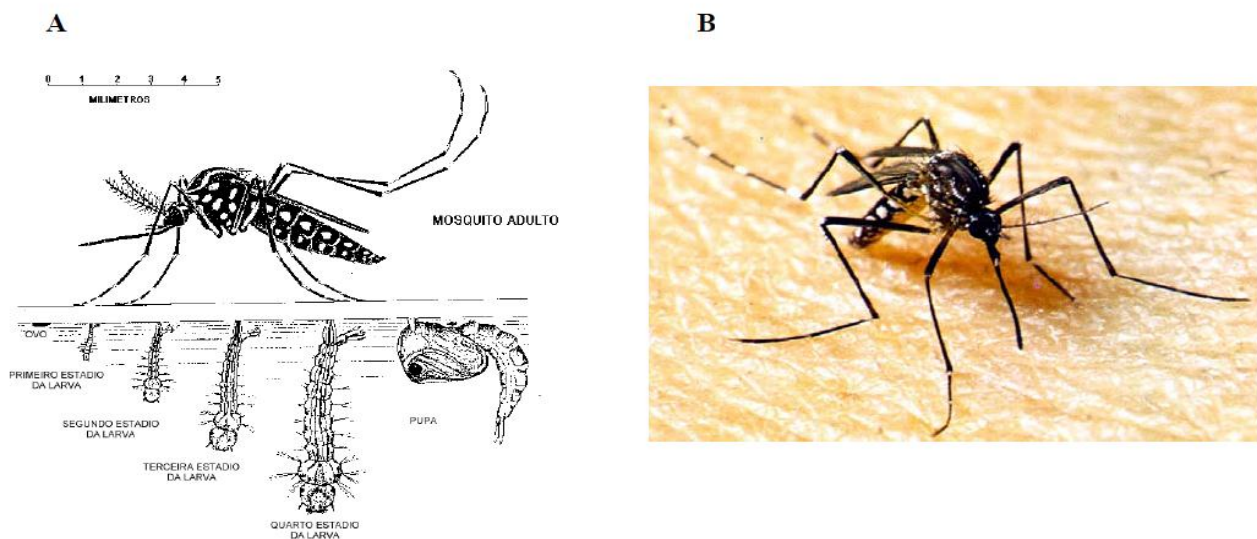
O aumento da diversidade genética demonstrou, ao longo dos últimos anos, que vem sendo acompanhado pelo aparecimento de novas cepas, sugerindo que nos próximos anos a exposição a vírus com maior patogenicidade seja ampliada (HOLMES; BURCH, 2000).

4.2. Ciclo biológico do Mosquito

O ciclo do *Aedes aegypti* é composto por quatro fases: ovo, larva, pupa e inseto adulto. As larvas se desenvolvem em água parada, limpa ou suja. Na fase do acasalamento, em que as fêmeas precisam de sangue para garantir o desenvolvimento dos ovos, ocorre a transmissão da doença (IOC, 2015).

O controle do vetor é difícil, por ser muito versátil na escolha dos criadouros onde deposita seus ovos, que são extremamente resistentes, podendo sobreviver vários meses até que a chegada de água propicia a incubação. Uma vez imersos, os ovos desenvolvem-se rapidamente em larvas, que dão origem às pupas, das quais surge o inseto adulto (CONWAY et al. 2014).

Figura 8: Mosquito *Aedes aegypti*



- a) Ilustração mostrando as fases de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti* ; b) foto de inseto adulto *Aedes aegypti* adaptado de <http://www.prdu.unicamp.br/dengue/mosquito.html>

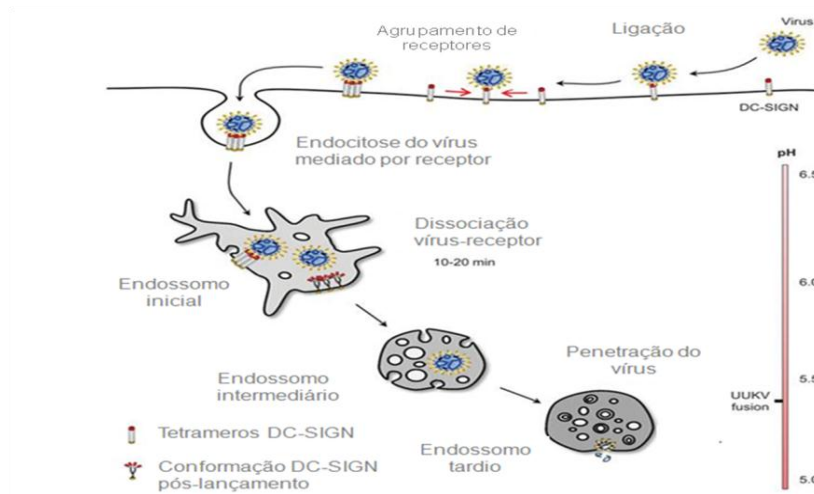
5. Infecção por DENV

O DENV interage, através de seu ligante (proteína E), com receptores e co-receptores localizados na superfície de células permissivas à infecção. Tal interação promove a adsorção e entrada da partícula viral por meio de endocitose (Figura 9). Além disso, esse estágio de “reconhecimento” (vírus-célula) determina o tropismo celular do DENV. Vários receptores foram propostos em diferentes células de mamíferos, incluindo o heparan sulfato, proteínas do choque térmico (Hsp70 e Hsp90), GRP78/Bip, CD14, receptor de laminina, CLEC5A (do inglês: C-type lectin domain family 5A), DC-SIGN (do inglês: DC (dendritic cell)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin), entre outros (CLYDE et al., 2006; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010; MURRELL et al., 2011).

Em geral, células da linhagem dos fagócitos mononucleares, tais como monócitos, macrófagos e células dendríticas são consideradas os alvos principais da infecção por DENV. Destacam-se as células dendríticas imaturas, especialmente aquelas derivadas de monócitos. Tais células apresentam alta expressão do receptor DC-SIGN na sua superfície, responsável por mediar a entrada do vírus (LOZACH et al., 2005; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010). Adicionalmente, estudos clínicos e de autópsias de indivíduos com histórico de dengue, apontam outras células, como hepatócitos, linfócitos, células endoteliais, neuronais e de Langerhans, também como alvos para a replicação viral (CABRERA-HERNADEZ et al., 2007; PAES et al., 2009). Uma vez realizada a endocitose da partícula viral, a glicoproteína E do DENV sofre eventos moleculares complexos, dependente de pH ácido, essenciais para o estabelecimento da infecção. Inicialmente, há a dissociação dos homodímeros da proteína E com a exposição do peptídeo ou “loop” de fusão que se insere na membrana do endossomo. Finalmente ocorre o processo de fusão das membranas viral e endossômica, culminando na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular (MODIS et al., 2004; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010).

No citoplasma, o genoma viral desnudo, livre do capsídeo, estabelece um processo infeccioso. As partículas virais de DENV são liberadas para o meio extracelular através de exocitose e ganham a corrente sanguínea do hospedeiro infectado. Portanto, nesse período de viremia, um mosquito (*Aedes*) pode se infectar durante o repasto sanguíneo (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010).

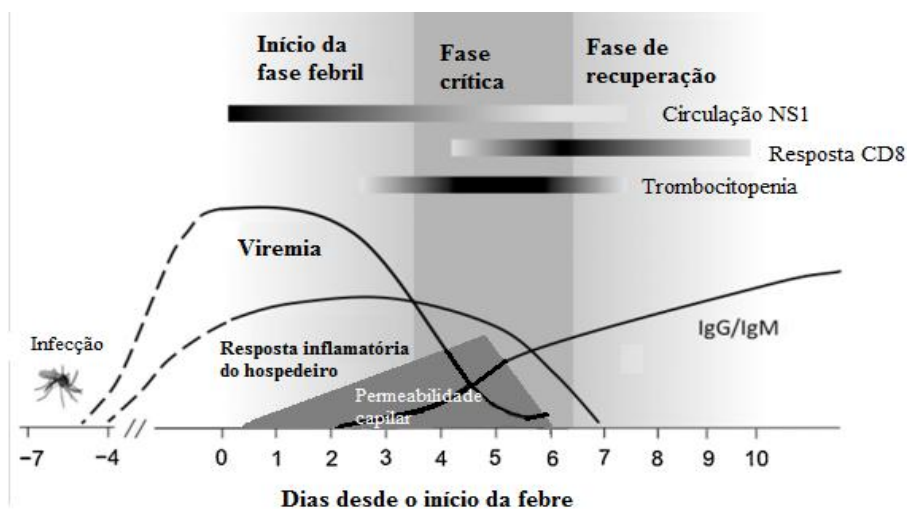
Figura 9: Mecanismo de entrada do vírus da dengue



Fonte: Lozach et al. 2011.

Quando o homem é contaminado, o vírus fica incubado em seu organismo de 2 a 15 dias (com médias de 5 a 7 dias), apenas após esse período é que surgirão os primeiros sintomas da doença. O período em que o mosquito pode ser contaminado ao picar um humano infectado vai desde um dia antes de aparecer à febre no homem até seis dias depois do aparecimento dos sintomas. Fora deste período o mosquito não se contaminará mais ao picar um indivíduo infectado. O aparelho genital do mosquito também fica parasitado transmitindo o vírus para os ovos do mosquito. Uma vez que o mosquito é contaminado fica capacitado a transmitir o vírus por toda a vida (GUBLER 1998).

Figura 10: Fases clínicas na evolução da dengue.



Fonte: Simmons et al. 2007.

5.1. Resposta imune

A primeira linha de defesa, contra o DENV provavelmente tem início com a produção de interferons (IFNs) essas moléculas parecem ser cruciais para a proteção, frente à infecção por DENV, *in vivo* e *in vitro*, (HO et al., 2005; GOMES et al., 2010; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010). A partícula viral interage com receptores de reconhecimento de patógenos, como as lecitinas do tipo-C e TLRs (toll-like receptors), expressos em células de origem mieloide, a participação desses receptores foi demonstrada na indução de resposta imune inata com produção de IFNs do tipo 1 (α e β) e 2 (γ) na infecção por DENV (SHRESTA et al., 2005; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010). Além disso, se evidenciou em pacientes com quadros leves de dengue, que a ativação de células NK (natural killer) podem secretar várias citocinas incluindo o IFN- γ , sobretudo durante os eventos iniciais da doença, antes do estabelecimento da resposta imune adaptativa (AZEREDO et al., 2006). Adicionalmente estudos com camundongos geneticamente deficientes de IFNs tipo 1 e 2 demonstraram que eles são altamente suscetíveis à infecção primária por DENV (SHRESTA et al., 2005; HO, 2005). Alguns trabalhos sugerem que as proteínas não estruturais do DENV, NS2A, NS4A, NS4B e NS5 estão envolvidas na inibição da resposta inata antiviral impedindo a produção de IFN- α (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010; JULANDER et al., 2011). Por outro lado, altos níveis de IFN- γ presente no soro de pacientes foram associados à doença grave (BOZZA et al., 2008).

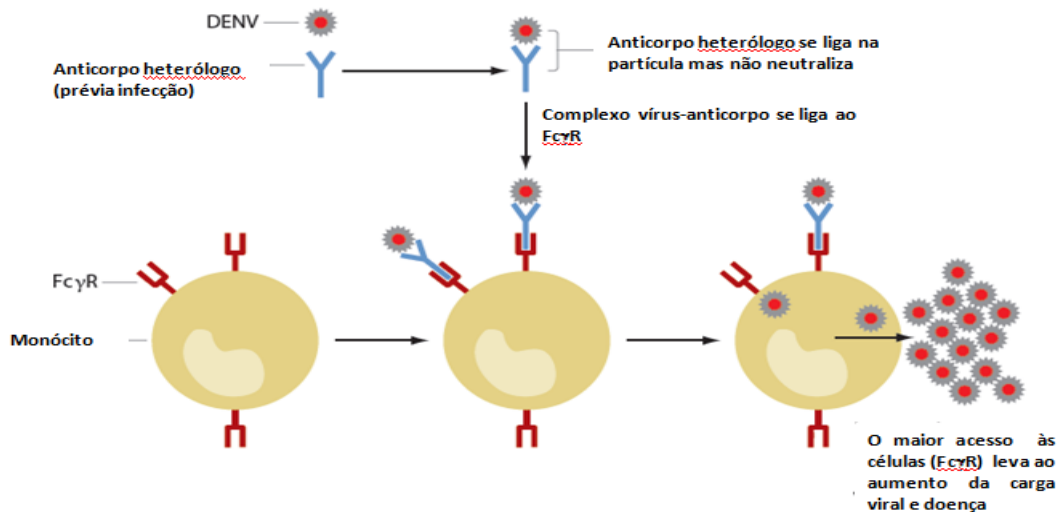
A resposta imune humoral se desenvolve aproximadamente seis dias após a picada do mosquito infectado com DENV (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010). Na infecção primária, inicialmente ocorre um aumento dos níveis de imunoglobulinas M (IgM) específicas para antígenos de DENV, as quais geralmente persistem no soro dos indivíduos por 30-90 dias. A partir do décimo dia de infecção há aumento dos níveis IgG específicas, que podem ser detectadas por muitos anos em indivíduos com histórico de dengue (GUZMAN et al., 2010; NAGESH et al., 2011). Na infecção secundária ocorre um rápido aumento nos títulos de IgG, enquanto que a resposta de IgM surge posteriormente e em baixos níveis (NAGESH et al., 2011; MURPHY, WHITEHEAD, 2011). A maioria dos anticorpos são direcionados contra as proteínas estruturais E e prM/M e contra a NS1 (KINNEY, HUANG, 2001). A proteína E apresenta-se como um forte imunógeno, capaz de induzir anticorpos com grande capacidade neutralizante bloqueando a ligação da partícula viral às células alvo e a fusão das membranas, viral e endossômica, abortando assim o estabelecimento da infecção (WHITEHEAD et al., 2007; MURPHY, WHITEHEAD, 2011; JULANDER et al., 2011). Anticorpos contra as

proteínas NS não neutralizam a infectividade viral diretamente, porém podem proteger através de outros mecanismos efetores (KURANE et al., 1984; PIERSON, DIAMOND, 2008). Os anticorpos anti-NS1 foram capazes de mediar a lise de células infectadas através da ativação de proteínas do complemento, por reconhecer a proteína NS1 pode se apresentar ancorada na superfície de células infectadas com DENV (MILLER, 2010). Foram detectados altos níveis de NS1 no soro dos pacientes com dengue durante o período febril, além de proteína NS1 solúvel também mostrar habilidade de ativar diretamente o sistema complemento (AVIRUTNAN et al., 2006). Após a ativação do sistema complemento há uma produção do complexo C5b-9 solúvel que pode estar associado aos casos graves de dengue, promovendo o aumento da permeabilidade de células endoteliais (AVIRUTNAN et al., 2006). Também foi demonstrado que estes anticorpos anti-NS1 podem apresentar reação cruzada com plaquetas ou causar apoptose em células endoteliais (LIN et al., 2002). A proteína NS1 tem sido indicada como um antígeno promissor para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue, ativando resposta imune protetora em modelos experimentais (SCHLESINGER et al., 1987; LIU et al., 2006; COSTA et al., 2007). Desta forma a participação da NS1 nesses mecanismos biológicos pode contribuir tanto para a imunopatogênese da doença bem como para a ativação de uma resposta imune protetora. Anticorpos preexistentes anti-DENV gerados durante a infecção primária e que reconhecem epítomos cruzados, presentes nos demais sorotipos, parecem ter papéis opostos durante a infecção secundária (LAOPRASOPWATTANA et al., 2007).

Quanto à gravidade da dengue, existem basicamente Três teorias que poderiam explicar a aparição das manifestações mais graves da doença. Na primeira é proposto que, após a infecção primária a imunidade contra o DENV é conseguida pela produção de anticorpos neutralizantes sorotipo específicos, dirigidos contra a proteína E. Em uma infecção secundária com um sorotipo diferente, anticorpos não neutralizantes poderiam promover um fenômeno denominado ADE (da sigla em inglês “antibody-dependent enhancement”) onde estes anticorpos não neutralizantes causariam um aumento na entrada do vírus em células fagocíticas mediado pelo receptor FcRII, resultando no aumento da carga viral no hospedeiro (Fig. 1.7) (LITTAUA et al., 1990; LAOPRASOPWATTANA et al., 2007; MATHEW, ROTHMAN, 2008; MURPHY, WHITEHEAD, 2011). Entretanto, a relevância desse mecanismo in vivo ainda não foi completamente esclarecida (MATHEW, ROTHMAN, 2008). Recentemente, foi demonstrado que os anticorpos anti-prM possuem capacidade limitada de neutralização e se ligam nas proteínas prM, não clivadas, presente na superfície viral. Tal ligação, associada à capacidade desses anticorpos de reagirem cruzadamente com os

outros sorotipos do DENV, também pode contribuir para o aumento da carga viral em humanos, através do fenômeno ADE (DEJNIRATTISAI 2010).

Figura 11: Representação esquemática do mecanismo de ADE.



Fonte: Murphy, Whitehead, 2011.

A infecção primária por DENV, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, também promove o desenvolvimento de uma resposta de células T, CD4+ e CD8+, específica contra epítomos das proteínas virais (MATHEW, ROTHMAN, 2008; YAUCH et al., 2009; MURPHY, WHITEHEAD, 2011). A presença de células T - específicas no soro com reatividade cruzada em indivíduos com infecções aguda, células T de baixa afinidade produzidas em uma infecção primária podem ter uma reação cruzada, tornando-se os efetores predominantes contra antígenos apresentados durante uma segunda infecção (MATHEW, ROTHMAN, 2008).

Na resposta imune descrita acima, um pressuposto fundamental na imunopatogênese da infecção por DENV é que células T de memória geradas durante uma infecção primária são capazes de responder a antígenos relacionados que são apresentados durante infecção secundária. A expansão seletiva de células T com reatividade cruzada em detrimento das células T naïve ativadas, que apresentariam maior avidéz, alteraria o repertório de células respondedoras no contato com outro sorotipo. Segundo Alan Rothman (2003), esta resposta estaria respaldada pelas seguintes observações:

- A.- Maior ativação de células T em pacientes com DHF, quando comparados ao fenótipo das células em pacientes com DF. Hemorragia
- B.- Alteração no perfil de citocinas produzidas em pacientes com doença grave.

C.- Expansão preferencial de células T de memória que reconhecem proteínas não estruturais.

Alguns estudos realizados demonstraram que a infecção por DENV induz uma resposta imune celular de memória específica, tanto com células de pacientes com dengue quanto em animais, e os clones de memória gerados são capazes de reagir contra epítomos homólogos e heterólogos de DENV (MATHEW, ROTHMAN, 2008; BASU, CHATURVEDI, 2008). Embora as células T de memória sejam capazes de reagir de forma cruzada contra sorotipos heterólogos do DENV, podendo assim prover imunidade protetora em infecções sequenciais, tal resposta, na verdade, vem sendo associada aos processos imunopatogênicos frente à infecção secundária (BASU, CHATURVEDI, 2008; MURPHY, WHITEHEAD, 2011). De acordo com a teoria do pecado original antigênico, as células T de memória derivadas da infecção primária, que reagem contra os sorotipos heterólogos de DENV durante a infecção secundária, são ativadas antes do estabelecimento de clones específicos contra a infecção corrente. Essa rápida ativação e proliferação de clones heterólogos com baixa afinidade, associada à robusta produção de citocinas e baixa atividade citotóxica, foram relacionadas ao extravasamento plasmático observado em quadros graves da dengue (MATHEW, ROTHMAN, 2008).

A perda da integridade das células endoteliais de um modo geral vem sendo associada à resposta imune anormal, com produção de altos níveis de citocinas e quimiocinas, (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, MCP-1, GM-CSF e INF- γ) e tal efeito vem sendo chamado de “Tsunami” de citocinas (citokine storm), observada em pacientes com quadros graves da doença (BASU, CHATURVEDI, 2008; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010). Além disso, estudos também demonstraram níveis elevados de moléculas solúveis no soro de pacientes com dengue grave como sCD4, sCD8, sIL-2, sTNFRs (MATHEW, ROTHMAN, 2008).

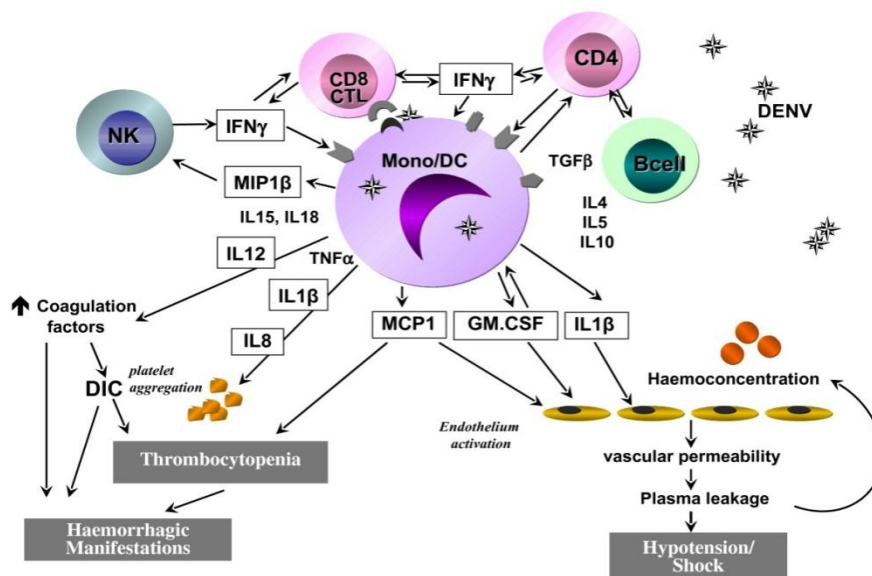
Outra teoria foi proposta por pesquisadores cubanos, a teoria integral de multicausalidade segundo a qual se aliam vários fatores de risco às teorias de infecções sequenciais e de virulência da cepa. A interação desses fatores de risco promoveria condições para a ocorrência da FHD:

- fatores individuais – menores de 15 anos e lactentes, adultos do sexo feminino, raça branca, bom estado nutricional, presença de enfermidades crônicas, diabetes, asma brônquica, anemia falciforme), preexistência de anticorpos, intensidade da resposta imune anterior;
- Fatores virais – sorotipos circulantes e virulência das cepas;

- Fatores epidemiológicos – existência de população suscetível, circulação simultânea de dois ou mais sorotipos, presença de vetor eficiente, alta densidade vetorial, intervalo de tempo calculado entre 3 meses e 5 anos entre duas infecções por sorotipos diferentes, sequência das infecções (DEN-2 secundário aos outros sorotipos), ampla circulação do vírus.

Assim, a exacerbação da resposta imune em dengue, tanto humoral quanto celular, parece estar fortemente relacionada à patogênese da doença, e a soma dessas três teorias descritas podem tentar explicar os casos mais graves (GUZMÁN; KOURI, 2002). Alguns polimorfismos encontrados em genes que fazem parte do complexo HLA (Human Leukocyte antigen) ou em genes não HLA também foram relacionados à suscetibilidade ou gravidade de infecções com DENV (VEJBAESYA et al., 2009).

Figura 12: Mecanismo de imunopatogênese da dengue.



Fonte: BOZZA et al., 2008.

5.2. Classificação da dengue

Segundo a OMS a dengue pode se apresentar como quadros de febre indiferenciada, antigamente classificada como FD (febre da dengue) e quadros mais graves como FHD/SCD (Febre hemorrágica da dengue/ síndrome de choque da dengue) (WHO, 1997; WHITEHEAD et al., 2007; WHO, 2009).

