



RENORBIO

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

Influência de polimorfismos nos genes FcγRIIa, CD209, VDR, TNF- α , IL-4, IL-6 e INF- γ na persistência de sintomas clínicos da dengue na fase de coalescência

Raquel Spinassé Dettogni

Vitória-ES

2015

RAQUEL SPINASSÉ DETTOGNI

Influência de polimorfismos nos genes FcγRIIa, CD209, VDR, TNF-α, IL-4, IL-6 e INF-γ na persistência de sintomas clínicos da dengue na fase de convalescença

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Iúri Drumond

Vitória
2015

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

Dettogni, Raquel Spinassé, 1985-
D479i Influência de polimorfismos nos genes FcγRIIIa, CD209, VDR,
TNF-α, IL-4, IL-6 e INF-γ na persistência de sintomas clínicos da
dengue na fase de coalescência / Raquel Spinassé Dettogni – 2015.
208 f. : il.

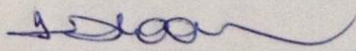
Orientador: Lúri Drumond Louro.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Espírito Santo – Brasil. 2. Sistema Imunológico.
3. Dengue . I. Louro, Lúri Drumond. II. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

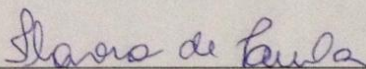
CDU: 61

ATA – DEFESA DE TESE

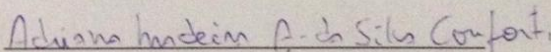
Ata de Defesa de Tese de Doutorado da aluna **RAQUEL SPINASSÉ DETTOGNI**. Ao décimo terceiro dia do mês de fevereiro do ano de dois mil e quinze, às 09 horas, reuniu-se a banca de Defesa de Tese composta pelos Professores Doutores Iúri Drumond Louro, da Renorbio/Universidade Federal do Espírito Santo, como Orientador, Flavia de Paula, da Renorbio/Universidade Federal do Espírito Santo, como Titular, Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti, da Renorbio/Universidade Federal do Espírito Santo, como Titular, Elizeu Fagundes de Carvalho, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como Titular, e Melissa de Freitas Cordeiro-Silva, da Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, como Titular, perante a qual Raquel Spinassé Dettogni, aluna regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal do Espírito Santo, defendeu, para preenchimento do requisito de doutora, sua Tese intitulada "**Influência de Polimorfismos nos Genes FcγRIIIa, CD209, VDR, TNF-α, IL-4, IL-6 e INF-γ na Persistência de Sintomas Clínicos da Dengue na Fase de Convalescença**". A defesa da referida tese ocorreu, das 9:10 às 10:20 tendo a doutoranda sido submetida à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a doutoranda APROVADA por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito SANS FALAR. Devendo a candidata apresentar dentro do prazo de 60 (sessenta) dias contados da data de hoje, os exemplares da versão final da tese devidamente corrigida com as sugestões propostas pela banca examinadora, bem como a declaração do orientador de que as correções foram efetuadas. Eu, Iúri Drumond Louro, que presidi a Banca de Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Registre-se que esta é a vigésima segunda Defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Espírito Santo. Em Vitória, 13 de fevereiro de 2015.



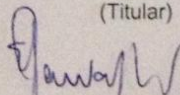
Prof. Dr. Iúri Drumond Louro
(Orientador)



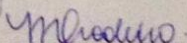
Prof.ª. Dr.ª. Flavia de Paula
(Titular)



Prof.ª. Dr.ª. Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti
(Titular)



Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho
(Titular)



Prof.ª. Dr.ª. Melissa de Freitas Cordeiro-Silva
(Titular)

À minha mãe, que sempre me apoiou com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

À *toda minha família*, em especial à *minha mãe Rosa*, pelo seu amor incondicional e apoio em todos os momentos.

Ao meu pai, pelo que representou para mim.

À *minha irmã Renata* por toda ajuda e carinho.

Ao meu marido Mauro, por todo amor, companheirismo, ajuda e principalmente, pela paciência e incentivo.

Às *minhas primas (Francine, Cristiane e Isabela)* e *amigas queridas (Cynara, Aline, Flávia e Jéssica)*, pelo carinho de sempre e inúmeros momentos de distração!

Aos meus sobrinhos Rebeca, Rafael e Lucas pela felicidade que me trouxeram.

Ao meu orientador Prof. Dr. Iúri Drumond Louro, por me orientar desde a iniciação científica com dedicação, ética e confiança e por enriquecer minha vida acadêmica com seus ensinamentos; sempre irei admirá-lo e agradecê-lo!

Ao Dr. Ricardo Tristão Sá, médico infectologista, pela preciosa ajuda e por ter contribuído com minhas coletas.

À *Denise Carramanhos*, coordenadora da Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde de Cariacica, pela ajuda nas minhas coletas.

Aos funcionários Amanda, da Unidade de Saúde de Porto de Santana, Geraldo, do Pronto Atendimento de Itacibá e Elizeth da Unidade de Saúde de Jardim América por gentilmente tornarem possíveis as minhas coletas.

Ao biólogo Leandro, funcionário da Vigilância Epidemiológica de Cariacida, pela alegria e disposição ao me ajudar.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição e paciência em analisar este trabalho.

Aos colegas de doutorado por experimentarem comigo esses quatro anos de pós-graduação, em especial à Clara Barbirato, por ter vivido comigo e me ajudado na correria e desespero do final do nosso doutorado.

Aos companheiros e ex-companheiros de laboratório, em especial Elda, Clara, Thaís, Mariana, Marcelo, Melissa, Elaine, Lidiane, Lyvia, Geise, Daniela, Victor, Vitor, Gabriela, Lucas, Fernanda, Jéssica e Quézia, por sempre me ajudarem com inteligência e paciência, por terem me proporcionado momentos de distração e por todo companheirismo. A amizade de vocês será inesquecível! Tenho um agradecimento especial ao Marcelo dos Santos, pela fundamental ajuda em toda a estatística. Sem ele eu não conseguiria ter meus resultados; à Thaís Tristão Tovar pela imensa ajuda com relação a tudo que envolveu os pacientes saudáveis que participaram do meu estudo; e à Melissa de Freitas Cordeiro-Silva pelo empréstimo das suas pipetas novinhas, sem as quais minha parte prática do trabalho teria sido prejudicada!

Aos indivíduos saudáveis que participaram do estudo, por permitirem a coleta das amostras de sangue e aos pacientes, que além de permitirem a coleta da amostra de sangue, generosamente contribuíram com o seguimento do estudo por sessenta dias. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Laboratório de Estatística da UFES (LESTAT), em especial à Franciane Figueiredo da Silva pela paciência, atenção e ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas e do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Ponto focal da Universidade Federal do Espírito Santo, muito obrigada pela atenção e ajuda na resolução dos assuntos burocráticos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo nos primeiros meses do doutorado.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (FAPES), pela bolsa de estudo.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese é apresentada em formato de Artigo Científico.

As listas de figuras, tabelas, siglas e abreviaturas contêm as ilustrações, tabelas e siglas e abreviaturas apresentadas na introdução e revisão bibliográfica deste trabalho.

RESUMO

Diferenças na susceptibilidade do hospedeiro à infecção, na gravidade e na permanência do quadro clínico da doença podem ser atribuídas, em parte, às variações da resposta imune. Estas variações são associadas a polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês: *single nucleotide polymorphisms* - SNPs). Como estudo prévio, foi realizada a caracterização da população geral do Espírito Santo (ES) - Brasil e de uma subpopulação do estado, de origem Pomerana, quanto aos SNPs -131 H/R, -336 A/G, *TaqI*, -308 A/G, -590 C/T, -174 G/C e +874 A/T nos genes FcγRIIa, CD209, VDR, TNF-α, IL-4, IL-6 e INF-γ, respectivamente. Cem indivíduos da Grande Vitória representaram a população geral do ES e 59 indivíduos de Santa Maria de Jetibá representaram a população de origem Pomerana. Como a fase aguda da dengue é bem caracterizada, este estudo objetivou ampliar o conhecimento da fase de convalescença. Noventa e seis indivíduos diagnosticados com dengue sintomática no final de 2012 e início de 2013, no ES, foram acompanhados por 60 dias a partir do início dos sintomas por meio do preenchimento de um questionário clínico e epidemiológico em quatro entrevistas. A persistência de 37 sintomas clínicos da dengue foi avaliada. Para analisar a influência da genética do sistema imunológico do hospedeiro na persistência de sintomas clínicos da dengue na fase de convalescença, foi determinada a associação entre os sete SNPs, para os quais a população do ES foi caracterizada, e a persistência de sintomas. O DNA genômico dos participantes do estudo foi extraído do sangue periférico e a genotipagem dos SNPs foi realizada por reação em cadeia da polimerase - polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (do inglês: *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism* - PCR-RFLP) As frequências genotípicas de todos os SNPs encontraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (do inglês: *Hardy-Weinberg equilibrium* - HWE), com exceção do SNP no gene IL-6. Não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências genotípicas dos SNPs nos genes FcγRIIa, CD209, VDR, TNF-α e IL-4 entre as duas populações. Diferença

estatisticamente significativa foi encontrada entre as duas populações nas distribuições genotípicas dos SNPs nos genes IL-6 ($p = 0,03$) e INF- γ ($p = 0,007$). Trinta e sessenta dias após o início dos sintomas, 38,5% e 11,5% dos indivíduos com dengue sintomática reportaram ter pelo menos um sintoma clínico da dengue, respectivamente. Dos sintomas analisados, os mais persistentes foram os relacionados à síndrome da fadiga como mialgia, artralgia, astenia e mal-estar, sendo a mialgia o mais frequente. A persistência de sintomas em 30 dias foi associada ao gênero feminino ($p = 0,044$) e a persistência de sintomas constitucionais foi associada à dengue secundária ($p = 0,041$). O SNP no gene Fc γ RIIa, foi associado à persistência de sintomas em 30 dias, no subgrupo de indivíduos com dengue secundária ($p = 0,046$), sendo a presença do alelo *H* associada à não persistência de sintomas ($p = 0,014$). A presença do alelo *A* do SNP no gene TNF- α foi associada à não persistência de sintomas no subgrupo de indivíduos com dengue secundária ($p = 0,025$), sendo o genótipo *GG* associado à persistência de sintomas neurológicos, psicológicos e comportamentais em 30 dias ($p = 0,038$). A presença do alelo *C* do SNP no gene IL-6 foi associado à persistência de sintomas dermatológicos em 30 dias ($p = 0,005$). O perfil genético desses SNPs pode favorecer o estabelecimento de marcadores imunogenéticos associados à fase convalescente da infecção pelo vírus da dengue (do inglês: *dengue virus* - DENV).

Palavras-chave: Espírito Santo-Brasil. SNP. Sistema Imune. Receptores. Citocinas. Dengue. Persistência de sintomas.

ABSTRACT

Differences in host susceptibility to infection, in the severity and permanence of the clinical picture of disease can be attributed, in part, to variations in the immune response. These variations are associated with single nucleotide polymorphisms (SNPs). As a previous study, the characterization of the general population of the Espírito Santo (ES)-Brazil and of a subpopulation of the state, of pomeranian origin, was performed as the SNPs -131 H/R, -336 A/G, *TaqI*, -308 A/G, -590 T/C, -174 G/C and +874 A/T in *FcγRIIa*, *CD209*, *VDR*, *TNF-α*, *IL-4*, *IL-6* and *IFN-γ* genes, respectively. One hundred individuals of the Grande Vitória represented the general population of ES and 59 individuals of Santa Maria de Jetibá represented the population of Pomeranian origin. As the acute phase of dengue is well characterized, this study aimed to expand the knowledge of the phase of convalescence. Ninety-six individuals diagnosed with symptomatic dengue in late 2012 and early 2013, in ES, were followed for 60 days from the onset of symptoms by completing a clinical and epidemiological questionnaire in four interviews. The persistence of 37 clinical symptoms of dengue was assessed. To analyze the influence of the genetics of the host immune system in the persistence of clinical symptoms of dengue in the convalescent phase, the association between seven SNPs, for which the population of ES was characterized, and the persistence of symptoms was determined. Genomic DNA of study participants was extracted from peripheral blood and genotyping of SNPs was performed by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The genotype frequencies of all SNPs were found in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), except for the SNP in the *IL-6* gene. There was no statistically significant difference in genotype frequencies of SNPs in *FcγRIIa*, *CD209*, *VDR*, *TNF-α* and *IL-4* genes between the two populations. A statistically significant difference was found between the two populations in the genotypic distributions of SNPs in *IL-6* ($p = 0.03$) and *INF-γ* ($p = 0.007$) genes. Thirty and sixty days after the onset of symptoms, 38.5% and 11.5% of symptomatic patients

with dengue reported having at least one clinical symptom of dengue, respectively. Symptoms among, the most persistent were related to fatigue syndrome as myalgia, arthralgia, asthenia and malaise, myalgia being the most frequent. The persistence of symptoms at 30 days was associated with female gender ($p = 0.044$) and persistent constitutional symptoms was associated with secondary dengue ($p = 0.041$). FcγRIIIa gene SNP, was associated with persistent symptoms at 30 days in the subgroup of patients with secondary dengue ($p = 0.046$), and presence of the *H* allele was associated with non-persistence of symptoms ($p = 0.014$). The presence of the *A* allele in the TNF-α gene SNP was associated with non-persistence of symptoms in the subgroup of patients with secondary dengue ($p = 0.025$), with the *GG* genotype associated with persistent neurological, psychological and behavioral symptoms in 30 days ($p = 0.038$). The presence of the *C* allele in the IL-6 gene SNP was associated with persistent dermatological symptoms at 30 days ($p = 0.005$). Genetic profiling of these SNPs may favor the establishment of immunogenetic markers associated with the convalescent infection phase by the dengue virus (DENV).

Keywords: Espirito Santo-Brazil. SNP. Immune System. Receptors. Cytokines. Dengue. Persistent symptoms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição espacial por sorotipo circulante do vírus da dengue (DENV) isolado, Brasil, 2013	33
Figura 2 - Incidência de dengue, por Município, Brasil, 2013	34
Figura 3 - Casos notificados de dengue no ES, 1995-2013*	35
Figura 4 - <i>Aedes aegypti</i>	38
Figura 5 - Cadeia aberta de leitura dos <i>Flavivirus</i>	39
Figura 6 - Morfologia do vírion de um <i>Flavivirus</i> e suas principais proteínas estruturais*	40
Figura 7 - Esquema do processo de fusão da membrana do vírus da dengue (DENV) à célula e de liberação do RNA viral	44
Figura 8 - Esquema da entrada do vírus da dengue (DENV) na célula por meio da formação de complexos imunes (ICs) com imunoglobulinas G (IgGs)	44
Figura 9 - Classificação dos casos de dengue de acordo com a gravidade, sugerida pela Organização Mundial de Saúde (OMS).....	51
Figura 10 - Esquema de um modelo para a patogênese da dengue	60
Figura 11 - Respostas imune inata e adaptativa à infecção viral	64
Figura 12 - Representação esquemática dos receptores Fc, com destaque para o receptor FcγRIIIa	70
Figura 13 - Esquema mostrando o receptor Fc interagindo com um patógeno revestido por anticorpo.....	71
Figura 14 - Estrutura do receptor DC-SIGN na superfície de uma célula dendrítica	72
Figura 15 - Representação esquemática da atuação do receptor VDR no sistema imune	73
Figura 16 - Modelo hipotético sobre a atuação das citocinas TNF- α , INF- γ , IL-4 e IL-6 durante a infecção pelo vírus da dengue (DENV).....	75

Figura 17 - Esquema nas funções da citocina IL-4.....	78
Figura 18 - Esquema mostrando algumas funções biológicas da citocina INF- γ	81
Figura 19 - Representação esquemática do gene Fc γ RIIa.....	84
Figura 20 - Representação esquemática do gene CD209.....	85
Figura 21 - Representação esquemática gene VDR.....	85
Figura 22 - Representação esquemática do gene TNF- α	86
Figura 23 - Representação esquemática do gene IL-4.....	87
Figura 24 - Representação esquemática do gene IL-6.....	88
Figura 25 - Representação esquemática do gene INF- γ	89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A - Adenina

A.D - Depois de cristo

AA - Aminoácido

ADE - *Antibody-dependent Enhancement* - aumento anticorpo-dependente

APC - *Antigen-presenting Cell* - célula apresentadora de antígeno

BA - Bahia

C - Citosina

CD209 - *Cluster* de diferenciação 209

CD32 - *Cluster* de diferenciação 32

CRD - *Carbohydrate Recognition Domain* - domínio de reconhecimento de carboidrato

Da - Daltons

DC - *Dendritic Cell* - célula dendrítica

DC-SIGN - *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Gabbing Non-integrin* - molécula não integrina capturadora de ICAM-3 específica de células dendríticas

DENV - *Dengue Virus* - vírus da dengue

DENV-1 - *Dengue Virus type 1* - vírus da dengue tipo 1

DENV-2 - *Dengue Virus type 2* - vírus da dengue tipo 2

DENV-3 - *Dengue Virus type 3* - vírus da dengue tipo 3

DENV-4 - *Dengue Virus type 4* - vírus da dengue tipo 4

DF - *Dengue Fever* - febre da dengue

DHF - *Dengue Hemorrhagic Fever* - febre hemorrágica da dengue

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* - ácido desoxirribonucleico

DSS - *Dengue Shock Syndrome* - síndrome de choque da dengue

E - Proteína do envelope

ELISA - *Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay* - Ensaio imunossorvente ligado à enzima

ES - Espírito Santo

Fc - Fragmento cristalizável

FcR - *Fragment cryztallizable Receptor* - receptor de fragmento cristalizável

Fc γ R1a - *Fragment crystallizable Receptor Gamma R1a* - receptor gamma R2a para fragmento cristalizável

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

FNS - Fundo Nacional de Saúde

G - Guanina

HCV - *Hepatitis C Virus* - vírus da hepatite C

HIV - *Human Immunodeficiency Virus* - vírus da imunodeficiência humana

HWE - *Hardy-Weimberg Equilibrium* - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC - *Immune Complex* - complexo imune

IEC - Instituto Evandro Chagas

IFI - Imunofluorescência Indireta

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IH - Inibição de hemoaglutinação

IL-4 - Interleucina 4

IL-4R - Receptor de interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

INF- γ - Interferon gamma

Kb - Kilobases

kDa - Kilodaltons

M - Proteína da membrana

MHC - *Major Histocompatibility Complex* - complexo maior de histocompatibilidade

mL - Mililitro

mm³ - Milímetro cúbico

MS - Ministério da Saúde

NEMES - Núcleo de Entomologia e Malacologia do Espírito Santo

NF - $\kappa\beta$ - *Nuclear Factor Kappa B* - fator de transcrição nuclear kappa beta

NIH - *National Institute of Health* - Instituto nacional de saúde

NK - *Natural killer*

nm - nanômetros

NS - Proteína não estrutural

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORF - *Open Reading Frame* - cadeia aberta de leitura

PCR-RFLP - *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism* - reação em cadeia da polimerase - polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição

pH - Potencial hidrogeniônico

PLC γ 1 - *Phospholipase C Gamma 1* - Fosfolipase C gamma 1

PNI - Programa Nacional de Imunizações

prM - Proteína pré-membrana

RE - Retículo endoplasmático

RER - Retículo endoplasmático rugoso

RJ - Rio de Janeiro

RNA - *Ribonucleic Acid* - Ácido ribonucleico

RT-PCR - *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction* - transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase

SESA - Secretaria de Estado da Saúde

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* - polimorfismo de nucleotídeo único

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

T- Timina

Tc - T citotóxico

TCR - *T Cell Receptor* - Receptor de célula T

Th - T *helper*

TNF- α - *Tumor Necrosis Factor alpha* - Fator de necrose tumoral alfa

U - Uracila

VDR - *Vitamin D Receptor* - receptor para vitamina D

WHO - *World Health Organization* - Organização mundial de saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.1.1 Objetivos específicos	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1 A DENGUE	29
3.1.1 Histórico da dengue	30
3.1.2 Dengue no Brasil	31
3.1.3 Dengue no Espírito Santo	34
3.2 TRANSMISSÃO DA DENGUE	36
3.2.1 Vetor	36
3.2.1.1 <i>Aedes aegypti</i>	37
3.2.1.2 <i>Aedes albopictus</i>	38
3.2.2 O vírus	38
3.2.2.1 Células envolvidas na infecção pelo DENV.....	41
3.2.2.2 Ciclo viral.....	42
3.2.2.2.1 <i>Entrada do vírus na célula hospedeira</i>	42
3.2.2.2.2 <i>Replicação e maturação da partícula viral</i>	45
3.2.2.2.3 <i>Liberação do vírus</i>	45
3.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA DENGUE.....	46
3.3.1 Quadro clínico	46
3.3.1.1 Infecções assintomáticas/oligosintomáticas.....	46
3.3.1.2 Dengue clássica.....	46
3.3.1.3 Febre hemorrágica da dengue/síndrome de choque da dengue	47
3.3.1.4 Apresentações clínicas incomuns.....	49

3.3.2 Classificação recente da dengue	50
3.3.3 Persistência de sintomas clínicos da dengue da fase de convalescença	52
3.4 DIAGNÓSTICO DA DENGUE	53
3.4.1 Isolamento viral	53
3.4.2 Sorologia	53
3.4.3 Diagnóstico molecular	54
3.5 TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA DENGUE	55
3.5.1 Tratamento	55
3.5.2 Vacinas	55
3.6 PATOGENIA, PATOLOGIA E IMUNIDADE NA DENGUE	57
3.6.1 Patogenia da dengue	57
3.6.1.1 Etiopatogenia da dengue grave.....	60
3.6.2 Imunologia da infecção pelo DENV	63
3.6.2.1 Respostas imunológicas.....	64
3.6.2.1.1 <i>Imunidade Inata</i>	64
3.6.2.1.2 <i>Imunidade adaptativa</i>	64
3.6.2.1.2.1 <u>Resposta mediada por células T CD8⁺</u>	64
3.6.2.1.2.2 <u>Resposta mediada por células T CD4⁺</u>	65
3.6.2.1.2.3 <u>Resposta mediada por anticorpos</u>	66
3.6.2.2 Receptores e citocinas na dengue.....	68
3.6.2.2.1 <i>Receptores na dengue</i>	69
3.6.2.2.1.1 <u>FcγRIIa</u>	69
3.6.2.2.1.2 <u>CD-SIGN (CD209)</u>	71
3.6.2.2.1.3 <u>VDR</u>	72
3.6.2.2.2 <i>Citocinas na dengue</i>	74
3.6.2.2.2.1 <u>TNF-α</u>	76
3.6.2.2.2.2 <u>IL-4</u>	77
3.6.2.2.2.3 <u>IL-6</u>	78
3.6.2.2.2.4 <u>INF-γ</u>	79
3.7 POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA DENGUE E EM OUTRAS INFECÇÕES	81
3.7.1 SNP no gene FcγRIIa	82

3.7.2 SNP no gene CD209	84
3.7.3 SNP no gene VDR	85
3.7.4 SNP no gene TNF-α	86
3.7.5 SNP no gene IL-4	87
3.7.6 SNP no gene IL-6	88
3.7.7 SNP no gene INF-γ	88
3.8 ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL E DE ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS INFECCIOSAS	89
4 REFERÊNCIAS	92
5 ARTIGOS DERIVADOS DA TESE	120
5.1 MANUSCRITO 1	120
5.2 MANUSCRITO 2	128
5.3 MANUSCRITO 3	140
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	165
6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES GERAL E POMERANA DO ESPÍRITO SANTO - BRAZIL.....	165
6.2 ANÁLISE DA PERSISTÊNCIA DE SINTOMAS CLÍNICOS DA DENGUE NO PERÍODO DE 60 DIAS DE ACOMPANHAMENTO APÓS INÍCIO DOS SINTOMAS...	166
6.3 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE SNPS NOS GENES Fc γ RIIa, CD209, VDR, TNF- α , IL-4, IL-6 e INF- γ E A PERSISTÊNCIA DE SINTOMAS CLÍNICOS DA DENGUE NA FASE DE CONVALESCÊNCIA.....	167
ANEXO 1	169
ANEXO 2	170
APÊNDICE 1	201
APÊNDICE 2	203
APÊNDICE 3	206

1 INTRODUÇÃO

Evidências disponíveis demonstram que, além do fator viral, fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro são correlacionados com a patogênese de várias doenças infecciosas (GUBLER, 1998). Diferenças na susceptibilidade do hospedeiro à infecção, na gravidade da infecção e na permanência do quadro clínico podem ser atribuídas, em parte, às variações da resposta imune. Estas variações são associadas a diversos SNPs (CHATURVEDI, 2006). SNPs podem ter influência na expressão gênica e na estrutura e função das proteínas codificadas pelos genes aos quais pertencem, de modo a promover variabilidade na resposta imune entre indivíduos. A presença de certos alelos pode contribuir para a susceptibilidade ou resistência do hospedeiro a várias infecções (AUCAN et al., 2000; LOKE et al., 2002; YEE et al., 2000), assim como pode influenciar na gravidade das doenças infecciosas e na permanência dos sintomas de uma infecção (GARCÍA et al., 2011; HARAPAN et al., 2013).

A caracterização de diferentes populações para SNPs em genes que atuam no sistema imune tem uma importante aplicação: serve como referência para estudos de associação dos SNPs com as características de doenças infecciosas. Como as frequências alélica e genotípica dos SNPs podem diferir entre populações, a caracterização de uma população para esses SNPs é essencial como estudo prévio ao estudo de associação nessa população. Isso permitirá a adequada interpretação do segundo estudo, o qual poderá ser analisado já se levando em consideração as frequências alélica e genotípica dos SNPs características da população em questão (PETZL-ERLER, 1999).

Nesse sentido, este estudo objetivou caracterizar as populações geral e Pomerana do ES quanto às frequências alélica e genotípica de SNPs em sete genes envolvidos na resposta imune (genes FcγRIIIa, CD209, VDR, TNF- α , IL-4, IL-6 e INF- γ) a diversas infecções, em especial à dengue.

No final do último século muitas doenças infecciosas tornaram-se frequentes, sendo a dengue uma das mais preocupantes (GUZMÁN; KOURI, 2002). A dengue é a arbovirose humana mais importante em termos de morbidade e mortalidade. Esta doença se apresenta como um sério problema de saúde pública no mundo,

especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais favorecem a proliferação dos seus vetores, os mosquitos do gênero *Aedes* (WHO, 2012). Aproximadamente 40% da população mundial se encontram em áreas de risco com possibilidade de adquirir a doença, representando 2,5 bilhões de pessoas a cada ano. Destas, estima-se que 500.000/ano desenvolvam o quadro de dengue grave necessitando de hospitalização e aproximadamente 2,5% evoluem a óbito (WHO, 2012).

Essa arbovirose é uma das infecções de interesse nos estudos devido ao seu relevante impacto econômico na saúde pública. O gasto médio por indivíduo foi estimado em 514 dólares para pacientes ambulatoriais e 1394 dólares para pacientes hospitalizados em vários países, inclusive no Brasil (SUAYA et al., 2009). Essa estimativa, feita por Suaya et al. (2009), não inclui gastos com vigilância epidemiológica e combate ao vetor, o que aumentaria ainda mais o custo. Na maioria dos casos, a infecção é autolimitada e dura cerca de 14 dias (HALSTEAD, 2007). No entanto, estudos demonstram sintomas persistentes a longo prazo (FINSTERER; KONGCHAN, 2006; GARCÍA et al., 2011; LIM; GOH, 2005; SEET; QUEK; LIM, 2007; TEIXEIRA et al., 2010), o que aumenta os prejuízos econômicos e de qualidade de vida dos pacientes. As manifestações clínicas da dengue na fase aguda são bem conhecidas e caracterizadas e poucos estudos recentes têm correlacionado a genética do indivíduo infectado com a proteção e/ou susceptibilidade à dengue. Por outro lado, os sintomas clínicos na fase de convalescença da infecção ainda são pouco caracterizados e raros são os estudos que associam a genética do hospedeiro com a presença de sintomas clínicos persistentes.

Considerando essas informações, esse estudo também objetivou determinar as frequências alélica e genotípica dos 7 genes, para os quais a população do ES foi caracterizada, em pacientes com dengue sintomática e associar a genética do sistema imune com a presença de sintomas clínicos após a fase aguda da dengue.

As características genéticas imunológicas associadas à persistência de sintomas clínicos poderão ser usadas como marcadores, ou seja, poderá ajudar a se determinar grupos de risco numa população exposta à dengue e a disponibilizar dados que poderão servir de alerta. Com esses dados, espera-se melhorar o manejo clínico da

doença e, conseqüentemente, a qualidade de vida dos pacientes. Essa associação pode também ter conseqüências importantes no desenvolvimento de profilaxias e terapêuticas contra a infecção pelo DENV. A resposta do hospedeiro aos medicamentos e às vacinas, em termos de eficiência e segurança, podem depender do genótipo dos pacientes e os SNPs caracterizados podem ser usados como novos marcadores na produção dessas terapias. Assim, a otimização da terapêutica futura contra a dengue pode ser beneficiada com os dados desse estudo e os resultados poderão ser considerados na transferência de drogas do laboratório para o uso clínico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar as populações geral e de origem Pomerana do ES quanto a SNPs em três genes que codificam importantes receptores do sistema imunológico (genes FcγRIIa, CD209 e VDR) e em quatro genes que codificam citocinas (genes TNF- α , IL-4, IL-6 e INF- γ).
- Avaliar a presença de 37 sintomas clínicos da dengue em pacientes com dengue sintomática em um período de dois meses após o início da infecção e associar os SNPs nos genes FcγRIIa, CD209, VDR, TNF- α , IL-4, IL-6 e INF- γ com a persistência dos sintomas clínicos na fase de convalescença da dengue.

2.1.1 Objetivos específicos

- Estabelecer as frequências alélica e genotípica dos SNPs -131 H/R, -336 A/G, *TaqI*, -308 A/G, -590 C/T, -174 G/C e +874 A/T nos genes FcγRIIa, CD209, VDR, TNF- α , IL-4, IL-6 e INF- γ , respectivamente, nas populações geral e de origem Pomerana do ES.
- Verificar a diferença das frequências alélica e genotípica dos sete SNPs entre as duas populações do ES.
- Acompanhar pacientes com dengue sintomática durante dois meses após o início dos sintomas e avaliar a duração de 37 sinais e sintomas clínicos da dengue.
- Determinar a prevalência da persistência dos sintomas clínicos da dengue na fase de convalescença.
- Verificar a relação das variáveis gênero, infecção secundária ou primária e medicamento usado na fase aguda com a persistência dos sintomas clínicos da dengue na fase de convalescença.

- Estabelecer as frequências alélica e genotípica de SNPs nos genes FcγRIIa, CD209, VDR, TNF- α , IL-4, IL-6 e INF- γ nos pacientes acompanhados.
- Associar os genótipos e alelos dos sete SNPs com a persistência de sintomas clínicos da dengue e assim, buscar avaliar o papel da genética do sistema imune na ocorrência de sintomas clínicos da dengue na fase de convalescença.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A DENGUE

A dengue é endêmica nas Américas, sudeste da Ásia, Pacífico Ocidental, Índia, Paquistão, Austrália, África e partes do Oriente Médio, sendo as três primeiras regiões as mais acometidas (GUZMÁN et al., 2002). Essa doença é a arbovirose humana que apresenta as maiores taxa de morte e morbidade no mundo (DOS SANTOS et al., 2002; HALSTEAD, 1992) e é considerada um problema reemergente da saúde pública. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que acima de 100 milhões de casos com 20 mil mortes acontecem por ano devido à infecção pelo DENV. A verdadeira incidência, porém, não é bem conhecida (CHINNAWIROTPISAN et al., 2008; GUBLER, 1998; GUBLER; MELTZER, 1999; WHO, 2003).

A infecção pelo DENV pode ser subclínica ou causar doenças que variam de uma síndrome leve gripal com dores de cabeça a uma doença grave e por vezes fatal (LEITMEYER et al., 1999).

Os surtos de dengue são causados por quatro sorotipos do vírus DENV antigenicamente distintos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (CHEN et al., 2008; LEITMEYER et al., 1999), os quais podem circular isolados ou em conjunto numa mesma região demográfica. Cada um desses sorotipos possui várias cepas diferentes difundidas na mesma região ou em diferentes partes do mundo. As epidemias podem ser ocasionadas por um único sorotipo (hipoendemicidade) ou por múltiplos sorotipos (hiperendemicidade), o que é mais frequente (GUBLER; CLARCK, 1995).

Vários fatores estão diretamente relacionados à emergência e reemergência da dengue: a urbanização desordenada, a alta densidade demográfica, condições climáticas favoráveis ao estabelecimento do vetor, o aumento das viagens aéreas e a inexistência de um controle efetivo do mosquito vetor (GUBLER, 1997; GUBLER; CLARCK, 1995; GUZMÁN et al., 2002). Essa doença pode ocorrer em qualquer localidade onde o vírus esteja presente e haja indivíduos susceptíveis, sendo a rota dos

transportes a via de disseminação do vírus entre os países, aparecendo primeiro nas cidades portuárias (GUBLER, 1997, 2002).

Apesar de a dengue ser uma doença bem pesquisada, uma vacina preventiva eficaz ainda não está disponível. Do mesmo modo, ainda não se pode contar com terapêutica etiológica e quimioprofilaxia efetivas (TAUIL, 2002). As medidas de controle e prevenção da doença permanecem focadas no agente transmissor, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de estratégias contra o vírus.

3.1.1 Histórico da dengue

A dengue tem sido descrita desde 1779-1780 em três continentes (América do Norte, Ásia e África), no entanto há relatos de que uma enfermidade semelhante ocorreu em momentos anteriores em vários países, incluindo registros na enciclopédia chinesa publicada durante a Dinastia Chinesa (265-420 A.D) (GUBLER, 2006; HIRSCH, 1883). Na enciclopédia, a dengue foi chamada de “água envenenada” pensando-se estar associada a insetos que sobrevoavam águas poluídas (HENKAL; PUTNAK, 1990). Ao longo do tempo, recebeu os mais variados nomes conforme o país ou a região considerada, como “febre da china” na Ásia, “*bohau*” na Oceania, “febre quebra-ossos” nos Estados Unidos, “colorado” nas colônias espanholas, “*dandy fever*” nas colônias inglesas, “dengue” nas Antilhas, “polca” no Rio de Janeiro (RJ) e “patuléia” na Bahia (BA) (GUBLER, 1998). A palavra “dengue” é de origem hispano-caribenha e é usada desde 1827 para identificar síndromes febris epidêmicas (GUBLER, 1997).

O sucesso do estabelecimento do DENV no ciclo urbano foi, principalmente, devido à expansão do mosquito vetor africano *Aedes aegypti*, à associação deste aos humanos e à eficiência dessa espécie na transmissão do DENV (GUBLER, 1997). A partir do século XVII, o *A. aegypti* foi levado para os demais continentes pelo transporte de escravos oriundos da África e as epidemias de dengue tornaram-se mais frequentes e disseminadas. É provável que antes do século XVIII a dengue já apresentasse uma ampla distribuição geográfica. Porém, por muito tempo essa doença foi considerada benigna, com epidemias maiores ocorrendo apenas em intervalos de 10 a 40 anos,

principalmente porque o vírus e o mosquito vetor só poderiam ser transportados entre locais distantes por navios a vela (GUBLER; CLARCK, 1995). Após a Segunda Guerra Mundial, houve a expansão demográfica do vetor e, conseqüentemente, do vírus, estabelecendo a pandemia que persiste até hoje (GUBLER, 1997).

Além do aumento da forma clássica da patogenia, a febre da dengue (do inglês: *Dengue Fever* - DF), no século XX ocorreram epidemias com a forma mais severa da doença, a febre da dengue hemorrágica/síndrome de choque da dengue (do inglês: *Dengue Haemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrome* - DHF/DSS). A primeira epidemia com DHF/DSS ocorreu em 1953/1954 nas Filipinas, expandindo rapidamente para vários países asiáticos e ilhas do Pacífico (WHO, 1997). Durante a década de 70, a DHF tornou-se a principal causa de hospitalização e morte em crianças da Ásia (WHO, 1997) e nas décadas seguintes, estas epidemias passaram a ocorrer em diversos países.

A expansão da dengue por toda a Ásia e Pacífico Sul está sendo repetida nas Américas (GUBLER, 1998). Antes da década de 1950, as pessoas estavam normalmente expostas a uma única cepa viral e as epidemias eram raras e autolimitadas. No entanto, a dispersão geográfica do mosquito vetor, o crescimento da densidade populacional e as viagens globais alteraram substancialmente o panorama epidemiológico da dengue (GUBLER, 1998). Agora a doença infecta, anualmente, um grande número de pessoas em todo o mundo (WHO, 1999), com exposição a dois ou mais sorotipos do DENV simultaneamente, resultando em frequentes epidemias de grande escala e maiores números de casos de DHF/DSS (GUBLER, 1998).

Nos últimos 50 anos, a incidência de dengue apresentou um aumento considerável (MACKENZIE; GUBLER; PETERSEN, 2004) e a cada década o número anual de casos da doença reportados pela OMS cresce exponencialmente.

3.1.2 Dengue no Brasil

O Brasil é o maior país da América do Sul, possui uma área de 8.512.000 km², clima predominantemente tropical e grande cobertura de florestas chuvosas (SESA,

2010). O clima e a grande diversidade de flora e fauna tornam o País adequado à dispersão de doenças causadas por arbovírus. Grande parte da população de, aproximadamente, 184 milhões de habitantes (IBGE, 2007), vive em áreas urbanas das grandes cidades nas regiões sudeste e nordeste, onde há infestação pelo mosquito *A. aegypti*.

O histórico de dengue no Brasil iniciou-se em 1946, com registro de surtos nos estados do RJ, BA, Pernambuco e em outras localidades do País. A doença foi denominada *polka* devido à aparência dos enfermos ser relacionada com a dança da época (FIGUEIREDO, 1996).

Oswaldo Cruz, em 1904, iniciou a erradicação do *A. aegypti* no RJ e após o apoio da Fundação Rockefeller, sua campanha obteve sucesso e o mosquito foi erradicado do País em 1957. Em 1967 houve a reintrodução do *A. aegypti*, o qual foi novamente eliminado em 1973 e, finalmente, reintroduzido para iniciar a reocupação em 1976 (FIGUEIREDO, 1996; PENNA, 2003).

Em 1986, houve a introdução do DENV-1 no RJ (FIGUEIREDO; FONSECA, 1996; SCHATZMAR; NOGUEIRA; TRAVASSOS DA ROSA, 1986), iniciando um processo de intensa circulação viral nos grandes centros urbanos, com epidemias que foram se expandindo para todas as regiões brasileiras.

Em abril de 1990, o DENV-2 foi isolado em Niterói, RJ (NOGUEIRA et al., 1990). A circulação simultânea do DENV-1 e do DENV-2 resultou no aparecimento dos primeiros casos de DHF no Brasil, embora casos fatais tenham sido identificados já durante a epidemia ocorrida em 1986 (NOGUEIRA et al., 1999; ZAGNE et al., 1994). A partir de 1994, a rápida dispersão do vetor em grande extensão territorial propiciou a circulação viral em um maior número de estados e municípios, expondo novas populações às infecções. Nesta década, mesmo em anos não epidêmicos, as políticas adotadas para a erradicação do vetor não foram eficazes e a doença registrou uma ocorrência de dezenas de milhares de casos por ano (MS, 1999).

Em 1998, o DENV-3 foi identificado em um caso isolado em São Paulo (ROCCO; KAVAKAMA; SANTOS, 2001), sendo novamente isolado em 2000 no RJ. No ano de 2002 ocorreu o último pico epidêmico, com a mais grave epidemia de dengue já ocorrida no Brasil. A dispersão do sorotipo 3 para os demais estados tem

proporcionado, desde então, o surgimento de surtos e epidemias graves, mas que, no entanto, ainda não atingiram os níveis de 2002 (VAUNGH et al., 2000).