A antiga classificação da OMS de 1997 dividia o quadro hemorrágico em quatro graus de gravidade: I, II, III e IV. No grau I, compreende os sintomas da dengue clássica e a prova do laço é positiva. No grau II estão presentes as características do grau I, 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 categorização de gravidade. 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. Assim, em 2009 a OMS estabeleceu uma nova classificação (Quadro 1) (WHO, 1997; 2009).

No Brasil, a nova classificação da OMS de 2009, só passou a vigorar oficialmente a partir de 01 de março de 2014, nos boletins epidemiológicos e programas governamentais, como “O Sentinela”, os casos de dengue registrados daí em diante já seriam classificados como, dengue, dengue com ou sem sinais de alarme e dengue grave, no SINAN, embora dados de 2013 precisassem ter sido inseridos/atualizados para esta nova classificação até 28 de fevereiro de 2014, o que não ocorreu (BRASIL, 2014).

Figura 13: Nova Classificação de dengue.

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

Adaptado da Organização Mundial da Saúde. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Fonte: WHO/TDR, 2009.

5.3. Manifestações clínicas

Um amplo espectro de manifestações clínicas pode ser encontrado em pacientes com dengue. Além disso, a dengue muitas vezes apresenta evolução clínica, com resultados imprevisíveis nos indivíduos sintomáticos (WHO, 2009). Por outro lado, muitos indivíduos infectados com DENV podem não apresentar sintomas da doença (ROTHMAN, 2003).

Os quadros de dengue se iniciam logo após o período de incubação viral que dura de 4-7 dias. A febre indiferenciada mimetiza o que ocorre em outras infecções virais, comprometendo assim, o diagnóstico de dengue (GURUGAMA et al., 2010). Na doença sintomática ocorre ainda o sintoma de “quebra-ossos” doloroso e uma fase febril que dura de 2-7 dias e, depois, na maioria dos pacientes a melhora ocorre lentamente. O vírus da dengue desaparece da corrente sanguínea aproximadamente ao mesmo tempo em que a febre se dissipa (WHITEHEAD et al., 2007).

Nos quadros de dengue, frequentemente são observados os sintomas de: febre alta; dores generalizadas pelo corpo (na cabeça, retro orbitais, nos ossos, nas articulações, abdominais); vômitos; diarreias; manifestações dermatológicas, pruriginosas ou não, como erupções maculo-papulares, erupção cutânea e ocasionalmente pequenas manifestações

hemorrágicas que caracterizam a dengue. Além disso, são relatadas leucopenias, trombocitopenias e elevações nos níveis de transaminases no soro dos indivíduos com dengue. A Dengue tem duração de aproximadamente 5-7 dias e após este período geralmente a febre cessa e os sintomas regredem. A recuperação em muitos pacientes é ainda acompanhada de fadiga prolongada e depressão por muitos dias (WHITEHEAD et al., 2007; WHO, 2009; ROSS, 2010; GURUGAMA et al., 2010).

O curso clínico inicial da dengue com sinais de alarme, antiga dengue hemorrágica (FHD) se assemelha com aquele apresentado na dengue. Contudo, os sintomas dos pacientes evoluem rapidamente, seguidos de sangramentos espontâneos. A dengue com sinais de alarme, uma das formas severas da doença, é caracterizada pelo extravasamento do plasma, trombocitopenia, coagulopatia e hemorragia. Os sinais de alarme são: dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, hipotensão postural e/ou lipotímia, hepatomegalia dolorosa, sangramento de mucosa ou hemorragias importantes (hematêmese e/ou melena), sonolência e/ou irritabilidade, diminuição da diurese, diminuição repentina da temperatura corpórea ou hipotermia, aumento repentino do hematócrito, queda abrupta de plaquetas, e desconforto respiratório. O aumento da permeabilidade vascular e extravasamento do plasma promovem uma diminuição do volume plasmático e conseqüentemente um choque hipovolêmico em certos pacientes, caracterizando a dengue grave (WHO, 2009; ROSS, 2010; GURUGAMA et al. 2010). Além disso, o extravasamento de fluido intravascular para os espaços intersticiais causa hemoconcentração e hipoproteïnemia podendo ainda o paciente com dengue com sinais de alarme apresentar insuficiência e/ou falência circulatória, trombocitopenia e hepatomegalia (WHO 2009).

Figura 14: Exantema máculo-papular causado pelo vírus da dengue

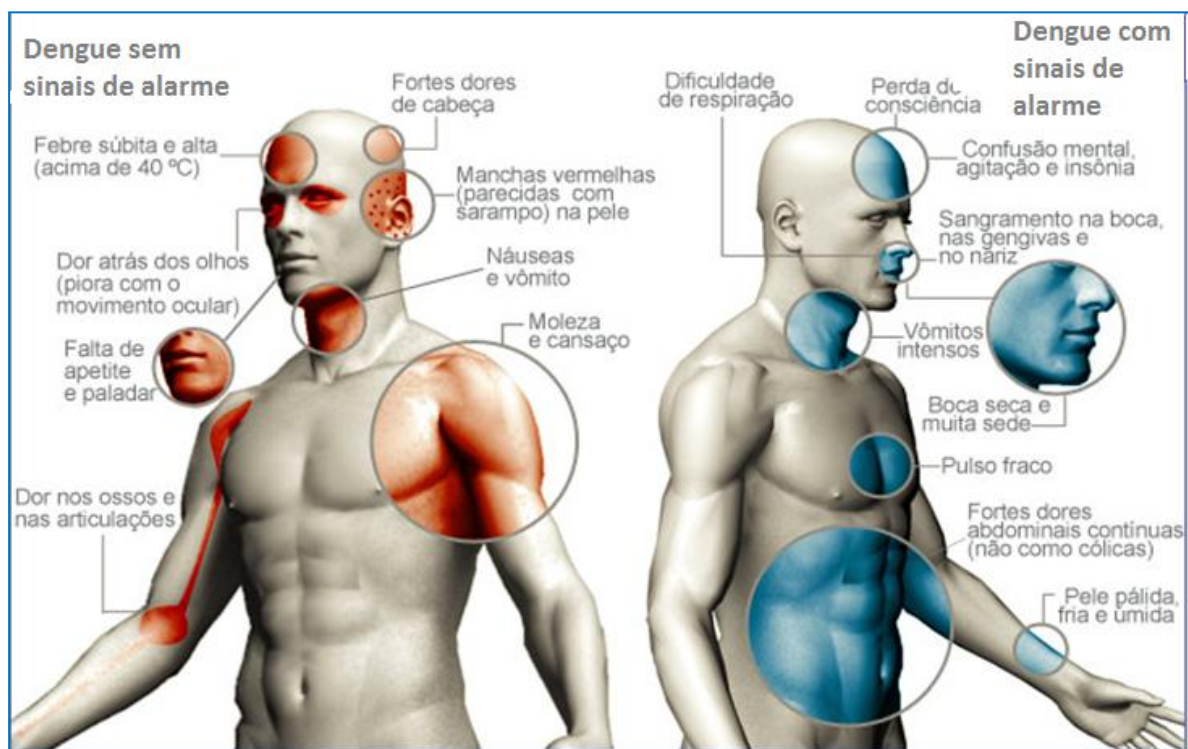


Fonte: Bulugahapitiya, U., *Dengue fever in travellers: A challenge for European physicians*.

Todos os sintomas da dengue estão relacionados com elevados níveis séricos de citocinas liberadas por células do sistema imune. Têm sido observados, altos teores séricos de IL-2 e de seu receptor solúvel, CD4 solúvel, IFN- γ com elevação mantida até a convalescença, TNF- α , IL-1 e PAF. A leucopenia e a discreta e transitória depressão medular que se apresentam nestes casos, também está associada aos altos teores de citocinas macrófágicas. As mialgias são consequentes, em parte, da multiplicação viral no próprio tecido muscular, inclusive músculos óculo-motores são acometidos, sendo responsáveis por cefaléia retro-orbitária em muitos pacientes (MANGADA et al., 2005).

Aproximadamente um terço dos pacientes com dengue pode ter apenas sintomas leves ou apresentar manifestações hemorrágicas, incluindo hemorragia, petéquias, sangramento gengival, e uma prova do laço positiva. A leucopenia e a trombocitopenia são achados comuns nos casos de dengue e acredita-se ser causado por ações destrutivas direta do vírus sobre as células precursoras de medula óssea. A replicação viral ativa e destruição celular na medula óssea acreditam-se ser a causa da dor óssea (SOUZA et al. 2013).

Figura 15: Manifestações clínicas da dengue com e sem sinais de alarme



Fonte: www.dengue.org.br

5.4. Diagnóstico

A identificação precoce dos casos de dengue é de vital importância para a tomada de decisões e adoção de condutas que deverão visar o agravamento dos casos e evitar óbitos. A organização dos serviços de saúde, tanto na área de vigilância epidemiológica quanto na prestação de assistência médica, é necessária para reduzir a letalidade por dengue no país, bem como fazer notificação de casos suspeitos e confirmados de modo a conhecer a situação da doença em cada região (BRASIL, 2013).

A classificação epidemiológica dos casos de dengue, que é feita habitualmente após desfecho clínico, na maioria das vezes é retrospectiva e depende de informações clínicas e laboratoriais disponíveis ao final do acompanhamento médico. Esses critérios não permitem o reconhecimento precoce de formas potencialmente graves, para as quais é crucial a instituição de tratamento imediato (BRASIL, 2013).

Portanto foi preconizado pelo Ministério da Saúde protocolo de condutas, que deve ser seguido frente a todo paciente com suspeita de dengue. É proposto que se faça uma abordagem clínico-evolutiva, baseada no reconhecimento de elementos clínico-laboratoriais e de condições associadas que podem ser indicativos de gravidade, com o objetivo de orientar a conduta terapêutica adequada para cada situação (BRASIL, 2013).

5.4.1. Tipos de diagnóstico

5.4.1.1. 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, chikungunya, infecção pelo zika, entre outras. Nas formas mais agressivas (dengue grave), pode manifestar-se similarmente como doença de Kawasaki, febre tifoide, hantavirose, febre amarela, leptospirose, septicemia, meningite por influenza tipo B, miocardites, entre outras. (BRASIL, 2013). Por isso, faz-se necessário o diagnóstico para servir de auxílio no tratamento mais adequado para a dengue.

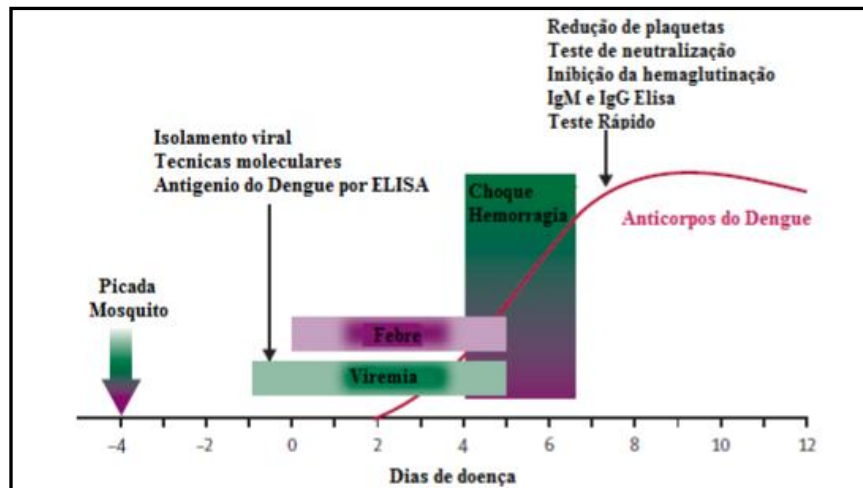
5.4.1.2. Diagnóstico laboratorial

Este diagnóstico para a dengue pode ser realizado através de técnicas virológicas, sorológicas e moleculares (GUZMAN et al. 2000; VELATHANTHIRIA et al., 2006).

O vírus após entrar em contato com o hospedeiro infecta o plasma, sangue e tecidos, principalmente o tecido imunitário, 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 16) (GUZMAN; KOURI, 2004; HALSTEAD, 2007; WHO, 2009).

Figura 16: Progressão da dengue x métodos de diagnóstico.



Fonte: Adaptado de Halstead, 2007.

5.4.1.2.1. Isolamento viral

A amostra sanguínea para o isolamento do vírus necessita ser colhida nos primeiros 4-5 dias de doença. O isolamento do vírus é feito através da inoculação em culturas de células ou inoculação em mosquitos, *A. albopictus* (C6/36), seguida de imunofluorescência indireta, apresenta alta especificidade (GUZMAN et al. 2000). A desvantagem é que é uma técnica demorada e o resultado só é obtido em 1-2 semanas (SHU; HUANG, 2004; GUZMAN; KOURI, 2004).

5.4.1.2.2. Diagnóstico molecular

A transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR), PCR em tempo real ou a amplificação isotérmica do Ácido nucleico (AIAN) são amplamente utilizadas para a detecção dos genes virais e diferenciação dos sorotipos em amostras de soro durante a fase aguda da doença, que coincide com o início da viremia, nos cinco primeiros dias dos sintomas (GUZMAN, KUORI, 2002; SHU; HUANG, 2004; WHO, 2005).

Estes testes possuem um alto grau de especificidade e sensibilidade, podendo detectar o ARN viral dentro de 24-48 horas. Porém requer equipamentos e reagentes que possuem um custo elevado, deve ser realizado por técnicos experientes e é necessário haver controle de qualidade a fim de evitar contaminação (SHU; HUANG, 2004; GUZMAN, KUORI, 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 e “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).

5.4.1.2.3. Diagnóstico sorológico

Estes são os mais usados para diagnóstico de infecção por dengue, por serem relativamente baratos e de fácil execução em comparação com outros métodos de diagnóstico (GUZMAN et al. 2010). Baseiam-se na detecção de anticorpos IgM, que surgem em regra nos primeiros dez dias de doença e persistem aproximadamente durante dois meses.

A confirmação de infecção por anticorpo IgG, necessita da comparação entre soro na fase aguda e na fase da convalescença, com subida do título entre ambos. Anticorpos IgG contra o dengue são produzidos a partir do 4º dia após o início dos sintomas, elevam-se gradualmente, atingindo altos níveis em duas semanas e mantêm-se detectáveis por vários anos, conferindo imunidade contra o tipo infectante para toda a vida (FIGUEIREDO, 1999; GUZMAN, KUORI, 2002; WHO, 2005).

O teste mais amplamente utilizado é o MAC-ELISA (IgM de captura de anticorpos), possui uma sensibilidade de 90-97%, em amostras coletadas após o 5º dia do início dos sintomas. A detecção do Anticorpo IgG na fase aguda, possibilita a distinção entre infecção primária e secundária. O diagnóstico sorológico é feito pela técnica imunoenzimática. Este teste é o mais comumente empregado nos kits comerciais para diagnóstico disponíveis em laboratórios clínicos. (GUZMAN, KUORI, 2002; GUZMAN, KUORI, 2004; WHO, 2004). Uma das limitações deste teste é a reatividade cruzada entre outros flavivírus circulantes. Esta limitação deve ser considerada quando se trabalha em regiões onde vários flavivírus podem circular simultaneamente. A detecção de IgM não é útil para a determinação do sorotipo viral devido à reatividade cruzada do anticorpo. Resultados falsos positivos podem ocorrer em lugares onde circulam vários patógenos como a malária, leptospirose, história de viagem recente, e registro de vacinação (especialmente na vacinação contra a febre amarela), doentes que já foram infectados pelo vírus do dengue e onde existam múltiplos Flavivírus (GUZMAN, HALSTEAD, 2010; GUZMAN, KUORI, 2004).

Hoje em dia encontram-se disponíveis testes rápidos que são úteis para realizar triagem da infecção pelo vírus do dengue. Usam o princípio da imunocromatografia sendo que muitos destes testes podem detectar anticorpos IgM e IgG e antígenos NS1. São testes úteis para triagem hospitalar, por serem rápidos, podendo posteriormente ocorrer a confirmação por outras metodologias. Apresentam algumas limitações com reações cruzadas e não conseguem diferenciar os sorotipos virais (DE PAULA, FONSECA, 2004, WHO, 2004).

5.4.1.6. Outros exames para 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 com contagens abaixo de 100.000/mm³ (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 à 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 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. As dosagens de albumina e 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 (WALLACH, 2003). Estes parâmetros podem ter seus valores aumentados consideravelmente na dengue (OLIVEIRA et al., 2009).

Prova do laço

A Prova do laço (PLa) positiva é uma manifestação frequente nos casos de dengue, principalmente nas formas graves, e apesar de não ser específica, serve como alerta, pois, a principal característica hemorrágica do quadro grave devido à fragilidade capilar, devendo ser utilizado rotineiramente na prática clínica como um dos elementos de triagem na dengue, e na presença da mesma, alertar ao médico que o paciente necessita de um monitoramento clínico

e laboratorial mais estreito. A prova do laço positiva também reforça o diagnóstico de dengue (BRASIL, 2013).

6. Tratamento da dengue

A valorização de cada caso deve ser dinâmica, pois o quadro clínico do paciente pode mudar rapidamente e necessitar de outras medidas terapêuticas.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, dado a inespecificidade quanto à evolução terapêutica, foram estandardizados os níveis de atuação segundo grupos de A-D (WHO, 2009).

Se o paciente não apresenta sinais de alarme ou manifestações hemorrágicas, pode ser tratado a nível ambulatorial apenas com um tratamento sintomático e de suporte. As recomendações baseiam-se em estimular a ingestão oral de líquidos para hidratação oral, como água, ou sucos de fruta e pode se fazer uso de paracetamol, ou dipirona. Os salicilatos não devem ser administrados, pois podem causar sangramentos e os antiinflamatórios não esteróideais (ibuprofeno, diclofenaco, nimesulida) e fármacos com potencial hemorrágico devem ser evitados, pois aumentam o risco de evolução para formas graves da doença (WHO, 2009; BRASIL, 2013). 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).

Quando ocorre a forma mais grave de dengue hemorrágica, é mandatária a hospitalização devido à necessidade de monitorar o paciente a fim de evitar a ocorrência de casos mais graves que podem levar ao óbito (WHO, 2009). O prognóstico é variável e depende da forma de apresentação da doença e do manejo clínico. A forma clássica da doença tem geralmente um bom prognóstico, podendo ser a mortalidade elevada nas formas mais graves.

Figura 17: Fluxograma de classificação de risco de dengue em unidades específicas para tratamento e suas condutas clínicas.

7. Polimorfismos genéticos

A dengue é uma doença multifatorial, onde fatores dinâmicos, incluindo a idade dos pacientes, as doenças crônicas pré-existentes, a sequência de infecções causadas por diferentes sorotipos DENV influenciam na evolução da doença. A análise epidemiológica de surtos DENV (1997 e 2001) em uma área endêmica cubana mostrou que pessoas de diferentes raças têm nomeadamente diferentes morbidades e sintomas após a infecção por DENV (KOURI et al, 1998;. DE LA SIERRA et al., 2007). Estes resultados possíveis eliminam a influencia de fatores da infecção secundária e virulência viral, e induzem ao questionamento de que o background genético do hospedeiro possa ser um fator determinante do desenrolar da doença causada pelo DENV.

A síndrome hemorrágica, uma característica da DHF/SCD, é uma anormalidade hematológica resultante de múltiplos fatores, incluindo a trombocitopenia, coagulopatia e vasculariopatia relacionada com disfunção das plaquetas e células endoteliais (HALSTEAD, 1993). Neste sentido vem se tornando de grande interesse o estudo da relação do vírus DENV com fatores genéticos do hospedeiro (polimorfismos) relacionados à resposta imune. Dentro deste contexto, polimorfismos genéticos de moléculas relacionados à resposta imune inata podem ser relevantes e parecem estar associado com DHF (KURANE, 2007).

7.1. Gene *DC-SIGN*

As células dendríticas (DCs) foram reconhecidas como importante fatores para as respostas imune inata e adaptativa. São as primeiras células a serem infectadas após a entrada do vírus da dengue através da picada do mosquito. O DC-SIGN (célula dendrítica específica de adesão intracelular da molécula ICAM-3) é um importante receptor do tipo lectina, expresso em DCs e servem como o receptor de entrada para o DENV, o vírus se utiliza destes receptor para penetrar na célula hospedeira, o que ocorre através do reconhecimento dos locais de glicosilação de DENV usando a glicoproteína E (YANG et al. 2012).

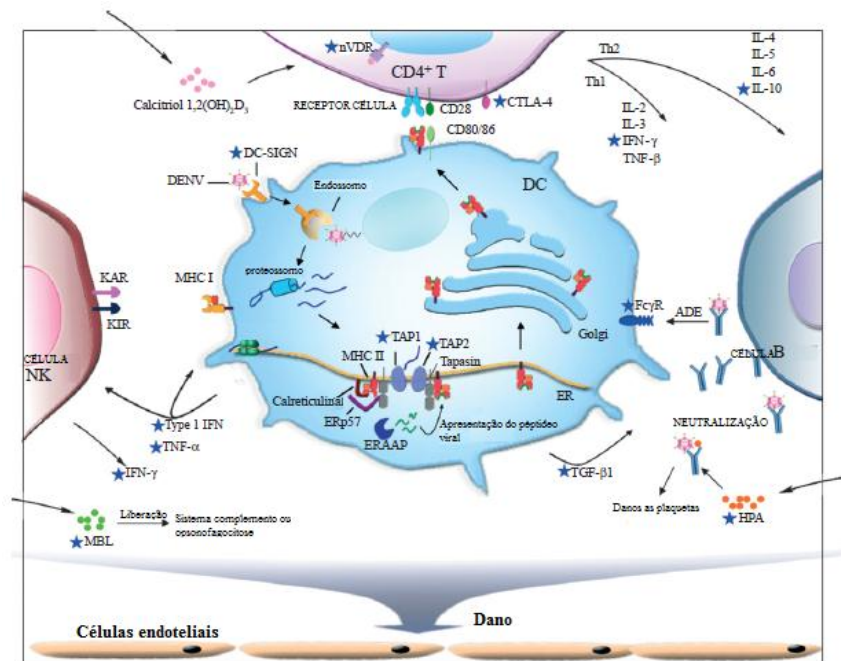
Esta célula dendrítica em particular, a DC-SIGN também conhecida como CD209 é o principal receptor de entrada do vírus da dengue. O receptor CD209 promove a interação inicial entre DCs e células T. O DC-SIGN (CD209) é uma lectina de tipo C que é expressa tanto em células dendríticas imaturas quanto nas maduras e é associado com tecidos linfóides periféricos em seres humanos. É um receptor de reconhecimento padrão que se liga a vários agentes patogênicos, incluindo HIV-1, vírus Ebola, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, e DENV. As evidências mostram que o DC-SIGN também

reconhece glicoproteínas endógenas, e que essas interações desempenham um papel importante na manutenção da homeostase imune em seres humanos e ratos. Os ligantes endógenos para DC-SIGN podem desempenhar um papel na modulação de tais respostas (MUMMIDI et al. 2001, OLIVEIRA et al. 2014).

O DC-SIGN também medeia à migração das DCs no endotélio por interação com ICAM-2. Os ligantes para o DC-SIGN induzem a internalização a partir da superfície da célula dendrítica e são alvos para o endossomo tardio ou compartimento lisossomal, e posterior processamento e apresentação para o MHC II para as células T. O DC-SIGN tem um domínio intracelular que permite a ativação das vias de transdução do sinal que levam a maturação das DCs, além de os ligantes de DC-SIGN levarem a sinalização dos receptores toll like e posterior liberação de citocinas (SVAJGER et al. 2010).