Da década de 80 a 2009, o Brasil permaneceu livre do DENV-4, mas os riscos de uma repentina introdução tornaram-se cada vez maiores, devido ao índice de turismo no País e à existência de uma frágil fronteira com locais onde já predomina a circulação dos quatro sorotipos. Em agosto de 2010, o Instituto Evandro Chagas (IEC), vinculado ao Ministério da Saúde (MS), confirmou casos de DENV-4 em Roraima, Paraná. Segundo informações disponibilizadas pelas Secretarias Estaduais de Saúde, o monitoramento da circulação viral demonstra: em 2009 e 2010 o isolamento dos sorotipos 1, 2 e 3 em diversos estados, com predomínio do sorotipo 1; em 2011 a cocirculação dos 4 sorotipos com predomínio dos 1 e 2; em 2012 a cocirculação dos sorotipos 1, 2 e 4 com predomínio do 4 e em 2013 a cocirculação dos 4 sorotipos com predomínio do 4 (Figura 1). Atualmente, o vetor e o vírus da dengue encontram-se disseminados em grande parte do território brasileiro e o País contribui com mais de 80% dos casos registrados nas Américas (Figura 2).

Distribuição dos sorotipos virais do DENV no Brasil - 2013

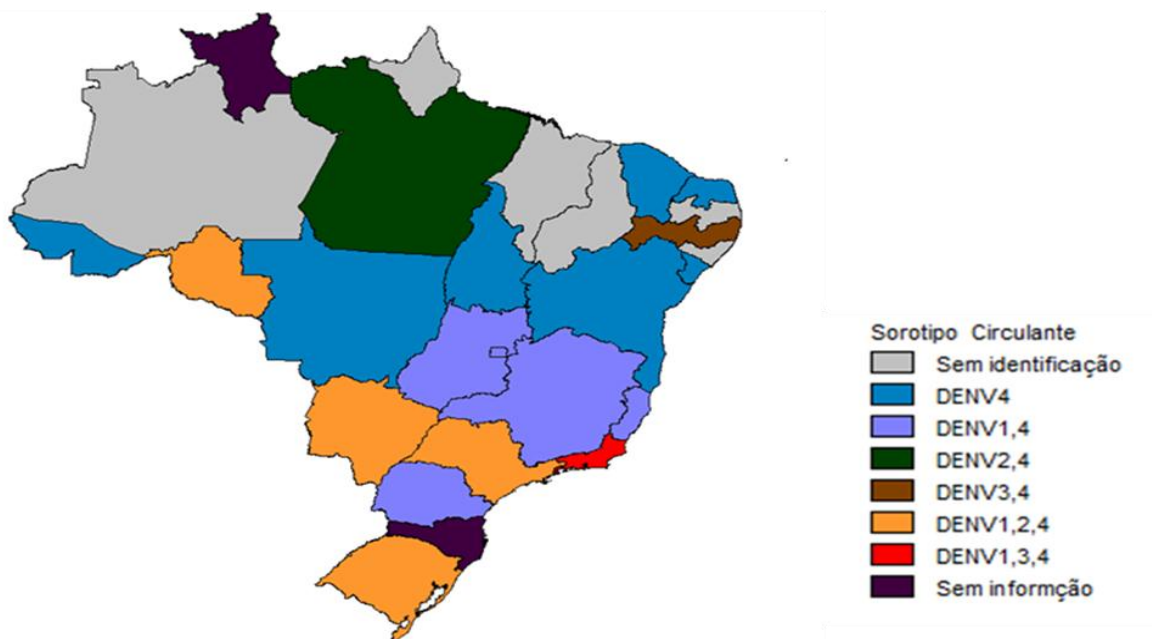


Figura 1. Distribuição espacial por sorotipo circulante do vírus da dengue (DENV) isolado, Brasil, 2013. Fonte: Coordenação Geral de Laboratórios da Saúde Pública/Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis/Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde - CGLAB/DEVIT/SVS/MS.

Incidência de Dengue no Brasil em 2013

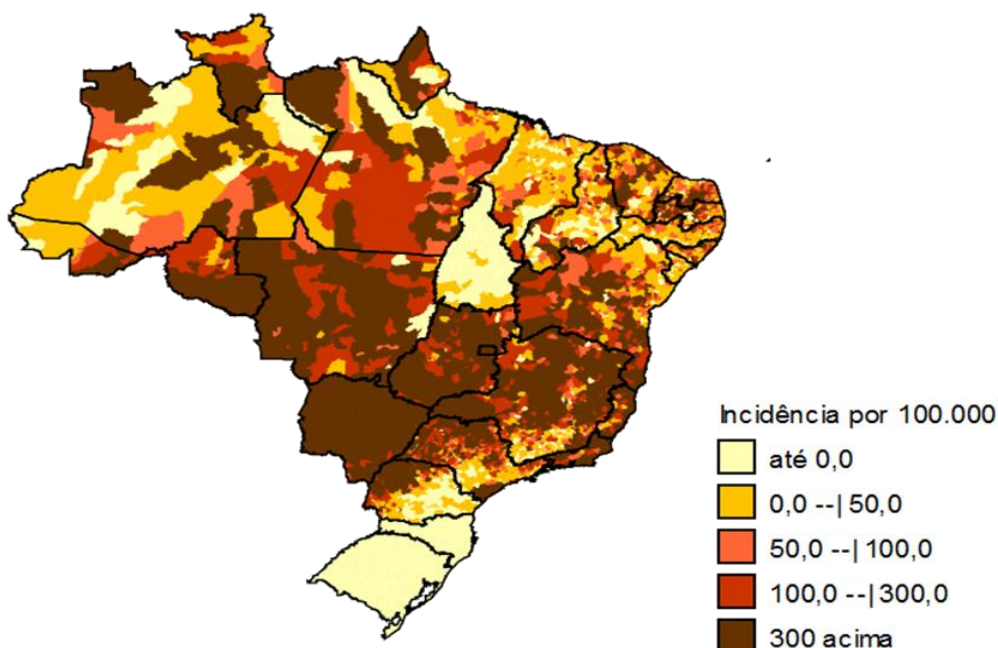


Figura 2. Incidência de Dengue, por Município, Brasil, 2013.

Fonte: Secretaria Estadual de Saúde/Sistema de Notificação de Agravos de Notificação - SES/SINAN NET-SINAN ONLINE.

3.1.3 Dengue no Espírito Santo

O ES possui 78 municípios e uma população acima de 3,5 milhões de habitantes (IBGE, 2007). Desses municípios, 59 apresentam infestação por dengue, representando 90% da população capixaba. No ES, o *A. aegypti* encontrou condições excepcionais para a sua reprodução e está presente pelo menos desde 1990, quando foi registrada a sua presença através de levantamentos entomológicos realizados pelo Núcleo de Entomologia e Malacologia do Espírito Santo e pela Secretaria de Estado da Saúde (NEMES/SESA). Neste ano, o mosquito foi encontrado em 16 municípios do Estado e, a partir de então, sua dispersão ocorreu de forma crescente, com maior velocidade a partir de 1995, ano no qual houve o registro dos primeiros casos de dengue no ES (SESA, 2010).

Houve a formação de três ondas epidêmicas no Estado: a primeira de 1995 a 1998, a segunda de 1999 a 2003, e a terceira onda de 2004 até 2011. A última onda se expande por mais anos, em comparação com as duas primeiras que foram de quatro anos cada. Nota-se em 2012 e 2013 o que se configura no início de uma quarta onda epidêmica (Figura 3).

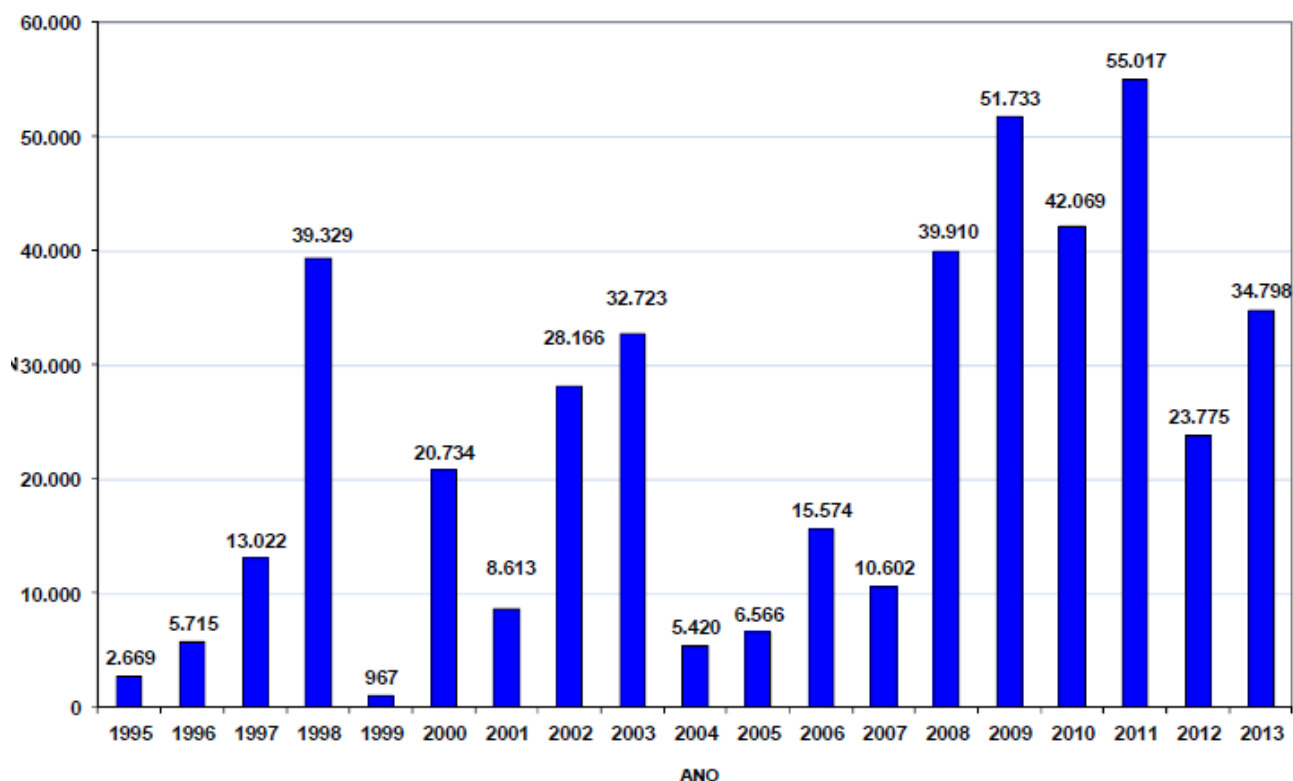


Figura 3. Casos notificados de dengue no ES, 1995-2013*.

*Casos notificados até a 13^o semana.

Fonte: Secretaria de Estado da Saúde - SESA (2013).

Em 2013 o ES esteve em terceiro lugar na lista dos estados com maior incidência de dengue no Brasil, totalizando uma incidência de 981,05/100.000 habitantes, a qual é considerada alta pelos critérios do Programa Nacional de Controle da Dengue. Nesse ano houve um aumento de 493,37% dos casos de dengue do ES em comparação com 2012, ano em que a incidência de dengue foi de 455,85/100.000 habitantes (SESA). No primeiro trimestre de 2013 registrou-se a maior notificação de dengue no ES, inclusive maior que os anos de 2009 e 2011, anos das maiores epidemias.

Os dados do isolamento viral da SESA informam a circulação dos sorotipos virais 1, 2 e 4 com predomínio do 1 seguido pelo 4 em 2012 e dos sorotipos 1 e 4, em números pareados, em 2013. Destaca-se a circulação do sorotipo viral 4, o qual foi recentemente introduzido do ES, expandiu rapidamente no final de 2012 e início de 2013, avançando nesse mesmo ano para todo o interior do estado .

3.2 TRANSMISSÃO DA DENGUE

Na dengue, os seres humanos são os hospedeiros finais para o DENV, sendo os únicos capazes de manifestar a doença clínica. A transmissão acontece quando a fêmea dos mosquitos alimenta-se do sangue de um indivíduo infectado, na fase de viremia, tornando-se hospedeira intermediária do DENV. Este se replica no mesentério do mosquito e depois se espalha por outros órgãos até alcançar as glândulas salivares, durante um período de incubação extrínseco de 8 a 10 dias (GUBLER, 1998; MCBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000). Após esse tempo, o vírus é transmitido quando o mosquito se alimenta do sangue de um novo hospedeiro (BANCROFT, 1906). Uma vez infectado, o mosquito pode transmitir o vírus até o fim de sua vida (cerca de 30 a 45 dias).

3.2.1 Vetor

O envolvimento de mosquitos na transmissão do DENV foi primeiramente documentado por Graham (1903), seguido por Bancroft (1906), o qual identificou o *A. aegypti* como vetor, o que foi posteriormente comprovado por Siler, Hall e Hitchens (1926).

A. aegypti é a principal espécie transmissora do DENV para humanos, sendo responsável pelo ciclo endêmico/epidêmico nos centros urbanos das regiões tropicais (GUBLER, 1998, 2002). Outras espécies de *Aedes* (*A. albopictus*, *A. polynesiensis* e *A. scutellaris*) atuam como vetores secundários no ciclo rural/epidêmico em regiões da

Ásia e África (GUBLER, 1998). Cada uma dessas espécies tem sua própria distribuição geográfica, sendo, no entanto, menos eficientes que o *A. Aegypti*.

3.2.1.1 *Aedes aegypti*

A espécie *A. aegypti* (Figura 4) é tropical e encontrada no mundo inteiro, geralmente entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul, onde a umidade e a temperatura favorecem sua proliferação (TAUIL, 2002). Esses mosquitos são oriundos da África e foram introduzidos nas Américas, provavelmente, durante a colonização européia pelo tráfico de escravos (GOMES, 1998). Dentre os mosquitos vetores, é o mais eficiente para transmissão da dengue porque é altamente antropofílico, com atividade hematofágica diurna e prospera em proximidade com os humanos, geralmente sobrevivendo em ambientes fechados e peridomiciliares (GUBLER, 2002; TAUIL, 2002). Esses mosquitos vivem, em média, 30 dias e a fêmea chega a pôr entre 150 a 200 ovos de cada vez, sendo capaz de realizar inúmeras posturas no decorrer da vida. Comumente exibem comportamento ininterrupto de repasto sanguíneo e a maioria das fêmeas alimenta-se múltiplas vezes entre a postura dos ovos, contribuindo para a rápida transmissão do vírus e a natureza explosiva das epidemias de dengue (BURKE; MONATH, 2001). Os ovos podem resistir a longos períodos de dessecação, às vezes por mais de um ano, recomeçando o desenvolvimento no próximo período chuvoso. Os mosquitos adultos possuem pequeno raio de ação, mantendo-se, em geral, a uma distância de 200 m dos locais da ovoposição. Contudo, os ovos ou o mosquito podem, acompanhando o homem, viajar, o que é uma forma reconhecida de disseminação vetorial (BURKE; MONATH, 2001).



Figura 4. *Aedes aegypti*.

Fonte: Copyright©Leronard E. Munstermann (1995).

3.2.1.2 *Aedes albopictus*

O *A. albopictus* é oriundo da Ásia e foi introduzido nas Américas em 1985 (BURKE; MONATH, 2001). Apresenta-se menos antropofílico do que o *A. aegypti*, mais tolerante ao frio e com capacidade de sobreviver tanto em ambiente silvestre, como peridomiciliar. A transmissão dos DENV pelo *A. albopictus* não está totalmente esclarecida, entretanto, a ocorrência de larvas infectadas pelo DENV-1 foi relatada no Brasil (FIGUEIREDO, 1996). No ano de 1986, o *A. albopictus* foi encontrado simultaneamente no RJ, em Minas Gerais e no ES. Acredita-se que a origem desses focos tenha sido o Japão, através do intercambio marítimo desse país com o sistema portuário do ES (Companhia Vale do Rio Doce), disseminando-se a partir daí para vários estados brasileiros (FORATTINI, 1986; MS, 1991; OPS, 1987). A dispersão desse mosquito por vários municípios brasileiros tem aumentado, gerando muita preocupação, pois, devido aos seus hábitos, não é passível de eliminação e tem a capacidade de tornar-se importante vetor na manutenção do ciclo de transmissão da dengue (TAUIL, 2002).

3.2.2 O vírus

O agente etiológico da dengue é o vírus DENV, pertencente à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*. Os quatro sorotipos distintos do DENV divergem em aproximadamente 30% de suas sequências proteicas (HOLMES, 2006).

Os *Flavivirus* têm genoma de RNA fita simples (do inglês: *Single-Strand RNA* - ssRNA) de polaridade positiva, com aproximadamente 11 kilobases (Kb) de tamanho e massa molecular de 4×10^6 daltons (Da) (WESTAWAY et al., 1985). O genoma possui na extremidade terminal 5' uma região *cap* (m7GpppAmp) e não apresenta cauda poliadenilada na extremidade 3' (CHAMBERS et al., 1990; HENCHAL; PUTNACK, 1990). Essas pontas 3' e 5' possuem duas regiões não codificantes, com 96 e 454 nucleotídeos, respectivamente, as quais são conservadas e fundamentais para a replicação do RNA e regulação da tradução (ALVAREZ et al., 2006). Entre estas regiões flangeadoras, o RNA é traduzido como uma sequência única a partir do primeiro ou segundo códon AUG presente na porção codificadora da molécula, o que resulta em uma poliproteína de 3.386 a 3.434 aminoácidos (AAs), que é clivada cotraducionalmente e pós-traducionalmente por proteases do vírus e do hospedeiro. Essa clivagem resulta nas proteínas estruturais (Capsídeo - C, Pré-membrana/Membrana - prM/M e Envelope - E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (CHAMBERS et al., 1990). As proteínas, que constituem uma única cadeia aberta de leitura (do inglês: *Open Reading Frame* - ORF) dos DENV, se apresentam na seguinte ordem: **Cap5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'** (Figura 5) (CHANG, 1997).

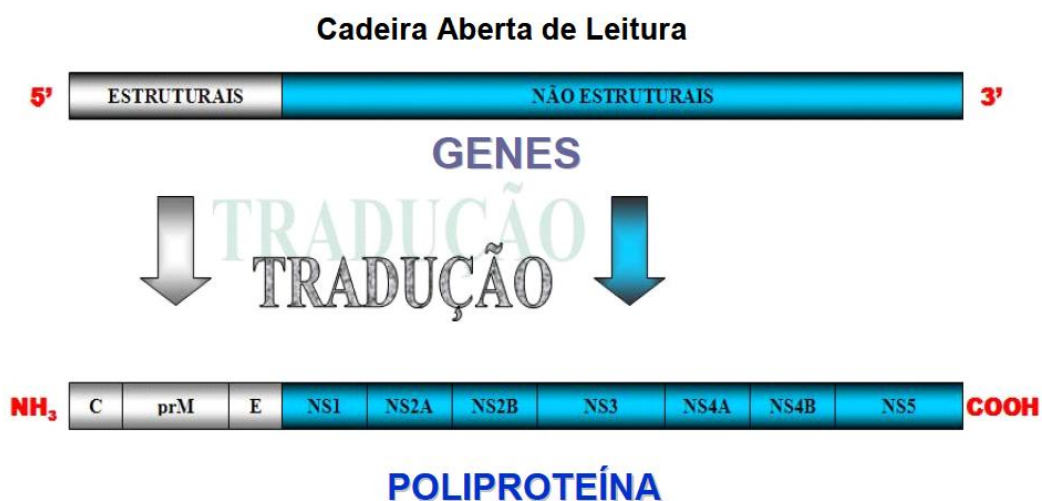


Figura 5. Cadeia aberta de leitura dos *Flavivirus*. Poliproteína clivada cotraducionalmente e pós-traducionalmente em três proteínas estruturais (em cinza) e sete proteínas não-estruturais (em azul).
Fonte: Batista (2007).

O vírion tem formato esférico e diâmetro de 40-60 nanômetros (nm) e, aproximadamente, 500 angstroms (Å) (HUANG et al., 2010) (Figura 6). O nucleocapsídeo icosaédrico, composto por proteínas C e RNA, é envolto por uma bicamada lipídica, que constitui o envelope. Embebidas na bicamada do envelope encontram-se as proteínas E, M e pequenos resíduos da forma não processada de M, a prM, as quais formam pequenas projeções na superfície do vírion (HEINZ; ALLISON, 2001; KUHN et al., 2002).

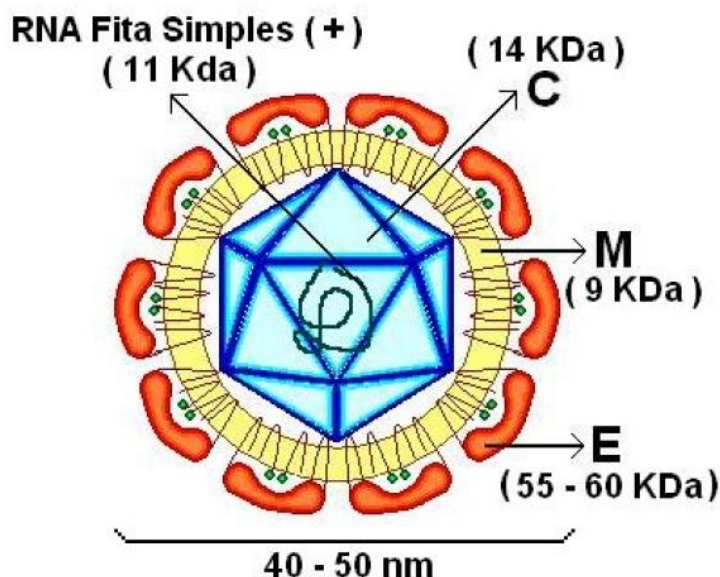


Figura 6. Morfologia do vírion de um *Flavivirus* e suas principais proteínas estruturais*.
*C: proteína do capsídeo; M: proteína da membrana e E: proteína do envelope.
Fonte: Batista (2007).

A proteína C é a responsável por conferir a forma esférica à partícula viral, possui um peso molecular de 14 kilodaltons (kDa) e apresenta caráter básico. O capsídeo é uma estrutura tênue envolvendo o RNA, mas é permeável a RNAses, o que torna importante a proteção feita pelo envelope lipídico (HENKAL; PUTNACK, 1990). A proteína prM é glicosilada, tem 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 E, forma o revestimento externo da partícula viral (CHAMBERS et al., 1990).

A proteína M auxilia na exposição do domínio de ligação ao receptor da proteína E (HEINZ; ALLISON, 2003) e protege essa proteína da reorganização estrutural e da fusão prematura (HEINZ; ALLISON, 2001; ZHANG et al., 2003).

A glicoproteína do envelope é a proteína viral de maior massa molecular (55-60 kDa). Apresenta-se altamente conservada entre os *Flavivirus* e possui um importante papel na infectividade do vírion, sendo local das propriedades biológicas principais dos vírus, inclusive a ligação de receptor, a hemoaglutinação dos eritrócitos, a indução neutralizadora de anticorpos e a resposta imunoprotetora (CHANG, 1997). Esta glicoproteína também participa da montagem do vírus (CHAMBERS et al., 1990; HEINZ; ALLISON, 2001) e da liberação dos componentes virais no citoplasma celular (HENCHAL; PUTNACK, 1990). Além dessas funções, a proteína E é capaz de promover a fusão da membrana do vírus com a membrana do endossomo, permitindo que a partícula infectante escape dessas vesículas (ROEHRIG, 1997; STIASNY; KIERMAYR; HEINZ, 2006). Esta proteína alterna entre diferentes estados oligoméricos: apresenta-se como trímeros de heterodímeros de prM-E nas partículas imaturas; como um dímero nos vírus maduros e como um trímero ao fundir-se com uma célula hospedeira (BRESSANELLI et al., 2004; MODIS et al., 2004).

3.2.2.1 Células envolvidas na infecção pelo DENV

Estudos iniciais *in vitro* mostraram serem os monócitos as células onde ocorre a replicação do DENV (HALSTEAD; O'ROURKE; ALLISON, 1977). No entanto, estudos recentes demonstram que após a picada de mosquito vetor, o DENV é injetado na corrente sanguínea, se espalha sobre a derme e epiderme e resulta na infecção de células dendríticas (do inglês: *Dendritic Cells* - DCs) imaturas, células de Langerhans e queratinócitos (LIMON-FLORES et al., 2005). Essas células infectadas migram então do local da infecção para linfonodos, onde os monócitos e os macrófagos passam a serem alvos para a infecção. Com isso, a infecção e o vírus são amplificados e se espalham pelo sistema linfático. Como resultado dessa viremia primária, muitas células da linhagem mononuclear como os monócitos derivados do sangue (DURBIM

et al., 2008), as DCs mieloides (BOONNAK et al., 2008; HO et al., 2004) e os macrófagos do baço e fígado são infectadas (BLACKLEY et al., 2007; JESSIE et al., 2004). Estudos sugerem que os linfócitos B podem também ser um alvo importante para a infecção. Por imunofluorescência indireta (IFI), foi demonstrada a presença de antígenos virais na superfície destas células (BOONPUCKNAVIG et al., 1976; KING et al., 1991). Além disso, com estudos *in vitro*, foi visto que o DENV pode, além de infectar, se replicar em células de origem epitelial e endotelial (MCBRIDE; BIELEFELDT OHMANN, 2000). Estudos recentes, realizados também em mastócitos humanos, demonstram que estas células podem ser infectadas com DENV, estimulando a produção de quimiocinas e citocinas capazes de ativar as células endoteliais e recrutar células efectoras para o local da infecção (MARSHAL; JAWADAT, 2004).

Apesar da dificuldade de se determinar se há o tropismo do DENV para tecidos específicos, estudos histopatológicos inferiram a presença do vírus em diferentes tecidos e órgãos como: pele, fígado, baço, nódulos linfáticos, rim, pulmão, medula óssea, timo e cérebro (BALSITIS et al., 2009; BASÍLIO DE OLIVEIRA et al., 2005; GASPERINO et al., 2007; HUERRE et al., 2001; JESSIE et al., 2004; KANGWANPONG; BHAMARAPRAVATI; LUCIA, 1995; SARIOL et al., 199; ROSEN; DROUET; DEUBEL, 1999). No entanto, partículas virais infecciosas foram isoladas apenas nas células do fígado e nas células mononucleares periféricas.

3.2.2.2 Ciclo viral

3.2.2.2.1 Entrada do vírus na célula hospedeira

Os flavivírus entram na célula por endocitose mediada por receptores (CHU; NG, 2004; MOSSO et al., 2008; SUKSANPAISAN; SUSANTAD; SMITH, 2009; VAN DER SCHAAR et al., 2008). Após a sua inoculação pela fêmea do mosquito vetor, o DENV será endocitado primordialmente por DCs imaturas que estão estrategicamente distribuídas na epiderme. Através de sua glicoproteína E, o vírus se ligará às DCs,

podendo utilizar diversos receptores, dentre estes, a molécula não integrina capturadora de ICAM-3 específica das células dendríticas (do inglês: *Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin* - DC-SIGN) (NAVARRO-SANCHEZ et al., 2003; TASSANEETRITHEP et al., 2003), expressa na superfície das DCs e um dos mais importantes receptores para o DENV. O DC-SIGN reconhece carboidratos presentes na proteína E, o que é importante para a entrada viral na célula (ALEN; SCHOLS, 2012). O ambiente ácido (aproximadamente pH<6,5) do endossomo desencadeia mudanças conformacionais nas glicoproteínas virais, de modo a ocorrer a fusão entre a membrana celular e o envelope viral, a dissociação das partículas virais e a liberação do RNA viral no citoplasma dando início ao ciclo de vida do vírus dentro da célula (CHEN et al., 1997; MODIS et al., 2004; REY, 2003; STIASNY et al., 2011). A mudança conformacional da proteína E é uma reorganização oligomérica, de modo que os homodímeros são rearranjados irreversivelmente em homotrímeros, capazes de se fundirem às células (BRESSANELLI et al., 2004; KIELIAN, 2006; MODIS et al., 2004; STIASNY et al., 2011; ZHANG et al., 2004). A transformação das partículas imaturas em maduras requer o rearranjo das proteínas E e M (ZHANG et al., 2004). Após a fusão, o genoma viral é liberado no citoplasma e a replicação dos vírus ocorre no interior das células (Figura 7).

Outro mecanismo de entrada do DENV na célula é por meio da formação de complexos imunes (do inglês: *Immune Complexes* - ICs) com imunoglobulinas G (IgGs) (Figura 8). Os ICs se ligam aos receptores Fc (do inglês: *Fc Receptors* - FcR) de células como macrófagos e monócitos, promovendo a infecção (PORTERFIELD, 1986). Os receptores Fc são uma família de glicoproteínas ligadas à membrana e expressos na superfície de leucócitos, mediando várias respostas imunológicas. Desses receptores, o receptor mais fisiológica e bioquimicamente expresso é o Fc gamma R2a (FcγRIIa), importante na regulação das respostas desencadeadas por ICs (GARCÍA et al., 2011). Após a internalização do IC, ocorre a formação do endossomo e a posterior fusão do envelope viral com a membrana celular, liberando o RNA viral no citoplasma (MONATH; HEINZ, 1996; RANDOLPH; STOLLAR, 1990) e iniciando a replicação e tradução no genoma viral.

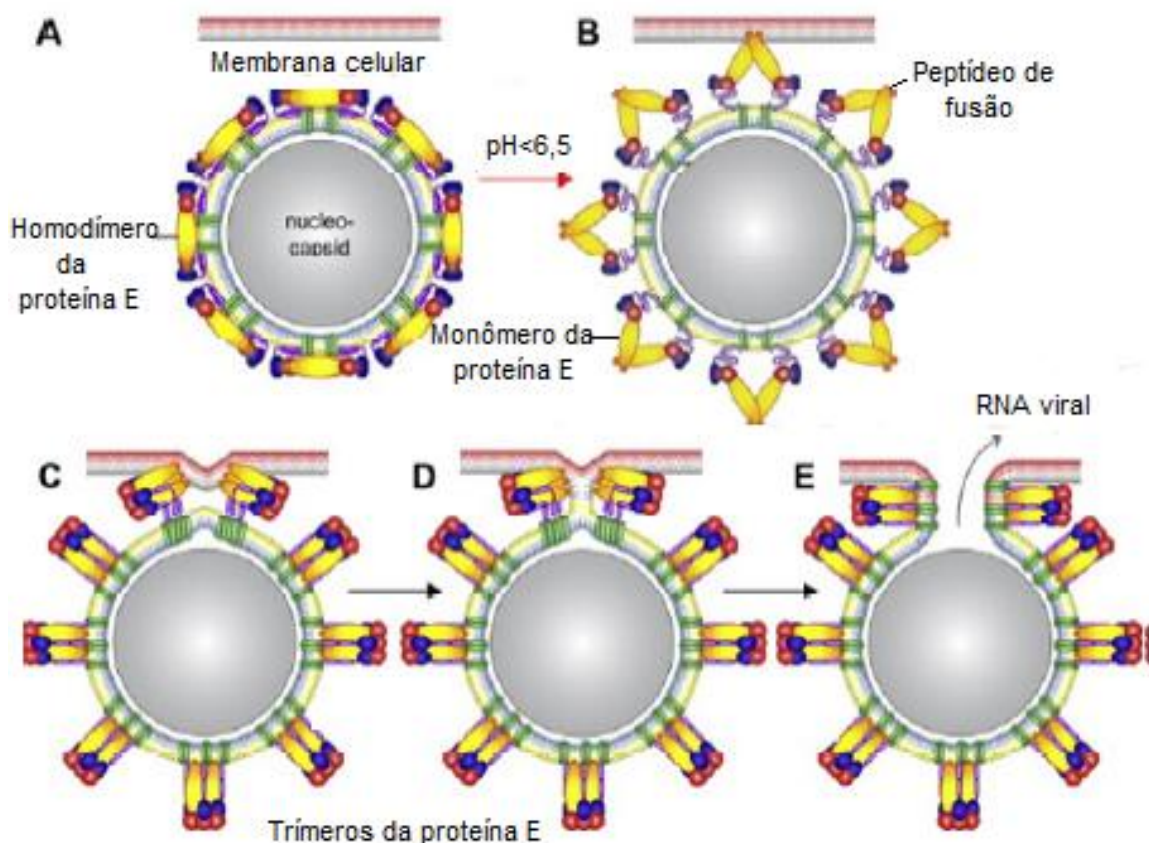


Figura 7. Esquema do processo de fusão da membrana do vírus da dengue (DENV) à célula e liberação do RNA viral. A - conformação de pré-fusão da proteína E consiste em homodímeros na superfície do vírus; B - o pH baixo do endossomo desencadeia a dissociação dos homodímeros de E, o que leva à inserção do peptídeo de fusão à membrana celular; C - um homotrímero de proteína E estável é formado em forma de gancho, criando uma ligação entre o vírus e a célula; D - fusão intermediária, na qual apenas as espículas das membranas celulares e virais estão fundidas e E - formação do homotrímero de proteína E pós-fusão e abertura do poro de fusão, permitindo a liberação do RNA viral para o citoplasma.

Fonte: Adaptado de Stiasny et al. (2011)

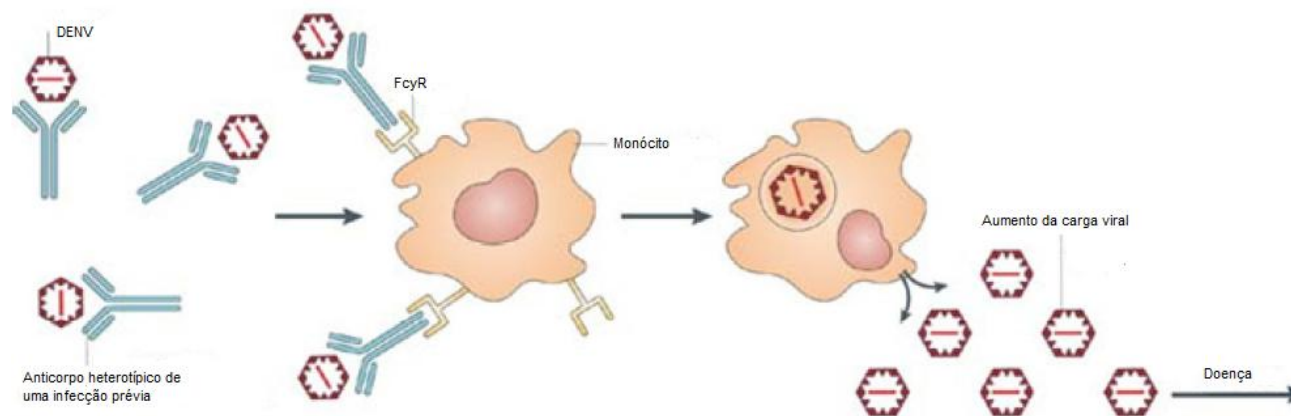


Figura 8. Esquema da entrada do vírus da dengue (DENV) na célula por meio da formação de complexos imunes (ICs) com IgGs. Os ICs se ligam aos receptores FcγR de células como macrófagos e monócitos, promovendo a infecção.

Fonte: Whintehead et al. (2007)

3.2.2.2.2 Replicação e maturação da partícula viral

Aproximadamente três horas após a fusão e liberação do genoma viral no citoplasma, a replicação dos vírus ocorre dentro de membranas intracelulares perinucleares (KIMURA; OHYAMA, 1988). O RNA do DENV é traduzido em associação com membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER) (EDGIL; POLACEK; HARRIS, 2006). Após o início da tradução do genoma viral, ocorre a síntese de um genoma de sentido negativo (3'-5') intermediário, o qual irá servir como molde para a síntese de múltiplas cópias do RNA viral de sentido positivo (5'-3'). Ciclos sucessivos de tradução produzem múltiplas cópias das 3 proteínas estruturais e das 7 não-estruturais, as quais, juntamente com o RNA viral, irão participar da formação, maturação e secreção da partícula viral, que ocorre no complexo de Golgi (CHAMBERS et al., 1990; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

Após a replicação, as partículas virais são reunidas na superfície do retículo endoplasmático (RE). O envelope é obtido por brotamento no RE celular, tendo como composição inicial as proteínas E e prM. As partículas imaturas são transportadas pela via secretória do Golgi, onde a prM é clivada por uma furino protease do hospedeiro, assumindo sua forma madura de M (LI et al., 2008). A fase inicial de latência do ciclo de replicação leva aproximadamente 12 horas, após as quais a progênie do vírus começa a ser liberada (CHANG, 1997). A clivagem de prM em M é fundamental para a infectividade do vírus, pois as partículas imaturas não são capazes de promover a fusão do vírus com membranas celulares, inclusive com a do endossomo (HENCHAL; PUTNACK, 1990). Essa clivagem permite a exposição de partes da E que se projetam do vírus (MODIS et al., 2003; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

3.2.2.2.3 Liberação do vírus

A liberação do vírus pode ocorrer por exocitose, pela fusão da membrana exocítica, contendo o vírus, com a membrana plasmática, ou por efeito citopático, através de aberturas pontuais na membrana que o separa o meio extracelular (HILL; LOGIBS; BLANDEN, 1993).

3.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA DENGUE

3.3.1 Quadro clínico

A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos do DENV pode promover manifestações clínicas variadas: o quadro assintomático; a doença clássica, a dengue não grave, muitas vezes denominada DF e formas mais graves e potencialmente fatais, a dengue grave, também denominada DHF e DSS (ALVAREZ et al., 2006; HENCHAL; PUTNACK, 1990; HOLMES, 2006). Quando o paciente é infectado pela primeira vez, diz-se que o mesmo tem uma infecção primária; quando infectado pela segunda vez, infecção secundária (WHO, 1997).

3.3.1.1 Infecções assintomáticas/oligosintomáticas

Mais da metade das infecções por dengue é assintomática ou muito suave (DA CUNHA et al., 1995), caracterizada por uma febre indiferenciada, com ou sem erupção cutânea, principalmente em bebês e crianças pequenas (PAHO, 1994; WHO, 1997). O percentual de tais infecções está relacionado a fatores do ambiente, do paciente, do vetor e do próprio vírus (GUZMÁN; KOURI, 2002).

3.3.1.2 Dengue clássica

A dengue clássica é uma doença incapacitante; o seu prognóstico, no entanto, é favorável (GUZMÁN; KOURI, 2002). É uma doença febril e autolimitada, com temperaturas próximas a 38°C e período de incubação de 2 a 7 dias. A febre tem o início abrupto e pode estar acompanhada de calafrios, cefaleia intensa, dor retro-orbital, exantema, prostração, mialgia e artralgia (PAHO, 1994; WHO, 1997). Podem ocorrer manifestações clínicas como tosse seca e fadiga (WHO, 1997). Além das manifestações clássicas, sintomas gastrointestinais, tais como náuseas, vômitos e diarreias, podem ocorrer. A febre persiste, em média, por 5 a 7 dias. Em 5 a 30% dos casos podem ocorrer pequenos sangramentos, principalmente gengivorragia, petéquias, epistaxe ou metrorragia e, raramente, hematêmese e hematúria, sendo importante a diferenciação desses casos de dengue clássico com complicações hemorrágicas, daqueles casos de DHF. Juntamente a esses sintomas, ocorre leucopenia e diferentes graus de trombocitopenia. Um ou dois dias após a defervescência pode ocorrer prurido (*rash*) maculopapular generalizado e a visualização de petéquias. O prognóstico é, em geral, benigno e a convalescença pode ser prolongada por vários meses, retardando a retomada das atividades cotidianas do paciente (GUZMÁN; KOURI, 2002), principalmente em adultos (GUZMÁN; KOURI, 2003).

Segundo a OMS, são diagnosticados com DF os pacientes com doença febril aguda com até 7 dias de duração, acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaleia, prostração, dor retro-orbital, artralgia, exantema e mialgia. Nesta classificação, também estão incluídos os pacientes que apresentarem manifestações hemorrágicas como prova de laço positiva, epistaxe, gengivorragia, metrorragia e outras. Por falta de especificidade destes sinais clínicos e sintomas, evidências laboratoriais ou epidemiológicas de infecção pelo DENV são necessárias para se confirmar o diagnóstico (NGUYEN; NGUYEN; TIEU, 1997).

3.3.1.3 Febre hemorrágica da dengue/síndrome de choque da dengue

As formas graves da dengue possuem o início semelhante à DF e por volta do terceiro ou quarto dia de evolução, coincidindo com a diminuição da febre, ocorre o agravamento da doença, com ocorrência de sangramentos maiores, podendo evoluir para o choque.

O vazamento de plasma é a maior característica patofisiológica observada na DHF e isso a diferencia da DF típica. Segundo a OMS, o que caracteriza a dengue hemorrágica são os seguintes sintomas: a febre ou história de febre recente de até 7 dias; tendência hemorrágica (presença de prova do laço positiva, petéquias, equimoses ou púrpuras, gengivorragia, metrorragia, menorragia, epistaxe, sangramentos de mucosas do trato gastrointestinal ou outros); trombocitopenia de moderada a marcada (abaixo de 100.000/mililitro - mL); aumento do hematócrito em 20% na admissão; queda do hematócrito em 20% após o tratamento; presença de derrames cavitários (pleural, ascítico ou pericárdico) e hipoproteinemia (MARTINEZ, 1992; NIMMANNITYA, 1987; PAHO, 1994; WHO, 1997).