O gene *DC-SIGN (CD209)* está localizado no cromossomo 19p13.2-3, possui seis exons. Eventos complexos de splicing alternativo no DC-SIGN pré RNAm geram um ensaio de transcrição que codifica para cinco tipos de isoformas de DC-SIGN, essas isoformas incluem formas associadas a membrana, solúveis e truncadas (MUMMIDI et al. 2001). É um gene altamente polimórfico, possui numerosos SNPs (polimorfismos de único nucleotídeo). Variações no genótipo do gene *CD209*, na região promotora (-336 A/G; rs 4804803) tem sido envolvido na patogênese de algumas doenças infecciosas humanas, por exemplo HIV, e também na dengue (WANG et al. 2011). Os polimorfismos do gene *DC-SIGN* foram reportados afetar a resposta a dengue, devido as importantes funções que o DC-SIGN desempenha na infecção com o DENV (SELVARAJ et al. 2009).

Figura 18: Visão geral dos eventos chave do sistema imune mostrando a entrada do DENV através de sua ligação ao DC-SIGN.



LEGENDA: o receptor DC-SIGN para o vírus na superfície de DCs, para entrada do DENV. Em seguida, as células NK e o MBL, como os primeiros defensores, rapidamente tentam matar as células infectadas. Algumas partículas escapam e são apresentadas ao linfócito T CD4⁺ que ativam as células Th1 e Th2, a migração dessas células podem ser reguladas pelo 1,25-(OH)₂D₃ calcitriol por ligação com nVDR. As células B podem produzir anticorpos diferentes, com a ajuda de citocinas relacionadas com células Th2. Os anticorpos têm três tipos de efeitos: ADE, neutralização e danos as plaquetas (ligação com HPA). O mecanismo patogênico imunológico do DENV aqui considerado nesses eventos imunes do hospedeiro pode levar a dano das células endoteliais, o aumento da permeabilidade vascular, e sintomas hemorrágicos. As estrelas azuis representam moléculas estratégicas do sistema imune em que os polimorfismos do locus têm sido associados com a patogênese da Dengue. FONTE: Fang et al.2012

O alelo G pode regular negativamente a atividade do promotor, pois afeta a ligação a um fator de transcrição Sp1 e resulta em regulação de baixo nível no DC-SIGN. O alelo G da variante do gene *DC-SIGN* -336A/G, é, por conseguinte, associado à proteção contra a DF. No entanto, o Genótipo AA está relacionado com a proteção contra DHF afetando a expressão do DC-SIGN na superfície DC e a replicação viral em DCs de doentes infectados por vírus DENV (FANG et al. 2012). Foi encontrada uma associação com a infecção por dengue em indivíduos DENV na Tailândia com o polimorfismo na região promotora do gene *CD209* (-336 A/G) (DESPRE'S et al., 2005).

Wang e colaboradores (2011) demonstraram a existência do polimorfismo *CD209* (-336 A/G) na população de Taiwan e encontrou uma frequência do alelo G superior em DHF do que em pessoas saudáveis (OR = 4,84) e DF pacientes (OR = 2,44). Estes resultados são consistentes com os resultados da investigação do povo tailandês (DESPRE`S et al., 2005). Foi reportado que a população chinesa tem uma frequência significativamente menor do alelo G (3,8%) (WICHUKCHINDA et al. 2007). No entanto, um estudo retrospectivo na população do Brasil mostrou que o polimorfismo *CD209* (-336 A/G) não teve associação com DHF (SILVA et al., 2010). Assim, o polimorfismo *CD209* (-336 A/G) pode ser parcialmente envolvido na infecção por DENV. Alternativamente, infecção por DENV pode ser causada pela heterogeneidade genética populacional. No entanto, a sua influência sobre a susceptibilidade ou proteção contra DENV permanece indefinida (WICHUKCHINDA et al., 2007).

7.2. Gene *CTLA-4*

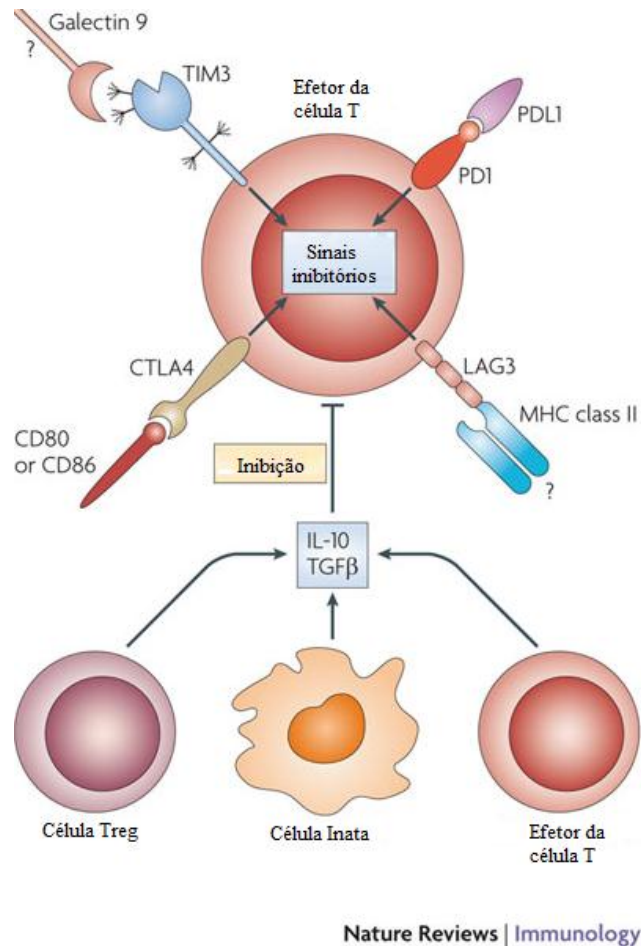
Após o DENV penetrar nas células dendríticas do hospedeiro via DC-SIGN, irá se ligar a ICAM-3 expresso em células T, através do receptor *CTLA-4* (antígeno 4 de linfócitos T citotóxico), que é expresso em células T ativadas, e tem homologia com outro receptor de superfície de células T, o CD28, ambas as moléculas se ligam a B7 nas APCs profissionais. (CHAMBERS et al. 1990). Moléculas coestimulatórias CD28 são constitutivamente mais expressas nas células T CD4⁺, mais também parte nas células T CD8⁺ (LINSLEY, et al. 1992). O receptor *CTLA-4*, expresso em células T é componente fundamental dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos, desempenha um papel essencial na homeostasia imunológica e é um receptor essencial na regulação negativa da ativação das células T, no entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de regulação para a expressão *CTLA-4*. Este sinal inibitório não só determina se as células T estão ativadas, mas também afeta a representação clonal de uma resposta imunitária (WANG et al. 2002). Além disso, *CTLA-4* é altamente expresso por células T reguladoras e pode desempenhar um papel importante nessa função. Uma explicação provável é que a interação *CTLA-4*: B7 desempenha um papel crítico na regulação da auto-tolerância, e conseqüentemente, a susceptibilidade a doença autoimune (KRISTIANSEN et al. 2000). Da mesma forma ocorre nas doenças infecciosas, onde as células T são componentes fundamentais dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos, pois bloqueia significativamente o aumento da ativação das células T e a replicação viral (KOUKI et al. 2000; CHEN et al. 2009). A alteração gênica *CTLA-4*

(+49G/A) parece aumentar a reatividade imunológica contribuindo para o desenvolvimento de patologias autoimunes e de doenças infecciosas (CHEN et al. 2009).

Polimorfismos em determinados locais do gene *CTLA-4* podem afetar a sua expressão concebivelmente (WANG et al. 2002). Cerca de 16 SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) e um microssatélite (AT) n foram relatados no locus de *CTLA-4* (JOHNSON et al. 2001). Contudo, apenas três SNPs (+49, -318 e o microssatélite) têm sido amplamente estudados. O SNP *CTLA-4* (+49G/A) está localizado no primeiro exon do gene *CTLA-4* na posição +49, que conduz a uma mudança na posição 17 de um aminoácido, treonina para alanina, o que vai ocasionar numa diminuição da expressão do receptor, defeito na formação do receptor, alteração na distribuição intracelular, endocitose, transporte de *CTLA-4* para a superfície e a produção de interleucina IL-2, como resultado, altera a proliferação de células T (KOUKI et al. 2000).

Assim o polimorfismo do gene *CTLA-4* pode desempenhar um papel na regulação do sistema imunológico. Uma correlação direta entre o polimorfismo do gene de *CTLA-4* (+49G/A) e a função das células T, bem como entre o genótipo de *CTLA-4* e a função da proteína *CTLA-4* em células T, tem sido relatada. Assim, foi reportado que pacientes que possuíam o genótipo polimórfico de *CTLA-4* (GG) exercia menos efeitos inibitórios sobre a proliferação das células T em comparação ao que possuíam o genótipo selvagem de *CTLA-4* (AA). Um polimorfismo do gene *CTLA-4* na sequência líder (exon 1) pode influenciar o nível ou o padrão de expressão da proteína. Em alternativa, as propriedades de transporte de *CTLA-4* do meio intracelular para a superfície da célula podem ser alteradas, de tal modo que os níveis de *CTLA-4* responsável pela sinalização negativa, a capacidade da molécula pode ser reduzida. Diferenças na sequência líder do gene podem resultar em taxas de endocitose ou transporte para a superfície possa encontrar-se alterado (KOUKI et al. 2000).

Figura 19: Receptor CTLA-4 na célula T interagindo com outras moléculas.



FONTE: NATURE REWIES/ IMUNOLOGY

7.3. Gene *TGF-β*

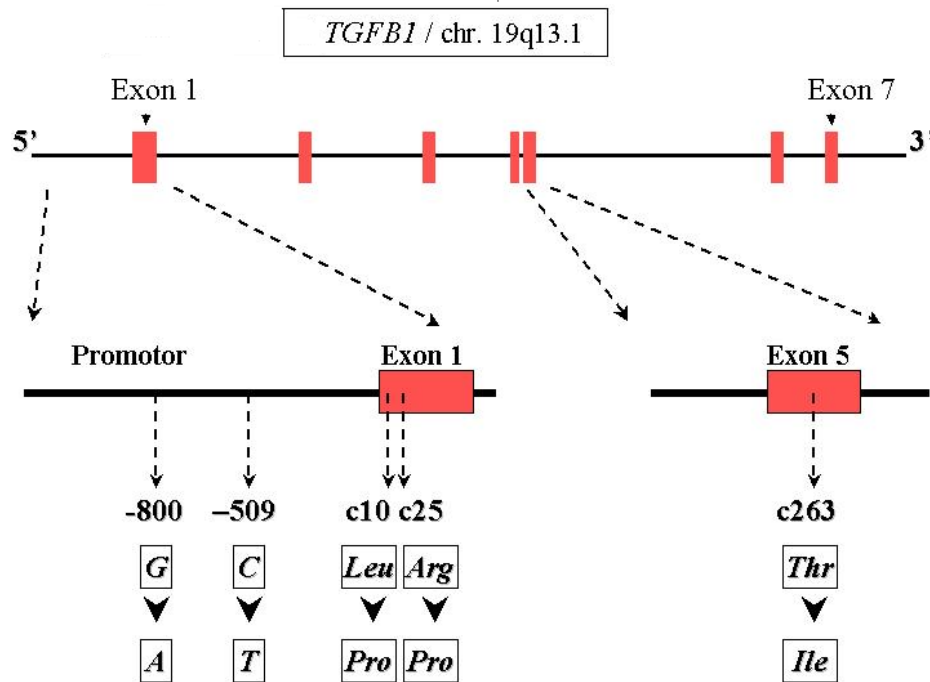
Na febre hemorrágica da dengue ocorre uma grande ativação de células T com produção desproporcional de citocinas pro-inflamatórias. Além do CTLA-4, outra molécula imune reguladora o TGF- β , tem sido descrita por estar envolvida na regulação de células T e na infecção pelo vírus da dengue. Interações entre polimorfismos dos genes *CTLA-4* e *TGF β 1* podem estar associados com a susceptibilidade da DHF e maior carga viral (CHEN et al. 2009; FERNÁNDEZ-MESTRE et al. 2009).

O TGF- β é uma citocina pleiotrópica que regula a proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares e participa de processos inflamatórios, angiogênese, reepitelização e regeneração tecidual (PASTAR et al. 2010). O TGF- β é considerada uma citocina principalmente pró-inflamatória, mas também desempenha papel crucial na angiogênese,

juntamente com outros moduladores, como o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (CRIVELLATO, 2011), expresso principalmente por linfócitos *T helper*, macrófagos e fibroblastos. É derivado da família gênica *TGFB*: *TGFB1*, *TGFB2* e *TGFB3*, que está localizada no cromossomo 19q13.1-13.3 e codifica três isoformas da citocina: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 (WATANABE et al., 2002). A maioria do TGF- β presente na circulação corresponde à isoforma TGF- β 1 e, polimorfismos em seu gene correspondente, podem estar associados a várias doenças e complicações como infarto, câncer, doenças autoimune e doenças infecciosas com a dengue (MANGADA, ROTHMAN 2005; STEINBERG, 2009).

A produção de TGF- β 1 é controlada geneticamente e vários SNPs exercem influência nos níveis circulantes da citocina (BHAYAL et al., 2011). Em particular, o polimorfismo TGF β 1 (-509C/T; rs1800469), na região promotora do gene, altera o sítio de ligação consenso do fator de transcrição e está associado com altas concentrações circulantes de TGF- β 1 no plasma (GRAINGER et al., 1999). Silverman e cols (2004) mostraram que o alelo T aumenta a ligação do YY1, em cerca de 30%, e a função basal do promotor, também em 30%. Grainger e cols (1999) relataram que a concentração de TGF- β 1 é aproximadamente duas vezes mais elevada em homozigotos TT do que em CC. Sie e cols (2006) também verificaram risco aumentado de infarto associado com a presença desse polimorfismo.

Vários SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) foram descritos no locus do *TGF- β 1* humano, no cromossoma 19q13. Dois SNPs estão localizados na região do promotor, nas posições -800 G>A e -509 C>T a partir do primeiro nucleotídeo transcrito. Dois outros SNPs estão localizados nos códons 10 (CTG> CCG) e 25 (CGG> CCG) de exon 1, conduzindo a substituições de aminoácidos de Leucina para Prolina (10) e Arginina por Prolina (25). Estas variantes alélicas resultam em diferenças significativas com relação à expressão *TGF- β 1* e alterar a concentração plasmática dessa citocina (GEWALTIG et al, 2002). O polimorfismo de TGF β 1 -509C/T foi relatado estar implicado com a susceptibilidade a dengue em pacientes Taiwanese (CHEN et al. 2009).

Figura 20: Organização gênica do *TGFβ*

Fonte: <http://www.genomos.eu>

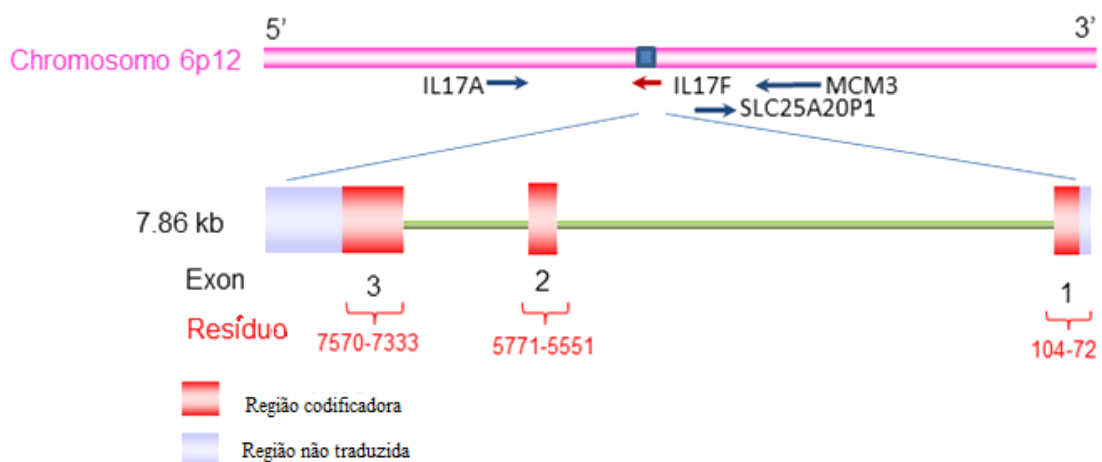
7.4. Gene *IL17*

As células Th17 são originárias das células T naïve em resposta a uma combinação de fatores como TGFβ1, IL-6, IL-21, IL-1β e IL-23, secretam principalmente IL-17 (CURTIS , WAY 2009). A IL-17F pertence a uma família de seis ligantes (IL-17 A – F) e cinco receptores (IL-17RA – E) e estão envolvidos com a regulação de células T, todos os membros da família da IL-17 tem estrutura protéica similar, caracterizada por quatro resíduos de cisteína altamente conservadas, e não possuem similaridade com outra citocina conhecida (KAWAGUCHI et al. 2004). A IL-17F se liga a IL-17RC tem atividade pro inflamatória, particularmente na resposta a antígenos bacterianos (KUESTNER et al. 2007). Todos os membros da família da IL-17 são responsáveis pela atividade patogênica das células Th17, a principal função das células secretoras de IL-17 é mediar à inflamação, através da produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, como TNF-α, IL-1β, IL-6, CXCL-6, CXCL-7, CXCL-8, IL-8 e MCP-1 (proteína-1 quimiotática de monócitos), e metaloproteinases. Estas últimas promovem o recrutamento de neutrófilos e macrófagos (recrutados por células Th1) (KAWAGUCHI et al. 2004; GUPTA, CHATUVERDI 2009). Adicionalmente, a secreção da IL-17 estimula fibroblastos, queratinócitos, células epiteliais, endoteliais e estromais,

secretam IL-6 (auto-regulação), IL-8, prostaglandina E (PGE), MCP-1 e GM-CSF (FOSSIEZ et al. 1998).

Polimorfismos no gene *IL-17* tem sido estudados na patogênese de várias doenças. Em um estudo caso-controle japonês demonstraram o papel do polimorfismo de *IL-17F* (7488 A/G), que leva a substituição do aminoácido na posição 161, de uma arginina para histidina (p.His161Arg) codificada pelo terceiro exon do gene *IL17F*, este polimorfismo é inversamente associado ao desenvolvimento de asma (KAWAGUCHI et al. 2006). Funcionalmente, a variante de *IL-17F* p.His161Arg falhou na indução de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, antagoniza a atividade do genótipo selvagem *IL-17F*, que tem a habilidade para ativar algumas citocinas, incluindo a IL-8, e antagoniza a função do genótipo selvagem de *IL-17F* (KAWAGUCHI et al. 2006). Além disso, *IL-17F* 7488GG tem sido relacionado a proteção para algumas doenças autoimunes, como colite ulcerativa, artrite reumatóide. As células T -17 (células Th17) desempenham um papel na defesa contra patógenos, como nas infecções bacterianas e fúngicas, mas existe pouca informação sobre infecções virais, alguns estudos com IL17 e alguns vírus como o HCV e HIV (YUE et al. 2008; GUPTA, CHATURVEDI 2009; CHANG et al. 2012), Até a redação desta tese temos o conhecimento de que apenas um estudo relacionou a IL-17 com dengue (ALAGARASU et al. 2015),.

Figura 21: Organização do gene *IL17*



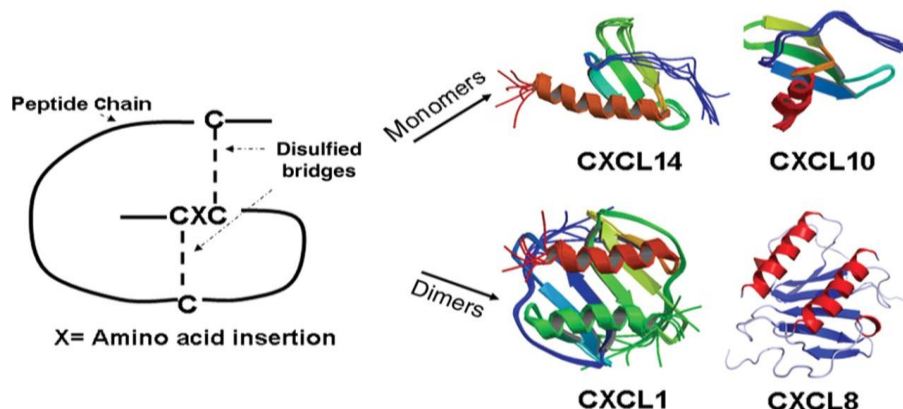
Fonte: atlasgeneticsoncology.org

7.5. Gene *IL8*

O gene que codifica IL-8 possui três polimorfismos comuns, *IL8* (-251 A/T, +396 T/G e +781 C/T). Dentre estes polimorfismos, o alelo T (polimórfico) de *IL8* (-251 A/T; rs4073) está relacionado a um aumento da produção de IL-8 e associado ao aumento do risco de desenvolver câncer de mama (SNOUSSI et al., 2010), de bexiga (LEIBOVICI et al., 2005), de estômago (SUGINOTO et al., 2010).

A IL-8 é uma citocina membro da família das quimiocinas Cis-X-Cis (CXC) produzida principalmente por macrófagos. Esta interleucina é designada como um potente atrator de neutrófilos e linfócitos, atuando na ativação dos mesmos. Além de um forte quimioatrator, a IL-8 também induz proliferação celular, migração e angiogênese (ZHANG, et al, 1999). O aumento da produção da proteína IL-8, tem sido visto em indivíduos com alelo A de *IL8* (-251 A/T) e também tem sido visto um aumento transcricional in vitro na resposta a estimulação de IL-1 β e TNF α (SAVAGE et al. 2006), e uma correlação muito marcante foi observada entre aumento dos níveis de IL-8 e DHF, com maiores níveis em pacientes com aumento grau da doença e desfecho com morte. Estes resultados sugerem que a IL-8 pode ter um papel importante e pode ser um indicador de gravidade crescente da doença e morte (RAGHUPATHY et al. 1998; FOSSIEZ et al. 1998).

Figura 22: Estrutura das quimiocinas



Fonte: Balestrieri et al. 2008.

Polimorfismos do TNF- α , TGF β 1, IL-2, IL-6, IL-8 e IL-17 têm sido correlacionados com algumas doenças infecciosas, assim como a dengue. Entretanto, são escassos os estudos associando a infecção pelo vírus da dengue para DC-SIGN, CTLA-4, TNF α , TGF β 1 e interleucinas (FERNANDEZ-MESTRE et al 2004, CHEN et al. 2009).

8. Perguntas de partida

Os polimorfismos dos genes das citocinas (*IL8*, *IL17* e *TGFβ1*) e dos receptores *DC-SIGN* (*CD209*) e *CTLA-4* estariam associados a uma predisposição para o desenvolvimento de dengue.

9. Hipótese

Polimorfismo de genes que codificam interleucinas e receptores podem estar associados à susceptibilidade a dengue e seus sinais e sintomas.

10. Objetivos

10.1. Geral

Identificar fatores genéticos de suscetibilidade, tendo como foco moléculas do processo inflamatório, ao desenvolvimento da dengue e a seus sinais e sintomas.

10.2. Específicos

- Determinar os genótipos dos polimorfismos dos genes das citocinas (*IL8*, *IL17* e *TGFβ*) e dos receptores *DC-SIGN* (*CD209*) e *CTLA-4*.
- Estimar a associação dos polimorfismos dos genes das citocinas (*IL8*, *IL17* e *TGFβ*) na suscetibilidade ao desenvolvimento da dengue.
- Estimar a associação dos polimorfismos dos genes dos receptores *DC-SIGN* (*CD209*) e *CTLA-4* na suscetibilidade ao desenvolvimento da dengue.