A FHD/DSS pode apresentar quatro graus de gravidade (I, II, III e IV), sendo os graus III e IV correspondente à DSS (NIMMANNITYA, 1993).

Os casos “típicos” de DHF/DSS apresentam quatro manifestações clínicas principais: febre alta, fenômenos hemorrágicos e, frequentemente, hepatomegalia e insuficiência circulatória. As manifestações hemorrágicas mais frequentes são as petéquias, os hematomas e os sangramentos nos locais de punção venosa. Epistaxes e gengivorragias são comuns, mas os sangramentos gastrointestinais volumosos são mais raros. Hepatomegalia dolorosa, de tamanho variável, pode surgir no início da fase febril. A lise febril pode ser acompanhada de suores profusos e mudanças na pulsação e na pressão sanguínea, além de extremidades frias e pele congestionada. Ainda na primeira semana da doença o paciente pode apresentar pele fria, manchada e congestionada, pulso rápido e cianose perioral. As dores abdominais são frequentemente referidas antes do início do choque que, se profundo, torna a pressão sanguínea e o pulso imperceptíveis (WHO, 1997).

O paciente pode recuperar-se rapidamente após terapia antichoque apropriada. No entanto, o choque não tratado adequadamente pode evoluir com acidose

metabólica e graves sangramentos gastrointestinais e em outros órgãos, podendo o paciente chegar a óbito em 12 a 24 horas.

3.3.1.4 Apresentações clínicas incomuns

Em frequência cada vez maior, têm sido registrados casos de comprometimento nervoso, hepático, esplênico e cardíaco. Gubler, Kuno e Waterman (1983) concluíram que podem ocorrer distúrbios neurológicos tanto na DF quanto na DHF.

O acometimento do sistema nervoso central (SNC) pode acontecer durante a infecção aguda ou como uma manifestação pós-infecciosa. Na DF, os sintomas neurológicos vão da irritabilidade e depressão passando pela paralisia mononeural até encefalites com ataques e morte (GUBLER, 1998). Na vigência de um quadro agudo de dengue, deve-se pensar em acometimento do SNC, diante de casos com cefaleia intensa, vômitos, convulsão/delírio, insônia, inquietação, irritabilidade e depressão, acompanhados ou não de meningismo discreto sem alteração da consciência ou deficiência neurológica focal, depressão sensorial e desordens comportamentais. Deve-se sugerir a hipótese de envolvimento do DENV diante de pacientes com síndrome de Guillain-Barré (polirradiculoneuropatia aguda), meningoencefalomielite e mononeuropatias que tiveram diagnóstico de dengue dias ou semanas atrás; também têm sido descritos casos de paralisia de Bell, neurite óptica, dificuldade de deambulação, disfunção sexual, retenção ou mesmo incontinência urinária.

A encefalopatia na DHF pode resultar de anoxia cerebral, edema, hemorragia intracraniana, e oclusão vascular. De uma maneira geral, os sintomas de encefalite da DHF atribuem-se à falha hepática e edema associado com o vazamento pela vascularização cerebral; na DF, entretanto, a patogênese da encefalopatia é menos clara.

Não se sabe se os DENV produzem doença neurológica como complicação não específica ou se ocorre a invasão direta do vírus no cérebro do hospedeiro, como na encefalite do Japão e na de St. Louis. Em alguns casos, os vírus foram isolados ou detectados por PCR no fluido cérebro-espinhal, mas também é possível que a

hemorragia ou vazamento pela barreira hematoencefálica permita que os anticorpos e vírus presentes no sangue vão para o fluido cérebro-espinhal, ou que o DENV possa atravessar essa barreira e infeccionar o fluido cérebro-espinhal. Finalmente, já se detectou, por mancha de imunoperoxidase, o antígeno do DENV no cérebro de casos fatais (NOGUEIRA et al., 1999). De uma forma geral, os resultados patológicos observados no cérebro estão associados com edema e hemorragia cerebrais, sem evidência de encefalite, sendo necessários mais estudos patológicos (GUZMÁN; KOURI, 2002).

Segundo a OMS, são diagnosticados com dengue com complicações, os pacientes que apresentarem um dos seguintes itens: plaquetopenia igual ou inferior 50.000/milímetro cúbico - mm^3 ; contagem total de leucócitos igual ou inferior a 1.000/ mm^3 ; hepatite por dengue; insuficiência hepática; miocardite; encefalite; hemorragias abundantes; alterações graves do sistema nervoso; disfunção cardiorrespiratória; hemorragia digestiva; derrames cavitários e óbito. Portanto são os pacientes graves que não preenchem os critérios da OMS de DHF e classificá-los como DF não é adequado.

3.3.2 Classificação recente da dengue

A OMS publicou em 1975 e atualizou em 1997 a base para a classificação clínica da dengue (WHO, 1975, 1997). Nessa classificação a dengue sintomática foi classificada clinicamente em DF e DHF/DSS, como reportado até agora neste trabalho.

Devido às dificuldades na classificação dos pacientes em diversas situações (BANDYOPADHYAY; LUM; KROEGER, 2006; DEEN et al., 2006; PHUONG et al., 2004), principalmente com relação aos casos graves, em 2009 a OMS propôs, no seu mais recente guia para diagnóstico, tratamento e prevenção de dengue, uma nova classificação. Houve a divisão da apresentação clínica da dengue em: Dengue (com ou sem sinais de alerta) e Dengue Grave (WHO, 2009) (Figura 9). A definição de dengue (não grave) é algo similar à antiga classificação de DF: uma combinação de dois ou mais sinais e sintomas junto com uma febre individual, em uma área endêmica.

Acrescentam-se como sinais de alerta/alarme, dor e sensibilidade abdominal, vômitos persistentes, acumulação clínica de fluídos, sangramento de mucosas, letargia, agitação e aumento do fígado (WHO, 2009).

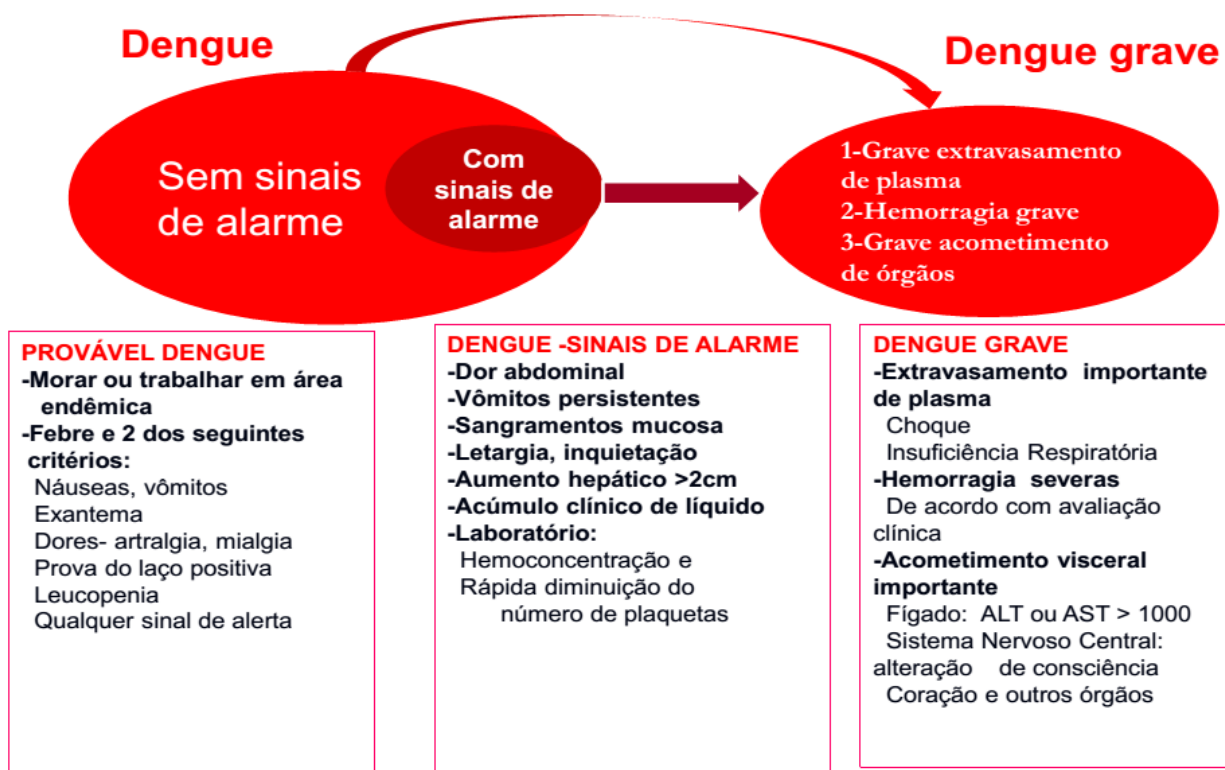


Figura 9. Classificação dos casos de dengue de acordo com a gravidade, sugerida pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Fonte: Tristão-Sá (2012), Adaptado de WHO (2009).

Esta nova classificação sugerida pela OMS é mais simples e fácil de usar, é mais fidedigna na tradução do estado de gravidade clínica do paciente, fornece a possibilidade de identificação de pacientes por meio dos sinais de alerta e não entra em conflito com a classificação anterior. É baseada em estudo multicêntrico com participação de especialistas dos principais países afetados pelas epidemias. No entanto, é possível que apresente limitações que podem ficar evidentes com o tempo de uso e por isso, deve ser continuamente reavaliada e, se necessário, mudar de acordo com uma real necessidade (TRISTÃO-SÁ, 2012).

3.3.3 Persistência de sintomas clínicos da dengue da fase de convalescença

As manifestações agudas da dengue são bem conhecidas e estudadas, já os sintomas clínicos da fase de convalescença da doença são pouco caracterizados. No entanto, alguns estudos fornecem evidências que sugerem que a dengue pode resultar em um quadro clínico que se prolonga após a fase aguda da doença (GARCÍA et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2005; LOW et al., 2006; SEET; QUEK; LIM, 2007; TEIXEIRA et al., 2010; TRISTÃO-SÁ et al., 2012). No ano de 1997, a OMS falou sobre a possibilidade de persistência da fadiga (WHO, 1997). Em 2005, González et al. (2005) avaliaram 47 indivíduos cubanos com dengue e verificaram a presença de algum sintoma clínico da dengue seis meses após a fase aguda da doença em 48,6% dos pacientes. Nesse estudo, os sintomas mais persistentes foram astenia (27,6%), cefaleia (14,8%) e artralgia (10,6%). Low et al. (2006) analisaram 133 pacientes com dengue em Singapura e verificaram a presença de cansaço, sonolência e perda de apetite por 3 semanas após a fase aguda da doença em 9% dos pacientes. Um ano depois, um trabalho realizado por Seet, Quek e Lim (2007) analisou 163 pacientes hospitalizados com dengue sintomática em Singapura, e observou a presença de fadiga dois meses após a fase aguda da doença em aproximadamente 25% dos pacientes e apontou como importantes fatores de risco para essa persistência da fadiga, a maior idade, o sexo feminino, a presença de calafrios e a ausência de exantema. No estudo realizado por García et al. (2011), que analisou 97 pacientes cubanos infectados pelo DENV, houve a persistência de algum sintoma clínico da dengue em 56,7% dos pacientes, no período de dois anos após a infecção. Nesse mesmo ano, um trabalho realizado em Minas Gerais por Teixeira et al. (2010) acompanhou 118 pacientes com dengue e 65,2% dos pacientes relataram a presença de pelo menos um sintoma clínico da dengue após os 14 dias da doença, sendo que em 8,5% o sintoma persistente foi intenso por 30 dias ou mais. Os sintomas mais persistentes nesse estudo foram fraqueza (58 casos), hipóxia (49 casos) e sonolência (40 casos), ocorrendo mais em mulheres. O trabalho de Tristão-Sá et al. (2012), analisou 90 pacientes com dengue em Campos dos Goytacazes, RJ e observou a persistência de pelo menos um sinal ou sintoma da dengue em 57,8% dos pacientes

um mês após a fase aguda da doença e em 33,3%, dois meses após a infecção. Os principais sintomas persistentes nesse estudo foram artralgia, fadiga, fraqueza, adinamia, anorexia, alterações do paladar e queda de cabelo. Apesar da pequena quantidade de estudos que analisaram a persistência de sintomas da dengue na fase de convalescença, a observação da ocorrência de sintomas persistentes em todos os trabalhos publicados sobre o assunto, demonstra a importância da expansão da base de dados sobre a dengue após a sua fase aguda.

3.4 DIAGNÓSTICO DA DENGUE

O diagnóstico efetivo da dengue é laboratorial, uma vez que os sintomas clínicos podem ser facilmente confundidos com outras doenças febris, tais como sarampo, malária e leptospirose, as quais, normalmente, cocirculam com a dengue. A detecção da infecção pode ser feita por isolamento viral, detecção de anticorpos específicos da fase pós-virêmica ou ainda por detecção de antígenos virais ou RNA viral em soro, plasma ou tecidos (DE PAULA; FONSECA, 2004).

3.4.1 Isolamento viral

O isolamento viral pode diagnosticar a dengue ainda na fase aguda da doença, antes que os títulos de anticorpos atinjam níveis detectáveis. É realizado inoculando-se soro ou plasma do paciente em mosquito, cérebro de camundongo ou em cultura de células de mamífero ou de mosquito (GUBLER et al., 1984).

3.4.2 Sorologia

Os métodos sorológicos só podem ser realizados cerca de cinco dias após o início dos sintomas, quando os anticorpos já estão detectáveis no soro ou plasma dos

pacientes. As limitações desses métodos incluem a reatividade cruzada, que pode existir entre os quatro sorotipos do DENV, e também entre estes e os outros flavivírus. Os métodos sorológicos são: teste de inibição da hemoaglutinação (IH), fixação do complemento, teste de neutralização, ensaio imunossorvente ligado à enzima (do inglês: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) IgM e ELISA indireto de IgG (DE PAULA; FONSECA, 2004).

Os testes ELISA são os mais usados devido a sua praticidade, especificidade e sensibilidade e por serem relativamente mais baratos que os outros. Esse tipo de detecção avalia a fase da infecção de acordo com a prevalência de alguns tipos de anticorpos. O ELISA com captura de anticorpos IgM é amplamente utilizado para detecção de infecções recentes (WANG et al., 2000). Os testes IgG-ELISA são usados para detecção de infecções passadas e sozinhos não têm valor para o diagnóstico de infecções agudas ou recentes (PEELING et al., 2010). A razão IgM/IgG é usada para distinção entre respostas primárias e secundárias (INNIS et al., 1989; MIAGOSTOVICH et al., 1999).

Apesar da qualidade dos testes ELISA e dos avanços que eles propiciaram na área de diagnóstico, eles possuem a mais importante limitação inerente todos os métodos sorológicos, que é a impossibilidade de detecção da doença na fase inicial ou aguda. Como tentativa de contornar esse problema, alguns testes imunoenzimáticos têm sido realizados para detecção da proteína viral NS1 (ALCON et al., 2002; YOUNG et al., 2000). O antígeno NS1 está presente no soro de indivíduos infectados no primeiro ao sexto dia de sintomas. Por isso, pode ser usado na detecção precoce da dengue (XU et al., 2006).

3.4.3 Diagnóstico molecular

Outra forma de verificar a presença do DENV é através da detecção do RNA viral por transcrição reversa seguida da PCR (do inglês: *reverse transcripton - polymerase chain reaction* - RT-PCR). Esta, devido a sua alta sensibilidade e rapidez na detecção de, potencialmente, qualquer sequência genética, revolucionou o campo

de diagnóstico das doenças infecciosas (RATCLIFF; HARRISON; BAULCOMBE, 1997). Assim como a técnica do isolamento viral, a RT-PCR possui a vantagem, em relação aos métodos sorológicos, de possibilitar a sorotipagem do vírus infectante e de permitir o diagnóstico da doença na sua fase inicial (DEUBEL, 1992). A vantagem dessa técnica em relação ao isolamento é ser menos trabalhosa e menos influenciada por problemas de armazenamento e manipulação do soro e outros fatores, além de ser capaz de fornecer resultados em um período de tempo consideravelmente mais curto (GUBLER, 1998; SCHILLING et al., 2004).

3.5 TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA DENGUE

3.5.1 Tratamento

Não existe um tratamento antiviral específico, mas os pacientes recebem medicação sintomática, como analgésicos e antitérmicos. Medicamentos à base de salicilatos e os anti-inflamatórios não hormonais são evitados, pois podem favorecer o aparecimento de manifestações hemorrágicas e acidose. A adequada hidratação oral e venosa e o repouso são eficazes no tratamento da grande maioria dos casos, de acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Em casos mais graves é realizada a terapia de apoio de líquidos e eletrólitos (FNS-BRASIL, 2002). Aos primeiros sinais de choque, o paciente é internado para ser feita a correção do volume de líquidos perdidos e da acidose. Na reposição de líquidos, os sinais de insuficiência cardíaca são constantemente monitorados (FNS-BRASIL, 2002). Por fim, o reconhecimento precoce dos sinais de alarme e o tratamento precoce são os passos fundamentais na redução da taxa de fatalidade dos casos de dengue (MARTINEZ, 1992; PAHO, 1994; WHO, 1997).

3.5.2 Vacinas

Apesar de ainda não haver uma vacina disponível que possa prevenir contra a dengue, já existem várias vacinas candidatas em diferentes estágios de desenvolvimento. São produtos que utilizam tanto a tecnologia convencional das vacinas com vírus atenuados, como as novas tecnologias de manipulação genética (JACOBS; YOUNG, 2003; KONISHI; KOSUGI; IMOTO, 2006).

Atualmente, vacinas tetravalentes, usando vírus atenuado por passagens sucessivas em cultura de células, encontram-se em testes que demonstraram que elas são capazes de induzir uma resposta imune contra os quatro sorotipos do DENV (ALMOND et al., 2002; STEPHENSON, 2005), embora reações colaterais importantes nos voluntários vacinados tenham sido observadas.

Técnicas de manipulação genética, que levam à produção de clones infecciosos de vírus, constituem a base de novas vacinas potenciais. Para a produção desses clones infecciosos é utilizada a estrutura (esqueleto) de vírus atenuados, na qual são inseridos genes selecionados de sorotipos do DENV. Além desses novos vírus, denominados vírus quiméricos, vários grupos de pesquisas estão desenvolvendo vacinas com diferentes tipos de abordagens com graus variáveis de sucesso (KONISHI; KOSUGI; IMOTO, 2006; TIMOFEEV; BUTENKO; STEPHENSON, 2004). Uma vacina quimérica tetravalente em estudo, submetida aos testes de avaliação, produziu anticorpos neutralizantes em macacos *rhesus* contra os quatro sorotipos do DENV (RAVIPRAKASH et al., 2006).

A maioria das vacinas em desenvolvimento utiliza a proteína E para produzir resposta imune. Também está sendo empregada na preparação de novas vacinas, a proteína não estrutural NS1 do vírus, com resultados satisfatórios em camundongos (TIMOFEEV; BUTENKO; STEPHENSON, 2004).

Para evitar problemas relacionados com reações adversas e com uma possível recombinação de um vírus vacinal com outro vírus selvagem (HALSTEAD; DEEN, 2002), tem-se procurado desenvolver vacinas utilizando vírus quiméricos, sem utilizar vírus vivos, nem mesmo os atenuados (ALMOND et al., 2002), mesmo que assim, se tenha uma resposta imune menos eficiente.

Uma vacina tetravalente foi produzida pelo Instituto Butantan, órgão da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, em parceria com os Institutos Nacionais

de Saúde dos Estados Unidos (NIH - *National Institutes of Health*) e encontra-se no aguardo da conclusão dos ensaios clínicos. A previsão é de que essa vacina possa fazer parte do Programa Nacional de Imunizações (PNI) até 2018. De acordo com o MS, estima-se que mais sete vacinas estejam na fase de pesquisa no País, incluindo a iniciativa nacional do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) em parceria com o laboratório privado da GlaxoSmithKline, com previsão de conclusão da vacina em 5 anos.

3.6 PATOGENIA, PATOLOGIA E IMUNIDADE NA DENGUE

3.6.1 Patogenia da dengue

A patogênese causada pelo DENV é determinada pela interação de inúmeros fatores: virulência viral, *status* imune e genética do hospedeiro e possivelmente outros, como a pré-existência de outras doenças (RICO-HESSE, 2010). A Figura 10 representa um modelo proposto para a patogênese da dengue.

Como já dito, embora o DENV se replique em uma variedade de células *in vitro*, incluindo as células mielóides, linfóides, epiteliais, endoteliais e linhagens de fibroblastos, acredita-se que as células principais para a replicação dos DENV sejam as mononucleares de linhagem fagocítica (AUNG-KHIN et al., 1975; BHAMARAPRAVATI; TUCHINDA; BOONYAPAKNAVIK, 1967; DIAMOND et al., 2000; GUBLER, 1998; HALSTEAD, 1988; HALSTEAD; O´ROURKE; ALLISON, 1977; INNIS, 1995; KURANE et al., 1990; MARCHETTE et al., 1973; MORENS et al., 1991). Após a inoculação do vírus através da picada do mosquito, a primeira replicação ocorre em linfonodos locais, células musculares estriadas e lisas e em fibroblastos. Com isto, há a disseminação do vírus, livre no plasma ou no interior de monócitos/macrófagos, dando início à viremia (MONATH, 1990; MONATH et al., 1996).

Os sintomas gerais da dengue surgem após o período de incubação de 2 a 7 dias, coincidindo com a viremia. Esses sintomas relacionam-se a níveis séricos elevados de citocinas liberadas por macrófagos ao interagirem com linfócitos T *helper*

(Th) ativados. A leucopenia e a discreta e transitória depressão medular que se apresentam também se relacionam aos altos teores de citocinas macrofágicas. As mialgias são consequentes, em parte, à multiplicação viral no próprio tecido muscular. O acometimento dos músculos oculomotores é responsável pela cefaleia retro-orbitária que muitos pacientes apresentam (KURANE; ENNIS, 1992; MONATH; HEINZ, 1996).

A dengue grave tem como base fisiopatológica uma resposta imune anômala, desencadeada pelo indivíduo infectado em resposta à cepa viral infectante. Há envolvimento de leucócitos, citocinas e ICs, causando aumento da permeabilidade por má função vascular endotelial, sem destruição do endotélio. O consequente extravasamento de líquidos para o interstício causa a queda da pressão arterial e as manifestações hemorrágicas associadas à trombocitopenia (MONATH et al., 1996; RICO-HESSÉ et al., 1998). Devido a tais manifestações, surgem hemoconcentração com redução da volemia, má perfusão tissular, hipóxia e acidose láctica. Em autópsias, observam-se hemorragias cutâneas em trato gastrointestinal, no septo interventricular cardíaco, no pericárdio, em espaços subaracnoideos e superfícies viscerais. A hepatomegalia e os derrames cavitários também são achados comuns. Os derrames em cavidade abdominal e no espaço pleural possuem alto teor proteico, com predomínio de albumina e contêm pouco material hemorrágico (BHAMATAPRAVATI; TICHUNDA; BOONYAPAKNAVIK, 1967; FIGUEIREDO; FONSECA, 1996; WHO, 1986). Nas análises microscópicas de materiais de necropsia observa-se edema perivascular com grande extravasamento de hemácias e infiltrado rico em monócitos e linfócitos, sem dano às paredes vasculares. Em alguns pacientes adultos com hemorragias, observam-se megacariócitos em capilares pulmonares, glomérulos renais, sinusóides hepáticos e esplênicos, como evidências de coagulação intravascular. Nos linfonodos e baço, há proliferação linfoplasmocitária com grande atividade celular e necrose de centros germinativos. A polpa branca esplênica é reduzida e, ali, observa-se linfocitólise abundante com fagocitose dessas células. Na medula óssea ocorre bloqueio da maturação megacariocítica e de outras linhagens celulares. No fígado observa-se hiperplasia, necrose hialina de células de *Kupffer* e a presença, em sinusóides, de células mononucleares com citoplasma acidófilo e vacuolizado, semelhantes a corpúsculos de *Councilman*, lembrando aspecto

encontrado na febre amarela. Os hepatócitos apresentam graus variáveis de esteatose e necrose mediozonal. Os rins têm glomerulonefrite relacionada, provavelmente, à deposição de ICs em membrana basal glomerular (BHAMATAPRAVATI; TICHUNDA; BOONYAPAKNAVIK, 1967; FIGUEIREDO; FONSECA, 1996; WHO, 1986). Chama atenção o fato de que as lesões patológicas observadas, excetuando-se as relacionadas a hemorragias profusas, não justificam a extrema gravidade e o óbito nos casos de dengue grave (BHAMATAPRAVATI; TICHUNDA; BOONYAPAKNAVIK, 1967; FIGUEIREDO; FONSECA, 1996).

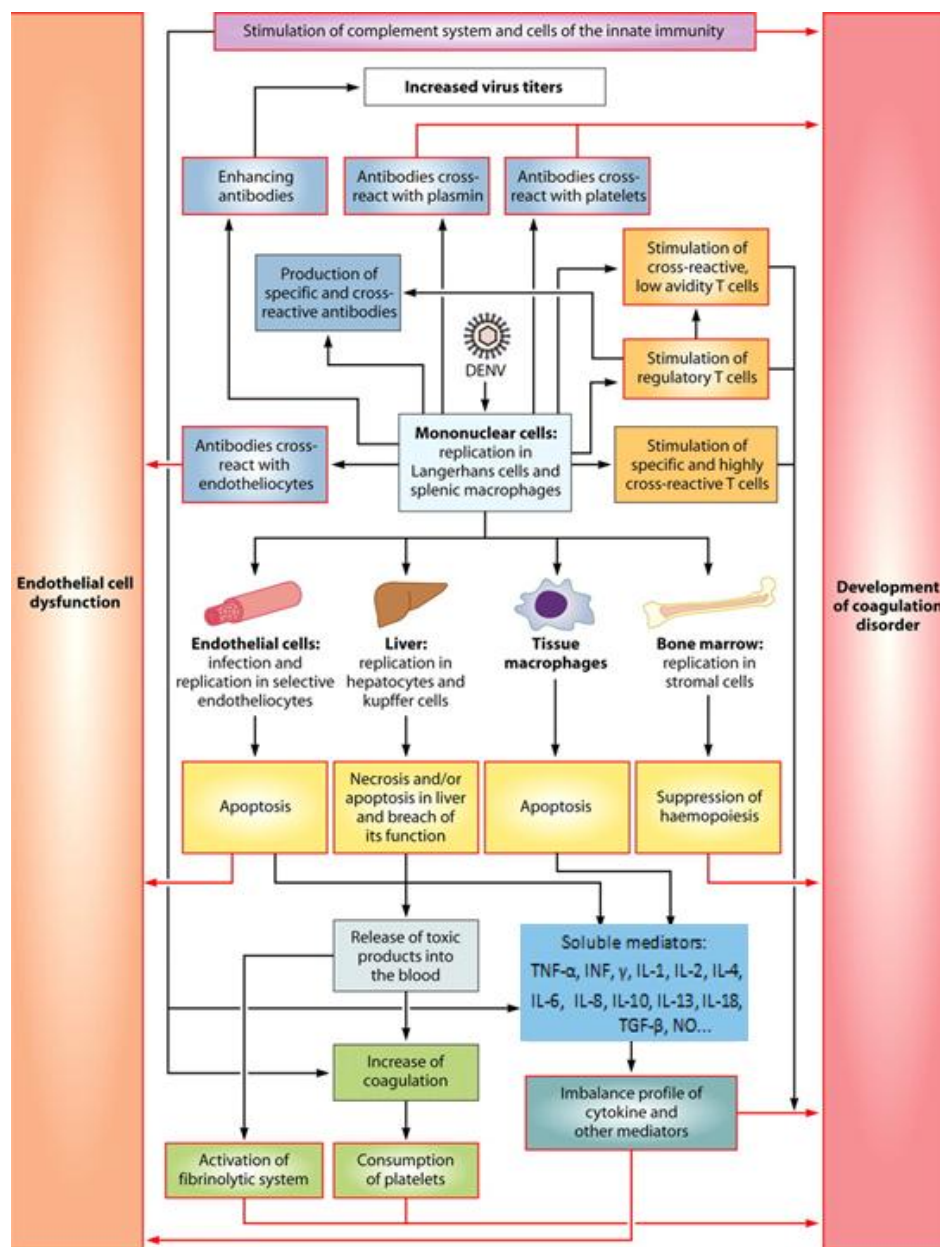


Figura 10. Esquema de um modelo para a patogênese da dengue.
Fonte: Adaptado de Martina, Koraka e Osterhaus (2009).

3.6.1.1 Etiopatogenia da dengue grave

Durante anos, a patogênese da dengue grave foi objeto de controvérsia. Alguns pesquisadores defendiam o ponto de vista de que a infecção secundária fosse o fator principal para a gravidade da doença, enquanto outros apontavam para a virulência do vírus (HAMMON, 1973; KOURI; GUZMÁN; BRAVO, 1987). Hoje, sabe-se que a

dengue grave ocorre como consequência de um mecanismo complexo, em que o vírus, o hospedeiro e sua resposta imune interagem de forma que ocorra a doença grave em 2 a 4% dos indivíduos com infecção secundária (GUZMÁN; KOURI; HALSTEAD, 2000). Publicou-se em 1987, uma hipótese integral para o desenvolvimento da epidemia de dengue grave: a intersecção dos três fatores (hospedeiro, vírus e epidemiologia) determina a ocorrência de uma epidemia de dengue grave e, para tal, são necessárias alta densidade do vetor, grande circulação viral e uma população susceptível (em risco de infecção secundária) (KOURI; GUZMÁN; BRAVO, 1987). Os fatores epidemiológico e viral determinam a epidemia, já os fatores individuais de risco, tais como sexo, raça, genética e doenças crônicas são fatores de predisposição que tornam a doença mais frequente em certa raça ou grupo etário (HALSTEAD, 1993).

Dentre os fatores do hospedeiro que podem influenciar na gravidade da dengue está o fenômeno denominado aumento anticorpo-dependente (do inglês: *Antibody-Dependent Enhancement - ADE*) como uma possível explicação para a ocorrência de dengue grave em reinfecções por sorotipos diferentes do DENV. Numa infecção secundária com um sorotipo diferente, a presença de pequena quantidade de anticorpos neutralizantes heterotípicos pode evitar a doença grave; por outro lado, na ausência destes, os anticorpos heterotípicos formam complexos com os DENV, que passam a infectar os fagócitos mononucleares com maior eficiência resultando na infecção de um maior número de células (HALSTEAD, 1993; HALSTEAD et al., 1967). Os anticorpos não neutralizantes produzidos na infecção prévia formam complexos com o DENV da infecção atual, ligando-se a receptores Fc γ R de diversas células através de sua porção Fc (fragmento cristalizável). O DENV quando associado ao anticorpo não neutralizante entra de maneira mais eficaz nas células. Essa facilitação na entrada do DENV nas células leva à infecção de um grande número de células e uma maior carga viral (Figura 8). Isso produziria uma quantidade mais elevada de citocinas que atuariam no endotélio levando a um aumento da permeabilidade vascular e da gravidade da dengue (HALSTEAD; O'ROURKE; ALLISON, 1977). O estímulo causado pela liberação da citocina Interferon-gamma (IFN- γ) por células Th CD4+ ativadas ainda agrava este quadro porque aumenta a exposição de Fc γ na membrana dos macrófagos tornando-os mais susceptíveis ao vírus (FIGUEIREDO, 2006). É

razoável supor que o fenômeno ADE possa de fato não só facilitar a entrada do DENV nas células como também comprometer a resposta imune antiviral e contribuir para a imunopatogênese da dengue grave, mas certamente diversos outros fatores contribuem de maneira relevante para a gravidade da dengue, uma vez que casos graves podem também ocorrer sem infecção prévia (CHAREONSIRISUTHIGUL; KALAYANAROOJ; UBOL, 2007).

Uma segunda explicação para a ocorrência de dengue grave em infecções secundárias é pela resposta dos linfócitos T, a chamada Teoria do Pecado Original Antigênico. Em uma primeira infecção, ocorre expansão clonal das populações de células T com maior afinidade pelos epítomos presentes no sorotipo infectante, ocasionando a formação de células de memória para esse sorotipo. Em uma infecção secundária, por outro sorotipo, as células de memória formadas na primeira infecção são ativadas e expandidas mais rapidamente que as células virgens específicas para o sorotipo da infecção atual. As células de memória tem menor afinidade pelo sorotipo infectante e, portanto, menos capacidade de eliminação viral que as células específicas geradas na segunda infecção. No entanto, possuem alta capacidade de liberar citocinas pró-inflamatórias, influenciando na imunopatologia da doença (MONGKOLSAPAYA et al., 2003).

Dentre outros fatores ligados ao hospedeiro, um importante é a influência da genética na patogênese da dengue. Indivíduos de etnia negra teriam mais resistência à dengue grave, como ocorre no Haiti, onde não há casos de dengue grave apesar da transmissão hiperendêmica do DENV e na África, onde há casos raros de dengue grave, apesar da cocirculação dos 4 sorotipos e da alta frequência das epidemias (HALSTEAD, et al., 2001). SNPs em várias moléculas do sistema imunológico já foram associados à patogênese da dengue suportando essa hipótese, como será discutido adiante.

Quanto aos fatores individuais de risco, as crianças encontram-se sob maior risco de desenvolver dengue grave que os adultos (GAMBLE et al., 2000; HALSTEAD; SIMASTHIEN, 1970; JATANASEN; THONGCHAROEN, 1993; NIMMANNITYA, 1987); o sexo feminino apresenta maior risco que o masculino; enfermidades crônicas como

diabetes e asma brônquica aumentam a ocorrência de dengue grave e os brancos estão sob maior risco que os negros (GUZMÁN; KOURI; BRAVO, 1999).

3.6.2 Imunologia da infecção pelo DENV

O conhecimento das interações parasita-hospedeiro auxilia a compreensão dos mecanismos imunes desenvolvidos pelo hospedeiro para controlar uma infecção. Esse controle é necessário tanto no desenvolvimento de respostas de proteção, com eliminação da infecção, quanto no balanceamento do próprio sistema imunológico evitando mecanismos imunes prejudiciais que propiciam a evolução para um quadro clínico mais grave ou fatal.

A eliminação da infecção pelo DENV se dá de maneira rápida e eficiente na maior parte dos casos, normalmente não ultrapassando 5 ou 6 dias após o início dos sinais e sintomas. Mecanismos têm sido propostos a fim de explicar de que forma a resposta imune contra o DENV está relacionada à exacerbação dos quadros clínicos da infecção. Sabe-se que a produção de citocinas por células infectadas pelo DENV desempenha um papel importante na patogênese da doença (FIGUEIREDO, 2012).

Apesar dos mecanismos imunológicos não estarem completamente elucidados, as respostas imune inata e adaptativa do hospedeiro exercem importante função na determinação na história natural da dengue. A resposta imune inata é induzida rapidamente e age como uma primeira-linha de defesa até que a resposta imune adaptativa específica passe a agir (Figura 11). Diferenças nas respostas mediadas por anticorpos, células T e citocinas podem ser percebidas entre pacientes com os diferentes quadros clínicos da dengue (SENEVIRATNE; MALAVIGE; DE SILVA, 2006).

Na resposta inata contra o DENV, atuam principalmente as DCs, células natural *killer* (NK) e os componentes ativos do sistema complemento. A resposta imune adquirida é mediada pelos linfócitos T (Th ou T CD4⁺ e T citotóxicos - Tc ou T CD8⁺) e por anticorpos, produzidos por células derivadas dos linfócitos B.

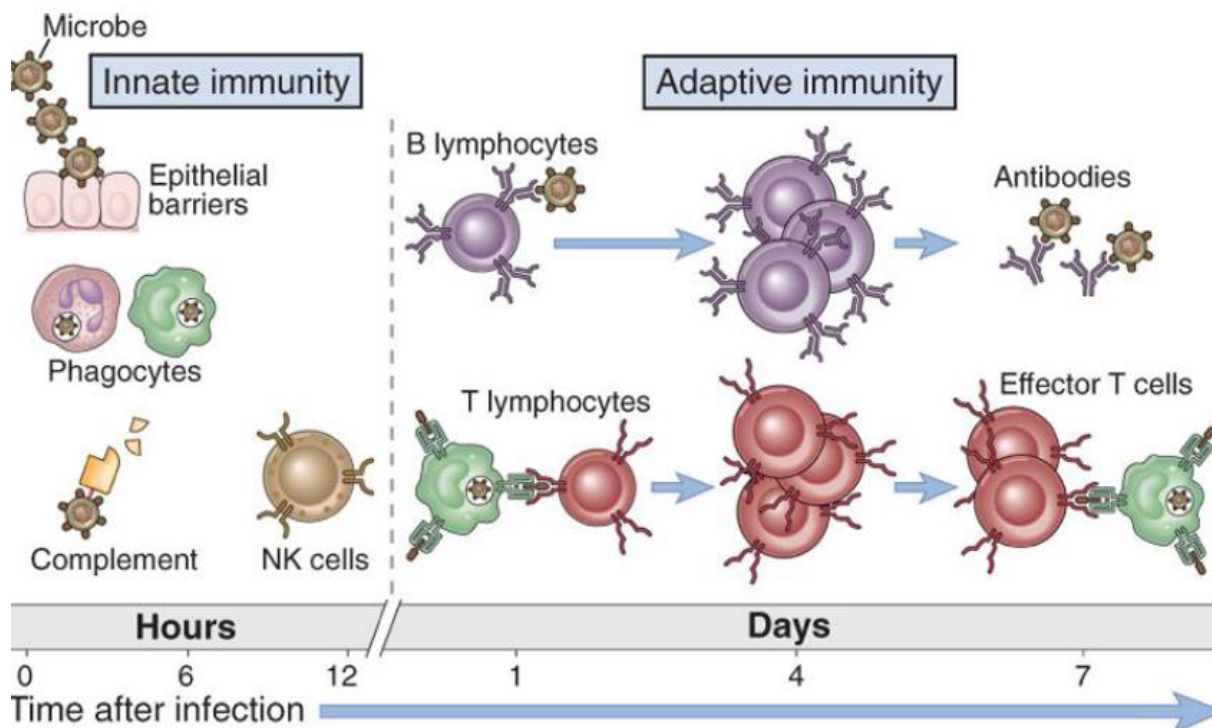


Figura 11. Respostas imune inata e adaptativa à infecção viral. Os mecanismos da resposta imune inata promovem a defesa inicial contra infecções e consistem na ação das barreiras mecânicas, das células fagocitárias, do sistema complemento e das células Natural *Killer*. A resposta imune adaptativa é desenvolvida posteriormente e consiste na ativação dos linfócitos T e B.

Fonte: Elsevier. Abbas et al.: Cellular and Molecular Immunology. Disponível em: www.studentconsult.com.

3.6.2.1 Respostas Imunológicas

3.6.2.1.1 *Imunidade inata*

Os principais componentes da resposta imune inata contra vírus são representados pelas DCs, sistema complemento e células NK.

As DCs são células apresentadoras de antígenos (do inglês: *Antigen-Presenting Cells* - APCs) que compreendem menos de 1% das células do sangue periférico (STEINMAM, 1991) e são cruciais na ligação entre as respostas imune inata e adaptativa. Após o reconhecimento e processamento do antígeno, as DCs o apresenta às células T e direcionam as respostas ao antígeno como tolerância, imunidade ou memória (KELSALL et al., 2002). Como já dito anteriormente, na entrada do DENV na

célula hospedeira, ocorre a ativação e o amadurecimento das DCs implicado na expressão de citocinas (HO et al., 2001). Este evento é fundamental para o controle inicial da infecção viral e a mediação para a resposta imune adaptativa através da ativação de linfócitos T e B virgens e também de células de memória (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

A produção de citocinas pelas DCs e pelos macrófagos estimulam a proliferação de células NK, já nos primeiros dias após a infecção. Juntamente com os linfócitos T CD8⁺ posteriormente estimulados, as células NK possuem um importante papel no controle da infecção (AZEREDO et al., 2006). Essas células estão presentes principalmente nos tecidos linfoides periféricos e atuam de forma direta, destruindo células infectadas, e de forma indireta, secretando citocinas. Algumas horas após a infecção será produzido Interferon-alfa (INF- α) pelas DCs, que age como antiviral (HO et al., 2001) e Interleucina-12 (IL-12) pelos fagócitos mononucleares. Essa citocina ativa ainda mais células NK para a eliminação dos patógenos intracelulares como o DENV. Uma vez ativadas, as células NK produzem INF- γ (MURPHY, 2011), o qual apresenta atividade antiviral (LIBRATY et al., 2001).