11. Materiais e Métodos

11.1. Casuística e coleta de dados

Um total de 196 pacientes com suspeita de dengue, foram recrutados para este estudo no período de agosto de 2011 a agosto de 2013, em três hospitais de Fortaleza, Hospital São José de Doenças Infecciosas - HSJ, referência em Fortaleza para doenças infecciosas, Hospital Universitário Walter Cantúdeo e Hospital Distrital Evandro Ayres De Moura – Frotinha de Antonio Bezerra utilizando-se de dados clínicos epidemiológicos e laboratoriais.

11.2. Aspectos Éticos

O presente estudo faz parte do projeto integrado de pesquisa desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, intitulado: “Análise investigativa de Genes Polimórficos ligados a susceptibilidade da infecção da Dengue Clássica e Hemorrágica em paciente no Estado do Ceará”, Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas – HSJ, protocolo nº 010/2011 e C.A.A.E 0013.0.042.000 - 11 (Anexo I), observando as normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde de acordo com as resoluções 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05.

Os pacientes foram abordados, pelo pesquisador cadastrado junto ao comitê de ética, momentos antes da realização do exame de sangue para avaliar parâmetros laboratoriais. Para cada paciente foi colhida a autorização atestando o seu consentimento em participar da pesquisa, do próprio paciente ou responsável ou do termo de assentimento quando menores de 18 anos ou incapazes (Anexo II) preenchidos um questionário com os dados epidemiológicos e clínico-patológicos obtidos no momento da entrevista (Anexo III), bem como por consulta nos prontuários para posterior registro em fichas estruturadas.

11.3. Confirmação diagnóstica e classificação da dengue

A triagem dos pacientes foi realizada pelos médicos clínicos e infectologistas do hospital. Os pacientes alvos da pesquisa foram pessoas que chegaram a um dos hospitais participantes, com suspeita de dengue, apresentando sinais e sintomas clínicos de dengue nos períodos de surto epidêmico do vírus. A classificação da doença seguiu a normatização da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2009).

A confirmação do diagnóstico e do sorotipo viral foi realizada pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará – LACEN - CE, o qual recebe todos os casos suspeitos de dengue do Estado e possui convênio com o HSJ e assim contribuiu de forma ativa no desenvolvimento desse projeto. Foram analisados os principais subgrupos virais pelo mesmo laboratório citado anteriormente, conforme descrito abaixo.

Foram coletadas as amostras de sangue de 196 pacientes para o estudo, a infecção pelo vírus da dengue foi confirmada em 115 pacientes, por meio de parâmetros clínicos e laboratoriais e foi designado como grupo dengue (DE) e os 81 restantes, que tiveram resultados negativos para a infecção por dengue foram classificados como grupo não dengue

(NDE), grupo controle. A coleta de outros dados clínicos necessários foi realizada através da busca SAME através dos prontuários médicos, bem como a coleta de sangue periférico foi viabilizada pelo laboratório de análises clínica dos Hospitais.

11.3.1. Determinação dos sorotipos virais

A determinação dos sorotipos virais foi realizada inicialmente pela técnica de isolamento viral com identificação dos sorotipos por imunofluorescência indireta (IFI). Nos casos de isolamento negativo, os soros dos pacientes foram ser submetidos à técnica de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR).

- Isolamento Viral

Para o isolamento viral, um alíquota de 25 uL provenientes do soro do paciente com suspeita de infecção pelo DENV, foi inoculada em cultura de células de *Aedes albopictus* clone C6/36, crescidas em meio Leibovitz modificado com glutamina (L-15), acrescido de triptose fosfato (10%), aminoácidos não-essenciais (1%), solução antibiótica contendo penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100µg/mL) e soro fetal bovino (5%, para o meio de crescimento e 2% para o de manutenção). Após 10 dias de incubação em temperatura ambiente, cada lote foi submetido ao teste de imunofluorescência indireta, utilizando-se anticorpos monoclonais contra os 4 sorotipos do dengue, como descrito por Gubler e colaboradores. (1984).

- Extração do RNA viral

O RNA viral foi extraído do soro do paciente com suspeita de infecção pelo DENV através do kit comercial QIAmp Viral Minikit (QUIAGEM, Inc., Valência, USA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (NOGUEIRA et al, 2005).

- Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR):

A metodologia descrita por LANCIOTTI et al (1992) foi utilizada para detecção e tipagem dos DENV em amostras de soro. Esse protocolo detecta os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento “semi-nested”, gerando produtos amplificados com tamanhos específicos em pares de base para cada sorotipo dos DENV. A RT-PCR constitui uma reação em duas etapas, onde a primeira é uma transcrição reversa (RT) seguida de uma

reação da polimerase em cadeia (PCR) que utiliza os oligonucleotídeos iniciadores (primers) D1 e D2 juntamente com as enzimas transcriptase reversa e Taq polimerase para a amplificação do RNA viral que foi extraído na etapa anterior: a segunda é uma PCR do produto obtido da anterior, onde o iniciador D1 é novamente utilizado com outros quatro, TS1, TS2, TS3 e TS4, para a amplificação dos sorotipos virais presentes na amostra. O produto final é visualizado em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo (LANCIOTTI et al, 1992; NOGUEIRA et al, 2002).

Tabela 1: Sequência dos primers e especificações para a realização da Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR).

<i>Oligonucleotídeo iniciador*</i> (Sentido do primer)	<i>Sequência</i>	<i>Posição No genoma</i>	<i>Tamanho do amplicon (em pares de base □pb□)</i>
D1 (+)	5'- TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG- 3'	134-161	511
D2 (-)	5'- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC- 3'	616-644	
TS1 (-)	5'- CGTCTCAGTGATCCGGGGG- 3'	568-586	482 (D1 + TS1)
TS2 (-)	5'- CGCCACAAGGGCCATGAACAG- 3'	232-252	119 (D1 + TS2)
TS3 (-)	5'- TAACATCATCATGAGACAGAGC- 3'	400-421	290 (D1 + TS3)
TS4 (-)	5'- CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA- 3'	506-527	392 (D1 + TS4)

11.4. Genotipagem

Amostras de sangue foram coletadas com EDTA para hemograma para avaliar a contagem de plaquetas e de glóbulos, e avaliação de hemoconcentração. Essas amostras também foram usadas para extração de DNA para a genotipagem. O DNA genômico foi extraído utilizando o método de salting-out, como descrito na literatura (MANIATIS, FRITSCH 1982). A qualidade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose a 1% e a quantidade de DNA obtido foi determinada utilizando o NanoDrop® 3300 fluorospectrometer (Wilmington, DE, EUA).

PCR-RFLP

A presença de polimorfismos nos genes das interleucinas foi detectada através da análise do DNA genômico, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase seguida de restrição enzimática (PCR- RFLP restriction fragment length polymorphism). Os primers e as

condições específicas para a PCR-RFLP foram realizados de acordo com a literatura descrita na Tabela 2. Os fragmentos amplificados foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para a visualização dos fragmentos amplificados, seguido de restrição. Os produtos da restrição foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% para visualização dos fragmentos e posterior documentação.

Deteção dos Polimorfismos de interleucinas *IL-8*, *IL-17*, e dos genes *TGFβ1*, *DC-SIGN* e *CTLA-4*. Foi realizada pela técnica de PCR-RFLP segundo as especificações e protocolos descritos na tabela 3. Os produtos da amplificação e restrição foram visualizados em gel de agarose 2,5% ou em gel de poliacrilamida 6,5% corados com brometo de etídio.

Tabela 2: Protocolos e especificações para a realização do PCR-RFLP.

	Polimorfismo	Sequência	Tam. do fragmento (pb)	Referência
<i>IL8</i>	-251 A/T (rs 4073)	PF: 5'-CCA TCA TGA TAG CAT CTG TA-3' PR: 5'-CCA CAA TTT GGT GAA TTA TTA A-3'	173pb	WEI et al., 2007
<i>IL17</i>	7488 A/G (rs763780)	PF: 5'-GTT CCC ATC CAG CAA GAG AC-3' PR: 5'-AGC TGG GAA TGC AAA CAA AC-3'.	412pb	SEIDERER et al. 2008
<i>TGFβ1</i>	-509 C/T (rs1800469)	PF 5'-CAG ACT CTA GAG ACT GTC AG-3' PR 5'-GTC ACC AGA GAA AGA GGA C-3'	419pb	CHEN et al. 2009
<i>CTLA-4</i>	+ 49 A / G (rs 231775)	5'-GCT CTA CTT CCT GAA GAC CT-3 ' 5'-AGT CTC ACT CAC CTT TGC AG-3'	162 pb	CHEN et al. 2009
<i>DC-SIGN</i>	-336 A/G (rs 4804803)	5'-AAC TGG GGG TGC TAC CTG GC-3' 5'-GGA TGG TCT GGG GTT GAC AG-3'	153pb	BARKHASH et al. 2011

A restrição com 20 µL do produto amplificado, foi realizada com 1U da enzima descrita na tabela 3, a 37°C durante 16 horas.

Tabela 3: Protocolos e especificações para a realização de restrição.

	Polimorfismo	Exon	Fragmento da PCR	Enzima de Restrição	Fragmentos da Restrição	Referência
<i>IL8</i>	-251 A/T	RP	173pb	AseI	(TT)173pb (AT)173, 152 e 21pb (AA)152 e 21pb	WEI et al., 2007
<i>IL17</i>	7488 A / G (rs763780)	RP	412pb	NlaIII	(AA) 288pb, 124pb (AG) 412pb, 288 pb e 124pb (GG) 412 pb	SEIDERER et al. 2008
<i>TGFβ1</i>	-509 C/T (rs1800469)	RP	509pb	Bsu36 I (Eco8II)	(CC)228pb, 191pb (CT) 419pb,228 pb e 191pb (TT) 419pb	CHEN et al. 2009
<i>CTLA-4</i>	+ 49 A / G (rs 231775)	RP		Bbv I	(AA)162 pb (GG) 88pb, 74pb (AG) 162pb, 88pb e 74pb	CHEN et al. 2009
<i>DC-SIGN</i>	-336 A/G (rs 4804803)	RP	153pb	HaeIII	(AA) 153pb (AG) 153, 134, e 19pb (GG) 134 e19pb	BARKHASH et al. 2011

RP: Região Promotora

PCR em tempo real

Uma parte das amostras foram genotipadas para a análise de SNP do gene CTLA-4 usando a técnica de PCR em tempo real no equipamento Rotor-Gene Q Series. O HRM (high resolution melt) é um método simples, rápido, confiável e usado amplamente. Trata-se de um método de análise pós-PCR, que permite analisar as variações genéticas de até 1 pb em amplicons de PCR usando o intercalante De DNA fluorescente EvaGreen. Neste estudo, o PCR-HRM foi realizado com um volume de reação foi 15 mL que inclui o molde de DNA de 10 ng, Master Mix 7,5 µL (EvaGreen- fluorescente EvaGreen), par de primers específicos na concentração 20µM. A ciclagem da PCR para a amplificação por PCR foi realizada com a desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 10 segundos, temperatura de anelamento dos primers foi de 57°C por 30 segundos. O HRM foi realizado durante o intervalo de 57-95°C aumentando em 0,1°C, e o genótipo do amplicon foi determinado utilizando Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0. As amostras usadas como padrão para comparação foram genotipadas anteriormente usando o método de PCR-RFLP e foram confirmadas por sequenciamento, e em todas as corridas utilizamos controle negativo na reação. Outras 10 amostras que fazem parte do n estudo foram sequenciadas para confirmar os resultados de genotipagem.

12. Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o software estatístico EpiInfo® versão 7 e SNPStats (<http://bioinfo.inconcologia.net/snpstats/start.htm>), realizando-se o Teste do Qui-quadrado (χ^2) e Teste Exato de Fisher e desequilíbrio de ligação. foram considerados estatisticamente significantes, valores de $p < 0,05$, e muito significativo $p < 0,01$.

13. Resultados

Os resultados dos polimorfismos de citocinas (*IL8*, *IL17* e *TGFβ*) serão apresentados em forma de artigo - tópico I dos resultados.

Os resultados dos polimorfismos dos genes dos receptores *CTLA-4* (+49 A/G) e *DC-SIGN* (-336 A/G)] isoladamente e em associação com os polimorfismos dos genes das citocinas estudados [*IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G), *TGFβ* (-509 C/T)], serão apresentados no tópico II dos resultados seguido da discussão.

Genetic Polymorphisms of *IL17F* (7488A/G); *IL8* (-251A/T) and *TGFβ* (-509 C/T) in dengue patients.

Ana Paula Santos do Carmo^{1*}, Isaac Farias Cansanção², Beatriz Almeida Guerra¹ Robério Dias Leite³, Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo⁴; Silvia Helena Barem Rabenhorst¹.

1 – College of Medicine, Department of Pathology and Forensic Medicine, Microbiology. Graduate Program in Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

2 – College of Medicine, Federal University of Vale do São Francisco, Paulo Afonso, Bahia, Brazil.

3 - São José Hospital of Infectious Diseases, Fortaleza, Ceará, Brazil.

4- Central Public Health Laboratory/Virology, Health Secretariat in the State of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Abstract

Dengue virus infection has emerged as one of the most important diseases caused by arbovirus. The infection leads to a variation in signs and symptoms of the disease, from an asymptomatic infection to severe forms. Genetic polymorphism in interleukin genes that alters their expression or function may be correlated with DENV disease susceptibility and progression. So, this study aimed to evaluate the influence of *IL17F* (7488A/G; rs 763780); *IL8* (-251A/T; rs 4073) and *TGFβ* (-509 C/T; rs 1800469) genes polymorphisms in 196 patients with signs and symptoms of dengue. All the SNPs studied were detected using PCR-RFLP. This study showed that the presence of the *IL17* G allele ($p=0.030$) and the polymorphic homozygous GG *IL17* [$p=0.0076$; OR 0.24 (0.07-0.79)] was associated with the protection from the disease's development. Also the protection was observed when the *IL8* (AA) was associated with *IL17* (AG) and (GG), $p=0.029$ and $p=0.0028$; respectively). Additionally, the relationship between polymorphisms and clinical findings showed some risk among the patients who had bleeding manifestations with the wild genotype of *IL17* (AA), ($p=0.044$) and protection in the presence of the heterozygous (CT) of *TGFβ* ($p=0.04$). In the conclusion section, our data shows the importance of the *IL17* polymorphic allele (7488A/G) alone or in combination *IL8*(-251A/T) for protection from dengue and add data for the relationship between polymorphism and the dengue signs and symptoms.

Key words: *IL17*, *IL8*, *TGFβ*, dengue, genetic polymorphisms, cytokine.

Introduction

In the tropical and subtropical areas, dengue viruses (DENVs) are the most important human arboviruses pathogens, which belong to the *Flaviviridae* family and *Flavivirus* genus. They are transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes* in at least four distinct serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4) (Gubler et al. 2012). Dengue causes serious infections, resulting in morbidity and mortality and it is still a public health issue in over 125 countries, including Brazil. It is estimated that there are currently 50–100 million cases of dengue every year worldwide, including more than 500,000 reported cases of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome (Simmons et al. 2012).

Dengue infection leads to a variation in signs and symptoms, from an asymptomatic infection to severe forms, which are classified (WHO, 2009) according to severity into two categories: dengue (with or without warning signs - DWS) and severe dengue (SD) (Malavige et al. 2004). The severity of the disease is associated with the dengue subtype, high viral load and high cytokines production, such as IFN- α and γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, resulting in a condition referred as “cytokine storm” (Perez et al. 2010; Martina 2004; Rattanaburee et al. 2015).

Recently the T cell 17 (Th17 cells) appears to be involved in viral infection response, including the dengue infection (Yue et al. 2008; chang et al. 2012; Zhang et al. 2010; Jain et al. 2013; Talarico et al. 2013). It was initially described in 2005 as T CD4⁺ cells secreting IL-17 and it plays a critical role in inflammatory responses orchestrating innate immune function (Harrington et al. 2005). The IL17 family includes six ligands (IL17 A - F) and five receptors (IL17 RA - E) (Seiderer et al. 2008). The IL-17A cytokine was the first of this family to be discovered (1993) more than 10 years ago, when IL-17 producing T cells were classified as a new distinct CD4 T cell subset. Then, the other members were identified based on the similarity between the molecules. IL-17F and IL-17A showed the higher percentage of homology (55%) among the members of the family and both were located close to each other on human chromosome 6 (6p12). Both are produced primarily in activated T-cells, while IL-17B, IL-17C, IL-17D, and IL-17E are expressed in a wide assortment of tissues (Moseley et al. 2003). Murine and human Th-17 cells have been shown to produce IL-17A and IL-17F, acting on local tissues to release pro-inflammatory cytokines, including IL-6, IL-8, TNF- α , IL-21, IL-1 β and IL-23, chemokines, including CXCL-6, CXCL-7, CXCL-8, and MCP-1, and metalloproteinases (Curtis,Way 2009, Yue et al, 2008). Besides the fact that both are responsible for the pathogenic activity of Th17cells (Rutitzky 2005), it was found that they have different biological effects. (Sarah, Gaffen 2009; Moseley et al. 2003).

It is believed that one of the factors that lead to different outcomes is the host's genetic background (Perez et al. 2010; Martina, 2009; Rattanabure et al. 2015). In fact, the polymorphisms of *TNF α* , *TGF β* , *IL2*, *IL6* and *IL8* genes have been correlated with dengue fever (Rattanabure et al. 2015; Gupta, Chaturvedi 2009; Patera et al. 2002). To the best of our knowledge, there is only one study relating to *IL17* polymorphism and dengue infection (Alagarasu et al. 2015). Nevertheless, there is information related to other flavivirus infections such as HBV and HCV (Yue et al. 2008; Chang et al. 2012; Zhang et al. 2010). Therefore, this study aimed to evaluate the influence of *IL17F* (7488A/G; rs 763780), *IL8* (-251A/T; rs 4073) and *TGF β* (-509 C/T; rs 1800469) that had already been associated to dengue genes polymorphisms in patients with suspected cases of dengue.

Materials and methods

Subjects

The study was approved by the Research Ethics Committee of the São José Hospital of Infectious Diseases, in Fortaleza, Ceará, Brazil. Patients were enrolled from August 2011 to August 2013. After that, they or their parent/guardian signed a consent form and answered a questionnaire. Then, clinical and epidemiological data was collected.

A total of 196 patients with suspected cases of dengue infection were admitted to the São José Hospital of Infectious Diseases, in Fortaleza, Ceará, Brazil. These patients had a CBC (complete blood count) and a differential blood count and underwent serological and molecular analysis in the Public Health Laboratory of the State of Ceará – LACEN/CE, which receives all suspected cases of dengue in the state. The classification of dengue symptoms was according to the WHO criteria of 2009 (WHO, 2015). Dengue virus infection was confirmed in 115, by clinical and laboratory parameters. The dengue group (DE) was designated and the remaining 81 were classified as the control group (NDE).

Laboratory test for dengue diagnosis

The analysis for diagnostic confirmation of dengue infection was by means of NS1 antigen, viral isolation, RT-PCR and IgM.

Blood collection of the patients from the study followed the standards set by WHO (WHO, 2015) and the Ministry of Health in Brazil (Brazil 2010), where blood and sera should be collected from patients up to the fifth day of infection for viral isolation, RT-PCR and Ag NS1 detection, and on the sixth day for IgM assays. Starting from this premise, (DE) included

patients with at least one positive laboratory test, whereas NDE consisted of patients who had all laboratory tests negative for dengue.

Genotypic analysis

DNA extraction was done using the salting-out method as previously described (Maniatis, Fritsch 1982) from the blood samples collected with EDTA and used for complete blood count (white blood cell counts, platelets, and hemoconcentration). DNA quality was determined by 1% agarose gel electrophoresis and the amount was determined using the NanoDrop® 3300 fluorospectrometer (Wilmington, DE, USA).

The genetic polymorphisms of *IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G) and *TGFβ* (-509 C/T) were detected by PCR-RFLP. The PCR was done using Master Mix (1x), (Qiagen, USA) with the specific primers described in the literature (Table 1) and 25 µg DNA samples. The fragments were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining and the restriction products were visualized by 6% polyacrylamide gel electrophoresis.

Tabela 1: primers and protocols used for performing PCR-RFLP.

	Polymorphism	Sequence	PCR Fragment	Restriction Enzyme	Reference
<i>IL8</i>	-251 A/T (rs 4073)	PF: 5'-CCA TCA TGA TAG CAT CTG TA-3' PR: 5'-CCA CAA TTT GGT GAA TTA TTA A-3'	173pb	AseI	WEI et al., 2007
<i>IL17</i>	7488 A/G (rs763780)	PF: 5'-GTT CCC ATC CAG CAA GAG AC-3' PR: 5'-AGC TGG GAA TGC AAA CAA AC-3'	412pb	NlaIII	SEIDERER et al. 2008
<i>TGFβ1</i>	-509 C/T (rs1800469)	PF 5'-CAG ACT CTA GAG ACT GTC AG-3' PR 5'-GTC ACC AGA GAA AGA GGA C-3'	509pb	Bsu36 I (Eco8II)	CHEN et al. 2009

Statistical analysis

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

Results

The demographic data of all 196 patients is demonstrated in Table 2. The median age of the patients with dengue was 31.6 years old, (range 2-80 years), and for patients without dengue was 30.9 years old, (range 1-83 years). The frequencies of male and female were similar, independently of the final diagnosis and any significant result was found between the age groups.

Table 2. Demographic characteristics in dengue patients and non-dengue patients.

CHARACTERISTIC	Total patients n (%)	Dengue group n (%)	Non-dengue group n (%)	<i>P</i>
GENDER				
Male	93 (47,4)	53 (46)	38 (46,9)	0.782
Female	103 (52,5)	62 (54)	41 (50,6)	
AGE				
0 to 20	40 (20,4)	22 (19,1)	18 (22,2)	0.453
21 to 59	138 (70,4)	85 (73,9)	53 (65,4)	0.381
> 60	8 (4)	4 (3,5)	4 (4,9)	0.548
ETHNICITY				
Caucasian	66 (33,7)	37 (32,2)	30 (37)	0.254
Non caucasian	108 (55,1)	69 (60)	39 (48,1)	
Unreported	21 (10,7)	9 (7,8)	12 (14,8)	
Total	196	115	81	

DE – dengue group; NDE– non-dengue group

The patients' clinical features and laboratory findings are summarized in Table 3. Prostration ($p=0.010$), nausea ($p=0.009$), vomiting ($p=0.017$), bleeding manifestations ($p=0.0009$) and petechiae ($p=0.000$) were statistically significant in dengue patients. For the laboratory findings, hemoconcentration was statistically significant in dengue patients, thrombocytopenia and the decreased white blood cell count occurred just in dengue patients.

Table 3 - Clinical presentations and laboratory findings in patients with e without Dengue.

Clinical presentations (Signs and symptoms)	NDE n=81 (%)	DE n=115 (%)	<i>p</i>	OR; 95% CI
Fever	69 (85.2)	107 (93)	0.073	0.43 (0.15 – 1.20)
Headache	64 (79)	99 (86)	0.192	0.61 (0.27 – 1.37)
Exanthema	28 (34.5)	40 (34.7)	0.975	0.99 (0.52 – 1.88)
Retro-orbital pain	46 (56.7)	77 (67)	0.147	0.65 (0.35 – 1.22)
Prostration	26 (32)	58 (50.4)	0.010*	0.46 (0.25 – 0.88)
Myalgia	50 (61.7)	81 (70.4)	0.202	0.68 (0.36 – 1.29)
Nausea	34 (42)	70 (60.8)	0.009**	0.47 (0.25 – 0.86)
Vomiting	27 (33.3)	58 (50.4)	0.017*	0.49 (0.26 – 0.92)
Arthralgia	38 (47)	64 (55.6)	0.227	0.70 (0.38 – 1.30)
Diarrhea	16 (19.7)	27 (23.5)	0.534	0.80 (0.38 – 1.70)
Abdominal pain	1 (1.23)	4 (3.47)	0.311	0.35 (0.01 – 3.38)
Bleeding manifestations	8 (11)	34 (40.7)	0.0009**	0.26 (0.10 – 0.64)
Mucosal bleeding	2 (2.5)	4 (3.5)	0.516	0.80 (0.26 – 2.52)
TGI bleeding	0	3 (2.6)	0.199	0.00 (0.00 – 3.18)
Petechiae	1 (1.2)	20 (17.4)	0.000**	0.06 (0.00 – 0.43)
Hematuria	1 (1.2)	1 (0.8)	0.656	1.21 (0.30 – 4.90)
Menorrhagia	0	4 (3.5)	0.115	0.00 (0.00 – 2.16)
Laboratory findings				
Hemoconcentration	4	22	0.003**	0.22 (0.06 - 0.71)
Thrombocytopenia (platelets < 100 x 10 ⁹ /L)	0	21	0.00004**	0.00 (0.00 – 0.29)
Decreased White cell count	0	45	0.0000**	0.00 (0.00 – 0.10)

**p*< 0.05 – statistically significant

***P*< 0.01 – very statistically significant

DE – dengue group

NDE – non-dengue group

Analysis polymorphisms of the *IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G), and *TGFβ* (-509 C/T) genes among dengue and non-dengue patients.

The genotypes and alleles frequencies distribution of all patients and among the dengue and the non-dengue group were consistent to the Hardy–Weinberg equilibrium, except for *IL17* (7488 A/G). The risk analysis and the alleles frequencies for the polymorphisms of the genes studied considering dengue and non-dengue patients are shown in Table 4. A protection from dengue development was observed when associated with patients carrying the *IL17* G allele (*p*=0.029) for the GG genotype (*p*=0.0076) and in the dominant model for the G allele (*p*=0.026). In fact, the wild-type genotype of *IL17F* (AA) was more frequent in DE. No statistical association was observed for *IL8* -251 A/T and *TGFβ* -509 C/T polymorphisms.

When the polymorphism genotypes were combined (Table 5), a protection was statistically associated to the interaction between *IL8* AA and both *IL17* AG ($p=0.029$) and *IL17* GG genotypes ($p=0.0028$). The statistical significance found between *IL17* (GG) polymorphic genotype and *TGF β* wild-type and heterozygous genotypes (CC and CT) ($p=0.041$ and $p=0.028$, respectively) was not considerable due to the inaccurate confidence interval.

Association of the *IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G) and *TGF β* (-509 C/T) polymorphisms with clinical features of dengue patients.

The analysis polymorphisms *IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G) and *TGF β* (-509 C/T) with the clinical features in dengue patients revealed a risk for bleeding manifestations associated to the wild type *IL17* (AA) genotype when compared with the presence of the G allele (dominant model; AG+GG), [($p = 0.044$); OR 2.58 (0.91-7.33)]. On the other hand, a protection from bleeding manifestations was statistically associated with the presence of the *TGF β* heterozygous genotype (overdominant model; CT versus CC+TT) [($p = 0.048$); OR 0.43 (0.17-1.08)]. No other association was found. In fact, for all signs, the genotype frequencies of the polymorphism in the studied genes were similar.

Table 4. Distribution of the *IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G), and *TGFβ* (-509 C/T) genotypes and alleles frequencies according to patients with dengue and non dengue

	Genotype <i>IL8</i> (-251 A/T)	DE n (%)	NDE n (%)	<i>P</i>	OR (95% CI)	Genotype <i>IL17</i> (7488 A/G)	DE(%)	NDE(%)	<i>P</i>	OR (95% CI)	Genotype <i>TGFβ</i> (-509 C/T)	DE (%)	NDE (%)	<i>p</i>	OR (95% CI)
Genotype frequencies	AA	51 (44,3)	34 (42)	-	Reference	AA	24 (22)	8 (10)	-	Reference	CC	26 (22,6)	15 (18,5)	-	Reference
	AT	48 (41,74)	33 (41)	0.922	0.97 (0.5-1.89)	AG	72 (66)	54 (67,5)	0.064	0.44 (0.17-1.14)	CT	50 (43,5)	39 (48,15)	0.43	0.74 (0.32-1.69)
	TT	16 (13,91)	14 (17,3)	0.524	0.76 (0.3-1.91)	GG	13 (11,9)	18 (22,5)	0.0076**	0.24 (0.07-0.79)	TT	39 (33,9%)	27 (33)	0.65	0.83 (0.35-2.00)
Allele frequencies	A	65%	62%	-	1.13 (0.73 – 1.76)	A	55%	44%	-	0.64 (0.41 – 0.98)	C	44%	42 %	0.730	1.07 (0.70 – 1.65)
	T	35%	38%	0.559		G	45%	56%	0.030*		T	56%	57 %		
Dominant	AA	50 (43,5)	34 (42)	-	Reference	AA	8 (10)	24 (22)		Reference	TT	39 (33,9)	27 (33,3)	-	Reference
	AT/TT	65 (56,5)	47 (58)	0.83	0.94 (0.53-1.67)	AG/GG	72 (90)	85 (78)	0.026*	0.39 (0.17-0.93)	CT/CC	76 (66,1)	54 (66,7)	0.93	0.97 (0.5-1.78)
Recessive	AA/AT	99 (86,1)	67 (82,7)	-	Reference	AA/AG	96 (88,1)	62 (77,5)	-	Reference	TT/CT	89 (77,4)	66 (81,5)	-	Reference
	TT	16 (13,9)	14 (17,3)	0.52	0.77 (0.35-1.69)	GG	13 (11,9)	18 (22,5)	0.054	0.47 (0.21-1.03)	CC	26 (22,6)	15 (18,5)	0.49	1.29 (0.63-2.62)
Overdominant	AA/TT	66 (57,4)	48 (59,3)		Reference	AA/GG	37 (33,9)	26 (32,5)		Reference	TT/CC	65 (56,5)	42 (51,9)	-	Reference
	AT	49 (42,6)	33 (40,7)	0.79	1.08 (0.61-1.92)	AG	72 (66,1)	54 (67,5)	0.84	0.94 (0.51-1.73)	CT	50 (43,5)	39 (48,1)	0.52	0.83 (0.47-1.47)
Additive	---	---	---	0.64	0.91 (0.61-1.35)	---	---	---	0.073	0.49 (0.29-0.84)	---	---	---	0.74	1.07 (0.72-1.58)

**p* < 0.05 – statistically significant

***P* < 0.01 – very statistically significant

DE – dengue group

NDE – non-dengue group

Table 5: Risk analysis considering the genotypes associations between the polymorphisms studied in patients Dengue (DE) and non dengue group (NDE).

Genotypes		NDE	DE	<i>p</i>	<i>OR</i>
<i>IL8 -251 A/T / IL17 7488 A/G</i>		n=81 (%)	n=115 (%)		
A/A + A/A		1 (1.23)	11 (9.6)	-	Reference
A/A + A/G		22 (27.2)	32 (27.8)	0.029*	0.13 (0.01 – 1.13)Δ
A/A + G/G		10 (12.3)	5 (4.3)	0.0028**	0.05 (0.00 – 0.55)Δ
A/T + A/A		3 (3.7)	11 (9.6)	0.359	0.33 (0.01 – 4.75)Δ
A/T + A/G		24 (29.6)	29 (25.20)	0.015*	0.11 (0.00 – 0.94) Δ
A/T + G/G		6 (7.4)	7 (6)	0.046*	0.11 (0.00 – 1.31) Δ
T/T + A/A		4 (5)	2 (1.7)	0.021*	0.05 (0.00 – 0.92) Δ
T/T + A/G		8 (9.9)	11(9.6)	0.049*	0.13 (0.00 – 1.34) Δ
Total	189	80	109		
Genotypes		NDE	DE n=115 (%)	<i>p</i>	<i>OR</i>
<i>IL17 7488 A/G + TGFβ -509 C/T</i>		n=81 (%)			
A/A + C/C		0	5 (4.6)		
A/G + C/T		28 (35)	34 (31.2)	0.059	0.00 (0.00 – 1.57) Δ
A/G + T/T		17 (21.2)	24 (22)	0.086	0.00 (0.00 – 1.92) Δ
G/G + C/C		6 (7.5)	4 (3.7)	0.041*	0.00 (0.00 – 1.39) Δ
G/G + C/T		7 (8.7)	4 (3.7)	0.028*	0.00 (0.00 – 1.15) Δ
G/G + T/T		5 (6.2)	5 (4.6)	0.083	0.00 (0.00 – 2.06) Δ
Total	189	80	109		

**P* < 0.05 – statistically significant

***P* < 0.01 – very statistically significant

DE – dengue group; NDE – non-dengue group

Δ OR Interval not accurate

Discussion

The involvement of Th17 cytokines with dengue infection still not well established (Kawaguchi et al. 2004). Experimental studies developed with a mouse model of infection demonstrated IL-17A production during severe DEV-2 infection (Guabiraba et al. 2013). Interestingly, a case-control study conducted by Becquart et al. (2010) developed with human patients with DENV-2 infection observed elevated IL-17 levels during the first days after symptom onset. On the other hand, Talarico et al. (2013) demonstrated an age-dependent Th17 response and, Malavige et al (2012) did not find any difference in IL-17 level between patients with dengue fever and patients who developed dengue shock syndrome. One of the points for TH17 involvement in dengue infection is the presence of cytokines as IL-6, IL-8 IL-1β, TNF-α, which are activated by IL-17 interleukins (Gupta&Chaturvedi, 2009).

Regarding *IL-17* polymorphism, up to the present moment, there is only one study from Alagarasu et al. (2015) with a dengue group in Maharashtra, India, evaluating the influence of the *IL17* polymorphisms in the risk of dengue among others interleukins.

The *IL17F* rs763780 polymorphism causes a His-->Arg substitution. An *in vitro* study accomplished by Kawaguchi et al. (2006) using functional analysis showed that the *IL17* G allele lacks the ability to activate the mitogen-activated protein kinase pathway, cytokine production and chemokine production in bronchial epithelial cells as the wild-type does. Therefore, the protection associated with the G allele found in this study could be a consequence of the decrease in the *IL17F* function to mediate the inflammation through the production of inflammatory cytokines and chemokines. In fact, in our study, among DE patients, the frequency of the *IL17* wild-type homozygous genotype (AA) was higher than in NDE. Data from the dengue group from India studied (Alagarasu et al. 2015) also demonstrated a protection with the *IL17F* rs763780 polymorphic, despite the fact that the heterozygous genotype is associated with the disease. Contrasting to our study in the haplotype analysis, these authors in which *IL17F* rs763780 was included did not reach significance for protection. However, they separate dengue from dengue fever with a similar number of patients from our study. In spite of that, our studies and the ones accomplished by Alagarasu et al. indicate the relevance of this allele for the protection from dengue development.

Another evidence for the lower effectiveness of the *IL17* G allele to downregulate the inflammation process could also be observed when the *IL17G* allele showed a protection from dengue even when associated with the *IL8* wild genotype (AA). The IL-8 is a pro-inflammatory cytokine, and this polymorphic allele is related to an IL-8 low expression (Savage et al. 2006). An IL-8 inflammatory process, along with other cytokines, including IL-6, TNF- α , IL-21, IL-1 β and IL-23 is induced by IL-17. Our data corroborates with the Kawaguchi and his collaborators' study, which demonstrated that the loss of function observed for the *IL17F* polymorphic allele is in fact due to this variant act as natural antagonist of the *IL17F* wild type in a dose-dependent manner, blocking the IL8 induced by wild type *IL17F* (AA).

In this study, some of the clinical signs and symptoms of dengue were also analyzed taking the studied polymorphism into account. The symptoms, such as prostration, nausea, vomiting, bleeding manifestations and the occurrence of petechiae were significantly more frequent in the dengue group, agreeing with the literature (Kalayanorooj et al 1997; Rothman 2011). The laboratory findings, such as thrombocytopenia, leukopenia and

hemoconcentration, although not significant, were present in more patients, which agrees with other studies as well (Wang et al. 2009). Considering the influence of polymorphism and signs and symptoms, our analysis showed a risk for bleeding manifestation associated to the wild type *IL17* (AA). This result corroborates with the study developed with ITP patients (primary immune thrombocytopenia), in which an association between the *IL17* (AA) wild type genotype and the most severe disease and bleeding manifestations was observed and, on its turn, the *IL17* polymorphic allele was associated with a decreased risk of disease (Saitoh et al. 2011).

On the other hand, the *TGFβ* heterozygous genotype (CT) showed a protection from bleeding manifestations. The TGF-β is produced by Th3 (Treg) cells, expressed by helper T lymphocytes, macrophages and fibroblasts and it has a pro-inflammatory action (Crivelatto 2011; Chaudhary et al. 2006). The production of TGF-β1 is genetically controlled and several SNPs influence its circulating levels, in particular, the -509 C/T polymorphism. In this polymorphism, the TGF-β concentrations are higher in the polymorphic genotype (TT) than in the wild-type (CC) patients (Kalayanoroj et al 1997; Wang et al. 2009). Interestingly, platelets express the largest amount of TGF-β in the body (Assoian et al.1983). Although the TGF-β's role in platelet-mediated hemostasis is unclear, circulating platelets appear to be important for regulating TGF-β blood levels. The presence of the polymorphism can introduce an imbalance in the hemostasis.

Conclusion

This study showed that the *IL17* G allele was associated with protection from dengue development. It also adds data to better understand the functionality of the *IL17G* allele, since the protection from *IL17* G was also observed in the presence of *IL8* (AA), corroborating with the data that the *IL17F* variant is a natural antagonist of wild *IL17F*. It points out the *IL17F* as a target potential to therapeutic drugs development for dengue and others similar flaviviruses.

References

Alagarasu K, Bachal RV, Tillu H, Mulay AP, Kakade MB, Shah PS, et al. Association of combinations of interleukin-10 and pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms with dengue hemorrhagic fever. *Cytokine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015 Jul;74(1):130–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.03.021>

Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* [Internet]. 1983 Jun 10;258(11):7155–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6602130>

Becquart P, Wauquier N, Nkoghe D, Ndjoyi-Mbiguino A, Padilla C, Souris M, et al. Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. *BMC Infect Dis* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2010;10(1):356. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3013083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Chang Q, Wang Y-K, Zhao Q, Wang C-Z, Hu Y-Z, Wu B-Y. Th17 cells are increased with severity of liver inflammation in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2012;27(2):273–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21592230>

Chaudhary R, Khetan D, Sinha S, Sinha P, Sonker A, Pandey P, et al. Transfusion support to Dengue patients in a hospital based blood transfusion service in north India. *Transfus Apher Sci*. 2006;35(3):239–44.

Chen RF, Wang L, Cheng JT, Chuang H, Chang JC, Liu JW, et al. Combination of CTLA-4 and TGF β 1 gene polymorphisms associated with dengue hemorrhagic fever and virus load in a dengue-2 outbreak. *Clin Immunol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;131(3):404–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2009.01.015>

Crivellato E. The role of angiogenic growth factors in organogenesis. *Int J Dev Biol*. 2011;55(4-5):365–75.

Curtis MM, Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*. 2009;126(2):177–85.

Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009;9(8):556–67. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2821718&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Guabiraba R, Ryffel B. Dengue virus infection: Current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology*. 2014;141(2):143–56.

Gubler DJ. The economic burden of dengue. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86(5):743–4.

Gupta, N & Chaturvedi U. Can helper T-17 cells play a role in dengue haemorrhagic fever? *Indian J Med Res.* 2009;130(1):5–8.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* [Internet]. 2005;6(11):1123–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200070>

Jain A, Pandey N, Garg RK, Kumar R. IL-17 level in patients with dengue virus infection & its association with severity of illness. *J Clin Immunol.* 2013;33(3):613–8.

Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis.* 1997;176(2):313–21.

Kawaguchi M, Onuchic LF, Li XD, Essayan DM, Schroeder J, Xiao HQ, et al. Identification of a novel cytokine, ML-1, and its expression in subjects with asthma. *J Immunol* [Internet]. 2001;167(8):4430–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591768>

Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(6):1265–73.

Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N, Suzuki S, Matsukura S, Kokubu F, et al. IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(4):795–801.

Malavige GN. Dengue viral infections. *Postgrad Med J* [Internet]. 2004;80(948):588–601. Available from: <http://pmj.bmj.com/cgi/doi/10.1136/pgmj.2004.019638>

Malavige GN, Huang LC, Salimi M, Gomes L, Jayaratne SD, Ogg GS. Cellular and Cytokine Correlates of Severe Dengue Infection. *PLoS One.* 2012;7(11).

Martina BEE. Dengue pathogenesis: A disease driven by the host response. *Sci Prog.* 2014;97(3):197–214.

Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(2):155–74.

Patera AC, Pesnicak L, Bertin J, Cohen JI. Interleukin 17 modulates the immune response to vaccinia virus infection. *Virology* [Internet]. 2002;299(1):56–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12167341

Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, et al. Tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: Implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;71(11):1135–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2010.08.004>

Rattanaburee T, Junking M, Panya A, Sawasdee N, Songprakhon P, Suttitheptumrong A, et al. Inhibition of dengue virus production and cytokine/chemokine expression by ribavirin and

compound A. *Antiviral Res* [Internet]. Elsevier B.V; 2015;124:83–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.10.005>

Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;11(8):532–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3014> \n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21760609>

Rutitzky LI, Lopes da Rosa JR, Stadecker MJ. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. *J Immunol* [Internet]. 2005;175(6):3920–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148138>

Saitoh T, Tsukamoto N, Koiso H, Mitsui T, Yokohama A, Handa H, et al. Interleukin-17F gene polymorphism in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol*. 2011;87(3):253–8.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1982. Accessed 20 Feb 2015. Available from: <http://www.molecularcloning.com>.

Savage SA. Interleukin-8 Polymorphisms Are Not Associated with Gastric Cancer Risk in a Polish Population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2006 Mar 1;15(3):589–91. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-05-0887>

Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, et al. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): Upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(4):437–45.

Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Apr 12;366(15):1423–32. Available from: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMra1110265>.

Talarico LB, Bugna J, Wimmenauer V, Espinoza MA, Quipildor MO, Hijano DR, et al. T helper type 2 bias and type 17 suppression in primary dengue virus infection in infants and young children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013;107(7):411–9.

Wang CC, Lee IK, Su MC, Lin HI, Huang YC, Liu SF, 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(9):871–7.

Wei YS, Lan Y, Tang RG, Xu QQ, Huang Y, Nong HB, et al. Single nucleotide polymorphism and haplotype association of the interleukin-8 gene with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Immunol*. 2007;125(3):309–17.

Who. Dengue and severe dengue [Internet]. WHO Fact Sheet. 2012. p. 1–4. Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html

World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. Spec Program Res Train Trop Dis [Internet]. 2009;x, 147. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf

Yue FY, Merchant A, Kovacs CM, Loutfy M, Persad D, Ostrowski M a. Virus-specific interleukin-17-producing CD4+ T cells are detectable in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 2008;82(13):6767–71.

Zhang JY, Song CH, Shi F, Zhang Z, Fu JL, Wang FS. Decreased Ratio of Treg Cells to Th17 Cells Correlates with HBV DNA Suppression in Chronic Hepatitis B Patients Undergoing Entecavir Treatment. *PLoS One*. 2010;5(11):1–6.

Tópico II – Resultados

Análises dos polimorfismos dos genes *CTLA-4* (+49 A/G) e *DC-SIGN* (-336 A/G), entre pacientes com dengue e sem dengue.

A distribuição alélica e genotípica para ambos os pacientes com dengue e sem dengue foram consistentes com o equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo de *DC-SIGN*. Para o polimorfismo do gene *CTLA-4*, somente no grupo dengue, a distribuição das frequências genotípicas encontram-se no equilíbrio de Hardy-Weinberg, porém as frequências genotípicas do grupo controle derivaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os dados relativos às frequências alélicas e genotípicas, bem como as análises de risco para dos genes dos receptores *CTLA-4* (+49 A/G) e *DC-SIGN* (-336 A/G), são apresentados na tabela 4. Por essa tabela observa-se que apesar do genótipo heterozigoto polimórfico de *CTLA-4* (+49 A/G) (AG) apresentar apenas uma tendência para o risco do desenvolvimento da dengue [$p=0.057$; OR 1.96 (1.04 – 3.69)], sua relevância para o risco é observada pela significância estatística encontrada somente no modelo *overdominante* [$p=0.018$; OR 2.03(1.12-3.68)]. Não foi observado associação para o polimorfismo *DC-SIGN* (-336 A/G).

Associação dos polimorfismos dos genes *IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G), *TGFβ* (-509 C/T) *CTLA-4* (+49 A/G) e *DC-SIGN* (-336 A/G), entre pacientes com dengue e sem dengue.

Quando os genótipos dos receptores foram associados entre si e com os polimorfismos das interleucinas estudadas (tabela 5), duas combinações mostraram resultados estatisticamente significantes, ambas associadas com proteção para a dengue; a associação do

genótipo heterozigoto de *DC-SIGN* (AG) com o homozigoto selvagem de *CTLA-4* (+49 A/G) e a associação do genótipo selvagem do receptor *DC-SIGN* (AA) com o homozigoto polimórfico de *IL17* (7488 GG). Nenhum resultado estatisticamente significativo foi observado nas associações entre os demais genes estudados

Associação dos polimorfismos dos genes *CTLA-4* (+49 A/G) e *DC-SIGN* (-336 A/G), com as manifestações clínicas dos pacientes com dengue.

Nas análises dos polimorfismos dos genes *CTLA-4* (+49 A/G) e *DC-SIGN* (-336 A/G), com as manifestações clínicas dos pacientes com dengue, observou-se que apesar da ausência de manifestações hemorrágicas, terem sido significativamente mais frequente em portadores do genótipo selvagem do receptor DC-SIGN (AA), e presente na presença do genótipo polimórfico GG ($p=0.016$), porém esse p não é confiável, mas o OR e o IC não conseguiu ser definido.

Análise haplotípica dos genes *IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G), *TGF β* (-509 C/T) *CTLA-4* (+49 A/G) e *DC-SIGN* (-336 A/G), entre pacientes com dengue e sem dengue.

A análise haplotípica, a qual considera a interação entre polimorfismos, duas combinações alélicas demonstraram uma maior probabilidade de proteção para o desenvolvimento da dengue, seguindo a sequência dos respectivos genes *IL8*, *IL17*, *TGF β* , *DC-SIGN* e *CTLA-4*, as combinações dos alelos [AGCAA; ($p= 0.0086$, OR 0.09, 0.02 – 0.53) e a combinação [AGTAG; ($p= 0.033$, OR 0.10, 0.01 – 0.81)].

Tabela 4: Associação dos polimorfismos dos genes *CTLA-4* (+49 A/G) e *DC-SIGN* (-336 A/G) pacientes com dengue (DE) and pacientes sem dengue (NDE).