Estudos recentes começam a esclarecer a dupla função do sistema complemento na proteção contra o DENV (AVIRUTNAN et al., 2011). Este sistema, composto por mais de 30 diferentes proteínas solúveis e de superfície, é um importante componente da resposta imune inata. Pode ser ativado pelas vias clássica e alternativa, e controla as infecções virais através de múltiplos mecanismos: lise de “virions” ou de células infectadas, produção de anafilatoxinas e indução de respostas pelas células B e T (LOBO et al., 2014).

3.6.2.1.2 Imunidade Adaptativa

3.6.2.1.2.1 Resposta mediada por células T CD8⁺

As células T CD8⁺ específicas para o DENV reconhecem células infectadas e respondem com um conjunto diversificado de funções efetoras, incluindo proliferação, lise de células-alvo e a produção de uma variedade de citocinas (ROTHMAN, 2011).

A resposta imune celular citotóxica ocorre sob estímulo das proteínas NS1, NS3 e E dos DENV (CHAMBERS et al., 1990; KURANE; ENNIS, 1992). Os linfócitos T CD8⁺ ativados reconhecem e eliminam as células que tiveram os antígenos virais expressos e apresentados por APCs, efetuando uma ação direta às células infectadas através da secreção de perforinas e granzimas que levam à lise celular.

As células T participam ativamente na resposta imune, reduzindo o número de células infectadas com o vírus e conferindo proteção contra reinfecção. A morte e redução de células infectadas pelo DENV é um dos principais mecanismos de controle da infecção viral.

3.6.2.1.2.2 Resposta mediada por células T CD4⁺

Há mais de duas décadas as células T CD4⁺ foram classificadas em dois subgrupos principais de acordo com suas citocinas secretadas (GUPTA; CHATURVEDI, 2009). As células T *helper* 1 (Th1) secretam citocinas com características pró-inflamatórias e são responsáveis pelas reações inflamatórias mediadas por células, hipersensibilidade do tipo retardada e lesão tissular em infecções e doenças autoimunes. As células T *helper* 2 (Th2) secretam citocinas de características anti-inflamatórias e estão associadas com a produção de anticorpos por células B. Infecções com uma resposta imune humoral dominante induzem uma alta expressão de citocinas relacionadas à Th2, enquanto as de resposta de hipersensibilidade do tipo retardada e defesa com domínio da atividade celular, exibem uma alta expressão das citocinas Th1. Na dengue, a resposta Th1 está ligada a recuperação da infecção enquanto uma resposta tipo Th2 leva à exacerbação da doença (GUPTA; CHATURVEDI, 2009).

3.6.2.1.2.3 Resposta mediada por anticorpos

O período de viremia, ou seja, o período no qual o vírus pode ser isolado do sangue circulante, começa cerca de 2 dias antes do início dos sintomas e vai até 5 a 6 dias depois, quando ocorre um *clearance* viral (a eliminação do vírus) da circulação e o aparecimento dos anticorpos neutralizantes (DA FONSECA; FONSECA, 2002).

Estudos sorológicos demonstram a formação de anticorpos neutralizantes, fixadores do complemento e inibidores de hemoaglutinação como resposta à infecção pelo DENV (DA FONSECA; FONSECA, 2002). Anticorpos neutralizantes e inibidores de hemoaglutinação surgem nos primeiros 7 dias da doença e podem durar toda a vida. Os anticorpos fixadores do complemento aparecem entre 7 e 14 dias depois do começo da enfermidade e persistem por curto tempo. Anticorpos heterotípicos aparecem ao mesmo tempo em que aqueles homotípicos, porém, em menor concentração. Reações cruzadas são encontradas em diferentes sorotipos e com outros arbovírus, embora, usualmente, os títulos dos anticorpos específicos se apresentem em concentrações bem mais elevadas. As infecções naturais produzem uma imunidade prolongada a uma reinfecção pelo mesmo sorotipo e protegem contra uma infecção por tipo diferente por um período de apenas 2 a 3 meses (DA FONSECA; FONSECA, 2002).

Quando se fala das respostas ao DENV mediadas por anticorpos em humanos, os principais alvos são as proteínas prM, E e as proteínas não estruturais NS1, NS3 e NS5 (ROTHMAN, 2011). Os anticorpos, principalmente os que se ligam a epítomos da proteína E, promovem lise do envelope ou bloqueio de seus receptores, com consequente neutralização viral. O mecanismo de neutralização relaciona-se à dissociação do dímero da E pela presença do anticorpo, impedindo as alterações conformacionais que levam aos trímeros da proteína E, as quais são importantes na entrada do vírus na célula hospedeira. A neutralização também pode ocorrer obstruindo o sítio de ligação viral ao receptor de membrana celular (ALLISON et al., 1995; CHAMBERS et al., 1990, 1997; KURANE; ENNIS, 1992). A proteína prM forma um heterodímero com a proteína E durante montagem do vírion inicial e é subsequentemente clivada durante a fase final da maturação do vírion. Depois da

clivagem, o fragmento remanescente (a proteína M) está completamente oculto pelos dímeros da proteína E do vírion maduro e torna-se inacessível para a ligação do anticorpo. Os anticorpos neutralizantes são direcionados contra a proteína E e agem em todos os epítomos próximos (ROTHMAN, 2011). Quanto aos anticorpos produzidos contra proteínas não estruturais, foi visto que os anticorpos contra a NS1 induzem apoptose de células endoteliais de maneira caspase-dependente (MALAVIGE et al., 2004).

Nos pacientes com dengue, a resposta humoral produzida por plasmócitos resultantes da ativação de linfócitos B costuma ser vigorosa. As imunoglobulinas M (IgM) específicas são detectáveis a partir do quarto dia, após o início dos sintomas, atingindo os níveis mais elevados por volta do sétimo ou oitavo dia e declinando lentamente, passando a não ser detectáveis após alguns meses. As IgGs específicas são observadas, em níveis baixos, a partir do quarto dia após o início dos sintomas, elevam-se gradualmente atingindo altos teores em duas semanas e mantendo-se detectáveis por vários anos, conferindo imunidade contra o tipo infectante, provavelmente, por toda a vida (FIGUEIREDO; CARLUCCI; DUARTE, 1989). Infecções por dengue em indivíduos que já tiveram contato com outros sorotipos do vírus ou, mesmo, com outros flavivírus (como os vacinados contra a febre amarela), podem alterar o perfil da resposta imune, que passa a ser do tipo anamnóstico ou de infecção secundária (reinfecção), com baixa produção de IgM e liberação intensa e precoce de IgG (RUSSEL, 1971). Depois da ligação com o antígeno, as diferentes subclasses de IgG variam em sua capacidade de ativar a via clássica do complemento. A IgG1 tem sido bastante efetiva, enquanto IgG2 tem sido menos. Altos níveis de IgG1 e IgG4 específicos e baixos níveis de IgG2 são observados em pacientes com dengue grave, comparados com aqueles com dengue não grave (MALAVIGE et al., 2004). Além disso, os pacientes com dengue grave apresentam níveis de Imunoglobulinas E (IgE) totais e dengue-específicos muito mais aumentados que os pacientes com dengue não grave (MALAVIGE et al., 2004).

3.6.2.2 Receptores e citocinas na dengue

Em todas as fases da resposta imune, seja inata ou adaptativa, o papel de citocinas e de receptores envolvidos na entrada do DENV na célula hospedeira e na resposta imune é fundamental. No contexto da infecção pelo DENV, os receptores FcγRIIa, DC-SIGN e receptor da vitamina D (do inglês: *Vitamin D Receptor* - VDR) e as citocinas fator de necrose tumoral alfa (do inglês: *Tumor Necrosis Factor alpha* -TNF-α), Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-6 (IL-6) e INF-γ exercem papel de destaque .

3.6.2.2.1 Receptores na dengue

3.6.2.2.1.1 FcγRIIa

As IgGs exercem inúmeras funções biológicas importantes por interagirem com vários tipos celulares. A base desta interação é a ligação dos domínios Fc da IgG com receptores específicos denominados receptores Fc (do inglês: *Fc receptors* - FcR) presentes nas membranas de células do sistema imune. Assim, os FcR são importantes mediadores da ligação entre as respostas imune humoral e celular (DAERON, 1997). O receptor FcγRIIa (CD32) (Figura 12) é um receptor presente na superfície celular de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas, DCs e células de *Langerhans*. Por ser um receptor de baixa afinidade, a ligação às IgGs monoméricas é ineficiente, mas a ligação à porção Fc das IgGs previamente complexadas ao antígeno multivalente, ou seja, na forma de ICs, ocorre com alta afinidade (DAERON, 1997; VAN DE WINKEL; CAPEL, 1993). O FcγRIIa é o receptor de IgG mais amplamente distribuído entre as células e a sua principal função é a ativação de células acessórias, o que o torna essencial na defesa do organismo contra infecções (OMI et al., 2002). A ligação desse receptor ao DENV opsonizado por IgGs pode ativar os fagócitos, desencadeando uma variedade de respostas biológicas, tais como: fagocitose, endocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpos, liberação de mediadores inflamatórios, captura e *clearance* de ICs, aumento da apresentação de antígenos (VAN DE WINKEL; CAPEL, 1993), transcrição de genes de citocinas (RAVETCH; BOLLAND, 2001), aumento da explosão respiratória (DAERON, 1997), dentre outras. O

FcγRIIIa não reconhece diretamente o antígeno, mas funciona como receptor de membrana para antígenos sem nenhuma especificidade pré-determinada. Quando se liga a esse receptor, o anticorpo confere ao antígeno especificidade para uma grande variedade de células, a maioria das quais são destituídas de estruturas de reconhecimento de antígeno (DAERON, 1997) (Figura 13). O DENV utiliza o FcγRIIIa para amplificar sua infecção nas células, pelo efeito denominado ADE, como já discutido.

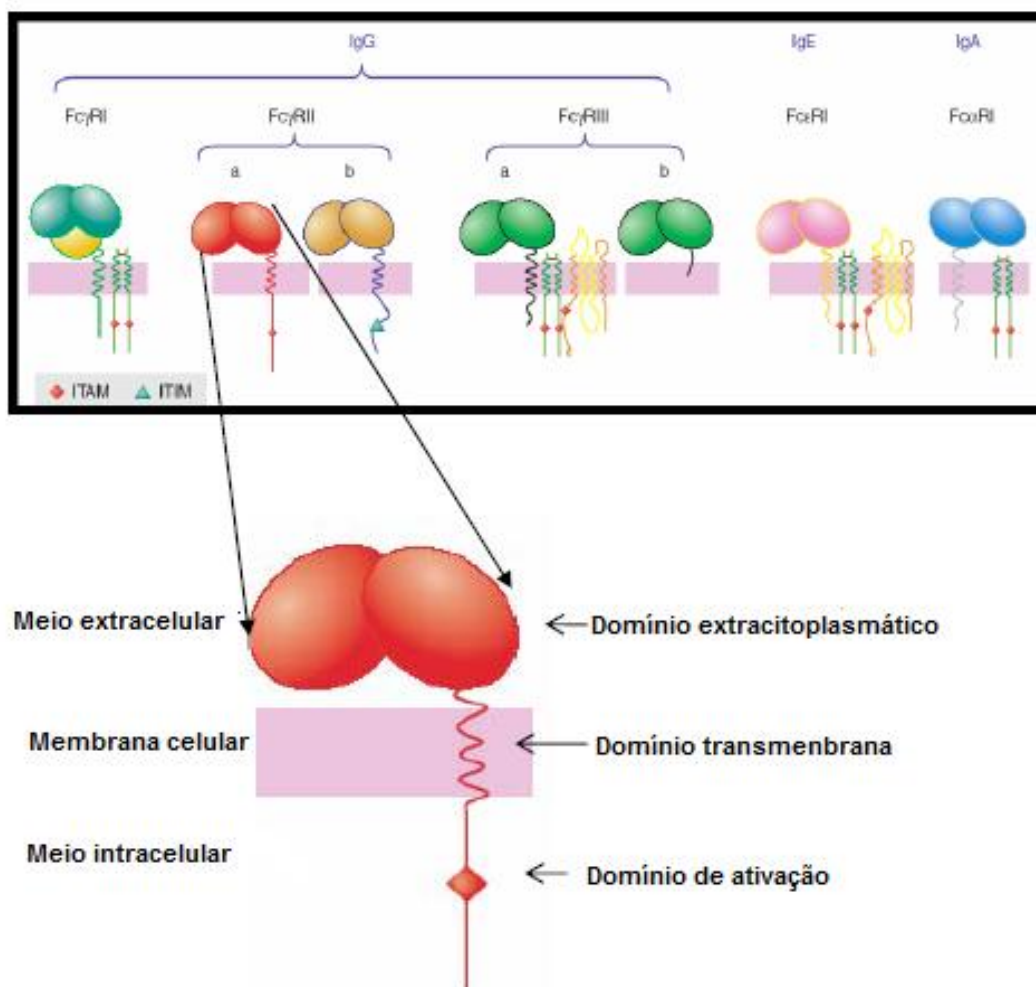


Figura 12. Representação esquemática dos receptores Fc, com destaque para o receptor FcγRIIIa. ITAM: Sequência de Ativação de Imunoreceptor baseada em tirosina (do inglês: *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*); ITIM: Sequência de inibição de Imunoreceptor baseada em tirosina (do inglês: *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*).
Fonte: adaptado de Menéndez (2010).

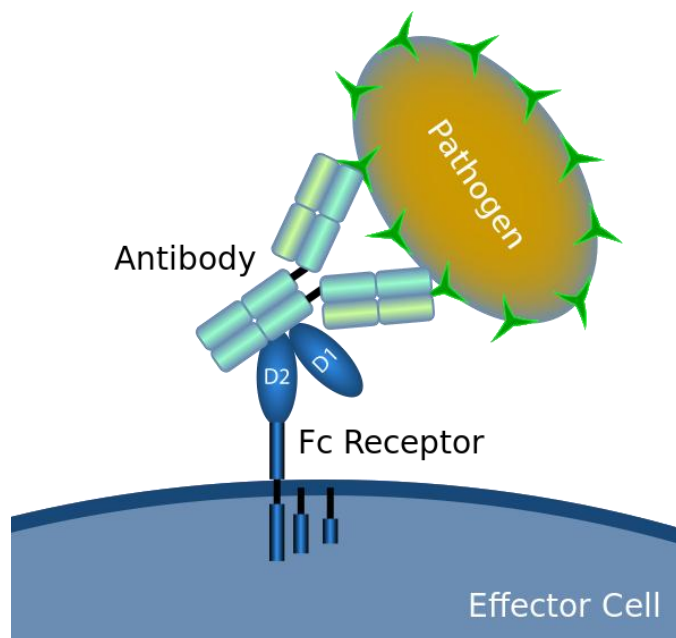


Figura 13. Esquema mostrando o receptor Fc interagindo com um patógeno revestido por anticorpo.
 Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Fc_receptor_schematic.svg.

3.6.2.2.1.2 DC-SIGN (CD209)

A molécula DC-SIGN (Figura 14), também conhecida pelo nome do gene que a codifica, CD209, é um receptor que tem alta afinidade pela molécula de ICAM-3. É um receptor de fixação natural dos DENV, expresso na superfície das DCs e macrófagos, dentre outras células (NAVARRO-SANCHEZ et al., 2003; TASSANEETRITHEP et al., 2003; LOKE et al., 2002). Após a introdução do DENV na pele, devido à sua presença no local anatômico da infecção inicial, as DCs imaturas são as primeiras células a serem infectadas. Além disso, as DCs imaturas são mais permissivas à infecção pelo DENV que as DCs maduras, monócitos e macrófagos (WU et al., 2000). A entrada do DENV nas DCs mediada pelo receptor DC-SIGN permite a infecção produtiva, liberando virions capazes de transmitir a infecção a células susceptíveis. Mais precisamente, o DC-SIGN é uma proteína transmembrana tetramérica, membro da família das lectinas tipo C e dependentes de cálcio. Atua reconhecendo resíduos de manose presentes na proteína E do DENV e assim, medeia o processo de endocitose viral (NAVARRO-SANCHEZ; DESPRES; CEDILLO-BARRON, 2005; MITCHELL;

FADDEN; DRICKAMER, 2001). O DC-SIGN é composto por 4 domínios: o citoplasmático, responsável pela sinalização e internalização; o transmembrana; sete a oito repetições que implicam em sua tetramerização e o domínio de reconhecimento de carboidrato (do inglês: *Carbohydrate Recognition Domain* - CRD) (MITCHELL; FADDEN; DRICKAMER, 2001). De acordo com um estudo *in vitro*, a infecção pelo DENV leva a um amadurecimento e ativação tanto das DCs infectadas, quanto das DCs vizinhas não infectadas (LIBRATY et al., 2001). A ativação e o amadurecimento das DCs implicam na expressão de moléculas na sua superfície e também da expressão de citocinas (Ho et al. 2001).

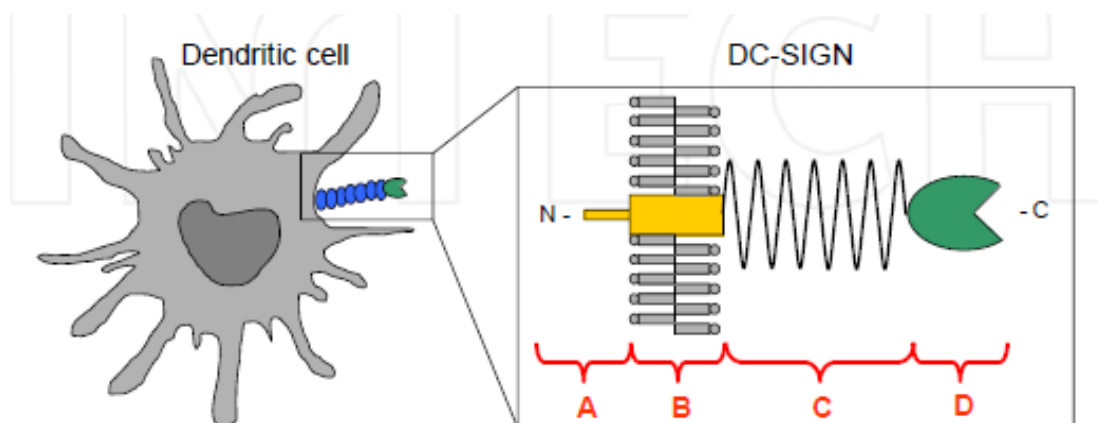


Figure 14. Estrutura do receptor DC-SIGN na superfície de uma célula dendrítica. A - domínio citoplasmático; B - domínio transmembrana; C - sete a oito repetições, responsáveis pela tetramerização do receptor e D - domínio de reconhecimento de carboidrato.

Fonte: Alen; Schols (2012).

3.6.2.2.1.3 VDR

A Vitamina D tem efeitos anti-inflamatórios, como a redução da produção de citocinas pelas células T e de IgGs pelas células B (DANIEL et al., 2005) e tem suas funções exercidas por meio do receptor VDR. Por mediar as funções da vitamina D e por ser expresso em células do sistema imune, o VDR tem papel importante na imunomodulação. Este receptor pertence à superfamília de receptores nucleares hormonais e funciona como um fator de transcrição ativado para mediar os efeitos da vitamina D na sua forma hormonal, a 1,25 diidroxivitamin D3 (1,25(OH)₂D3)

(PETERLIK; CROSS, 2005). Na ausência do VDR a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fica livre no citoplasma (NAGPAL; NA; RATHANACHALAM, 2005). Quando um linfócito T virgem tem seu receptor (do inglês: *T-Cell Receptor* - TCR) exposto a um antígeno apresentado por uma APC, o gene que codifica o VDR é expresso. O VDR produzido se liga então à $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no citoplasma da célula T. Após essa ligação, o VDR volta ao núcleo e ativa o gene que codifica a fosfolipase C gamma 1 (do inglês: *Phospholipase C gamma 1* - $\text{PLC}\gamma 1$). Essa proteína tem função central na ativação completa do linfócito T (JOSEPH et al., 2012; PROVVEDINI et al., 1983; VONESSEN et al., 2010). Assim, a expressão do VDR é fundamental na ativação completa dos linfócitos T virgens (VONESSEN et al., 2010) (Figura 15).