	Genótipo <i>DC-SIGN</i> (-336 A/G)	DE n (%)	NDE n (%)	<i>p</i>	OR (95% CI)	Genótipo <i>CTLA</i> (+49 A/G)	DE n (%)	NDE n (%)	<i>p</i>	OR (95% CI)
Frequências genótípicas	AA	76 (66)	48 (59)	-	Referência	AA	42 (37.5)	39 (48.8)	-	Referência
	AG	36 (31)	30 (37)	0.368	0.76 (0.41-1.39)	AG	57 (50.9)	27 (33.8)	0.057	1.96 (1.04-3.69)
	GG	3 (3%)	3 (4)	0.678	0.63 (0.12-3.26)	GG	13 (11.6)	14 (17.5)	0.738	0.86 (0.36-2.06)
Frequências alélicas	A	188 (82)	126 (78)	-	0.78 (0.47-1.2)	A	141 (63)	105 (66)	-	1.12 (0.73-1.7)
	G	42 (18)	36 (22)	0.333		G	83 (37)	55 (34)	0.589	
Dominante	AA	76 (66.1)	48 (59.3)	-	Referência	AA	42 (37.5)	39 (48.8)	-	Referência
	AG/GG	39 (33.9)	33 (40.7)	0.33	0.75 (0.41-1.34)	AG/GG	70 (62.5)	41 (51.2)	0.12	1.59 (0.89-2.84)
Recessivo	AA/AG	112 (97.4)	78 (96.3)	-	Referência	AA/AG	99 (88.4)	66 (82.5)	-	Referência
	GG	3 (2.6)	3 (3.7)	0.66	0.70 (0.14-3.54)	GG	13 (11.6)	14 (17.5)	0.25	0.62 (0.27-1.40)
Overdominante	AA/GG	79 (68.7)	51 (63)	-	Referência	AA/GG	55 (49.1)	53 (66.2)	-	Referência
	AG	36 (31.3)	30 (37)	0.40	0.77 (0.43-1.41)	AG	57 (50.9)	27 (33.8)	0.018*	2.03(1.12-3.68)
Additivo	---	---	---	0.32	0.77 (0.46-1.29)	---	---	---	0.60	1.12 (0.74-1.69)

Tabela 5: Análises de risco, considerando as associações os polimorfismos dos genótipos *IL8* (-251 A/T), *IL17* (7488 A/G), *TGFβ* (-509 C/T), *CTLA-4* (+49 A/G) e DC-SIGN (-336 A/G), estudados em pacientes com dengue (DE) e grupo sem dengue (NDE).

Genotypes					Genotypes				
<i>DC A/G + CTLA A/G</i>	DE n=115 (%)	NDE n=81 (%)	<i>p</i>	<i>OR</i>	<i>DC A/G + IL8 -251 A/T</i>	DE n=115 (%)	NDE n=81 (%)	<i>p</i>	<i>OR</i>
A/A + A/A	28 (25)	16 (20)	-	1	A/A + A/A	32 (27.8)	19 (23.5)	-	1
A/A + A/G	38 (33.9)	20 (25)	0.843	1.09 (0.44-2.67)	A/A + A/T	35 (30.4)	19 (23.5)	0.825	1.09 (0.46-2.62)
A/A + G/G	8 (7.1)	11 (13.8)	0.112	0.42 (0.12-1.42)	A/A + T/T	9 (7.8)	10 (12.3)	0.245	0.53 (0.16-1.75)
A/G + A/A	12 (10.7)	22 (27.5)	0.013*	0.311 (0.12-0.79)	A/G + A/A	15 (13.0)	14 (17.3)	0.335	0.63 (0.25-1.60)
A/G + A/G	18 (16.1)	5 (6.3)	0.220	2.05 (0.64-6.60)	A/G + A/T	14 (12.2)	13 (16.0)	0.352	0.63 (0.24-1.64)
A/G + G/G	5 (4.5)	3 (3.8)	0.951	0.95 (0.20-4.52)	A/G + T/T	7 (6.1)	3 (3.7)	0.735	1.38 (0.31-6.00)
G/G + A/A	2 (1.8)	1 (1.3)	0.915	1.14 (0.09-13.6)	G/G + A/A	3 (2.6)	1 (1.2)	1.000	1.78 (0.17-18.3)
G/G + A/G	1 (0.9)	2 (2.5)	0.549	0.28 (0.02-3.40)	G/G + A/T	0 (0.0)	1 (1.2)	0.384	undef
G/G + G/G	0 (0.0)	0 (0)	-	-	G/G + T/T	0 (0.0)	1 (1.2)	0.384	undef
Total	112	80		Total	115	81			

Genotypes					Genotypes				
<i>DC A/G + IL17 7488 A/G</i>	DE n=115 (%)	NDE n=81 (%)	<i>p</i>	<i>OR</i>	<i>DC A/G + TGFβ -509 C/T</i>	DE n=115 (%)	NDE n=81 (%)	<i>p</i>	<i>OR</i>
A/A + A/A	15 (13,8)	6 (7.5)	-	1	A/A + C/C	15 (13.0)	9 (11.1)	-	1
A/A + A/G	49 (45)	31 (38.8)	0.388	0.63 (0.19-1.99)	A/A + C/T	36 (31.3)	23 (28.4)	0.899	0.94 (0.32-2.77)
A/A + G/G	6 (5.5)	10 (12.5)	0.039*	0.24 (0.05-1.16)	A/A + T/T	25 (21.7)	16 (19.8)	0.902	0.94 (0.29-2.99)
A/G + A/A	9 (8.3)	2 (2.5)	0.680	1.8 (0.29-10.9)	A/G + C/C	11 (9.6)	6 (7.4)	0.885	1.1 (0.30-4.00)
A/G + A/G	20 (18.3)	22 (27.5)	0.107	0.36 (0.11-1.11)	A/G + C/T	12 (10.4)	14 (17.3)	0.246	0.51 (0.16-1.59)
A/G + G/G	7 (6.4)	6 (7.5)	0.461	0.46 (0.11-1.9)	A/G + T/T	13 (11.3)	10 (12.3)	0.676	0.78 (0.24-2.50)
G/G + A/A	0 (0.0)	0 (0)	-	-	G/G + C/C	0 (0.0)	0 (0.0)	-	-
G/G + A/G	3 (2.8)	1 (1.3)	1.000	1.2 (0.10-13.9)	G/G + C/T	2 (1.7)	2 (2.5)	1.000	0.6 (0.07-5.03)
G/G + G/G	0 (0.0)	2 (2.5)	0.110	undef	G/G + T/T	1 (0.9)	1 (1.2)	1.000	0.6 (0.03-10.8)
Total	109	80		Total	115	81			

Tabela 6: Associação dos genótipos dos genes estudados com a presença ou ausência de manifestações hemorrágicas em pacientes com dengue.

<i>DC-SIGN</i>	Grupo Dengue			<i>CTLA-4</i>	Grupo Dengue		
	Manisf hemorr	Ausente n (%)	Presente n (%)		P/ OR	Manisf hemorr	Ausente n (%)
AA	58 (69)	18 (58)	-	AA	31 (37)	12(38,7)	-
AG	26 (31)	10 (32)	0.640 /1.24 (0.46 – 3.33)	AG	40 (47,6)	16 (51,6)	0.941/ 1.03 (0.39 – 2.74)
GG	0	3 (10)	0.016 / Undef	GG	11 (13)	2 (6,4)	0.301/ 0.47 (0.06 – 2.82) *
Total	84	31	-	Total			

Δ IC NÃO CONFIÁVEL

Tabela 7: Associação dos genótipos dos genes estudados com o achado laboratorial de Hemoconcentração em pacientes com dengue.

<i>DC-SIGN</i>	Grupo Dengue			<i>CTLA-4</i>	Grupo Dengue		
	Hemoconcentração	Não n (%)	Sim n (%)		<i>p/ OR (IC)</i>	Hemoconcentração	Não n (%)
AA	43 (62)	16 (72,7)	-	AA	28 (40)	9 (41)	-
AG	24 (35)	6 (27,3)	0.461	AG	33 (48)	9 (41)	0.759/ 0.05 (0.26 -2.70)
GG	2 (3)	0	0.540	GG	6 (9)	4 (18)	0.272
Total	69	22		Total	69	22	

Tabela 8: Associação dos genótipos dos genes estudados com a contagem de leucócitos em pacientes com dengue.

DC-SIGN	Grupo Dengue						CTLA-4	Grupo Dengue					
	a Aumentada n (%)	P / OR a x b	b Diminuída n (%)	P / OR b x c	c Normal n (%)	P / OR a x c		a Aumentada n (%)	P / OR a x b	b Diminuída n (%)	P / OR b x c	c Normal n (%)	P / OR a x c
AA	1 (33)	-	29 (70,7)	-	24 (61)	-	AA	1 (33)	-	18 (44)	-	13 (33)	-
AG	2 (66)	0.212/ NC	11 (27)	0.376 / 1.54 (0.53 – 4.47)	14 (36)	0.333/ Undef	AG	2 (66)	0.500/ Undef	17 (41)	0.270 / 1.71 (0.59 – 5.00)	21 (54)	0.603 / Undef
GG	0	0.967/ Undef	1 (2,4)	0.707 / Undef	1 (2,5)	0.961 / Undef	GG	0	0.791 / Undef	5 (12)	0.593 / Undef	4 (10)	0.777 / Undef
Total	3		41		39		Total	3		41		39	

Tabela 9: Associação dos genótipos dos genes estudados com a contagem de plaquetas em pacientes com dengue.

CTLA-4		Grupo Dengue							
Contagem de plaquetas	a 100.000 – 150.000/ mm ³ n (%)	P / OR a x b	b 50.000 – 100.000/ mm ³ n (%)	P / OR b x c	c 100.000 – 150.000/ mm ³ n (%)	P / OR c x d	d > 150.000/ mm ³ n (%)	P / OR d x a	P / OR d x b
AA	18 (56)	-	5(31)	-	2 (50)	-	12 (30)	-	-
AG	11 (34)	0.155	8 (50)	0.558	2 (50)	0.472	22 (55)	0.033 / 3.00 (0.95 – 9.62)	0.548
GG	2 (6,2)	0.123	3 (18,7)	0.466	0	0.532	5 (12,5)	0.140	0.513
Total	32		16		4		40		
DC-SIGN		Grupo Dengue							
Contagem de plaquetas	a 100.000 – 150.000/ mm ³ n (%)	P / OR a x b	b 50.000 – 100.000/ mm ³ n (%)	P / OR b x c	c 100.000 – 150.000/ mm ³ n (%)	P / OR c x d	d > 150.000/ mm ³ n (%)	P / OR d x a	P / OR d x b
AA	22 (69)	-	12(75)	-	3 (75)	-	22 (55)	-	-
AG	8 (25)	0.597	4 (25)	0.718	1 (25)	0.415	18 (45)	0.116	0.166
GG	2 (6,2)	0.438	0	-	0	-	0	0.266	-
Total	32		16		4		40		

14. Discussão

Vários estudos têm reportado o papel de citocinas nos mecanismos imunológicos em diferentes infecções virais (FERNANDEZ-MESTRE et al 2004, CHEN et al. 2009). SUN; KOCHER, 2013), assim polimorfismos genéticos de citocinas e receptores são alvos interessantes para a compreensão da susceptibilidade genética à dengue. Os polimorfismos genéticos de moléculas relacionados à resposta imune como os receptores DC-SIGN (CD209) e CTLA-4, podem ser relevantes no estudo da dengue pelo seu papel na resposta imune inata à infecção por esse vírus. Vários polimorfismos são descritos nestes genes. O receptor DC-SIGN é codificado pelo gene *DC-SIGN (CD209)* localizado no cromossomo 19p13.3 e é altamente polimórfico sendo relatado numerosos SNPs (-336 A/G; -201 C/A; -139 T/C de promotor; +660 G/A e +791 C/G no exon 4) (IWASHIMA et al. 2011), e o receptor CTLA-4 é codificado pelo gene *CTLA-4*, localizado no cromossomo 2q33, Cerca de 16 SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) e um microssatélite (AT) n foram relatados no locus de CTLA-4 (JOHNSON et al. 2001, DIAS et al. 2013). Contudo, apenas três SNPs (+49, -318 e o microssatélite) têm sido amplamente estudados. Destes, os polimorfismos *DC-SIGN* (-336 A/G; rs 4804803) e *CTLA-4* (+49 A/G; rs 231775) são descritos serem relacionados com dengue.

O receptor DC-SIGN é crucial para a infecção das células dendríticas pelo DENV (NAVARRO-SANCHEZ 2003), a região promotora (-336) tem sido descrita ser reguladora da função e dos níveis de DC-SIGN. No polimorfismo do gene *DC-SIGN* (-336A/G), o alelo G regula negativamente a atividade do promotor já que afeta a ligação do fator de transcrição Sp1 (SAKUNTABHAI et al. 2005; FANG et al. 2012). Adicionalmente, Wang e colaboradores (2011) demonstraram que os genótipos heterozigotos de *DC-SIGN* (-336 A/G), em comparação com homozigoto selvagem (AA), estavam relacionados com um aumento na expressão de receptores na superfície de células dendríticas derivadas de monócitos (MDDCs) e a um aumento da produção de quimiocinas, estes pesquisadores também demonstraram que o genótipo heterozigoto polimórfico foi o mais eficiente em controlar replicação viral.

Neste estudo não foi observado nenhuma associação do polimorfismo *DC-SIGN* - 336A/G com susceptibilidade a dengue. Este dado corrobora os estudos realizados no Brasil, com dengue (SILVA et al. 2010; XAVIER-CARVALHO et al. 2013; OLIVEIRA et al. 2014). Em um estudo realizado na Índia com pacientes com dengue também não encontrou associação da dengue com o polimorfismo *DC-SIGN* (-336 A/G) mesmo tendo, a população estudada, distribuição genotípica diferente das encontradas em nosso estudo. Por outro lado,

um estudo realizado no México encontrou associação entre a presença do alelo G e a dengue sintomática, vale ressaltar, no entanto, que o risco foi calculado tendo como referência indivíduos dengues assintomáticos não sendo encontrada associação desse polimorfismo com o agravamento da doença (NOECKER et al. 2014). Contrastando com o estudo de pacientes mexicanos, dois estudos com pacientes asiáticos mostraram forte associação da presença do alelo G e o risco para dengue hemorrágica (SAKUNTABHAI et al. 2005; WANG et al. 2011). Embora as diferenças nas frequências alélicas possam divergir entre as populações e com isso mudar o impacto de um determinado polimorfismo sobre a susceptibilidade a uma doença, Wang e colaboradores (2011) sugerem que diferenças nos critérios de definição de FHD (Febre hemorrágica da dengue) no caso dos estudados com dengue poderiam ser a causa do encontro de resultados contraditórios. Esse é um aspecto a ser considerado, pois apesar da OMS definir novos critérios os mesmos não são ainda amplamente usados na literatura. Neste contexto é interessante ressaltar que a frequência do genótipo (GG) na população controle encontradas neste estudo é similar à encontrada nos estudos brasileiros, citados anteriormente, com indivíduos do Espírito Santo e do Pará, mas difere das frequências encontradas no estudo realizado no Rio de Janeiro (CE 4%; ES 3%; PA 4%; RJ 1%) (SILVA et al. 2010; XAVIER-CARVALHO et al. 2013; OLIVEIRA et al. 2014). A frequência do alelo G na população brasileira é maior do que em outras populações de outros estudos realizados em outros países (SAKUNTABHAI et al. 2005; WANG et al. 2011; NOECKER et al. 2014).

O receptor CTLA-4 é um componente fundamental dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos, pois desempenha um papel essencial na homeostasia imunológica e na regulação negativa da ativação das células T, no entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de regulação para a expressão CTLA-4 (WANG et al. 2002; CORREA et al. 2005). KOUKI e colaboradores (2000) em um estudo de expressão do receptor considerando o polimorfismo de *CTLA-4* (+49A/G) em doenças tireoidianas (doença de Graves e a Tireoidite de Hashimoto) observou que embora os indivíduos GG, possuíssem um aumento da expressão do receptor, esse aumento foi significativamente maior para os indivíduos com o genótipo (AA), sendo também o alelo G associado com reduzido controle da proliferação das células T.

No presente estudo a distribuição das frequências alélicas do gene *CTLA-4* no grupo sem dengue derivou do equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que é um fato esperado, como um evento não causal, em uma população etnicamente diversa onde há uma mistura de alelos (WEINBERG, MORRIS 2003; PEREZ et al., 2010), o que é o caso da população brasileira. As frequências encontradas neste estudo para o gene *CTLA-4* (+49 A/G) no grupo controle,

foram similares às frequências dos controles de indivíduos saudáveis, observadas em outros estudos caso-controle realizados com este gene na população brasileira, porém na investigação de influência deste polimorfismo em outras doenças (PAVONI et al. 2006; FERREIRA et al. 2009; PEDELOSKI et al. 2011; DIAS et al. 2013)..

As análises deste estudo relativas ao polimorfismo do gene *CTLA-4* (+49 A/G) mostraram um risco para dengue para os portadores do genótipo heterozigoto (AG), no modelo *overdominante*, validando a tendência encontrada para o genótipo heterozigoto. A ocorrência de associações encontradas somente com o genótipo heterozigoto é um fenômeno observado na seleção de alelos específicos resistentes a uma doença, mas susceptíveis à outra. Neste contexto, há efeitos opostos nos dois homozigotos: enquanto um dos genótipos confere susceptibilidade a um tipo da doença (doença infecciosa), o outro confere susceptibilidade a uma doença diferente (CORREA et al. 2005).

Até o momento da redação deste texto, somente dois trabalhos estudaram o polimorfismo do gene *CTLA-4* com a infecção por dengue. Os dados deste estudo são contrários aos encontrados no estudo de Fernández-Mestre e colaboradores (2009), onde não foi encontrada associação entre o polimorfismo *CTLA-4* com a infecção por dengue. Por outro lado, Cheng e colaboradores (2009) mostraram uma associação deste polimorfismo em combinação com genótipo selvagem de *TGFβ* (CC), para o desenvolvimento da dengue hemorrágica. O risco para dengue encontrado em nosso estudo parece ser devido ao comprometimento do papel regulador da resposta imune atribuído ao *CTLA-4*.

Nas análises de associação dos genótipos dos receptores estudados com as citocinas IL8, IL17, *TGFβ*, analisadas anteriormente foi observado duas combinações genótípicas associadas com a proteção: *DC-SIGN* (AG) + *CTLA-4* (AA) e *DC-SIGN* (AA) + *IL17* (GG). Na associação *DC-SIGN* (AG) + *CTLA-4* (AA) pode-se justificar a proteção encontrada pela provável diminuição da endocitose viral e pela função reguladora da molécula *CTLA-4* não estar comprometida. Na segunda combinação a proteção à infecção pode estar relacionada à presença do genótipo polimórfico de *IL17*, o qual foi descrito no tópico I dos resultados (artigo). Assim, a proteção associada ao alelo G de *IL17* encontrada neste estudo poderia ser uma consequência da diminuição da função da *IL17F* em mediar à inflamação através da produção de citocinas.

Nas análises dos polimorfismos dos genes *CTLA-4* (+49 A/G) e *DC-SIGN* (-336 A/G), com as manifestações clínicas dos pacientes com dengue, observou-se que a ausência de manifestações hemorrágicas foi significativamente mais frequente em portadores do genótipo selvagem do receptor *DC-SIGN* (AA). Apesar de no nosso estudo não ter sido encontrado

nenhuma associação com esse polimorfismo, é relatado que o genótipo AA está relacionado com a proteção contra DHF, pois afeta a expressão do DC-SIGN na superfície de células dendríticas e a replicação viral nas DCs de doentes infectados por vírus DENV (FANG et al. 2012). Adicionalmente, pacientes com dengue portadores do genótipo heterozigoto de *CTLA-4* (AG) foram estatisticamente associados a uma contagem de plaquetas normal ($p=0.033$). Foi reportado que a presença de manifestações hemorrágicas e a trombocitopenia na dengue estão associadas à produção de citocinas tais como, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1 (BOZZA et al. 2008).

A análise haplotípica, mostrou que duas combinações alélicas demonstraram uma maior probabilidade de proteção para o desenvolvimento da dengue, [AGCAA e AGTAG] na sequência dos respectivos genes *IL8*, *IL17*, *TGF β* , *DC-SIGN* e *CTLA-4*, esta análise reforça os dados do nosso artigo, onde encontramos uma proteção para a doença associada à presença do alelo G da *IL17*.

15. Conclusão

- Não foi observada associação do polimorfismo do gene *DC-SIGN* com a dengue;
- Foi observado risco para dengue com o genótipo heterozigoto de *CTLA-4* foi observada no modelo *overdominante*;
- Foi observada uma associação com a ausência de manifestações hemorrágicas com o genótipo selvagem de (AA) e a presença com o genótipo polimórfico (GG) *DC-SIGN*.
- Uma proteção para a dengue pode ser observada em duas combinações genótípicas *DC-SIGN* (AG) + *CTLA-4* (AA), e *DC-SIGN* (AA) + *IL17* (GG) e duas combinações haplotípicas considerando a interação dos alelos [AGCAA] e [AGTAG] dos respectivos genes *IL8*, *IL17*, *TGF β* , *DC-SIGN* e *CTLA-4*.

16. Conclusão final da tese

Os dados deste estudo mostram a importância do polimorfismo *IL17* (7488 A/G; rs 763780) na modulação da resposta inflamatória ao DENV, onde devida a baixa efetividade do genótipo GG parece ser relevante para um controle negativo da cascata da resposta imunológica decorrente da infecção pelo vírus da dengue. Essa regulação negativa é corroborada pelo fato da proteção também observada na presença dos genótipos dos genes *TGFβ* (-509 C/T; rs 1800469) e *IL8*(-251 A/T; rs 4073) e dos receptores *DC-SIGN* (-336 A/G; rs 4804803) e *CTLA-4* (+49 A/G; rs 231775). Esse resultado torna-se interessante à medida que aponta essa molécula como potencial alvo para terapias em áreas endêmicas e em períodos de endemias.

Na análise dos receptores não encontramos associação do polimorfismo do gene *DC-SIGN* com a dengue. Porém uma tendência a risco para dengue com o genótipo heterozigoto de *CTLA-4* foi observada no modelo *overdominante*. Indicando uma importância desse receptor na susceptibilidade à dengue. Uma proteção para a dengue pode ser observada em duas combinações genóticas *DC-SIGN* (AG) + *CTLA-4* (AA), e *DC-SIGN* (AA) + *IL17* (GG) e duas combinações haplotípicas considerando a interação dos alelos [AGCAA] e [AGTAG] dos respectivos genes *IL8*, *IL17*, *TGFβ*, *DC-SIGN* e *CTLA-4* reforçando os dados das análises individuais desses genes no presente estudo.

17. Dificuldades na execução do trabalho

Algumas dificuldades encontradas durante a realização deste trabalho:

- Dificuldades no acesso aos pacientes, dados clínicos e amostras;
- A maioria dos pacientes com dengue simples atendidos, em nível de emergência não possuíam prontuários;
- Falta de banco de dados com resultados dos exames laboratoriais, que nos permitissem ter os dados da evolução da doença;
- Logística de transporte de amostras ao LACEN para a realização dos exames para a confirmação sorológica;
- Pacientes internados com dengue com sinais de alarme e dengue grave, já chegavam ao hospital com mais de cinco dias do início dos sintomas e sem ter colhido neste período a amostra para o isolamento viral, sendo assim excluído da nossa pesquisa, o que justificou termos poucos casos de dengue com sinais de alarme.
- A nível experimental, tivemos dificuldades na obtenção do DNA dos pacientes, pois extraímos o DNA a partir do Buffy-coat e a maioria dos pacientes possui leucopenia, o que nos proporcionou um DNA de pouca quantidade de qualidade.

18. Referências

ALLEN, M. M.; KAPTEIN, S. J.; DE BURGHGRAEVE, T.; BALZARINI, J.; NEYTS, J.; SCHOLS, D. Antiviral activity of carbohydratebinding agents and the role of DC-SIGN in dengue virus infection. *Virology*, v. 387, p. 67–75, 2009.

ALAGARASU, K., DAMLE, I.M., BACHAL, R.V., MULAY, A.P., SHAH, P.S., DAYARAJ, C.. Association of promoter region polymorphisms of CD209 gene with clinical outcomes of dengue virus infection in Western India. *Infect Genet Evol.* n. 17, p. 239–242, 2013.

ASSENBERG, R., MASTRANGELO, E., WALTER, T.S., VERMA, A., MILANI, M., OWENS, R.J., STUART, D.I., GRIMES, J.M., MANCINI, E.J.. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J Virol.* v.83, n. 24, p. 12895-906, 2009.

AVIRUTNAN, P.; PUNYADEE, N.; NOISAKRAN, S.; KOMOLTRI, C.; THIEMMECA, S.; AUETHAVORNANAN, K.; JAIRUNGSRI, A.; KANLAYA, R.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; PUTTIKHUNT, C.; PATTANAKITSAKUL, S. N.; YENCHITSOMANUS, P. T.; MONGKOLSAPAYA, J.; KASINRERK, W.; SITTISOMBUT, N.; HUSMANN, M.; BLETTNER, M.; VASANAWATHANA, S.; BHAKDI, S.; MALASIT, P. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.*, v. 193, n. 8, p. 1078-1088, 2006.

AZEREDO, E. L.; DE OLIVEIRA-PINTO, L. M.; ZAGNE, S. M.; CERQUEIRA, D. I.; NOGUEIRA, R. M.; KUBELKA, C. F. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol.*, v. 143, n. 2, p. 345-356, 2006.

BALESTRIERI, M. L.; BALESTRIERI, A.; MANCINI, F. P.; NAPOLI, C. Understanding the immunoangiostatic CXC chemokine network. *Cardiovasc Res.*, v. 78, n. 2, p. 250-256, 2008.

BARKHASH, A.V., PERELYGIN, A.A., BABENKO, V.N., BRINTON, M.A., VOEVODA, M.I.. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the CD209 gene is associated with human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* p. 1-5, 2011.

BASU, A.; CHATURVEDI, U. C. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, v. 53, n. 3, p. 287-299, 2008.

BHAYAL, A. C.; PRABHAKAR, B.; RAO, K. P.; PENCHIKALA, A.; AYESHA, Q.; JYOTHY, A.; NALLARI, P.; VENKATESHWARI, A. Role of transforming growth factor- β 1 -509 C/T promoter polymorphism in gastric cancer in south Indian population. *Tumor Biology.*, v. 32, n. 5, p. 1049-1053, 2011.

BIELEFELDT-OHMANN, H. Pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. *Trends Microbiol.*, v. 5, n. 10, p. 409-413, 1997.

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, n. 86. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília-DF, 2005.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2013. Dengue diagnóstico e manejo clínico: Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/dengue_manejo_adulto_crianca__4ed_2011.pdf f. Acesso em: 28/10/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2014/11/ministerio-da-saude-atualiza-dados-sobre-casos-de-dengue>> Acesso em: 11 nov 2015.

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, 2007.

BULUGAHAPITIYA, U.; SIYAMBALAPITIYA, S.; SENEVIRATNE, S. L.; FERNANDO, D. J. Dengue fever in travellers: A challenge for European physicians. *Eur J Intern Med.*, v. 18, n. 3, p. 185-192, 2007.

CABRERA-HERNANDEZ, A.; THEPPARIT, C.; SUKSANPAISAN, L.; SMITH, D. R. Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70. *J Med Virol.*, v. 79, n. 4, p. 386-392, 2007.

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Ver. Microbiol.*, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHANG, Q.; WANG, Y. K.; ZHAO, Q.; WANG, C. Z.; HU, Y. Z.; WU, B. Y. Th17 cells are increased with severity of liver inflammation in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol.*, v. 27, n. 2, p. 273–278, 2012.

CHEN, R.F., LIU, J.W., YEH, W.T., WANG, L., CHANG, J.C., YU, H.R., CHENG, J.T., YANG, K.D.. Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* n. 44, p. 43–50, 2005.

CHEN, M. C.; LIN, C. F.; LEI, H. Y.; LIN, S. C.; LIU, H. S.; YEH, T. M.; ANDERSON, R.; LIN, Y. S. Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. *J Immunol.*, v. 3, n. 183, p. 1797-1803, 2009.

CLYDE, K.; HARRIS, E. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol.*, v. 80, n. 5, p. 2170-2182, 2006.

CONWAY, M. J.; COLPITTS, T. M.; FIKRIG, E. Role of the vector in arbovirus transmission. *Annu Rev Virol.*, v. 1, p. 71-88, 2014.

CORREA, P.A., GOMEZ, L.M., CADENA, J., ANAYA, J.M.. Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. *J Rheumatol.* n. 32, p. 219–24, 2005.

COSTA, S. M.; AZEVEDO, A. S.; PAES, M. V.; SARGES, F. S.; FREIRE, M. S.; ALVES, A. M. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology.*, v. 358, p. 413-423, 2007.

CRIVELLATO, E. The role of angiogenic growth factors in organogenesis. *The International Journal of Developmental Biology.*, v. 55, n. 4-5, p. 365-375, 2011.

CURTIS, M.M., WAY, S.S.. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology.* v. 2, n. 126, p. 177-85, 2009

DEJNIRATTISAI, W.; JUMNAINSONG, A.; ONSIRISAKUL, N.; FITTON, P.; VASANAWATHANA, S.; LIMPITIKUL, W.; PUTTIKHUNT, C.; EDWARDS C.; DUANGCHINDA, T.; SUPASA, S.; CHAWANSUNTATI, K.; MALASIT, P.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science.*, v. 328, p. 745-748, 2010.

DE LA C SIERRA, B.; KOURI, G.; GUZMAN, M. G. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol.*, v. 152, p. 533-542, 2007.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.*, v. 8, n. 6, p. 390-398, 2004.

DESPRE`S, P.; SAKUNTABHAI, A.; JULIER, C. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Med Sci.*, v. 21, p. 905–906, 2005.

DETOGNI, R.S., SÁ, R.T., TOVAR, T. T., LOURO, I.D.. Polymorphic genetic variation in immune system genes: a study of two populations of Espirito Santo, Brazil. *Mol Biol Rep.* v. 8, n. 40, p.4843-9, 2013.

DIAS, F.C., MEDINA, T.D.A.S., MENDES-JUNIOR, C.T., DANTAS, R.O., PISSETTI, C.W., JUNIOR, V.R., DELLALIBERA-JOVILIANO, R., MARIN-NETO, J.A., GUTIERREZ, F.R., MOREAU, P., SILVA, J.S., DONADI, E.A.. Polymorphic sites at the immunoregulatory CTLA-4 gene are associated with chronic chagas disease and its clinical manifestations. *PLoS One.* v. 8, n. 10, p. 1-7 2013.

FANG, X., HU, Z., SHANG, W., ZHU, J., XU, C., RAO, X.. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol. Nov*; v. 2, n. 66, p. 134-46, 2012.

FARRAR, J. J.; NGUYEN, V. V.; WILLS, B. Dengue. *N Engl J Med.*, v. 366, n. 15, p. 1423–1432, 2012.

FERNÁNDEZ-MESTRE, M.; SÁNCHEZ, K.; BALBÁS, O.; GENDZEKHZADZE, K.; OGANDO, V.; CABRERA, M.; LAYRISSE, Z. Influence of CTLA-4 gene polymorphism in autoimmune and infectious diseases. *Hum Immunol.*, v. 7, n. 70, p. 532-535, 2009.

FERREIRA, A.C., GOMES, K.B., SAMPAIO, I.B., OLIVEIRA, V.C., PARDINI, V.C., GODARD, A.L.. Type 1 diabetes susceptibility determined by HLA alleles and CTLA-4 and insulin genes polymorphisms in Brazilians. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* v. 3, n. 53, p. 368-73, 2009.

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

FIGUEIREDO, L. T. Dengue in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 45, n. 3, p. 285, 2012.

FOSSIEZ, F., BANCHEREAU, J., MURRAY, R., VAN KOOTEN, C., GARRONE, P., LEBECANE, S.. Interleukin -17. *Int Rev Immunol.* n. 16, p. 541-51, 1998.

GEWALTIG, J.; MANGASSER-STEPHAN, K.; GARTUNG, C.; BIESTERFELD, S.; GRESSNER, A. M. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin Chim Acta.*, v. 316, n. 1-2, p. 83-94, 2002.

GOMES, A. L.; WEE, L. J. K.; KHAN, A. M.; GIL, L. H. V. G.; MARQUES JR, E. T. A.; CALZAVARA-SILVA, C. E.; TAN, T. W. Classification of dengue fever patients based on gene expression data using support vector machines. *PLoS One.*, v. 5, n. 6, 2010.

GRAINGER, D. J.; HEATHCOTE, K.; CHIANO, M.; SNIEDER, H.; KEMP, P. R.; METCALFE, J. C.; CARTER, N. D.; SPECTOR, T. D. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type 1. *Human Molecular Genetics.*, v. 8, n. 1, p. 93–97, 1999.

GUBLER U, CHUA AO, HOFFMAN BJ, COLLIER KJ, ENG J. Cloned cDNA to cholecystokinin mRNA predicts an identical preprocholecystokinin in pig brain and gut. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 v. 14, n. 81, p. 4307-4310, 1984.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.*, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J. The emergence of epidemic dengue fever and dengue hemorrhagic fever in the Americas: a case of failed public health policy. *Rev Panam Salud Publica.*, v. 17, n. 4, p. 221-224, 2005.

GURUGAMA, P.; GARG, P.; PERERA, J.; WIJEWICKRAMA, A.; SENEVIRATNE, S. L. Dengue viral infections. *Indian J Dermatol.*, v. 55, n. 1, p. 68-78, 2010.

GUPTA, N.; CHATURVEDI, U. C. Can helper T-17 cells play a role in dengue haemorrhagic fever? *Indian J Med Res.*, v.1, n.130, p. 5-8, 2009.

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.

GUZMAN, M. G., KOURI, G. Dengue: an update. *The Lancet Infectious Diseases.*, v. 2, p. 33–42, 2002.

GUZMAN, M. G., KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases.*, v. 8, p. 69–80, 2004.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.*, v. 8, n. 12, p. S7-16, 2010.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* n. 239, p. 476-481, 1988.

HALSTEAD SB. Global epidemiology of dengue: Health systems in disarray. *Trop Med.* n. 35, p. 137–46, 1993.

HALSTEAD, S. B. Dengue. *Lancet.*, v. 370, p. 1644-1652, 2007.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.*, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HO, L. J.; HUNG, L. F.; WENG, C. Y.; WU, W. L.; CHOU, P.; LIN, Y. L.; CHANG, D. M.; TAI, T. Y.; LAI, J. H. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol.*, v. 174, n. 12, p. 8163-8172, 2005.

HOLMES, E. C., AND S. S. BURCH. The Causes and Consequences of Genetic Variation in Dengue Virus. *Trends in Microbiology*, 8: 74–77, 2000.

INSTITUO OSWALDO CRUZ (IOC). Dengue: Vírus e o vetor. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html>> Acesso em: 12/10/2015.

IWASHIMA S1, KIMURA M, ISHIKAWA T, OHZEKI T. Importance of C-reactive protein level in predicting non-response to additional intravenous immunoglobulin treatment in children with Kawasaki disease: a retrospective study. *Clin Drug Investig.* v. 3, n. 31, p. 191-9, 2011.

JOHNSON, G. C.; ESPOSITO, L.; BARRATT, B. J.; SMITH, A. N.; HEWARD, J.; DI GENOVA, G.; UEDA, H.; CORDELL, H. J.; EAVES, I. A.; DUDBRIDGE, F.; TWELLS, R. C.; PAYNE, F.; HUGHES, W.; NUTLAND, S.; STEVENS, H.; CARR, P.; TUOMILEHTO-

WOLF, E.; TUOMILEHTO, J.; GOUGH, S. C.; CLAYTON, D. G.; TODD, J. A. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet.*, v. 29, p. 233–237, 2001.

JULANDER, J. G.; PERRY, S. T.; SHRESTA, S. Important advances in the field of anti-dengue virus research. *Antivir Chem Chemother.*, v. 21, n. 3, p. 105-116, 2011.

KAWAGUCHI, M.; ADACHI, M.; ODA, N.; KOKUBU, F.; HUANG, S. K. IL-17 cytokine family. *The Journal of allergy and clinical immunology.*, v. 114, n. 6, p. 1265–1273, 2004.

KAWAGUCHI, M.; TAKAHASHI, D.; HIZAWA, N.; SUZUKI, S.; MATSUKURA, S.; KOKUBU, F.; MAEDA, Y.; FUKUI, Y.; KONNO, S.; HUANG, S. K.; NISHIMURA, M.; ADACHI, M. IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 117, p. 795–801, 2006.

KINNEY, R. M.; HUANG, C. Y. Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. *Intervirology.*, v. 44, n. 2-3, p. 176-197, 2001.

KOURI, G.; GUZMA, M. G.; VALDE, L.; CARBONEL, I.; DEL ROSARIO, D.; VAZQUEZ, S. LAFERTE, J.; DELGADO, J.; CABRERA, M. V. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis.*, v. 4, p. 89–92, 1998.

KOUKI, T.; SAWAI, Y.; GARDINE, C.; FISFALEN, M.; ALEGRE, M.; DEGROOT, L. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol.*, v. 165, p. 6606–6611, 2000.

KRISTIANSEN, O. P.; LARSEN, Z. M.; POCIOT, F. CTLA-4 in autoimmune diseases—a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun.*, v. 1, p. 170–184, 2000.

KURANE, I.; HEBBLEWAITE, D.; BRANDT, W. E.; ENNIS, F. A. Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol.*, v. 52, n. 1, p. 223-230, 1984.

KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol. Microbiol Infect Dis.*, v. 30, p. 329–340, 2007.

KUESTNER, R. E.; TAFT, D. W.; HARAN, A.; BRANDT, C. S.; BRENDER, T.; LUM, K.; HARDER, B.; OKADA, S.; OSTRANDER, C. D.; KREINDLER, J. L.; AUJLA, S. J.; REARDON, B.; MOORE, M.; SHEA, P.; SCHRECKHISE, R.; BUKOWSKI, T. R.; PRESNELL, S.; GUERRA-LEWIS, P.; PARRISH-NOVAK, J.; ELLSWORTH, J. L.; JASPERS, S.; LEWIS, K. E.; APPLEBY, M.; KOLLS, J. K.; RIXON, M.; WEST, J. W.; GAO, Z.; LEVIN, S. D. Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J Immunol.*, v. 179, p. 5462–5473, 2007.

LANCIOTTI, R.S., CALISHER, C.H., GUBLER, D.J., CHANG, G.J., VORNDAM, A.V.. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* v. 3, n. 30, p. 545-51, 1992.

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.

LAOPRASOPWATTANA, K.; LIBRATY, D. H.; ENDY, T. P.; NISALAK, A.; CHUNSUTTIWAT, S.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L.; GREEN, S. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication. *J Infect Dis.*, v. 195, n. 8, p. 1108-1116, 2007.

LEIBOVICI, D.; GROSSMAN, H. B.; DINNEY, C. P.; MILLIKAN, R. E.; LERNER, S.; WANG, Y.; GU, J.; DONG, Q.; WU, X. Polymorphisms in Inflammation Genes and Bladder Cancer: From Initiation to Recurrence, Progression, and Survival. *J Clin Oncol.*, v. 23, p. 5746-5756, 2005.

LIN, C. F.; LEI, H. Y.; SHIAU, A. L.; LIU, H. S.; YEH, T. M.; CHEN, S. H.; LIU, C. C.; CHIU, S. C.; LIN, Y. S. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol.*, v. 169, n. 2, p. 657-664, 2002. Erratum in: *J Immunol.*, v. 169, n. 4, 2215, 2002.

LINSLEY, P. S.; GREENE, J. L.; TAN, P.; BRADSHAW, J.; LEDBETTER, J. A.; ANASETTI, C.; DAMLE, N. K. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, v. 176, p. 1595, 1992.

LITTAUA, R.; KURANE, I.; ENNIS, F. A. Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol.*, v. 144, p. 3183–3186, 1990.

LIU, W. T.; LIN, W. T.; TSAI, C. C.; CHUANG, C. C.; LIAO, C. L.; LIN, H. C.; HUNG, Y. W.; HUANG, S. S.; LIANG, C. C.; HSU, H. L.; WANG, H. J.; LIU, Y. T. Enhanced immune response by amphotericin B following NS1 protein prime-oral recombinant Salmonella vaccine boost vaccination protects mice from dengue virus challenge. *Vaccine.*, v. 24, n. 31-32, p. 5852-5861, 2006.

LOEB, M. Genetic susceptibility to West Nile virus and dengue. *Public Health Genomics.*, v. 16, p. 4-8, 2013.

LOZACH, P. Y.; BURLEIGH, L.; STAROPOLI, I.; NAVARRO-SANCHEZ, E.; HARRIAGUE, J.; VIRELIZIER, J. L.; REY, F. A.; DESPRÈS, P.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; AMARA, A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem.*, v. 280, n. 25, p. 23698-23708, 2005.

LOZACH, P. Y.; KÜHBACHER, A.; MEIER, R.; MANCINI, R.; BITTO, D.; BOULOY, M.; HELENIUS, A. DC-SIGN as a receptor for phleboviruses. *Cell Host Microbe.*, v. 10, n. 1, p. 75-88, 2011.

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>.

- MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev.*, v. 225, p. 300-313, 2008.
- MANGADA, M. M.; ROTHMAN, A. L. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4⁺ T cells to heterologous serotypes. *J Immunol.*, v. 175, p. 2676–2683, 2005.
- MCCONNELL, J. 15th international congress on infectious diseases. *Lancet Infect Dis.*, v. 12, p. 593, 2012.
- MILLER, N. Recent progress in dengue vaccine research and development. *Curr Opin Mol Ther.*, v. 12, p. 31-38, 2010.
- MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature.*, v. 427, n. 6972, p. 313-9, 2004.
- MUMMIDI, S.; CATANO, G.; LAM, L.; HOEFLE, A.; TELLES, V.; BEGUM, K.; JIMENEZ, F.; AHUJA, S. S.; AHUJA, S. K. Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms. Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts. *J Biol Chem.*, v. 276, n. 35, p. 33196-33212, 2001.
- MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol.*, v. 29, p. 587-619, 2011.
- MURRELL, S.; WU, S. C.; BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol Adv.*, v. 29, n. 2, p. 239-247, 2011.
- NAGESH K. T, AMBUJ S, PABAN K. D, ASHA M. J. Detection of Dengue Virus Methods in Molecular Biology. v. 665, p. 51-64, 2011.
- NAVARRO-SANCHEZ, E., ALTMAYER, R., AMARA, A., SCHWARTZ, O., FIESCHI, F., VIRELIZIER, J.L., ARENZANA-SEISDEDOS, F., DESPRES, P.. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* n. 4, p. 723–728, 2003.
- NEAL, J. W. Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS? *J Infect.*, v. 69, n. 3, p. 203-215, 2014.
- 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.
- NOBLE, C. G.; CHEN, Y. L.; DONG, H.; GU, F.; LIM, S. P.; SCHUL, W.; WANG, Q. Y.; SHI, P. Y. Strategies for development of dengue virus inhibitors. *Antiviral Research.*, v. 85, p. 450–462, 2010.
- NOECKER, C.A., AMAYA-LARIOS, I.Y., GALEANA-HERNÁNDEZ, M., RAMOS-CASTAÑEDA, J., MARTÍNEZ-VEJA, R.A.. Contrasting associations of polymorphisms in

Fc γ RIIa and DC-SIGN with the clinical presentation of dengue infection in a Mexican population. *Acta Trop.* n. 138, p. 15-2, 2014.

NOGUEIRA, R.M.R., SCHATZMAYR, H.G., FILIPPIS, A.M.B., SANTOS, F.B., CUNHA, R.V., COELHO, J.O., DE SOUZA, L.J., GUIMARÃES, F.R., DE ARAÚJO, E.S., DE SIMONE, T.S., BARAN, M., TEIXEIRA, G. JR., MIAGOSTOVICH, M.P.. Dengue virus type 3, Brazil. *Emerg Infect Dis.*, n. 11, p. 1376-1381, 2002.

NOGUEIRA RM, SCHATZMAYR HG, DE FILIPPIS AM, DOS SANTOS FB, DA CUNHA RV, COELHO JO, DE SOUZA LJ, GUIMARÃES FR, DE ARAÚJO ES, DE SIMONE TS, BARAN M, TEIXEIRA G JR, MIAGOSTOVICH MP. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis.* v. 9, n.11, p. 1376-1381, 2005.

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.

OLIVEIRA, L.F., LIMA, C.P., AZEVEDO, R.S., MENDONÇA, D.S., RODRIGUES, S.G., CARVALHO, V.L., PINTO, E.V., MAIA, A.L., MAIA, M.H., VASCONCELOS, J.M., SILVA, A.L., NUNES, M.R., SENA, L., VASCONCELOS, P.F., SANTOS, E.J.. Polymorphism of DC-SIGN (CD209) promoter in association with clinical symptoms of dengue fever. *Viral Immunol.* v. 5, n. 27, p. 245-9, 2014.

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. S. Paulo.*, v. 25: p. 53-54, 1984.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Dengue and severe dengue. N. 117, 2012. Updated September 2014.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=&gid=29963&lang=pt> Acesso em: 04/05/2015.

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.

PAES, M. V.; LENZI, H. L.; NOGUEIRA, A. C.; NUOVO, G. J.; PINHÃO, A. T.; MOTA, E. M.; BASÍLIO-DE-OLIVEIRA, C. A.; SCHATZMAYR, H.; BARTH, O. M.; ALVES, A. M. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest.*, v. 89, n. 10, p. 1140-1151, 2009.

PASTAR, I.; STOJADINOVIC, O.; KRZYZANOWSKA, A.; BARRIENTOS, S.; STUELTEN, C.; ZIMMERMAN, K.; BLUMENBERG, M.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Attenuation of the Transforming Growth Factor β -Signaling Pathway in Chronic Venous Ulcers. *Molecular Medicine.*, v. 16, n. 3-4, p. 92-101, 2010.

- PAVONI, D.P., CERQUEIRA, L.B., ROXO, V.M., PETZL-ERLER, M.L.. Polymorphism of the promoter region and exon 1 of the CTLA4 gene in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *Braz J Med Biol Res.* v. 9, n. 39, p. 1227-32, 2006.
- PENDELOSKI, K.P., SASS, N., TORLONI, M.R., MATTAR, R., MORON, A.F., FRANCHIM, C.S., DAHER, S.. Immunoregulatory gene polymorphisms in women with preeclampsia. *Hypertens Res.* v. 3, n. 34, p. 384-8, 2011.
- 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- α , transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* n. 71, p. 1135–1140, 2010.
- PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.*, v. 11, n. 4, p. 369-377, 2008.
- PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert Rev Mol Med.* v. 12, p. 10, 2008.
- PINHEIRO, F. P.; CORBER, S. J. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q.*, v. 5, p. 161-169, 1997.
- POULIOT, S. H.; XIONG, X.; HARVILLE, E.; PAZ-SOLDAN, V.; TOMASHEK, K. M.; BREART, G.; BUEKENS, P. Maternal dengue and pregnancy outcomes: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv.*, v. 65, p. 107-118, 2010.
- POZZETTO, B.; MEMMI, M.; GARRAUD, O. Is transfusion-transmitted dengue fever a potential public health threat? *World J Virol.*, v. 4, n. 2, p. 113-123, 2015.
- RAGHUPATHY R, CHATURVEDI UC, AL-SAYER H, ELBISHBISHI EA, AGARWAL R, NAGAR R. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol.* n. 56, p. 280-5, 1998.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci.*, v. 67, n. 16, p. 2773-2786, 2010.
- ROSS, T. M. Dengue virus. *Clin Lab Med.*, v. 30, n. 1, p. 149-60, 2010.
- ROTHMAN AL. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Virus Res.* n. 60, p. 397–419, 2003.
- RUBERTO, I.; MARQUES, E.; BURKE, D. S.; VAN PANHUIS, W. G. The availability and consistency of dengue surveillance data provided online by the World Health Organization. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 9, n. 4, 2015.
- SAKUNTABHAI, A., TURBPAIBOON, C., CASADEMONT, I., CHUANSUMRIT, A., LOWHNOO, T., KAJASTE-RUDNITSKI, A., KALAYANAROOJ, S.M., TANGNARARATCHAKIT, K., TANGTHAWORNCHAIKUL, N., VASANAWATHANA, S., CHAIYARATANA, W., YENCHITSOMANUS, P.T., SURIYAPHOL, P.,

AVIRUTNAN, P., CHOKEPHAIBULKIT, K., MATSUDA, F., YOKSAN, S., JACOB, Y., LATHROP, G.M., MALASIT, P., DESPRES, P., JULIER, C.. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat. Genet.* n. 37, p. 507–513, 2005.

SAVAGE S.A., HOU L., LISSOWSKA J., CHOW W.H., ZATONSKI W., CHANOCK S.J., YEAGER M., Interleukin-8 polymorphisms are not associated with gastric cancer risk in a Polish population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2006).

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

SCHLESINGER, J. J.; BRANDRISS, M. W.; WALSH, E. E. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol.*, v. 68, n. 3, p. 853-857, 1987.

SELVARAJ, P.; ALAGARASU, K.; SWAMINATHAN, S.; HARISHANKAR, M.; NARENDRAN, G. CD209 gene polymorphisms in South Indian HIV and HIV-TB patients. *Infect Genet Evol.*, v. 9, p. 256–262, 2009.

SEIDERER J1, ELBEN I, DIEGELMANN J, GLAS J, STALLHOFER J, TILLACK C, PFENNIG S, JÜRGENS M, SCHMECHEL S, KONRAD A, GÖKE B, OCHSENKÜHN T, MÜLLER-MYHSOK B, LOHSE P, BRAND S. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): Upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* v. 4, n.14, p. 437–445, 2008.

SHU, P. Y.; HUANG, J. H. Current Advances in Dengue Diagnosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.*, v. 11, n. 4, p. 642–650, 2004.

SHRESTA, S.; SHARAR, K. L.; PRIGOZHIN, D. M.; SNIDER, H. M.; BEATTY, P. R.; HARRIS, E. Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice. *J Immunol.*, v. 175, n. 6, p. 3946-3954, 2005.

SIE, M. P. S. TGF- β 1 Polymorphisms and Risk of Myocardial Infarction and Stroke: The Rotterdam Study. *Stroke.* v. 37, n. 11, p. 2667-2671, 2006.

SILVA, L. K.; BLANTON, R. E.; PARRADO, A. R.; MELO, P. S.; MORATO, V. G.; REIS, E. A.; DIAS, J. P.; CASTRO, J. M.; VASCONCELOS, P. F.; GODDARD, K. A.; BARRETO, M. L.; REIS, M. G.; TEIXEIRA, M. G. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. *Eur J Hum Genet.*, v. 18, p. 1221–1227, 2010.

SIMMONS, C. P.; POPPER, S.; DOLOCEK, C.; CHAU, T. N.; GRIFFITHS, M.; DUNG, N. T.; LONG, T. H.; HOANG, D. M.; CHAU, N. V.; THAO LE, T. T.; HIEN, T. T.; RELMAN, D. A.; FARRAR, J. 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.*, v. 83, n. 2, p. 22-35, 2007.

SOUZA, L. J. de; PESSANHA, L. B.; MANSUR, L. C.; SOUZA, L. A. de; RIBEIRO, M. B. T.; SILVEIRA, M. V. da; SOUTO FILHO, J. T. Comparison of clinical and laboratory characteristics between children and adults with dengue. *Braz J Infect Dis.*, v. 17, n. 1, 2013.

SNOUSSI, K.; MAHFOUDH, W.; BOUAOUINA, N.; FEKIH, M.; KHAIRI, H.; HELAL, A. N.; CHOUCANE, L. Research article Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. *BMC Cancer.* v. 10, p. 1-12, 2010.

STEINBERG, M. H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *Scientific World Journal.*, v. 9, p. 46–67, 2009.

SUGIMOTO, M.; YAMAOKA, Y.; FURUTA, T. Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. *World J Gastroenterol.*, v. 16, n. 10, p. 1188-1200, 2010.

SUN, P., KOCHER, T. J.. The Battle between Infection and Host Immune Responses of Dengue Virus and Its Implication in Dengue Disease Pathogenesis. *ScientificWorldJournal.* v. 2013, p. 1-11, 2013.

SVAJGER, U.; ANDERLUH, M.; JERAS, M.; OBERMAJER, N. C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell Signal.*, v. 22, n. 10, p. 1397-1405, 2010.

VEJBAESYA, S.; LUANGTRAKOOL, P.; LUANGTRAKOOL, K.; KALAYANAROOJ, S.; VAUGHN, D. W.; ENDY, T. P.; MAMMEN, M. P.; GREEN, S.; LIBRATY, D. H.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L.; STEPHENS, H. A. TNF and LTA gene, allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. *J Infect Dis.*, v. 199, n. 10, p. 1442-1448, 2009.

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 Bulletin.*, v. 30, p. 191-196, 2006.

VERONESI, R. **Doenças Infeciosas e Parasitárias**. 8.ed. Guanabara Koogan, 1991.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado De Infectologia** - 2 Volumes- 4ª Edição, Editora Atheneu, 2010.

VORNDAM, V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infection. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York: CAB International; p. 313-333. 1997.

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.* n. 20, p. 197–205, 2013.

WALLACH, **Interpretação de Exames Laboratoriais**. Editora Medsi, 7ª edição, 2003.

WANG, X. B.; ZHAO, X.; GISCOMBE, R.; LEFVERT, A. K. A CTLA-4 gene polymorphism at position 318 in the promoter region affects the expression of protein. *Genes Immun.*, v. 3, p. 233–234, 2002.

WANG, L.; CHEN, R.; LIU, J.; LEE, K.; LEE, C.; KUO, C.; HUANG, S.; YANG, K. D. DC-SIGN (CD209) Promoter 2336 A/G Polymorphism is Associated with Dengue Hemorrhagic Fever and Correlated to DC-SIGN Expression and Immune Augmentation. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 1, n. 5, p. 1-10, 2011.

WATANABE, Y.; KINOSHITA, A.; YAMADA, T.; OHTA, T.; KISHINO, T.; MATSUMOTO, N.; ISHIKAWA, M.; NIIKAWA, N.; YOSHIURA, K. A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor-1 (TGF-1) and its signaling pathway. *Journal of Human Genetics.*, v. 47, p. 478-483, 2002.

WEI Y-S., LAN Y., TANG R-G., XU Q-Q., HUANG Y., NONG H-B., HUANG W-T. Single nucleotide polymorphism and haplotype association of the interleukin-8 gene with nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Immunology*, n. 125, p. 309–317, 2007.

WEINBERG, C.R., MORRIS, R.W.. Testing for Hardy–Weinberg disequilibrium using a genome single-nucleotide polymorphism scan based on cases only. *Am J Epidemiol.* N. 158, p. 401–3, 2003.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.*, v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.

WICHUKCHINDA, N.; KITAMURA, Y.; ROJANAWIWAT, A.; NAKAYAMA, E. E.; SONG, H.; PATHIPVANICH, P.; AUWANIT, W.; SAWANPANYALERT, P.; IWAMOTO, A.; SHIODA, T.; ARIYOSHI, K. The polymorphisms in DC-SIGN affect susceptibility to HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retrovir.*, v. 23, p. 686–692, 2007.

World Health Organization (WHO), Dengue diagnostics: proceedings of a joint TDR/WHO and PDVI workshop. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004.

World Health Organization (WHO), Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. 2009.

World Health Organization (WHO), Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization, 1997.

YANG, J.; ZHANG, J.; CHEN, W.; HU, Z.; ZHU, J.; FANG, X.; YUAN, W.; LI, M.; HU, X.; TAN, Y.; HU, F.; RAO, X. Eliciting crossneutralizing antibodies in mice challenged with a dengue virus envelope domain III expressed in *Escherichia coli*. *Can J Microbiol.*, v. 58, p. 369–380, 2012.

YAUCH, L. E.; ZELLWEGER, R. M.; KOTTURI, M. F.; QUTUBUDDIN, A.; SIDNEY, J.; PETERS, B.; PRESTWOOD, T. R.; SETTE, A.; SHRESTA, S. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol.*, v. 182, n. 8, p. 4865-4873, 2009.

YUE, F. Y.; MERCHANT, A.; KOVACS, C. M.; LOUTFY, M.; PERSAD, D.; OSTROWSKI, M. A. Virus-specific interleukin-17-producing CD4⁺ T cells are detectable in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.*, v. 82, n. 13, p. 6767–6771, 2008.

ZHANG, Q. B.; ETOLHI, G.; DAWODU, J. B.; GEMMELL, C. G.; RUSSELL, R. I. Relationship between mucosal levels of *Helicobacter pylori* specific IgA, interleukin-8 and gastric inflammation. *Clin Sci.*, v. 96, p. 409-414, 1999.

ZHANG, W.; CHIPMAN, P. R.; CORVER, J.; JOHNSON, P. R.; ZHANG, Y.; MUKHOPADHYAY, S.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H.; ROSSMANN, M. G.; KUHN, R. J. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol.*, v. 10, n. 11, p. 907-912, 2003.

Anexos

ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar de uma pesquisa em com o título “**Análise investigativa de genes polimórficos ligados à suscetibilidade da infecção da dengue clássica e hemorrágica em pacientes do estado do Ceará**”, que tem como objetivo principal entender melhor as células de defesa de seu corpo que podem conter algumas alterações específicas, os quais possibilitem aumentar as chances de desenvolver a doença com a qual você se encontra atualmente em tratamento.

O propósito deste folheto é esclarecer aberta e claramente todos os procedimentos envolvidos no estudo clínico, antes de sua decisão quanto à participação.

O estudo está sendo realizado por um grupo de pesquisadores do Ceará. Esse estudo permitirá verificar se existem diferenças regionais dessa doença. Se concordar em participar, você não terá benefício direto imediato, em princípio, mas poderá estar contribuindo para que se entenda melhor porque algumas pessoas são mais sensíveis do que outras a ter essa doença e assim poder beneficiar um número maior de pessoas no futuro.

Nenhuma mudança será feita no seu tratamento, assim nenhum efeito colateral poderá ser atribuído ao presente trabalho. A única coisa que será feita de diferente será a coleta de uma amostra de sangue, em torno de 5 mL (uma colher de sobremesa), retirado durante a sua internação e/ou atendimento, para ser examinada no laboratório verificando essas regiões específicas para o estudo. Os possíveis riscos em relação à coleta são baixos, visto que as pessoas encarregadas para esta função encontram-se com bastante experiência para esta finalidade. Você poderá sentir algum leve desconforto, mas que não será diferente do que qualquer coleta de sangue já realizada durante sua vida.

Paralelamente serão anotadas algumas questões referentes a você, no que diz respeito à data de nascimento, raça, sexo, cidade em que nasceu e informações relativas à sua doença. Estas informações serão retiradas do seu prontuário ou na ausência delas, serão perguntadas pessoalmente a você, ocupando de seu tempo entre coleta e anotações cerca de 5 a 10 minutos.

É importante entender que você não é obrigado (a) a participar do estudo. Se você decidir não participar ou desejar suspender a participação mais tarde, você não precisa dar explicações e pode ficar certo (a) de que continuará sendo assistido(a) e tratado(a) com o melhor cuidado possível, devendo comunicar esta decisão a seu médico, para que ele tome conhecimento e faça os esclarecimentos devidos.

Fique à vontade para formular pergunta aos pesquisadores, cujos nomes e telefones são encontrados ao final deste folheto, mesmo que pareça muito simples sua dúvida. Você poderá também conversar sobre o estudo com familiares, amigos ou com o médico que lhe assistiu.

Todos os seus dados pessoais serão tratados de maneira estritamente confidencial, ficando sua identificação inteiramente protegida. A qualquer época você poderá ter acesso às informações e conclusões do presente estudo, bem como de resultados de seus exames individualmente. Qualquer dúvida pode contatar os pesquisadores abaixo:

NOME: **Dr. Robério Dias Leite** TELEFONE: (85) 9986-9832

NOME: **Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst** TELEFONE: (85) 9994-5689

NOME: **Msc. Isaac Farias Cansanção** TELEFONE: (88) 9911-8589

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS DO HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS. TELEFONE: 3452-7880.

Os pesquisadores acima se comprometem a respeitar todas as normas da resolução 196/96 CONEP/CEP do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Se você decidir participar, então leia e assine o formulário na presença de seu médico e mantenha uma cópia do formulário e desse folheto para sua informação.

Você terá mais tempo para pensar se ainda estiver inseguro(a) quanto à participação.

Obrigado por ter lido esse folheto e por considerar sua participação no presente estudo.

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

Nome do Investigador: _____

1. Confirmando que li e entendi o folheto informativo sobre o estudo acima e tive a oportunidade de questionar e tirar as dúvidas que me surgiram.
2. Entendo que minha participação é voluntária e que tenho a liberdade de desistir a qualquer tempo sem apresentar razões e sem que minha assistência médica ou direitos legais sejam afetados.
3. Entendo que os itens de quaisquer dos meus registros médicos podem ser examinados pelos representantes responsáveis pela pesquisa ou pelas autoridades regulatórias, quanto à relevância de minha participação nesse estudo de pesquisa. Concedo permissão para que esses indivíduos tenham acesso aos meus registros.
4. Concordo em participar do estudo acima.
5. É de meu conhecimento que receberei uma cópia do presente formulário de consentimento

Fortaleza – CE, ____ / ____ / ____.

Nome completo do Paciente: _____

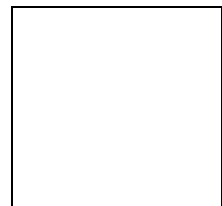
Endereço: _____

Telefone: _____ Assinatura: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Assinatura do investigador: _____



TERMO DE ASSENTIMENTO - MENOR DE 18 ANOS E INCAPAZ

Você está sendo consultado(a) sobre a participação de seu filho no projeto de pesquisa : **“Análise investigativa de genes polimórficos ligados à suscetibilidade da infecção da dengue clássica e hemorrágica em pacientes do estado do Ceará”**, que tem como objetivo principal entender melhor as células de defesa de corpo de seu filho que podem conter algumas alterações específicas, os quais possibilitem aumentar as chances de desenvolver a doença com a qual ele se encontra atualmente em tratamento.

O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração em permitir a inclusão de seu filho neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você e ao seu filho.

O estudo está sendo realizado por um grupo de pesquisadores do Ceará. Esse estudo permitirá verificar se existem diferenças regionais dessa doença. Se concordar pela participação do seu filho, vocês não terão benefícios diretos imediato, em princípio, mas poderá estar contribuindo para que se entenda melhor porque algumas pessoas são mais sensíveis do que outras a ter essa doença e assim poder beneficiar um número maior de pessoas no futuro.

Nenhuma mudança será feita no tratamento de seu filho, assim nenhum efeito colateral poderá ser atribuído ao presente trabalho. A única coisa que será feita de diferente será a coleta de uma amostra de sangue adicionada à coleta padrão realizada pelo hospital, em torno de 5 mL (uma colher de sobremesa), retirado durante a sua internação e/ou atendimento, para ser examinada no laboratório verificando essas regiões específicas para o estudo. Os possíveis riscos em relação à coleta são baixos, visto que as pessoas encarregadas para esta função encontram-se com bastante experiência para esta finalidade. Seu filho poderá sentir algum leve desconforto, mas que não será diferente do que qualquer coleta já realizada durante sua vida.

Paralelamente serão anotadas algumas questões referentes ao seu filho, no que diz respeito à data de nascimento, raça, sexo, cidade em que nasceu e informações relativas à doença. Estas informações serão retiradas do prontuário ou na ausência delas, serão perguntadas pessoalmente a você, responsável pelo menor, ocupando de seu tempo entre coleta e anotações cerca de 5 a 10 minutos.

A participação de seu filho (ou do menor sob sua guarda) é isenta de despesas ou perdas decorrentes à participação a esta pesquisa. É importante entender que seu filho não é obrigado(a) a participar do estudo. Se você decidir que seu filho não participe ou desejar suspender a participação mais tarde de seu filho, você não precisa dar explicações e pode ficar certo(a) de que seu filho continuará sendo assistido(a) e tratado(a) com o melhor cuidado possível, devendo comunicar esta decisão ao médico, para que ele tome conhecimento e faça os esclarecimentos devidos.

Todos os dados pessoais seu e de seu filho serão tratados de maneira estritamente confidencial, ficando as suas identificações inteiramente protegidas. A qualquer época você poderá ter acesso às informações e conclusões do presente estudo, bem como de resultados dos exames do seu filho individualmente, mas concorda que sejam divulgados em publicações científicas, desde que seus dados e do seu filho não sejam mencionados.

Fique à vontade para formular pergunta aos pesquisadores, cujos nomes e telefones são encontrados logo abaixo, mesmo que pareça muito simples sua dúvida. Você poderá também conversar sobre o estudo com familiares, amigos ou com o médico que lhe assistiu.

Qualquer dúvida pode contatar os pesquisadores abaixo:

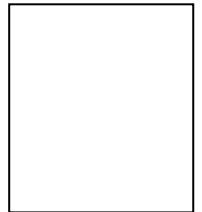
NOME: **Dr. Robério Dias Leite** TELEFONE: (85) 9986-9832

NOME: **Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst** TELEFONE: (85) 9994-5689

NOME: **Msc. Isaac Farias Cansação** TELEFONE: (88) 9911-8589

2. Identificação do Sujeito da Pesquisa e do Responsável:

Nome do menor ou incapaz: _____
 Data de nascimento: _____
 Nome do responsável: _____
 Data de Nascimento: _____
 Profissão: _____
 Nacionalidade: _____
 Estado Civil: _____ CPF/MF: _____ RG: _____
 Endereço: _____
 Telefone: _____ E-mail: _____



Eu, _____, responsável pelo menor acima identificado, autorizo sua participação, como voluntário(a) no presente projeto de pesquisa. Discuti com o pesquisador responsável sobre minha decisão em autorizar a sua participação e estou ciente que:

Declaro que obtive todas as informações necessárias e esclarecimento quanto às dúvidas por mim apresentadas e, por estar de acordo, assino o presente documento em duas vias de igual teor e forma, ficando uma minha posse.

Fortaleza, CE, _____ de _____ de 20____

 Sujeito da pesquisa

 Responsável pelo sujeito da pesquisa

 Pesquisador responsável pela pesquisa

Testemunhas:

Nome:

RG:

CPF/MF:

Telefone:

Nome:

RG:

CPF/MF:

Telefone:


ANEXO III - FICHA DE COLETA DE DADOS DO PACIENTE (DENGUE)

Data: ___/___/___ N° Prontuário: _____ Local coleta _____

DIA INICIAL DOS SINTOMAS: _____

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 mm³ [] 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 ³				
Hemoglobina: g/dL				
Hematócrito: %				
Leucócitos:				
Neutrófilos:				
Linfócitos totais:				
Eosinófilos:				
Monócitos:				
Basófilos:				
Nº de plaquetas: mm ³				
Transaminases (AST/ALT):				
Dosagem de albumina:				

Diagnostico 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: _____

Tabelas complementares

Tabela: Associação dos genótipos dos genes estudados com a presença ou ausência de manifestações hemorrágicas em pacientes com dengue.

<i>IL7</i>	Grupo Dengue			<i>TGFβ</i>	Grupo Dengue			<i>IL8</i>	Grupo Dengue			
	Manisf hemorr	Ausente n (%)	Presente n (%)		P/ OR	Manisf hemorr	Ausente n (%)		Presente n (%)	P/ OR	Manisf hemorr	Ausente n (%)
AA	13 (17)	11 (34)	-	CC	16 (20)	10 (30)	-	AA	32 (38)	18 (58)	1	
AG	53 (75)	19 (59)	0.075/ 0.42 (0.15 – 1.23)	CT	40 (49)	10 (30)	0.082 / 0.40 (0.12 – 1.29)	AT			0.212 / 0.58 (0.22 – 1.50)	
GG	2 (6.2)	11(14)	0.021/ Undef	TT	25 (31)	14 (41)	0.833 / 0.90 (0.28 – 2.83)	TT	37 (44)	12 (39)	0.018 / 0.12 (0.01 – 0.99)Δ	
Total	77	32		Total	81			Total	84	31		

Δ IC NÃO CONFIÁVEL

Tabela : Associação dos genótipos dos genes estudados com o achado laboratorial de Hemoconcentração em pacientes com dengue.

IL17	Grupo Dengue			TGF	Grupo Dengue			IL8	Grupo Dengue		
	Hemoconcentração	Não n (%)	Sim n (%)		P/ OR	Hemoconcentração	Não n (%)		Sim n (%)	P/ OR	Hemoconcentração
AA	12 (17)	6 (27)	-	CC	14 (20)	5 (22,7)	-	AA	32 (46)	11 (50)	-
AG	46 (66,6)	13 (59)	0.330 / 0.57 (0.15 – 2.09)	CT	31 (45)	11 (50)	0.800	AT	25 (36)	10 (45)	0.767 / 1.16 (0.38 – 3.56)
GG	7 (10)	3 (13)	0.600	TT	24 (35)	6 (27)	0.464	TT	12 (17)	1 (4)	0.605
Total	65	22		Total	69	22		Total	69	22	

Tabela : Associação dos genótipos dos genes estudados com a contagem de plaquetas em pacientes com dengue.

<i>IL17</i>		Grupo Dengue								
Contagem de plaquetas	a 100.000–150.000/ mm ³ n (%)	P / OR a x b	b 50.000–100.000/ mm ³ n (%)	P / OR b x c	c <50.000/ mm ³ n (%)	P / OR c x d	d > 150.000/ mm ³ n (%)	P / OR d x a	P / OR d x b	
AA	8 (25)	-	3 (18,7)	-	1 (25)	-	6 (15)	-	-	
AG	17 (53)	0.375	11 (68,7)	0.579	2 (50)	0.457	30 (75)	0.161 / 2.35 (0.60 – 9.40)	0.490	
GG	5 (15,6)	0.676	2 (12)	0.714	1 (25)	0.533	2 (5)	0.442	0.510	
Total	32		16		4		40			
IL8	AA	17 (53)	-	6 (37)	-	3 (75)	-	17 (42)	-	-
	AT	10 (31)	0.218 / 2.27 (0.51 – 10.45)	8 (50)	0.256	1 (25)	0.343	17 (42)	0.311 / 1.70 / 0.75 (0.54 – 5.44)	0.652 / 0.18 (-3.11)
	TT	5 (15,6)	0.623	2 (12)	0.509	0	0.438	6 (15)	0.793	0.669
	Total	32		16		4		40		
TGFβ	CC	8 (25)	-	2 (12)	-	0	-	9 (22)	-	-
	CT	12 (37)	0.250	8 (50)	0.818	1(25)	0.718	22 (55)	0.417 / 1.63 (0.43 – 6.28)	0.454
	TT	12 (37)	0.454	6 (37)	0.509	3 (75)	0.165	9 (22)	0.535 / 0.67 (0.15 – 2.91)	0.225
	Total	32		16		4		40		