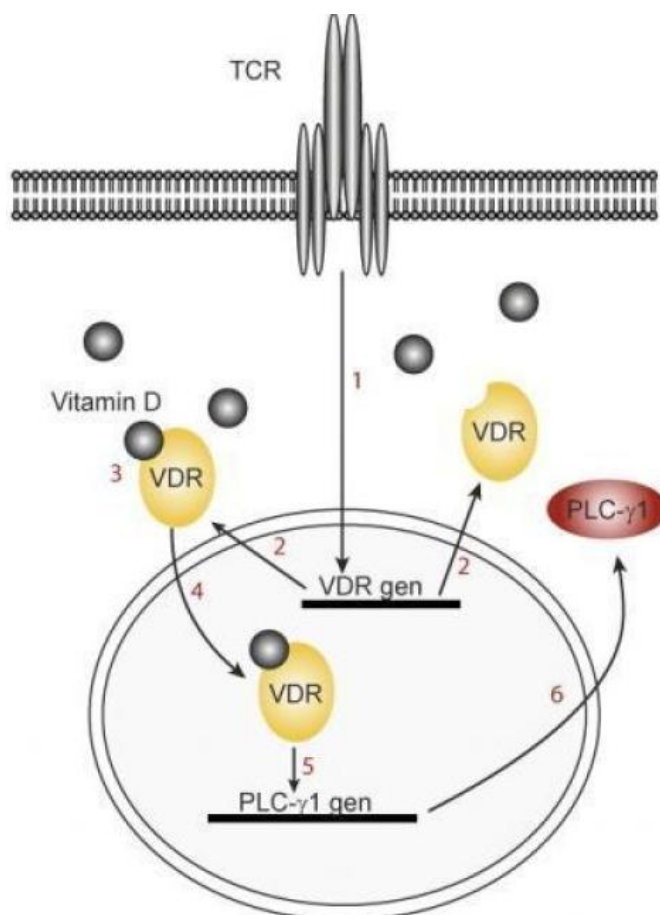


Figura 15. Representação esquemática da atuação do receptor VDR no sistema imune. Ao reconhecer antígenos com o seu receptor (TCR), a célula T envia sinais de ativação da expressão gênica para o gene que codifica o receptor VDR (1). Ocorre a produção de VDR (2) e a ligação deste com a vitamina D no citoplasma celular (3). Após essa ligação, o VDR volta ao núcleo celular e ativa o gene que codifica a proteína fosfolipase C gamma 1 ($\text{PLC}\gamma 1$) (5). Esta proteína é então sintetizada (6) e as células T são mantidas ativas.

Fonte: <http://vitaminad.nositio.net/news/vitaminad-autoimunes.htm>

A expressão do VDR e a ligação deste à $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tem importante papel tanto no desenvolvimento e diferenciação, quanto na função efetora das células T (CANGANELLA; KATO; HORIKOSHI, 2000), participando da ativação de monócitos, que são importantes sítios da infecção e replicação do DENV. Além disso, o VDR também atua na supressão da produção de IgGs e da proliferação de linfócitos B (MACDONALD et al., 1994; HALSTEAD; O'ROURKE; ALLISON, 1977). Outro papel imunorregulatório da vitamina D é a regulação negativa da expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como o $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ nas células do sistema imune (PEURTA-GUARDO et al., 2012; VIDYARANI et al., 2007). Foi demonstrado que a vitamina D suprime a replicação do DENV (PEURTA-GUARDO et al., 2012). Um estudo recente relatou níveis mais elevados de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em pacientes infectados pelo DENV, em relação aos controles aparentemente saudáveis (ALAGARASU et al., 2012). Além disso, tem sido demonstrado que a vitamina D regula positivamente a expressão de receptores de entrada do DENV, como o DC-SIGN e o $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ (RIGBY et al., 1984; TORRES et al., 2010; ZHU; ZHOU; ZHENG, 2002)

3.6.2.2.2 *Citocinas na dengue*

Citocinas são bastante envolvidas na resistência a infecções e na exarcebação do quadro clínico das infecções. Estas proteínas regulam tanto o início quanto a manutenção e equilíbrio das respostas imunológicas contra patógenos (DITTMER et al., 2001), além de selecionar o tipo de resposta imune de acordo com o perfil da infecção (ABBAS; LICHTMANN, 2007). Experimentos realizados em camundongos com inativação de genes que codificam citocinas têm revelado como essas proteínas regulam as respostas imune contra infecções (DITTMER et al., 2001; LIBLAU; SINGER; MCDEVITT, 1995). O centro dessa regulação são as células T CD4^+ , que como já dito, são subdivididas em células Th1 e Th2, de acordo com o tipo de citocinas que produzem. Células Th1 produzem, por exemplo, $\text{INF-}\gamma$, o qual induz a resposta imune celular e neutralização viral por IgG2 (LIBLAU; SINGER; MCDEVITT, 1995). Em

contraste, as células Th2 secretam, por exemplo, IL-4, que estimula a proliferação de células B e a diferenciação de IgGs em IgG1 e IgE (LIBLAU; SINGER; MCDEVITT, 1995). Sabe-se que em humanos a IL-4 estimula a diferenciação das IgGs em IgG4 (LEE et al., 2013). O balanço entre essas duas respostas tem papel importante na imunidade e na patogênese de muitas doenças infecciosas (CLERICI; SHEARER, 1993; CONSTANT; BOTTOMLY, 1997; GAZZINELLI; GIESE; MORSE, 1994; KANAGAWA et al., 1993; MORAWETZ et al., 1994; SITBON et al., 1985) como a dengue (Figura 16).

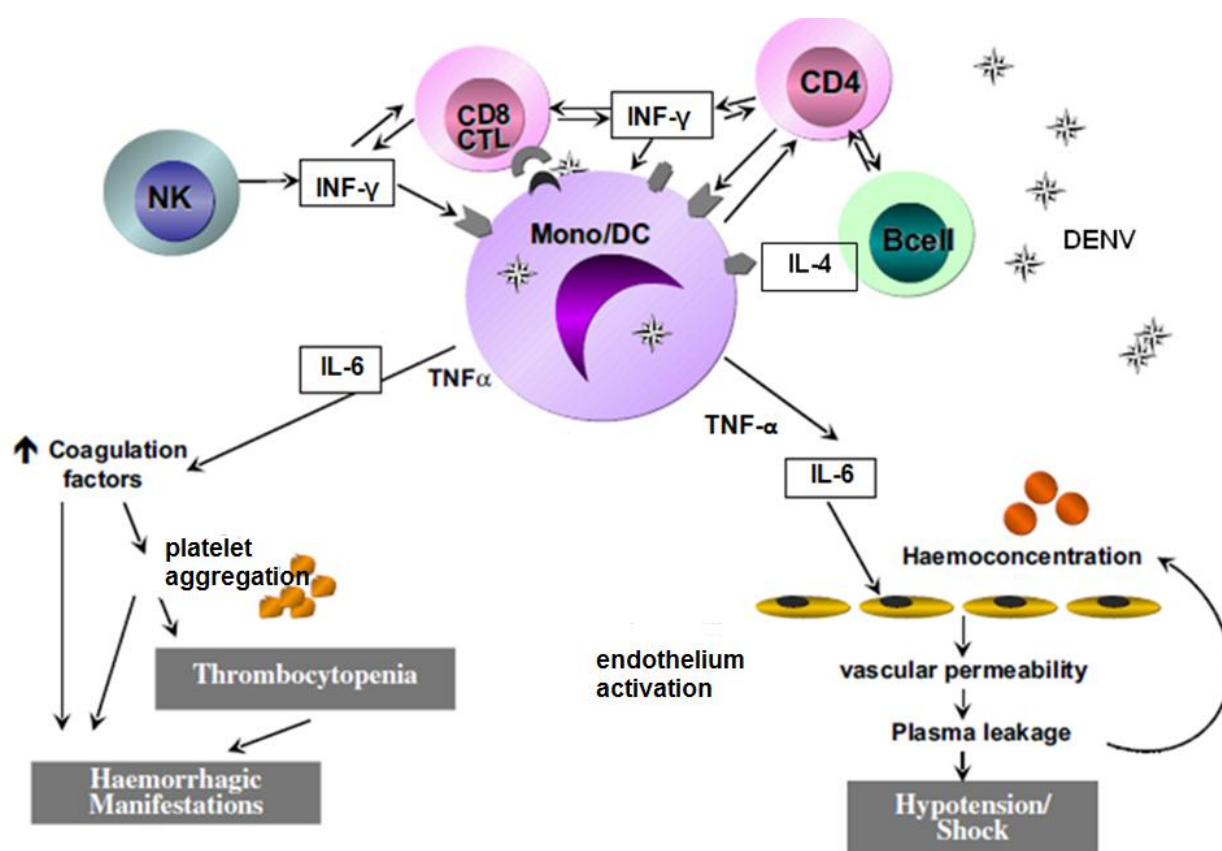


Figura 16. Modelo hipotético sobre a atuação das citocinas TNF- α , INF- γ , IL-4 e IL-6 durante a infecção pelo vírus da dengue (DENV). Detalhes sobre a atuação de cada citocina se encontram no texto. Fonte: adaptada de Bozza et al. (2008).

Um estudo realizado por Chaturvedi et al. (1999) mostrou o momento em que citocinas envolvidas na resposta imunológica contra o DENV aparecem no plasma de pacientes infectados. As primeiras citocinas a apresentarem altos níveis plasmáticos em células infectadas com o DENV são TNF- α (primeiro dia de infecção, com valor

máximo no segundo, declinando rapidamente e estabilizando em um valor médio no quinto dia), INF- γ (segundo dia de infecção, com valor máximo no terceiro e desaparecendo no sexto dia após uma queda brusca) e IL-6 (primeiro dia de infecção, com valor máximo no segundo, declinando rapidamente após o quarto dia e estabilizando em um valor médio no oitavo dia), dentre outras. As citocinas que aparecem mais tardiamente são IL-4 (sexto dia de infecção, com valor máximo no sétimo), dentre outras. Os achados do estudo de Chaturvedi et al. (1999) ainda mostram que ocorre uma mudança da resposta Th1, observada na fase inicial da infecção (nos três primeiros dias), para a resposta Th2 na fase mais tardia da infecção (após o quarto dia).

3.6.2.2.2.1 TNF- α

Citocinas pró-inflamatórias apresentam um importante papel na patogênese da dengue grave, especialmente o TNF- α , o INF- γ e a IL-6 (CHAKRAVARTI; KUMARIA, 2006; RESTREPO et al., 2008). O TNF- α é uma citocina multifuncional liberada por monócitos infectados pelo DENV e é considerada o mais importante modulador inflamatório (CARDIER et al., 2005; YEN et al., 2008). Dentre as funções do TNF- α estão a indução da produção de outras citocinas e quimiocinas pelas células do sistema imune e da expressão de moléculas de adesão, além do aumento da permeabilidade do endotélio e o conseqüente aumento do número de células mononucleadas no local da inflamação (CERAMI, 1993; VASSALLI, 1992). A principal função fisiológica do TNF- α é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção e ativar essas células para erradicar os microrganismos, sendo responsável pela regulação da imunidade inata e mediação da inflamação aguda. A sinalização do TNF- α é realizada principalmente por meio de receptores de superfície celular, que ativam fatores de transcrição nucleares promotores de vários genes pró-inflamatórios (WALLACH et al., 1999). Além de induzir as vias de produção de reativos de oxigênio, a ligação do TNF- α aos seus receptores pode ativar a via das caspases e desencadear o processo de apoptose celular (HEHLGANS; PFEFFER, 2005). A sua

potente ação biológica propicia um intenso dano tecidual e quando liberado em altas concentrações sistemicamente, pode ser responsável por quadros de hipotensão, extravasamento plasmático e estimulação de cascatas de coagulação em condições patológicas como a dengue (PFEFFER, 2003; PINTO et al., 1999).

O aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α tem sido associado à dengue (CHATURVEDI et al., 2000; HARAPAN et al., 2013). Dewi, Takasaki e Kurane (2004) mostraram que o TNF- α é capaz de aumentar a permeabilidade das células do endotélio *in vitro*, o que sugere seu possível papel na dengue grave. Em um modelo animal de dengue grave induzida, altos níveis de TNF- α em alguns tecidos foram correlacionados com o apoptose de células endoteliais e hemorragia (CHEN et al., 2007). Por fim, o TNF- α pode ser associado à patogênese da dengue por vários motivos: a) aumenta a permeabilidade capilar; b) aumenta a expressão de fator tecidual em monócitos e células endoteliais; c) diminui a expressão de trombomodulina em células endoteliais; d) influência na produção de IL-6, atuando indiretamente na coagulação e fibrinólise e e) medeia a ativação da morte induzida de células T (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

3.6.2.2.2 IL-4

A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória multifuncional, que se liga ao receptor de IL-4 (IL-4R) para mediar a diferenciação de células T ativada por antígenos (NELMS et al., 1999). DCs infectadas pelo DENV induzem a proliferação de células T e a produção de IL-4 (HO et al., 2004). Das citocinas associadas à patogênese da dengue, a IL-4 se destaca por seu papel na mudança da resposta imune Th1 para a resposta Th2 (CHATURVEDI; NAGAR; SHRIVASTAVA, 2006). Essa citocina é primariamente produzida pelas células Th2 e regula o crescimento das células B e a troca de classe das IgGs, assim como suprime a resposta Th1 (LOKE et al., 2002) (Figura 17). Altos níveis plasmáticos de IL-4 têm sido associados à dengue grave (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009). A resposta Th1 tem sido relacionada à eliminação da infecção, enquanto que a resposta Th2, cujo principal indutor é a IL-4, (BERNASCONI et al.,

1995; CHEN et al., 2005, 2007; GREEN et al., 1999; SPELLBERG; EDWARDS, 2001), tende a levar à patologia severa e à exarcebação da doença, com persistência da infecção (MOSMANN; SAD, 1996). Como já dito, das citocinas envolvidas na patogênese da dengue, as níveis de TNF- α , INF- γ e IL-6 somem rapidamente, enquanto que os níveis de IL-4 sobem do quarto ao oitavo dia de infecção. Estudos demonstram que o aumento de IL-4 e consequentemente da resposta Th2 acompanham a defeverscência (MABALIRAJAN et al., 2001). Em geral, níveis plasmáticos de citocinas da resposta Th1 são altos na dengue não grave, somente algumas permanecendo na dengue grave. Já níveis plasmáticos de citocinas da resposta Th2 são elevados somente na dengue grave (CHATURVEDI et al., 1999, 2000; CHEN et al., 2005, 2007; GREEN et al., 1999; YEH et al., 2006).

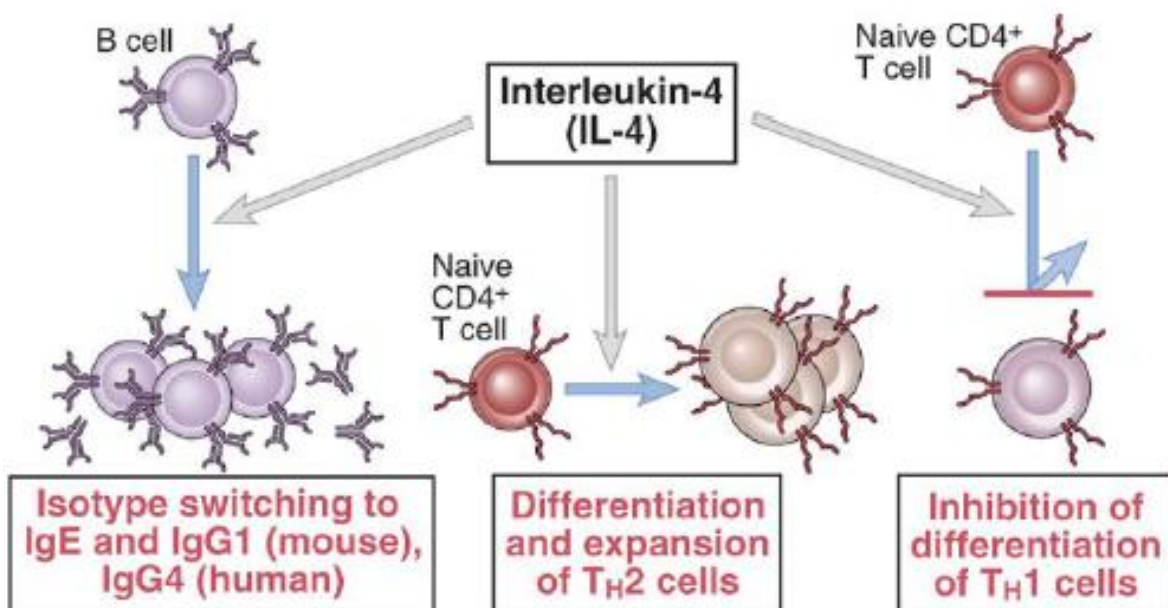


Figura 17. Esquema das funções da citocina IL-4.
 Fonte: Elsevier. Abbas et al.: Cellular and Molecular Immunology.
 Disponível em: www.studentconsult.com.

3.6.2.2.3 IL-6

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que possui função anti e pró-inflamatória e é o maior mediador da febre e das reações da fase aguda de infecções. É produzida

durante as respostas imunes inata e adaptativa por linfócitos T e B, macrófagos, monócitos, fibroblastos, células endoteliais ativadas e DCs (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; TERRY; LOUKACI; GREEN, 2000). Um estudo confirmou que a IL-6 possui importante influência na coagulação e na fibrinólise (SHEN et al., 2001). Essa citocina é associada com a dengue pelos seguintes motivos: a) juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias, potencializa a cascata de coagulação; b) diminui a produção de TNF- α e de seus receptores e c) é um potente indutor da febre (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009). Altas concentrações de IL-6 têm sido envolvidas no vazamento de plasma e desenvolvimento de choque hipovolêmico (OGAWA; GRANT, 2007). Em um modelo animal, os níveis plasmáticos de IL-6 se mostraram altos em animais infectados pelo DENV (ATRASHEUSKAYA et al., 2003). Em humanos os níveis plasmáticos de IL-6 têm sido altos em pacientes com dengue grave (JUFFRIE et al., 2001; RESTREPO et al., 2008).

A IL-6 tem importante papel no balanço entre as respostas Th1 e Th2. Essa citocina promove a produção de IL-4 pelas células T e a consequente diferenciação das células T CD4⁺ em células Th2. Além disso, a IL-6 inibe a produção de INF- γ e, conseqüentemente, a diferenciação das células T CD4⁺ em Th1 (DIEHL; RINCÓN, 2002). Foi demonstrado que a diferenciação para Th2 induzida pela IL-6 é dependente de IL-4, mas a inibição da diferenciação para Th1 não é (DIEHL; RINCÓN, 2002). No estudo de Chaturvedi et al. (1999), comentado acima, foi visto que inicialmente a dengue é caracterizada pela presença de citocinas Th1 e posteriormente pelas citocinas da resposta Th2. A IL-6 é uma citocina considerada Th2 por induzir a produção de anticorpos por células B e por atuar na inflamação aguda. Mesmo assim, é uma citocina que aparece em níveis altos no plasma no início da dengue (ROMAGNANI, 1994). Embora seus níveis diminuam no quarto dia, persiste em níveis baixos (CHATURVEDI et al., 1999).

3.6.2.2.2.4 INF- γ

O INF- γ , único representante da classe de interferon do tipo II, é considerado uma citocina efetora da resposta imune inata e adaptativa, característica das respostas Th1. É produzido e secretado por células NK e linfócitos T (ABBAS; LICHTMANN, 2007) e exerce papel crítico na imunidade inata e adaptativa contra infecções virais. Entre suas ações biológicas está a ativação de macrófagos, facilitando a ação dos linfócitos T e das células NK na eliminação dos micro-organismos fagocitados. Além disso, essa citocina estimula: a síntese de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico; a expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (do inglês: *Major Histocompatibility Complex* - MHC) de classe I e II e de moléculas coestimulatórias nas células APCs; a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para Th1; a inibição da resposta Th2; os linfócitos B para mudança de classe, especialmente para IgG2; a ativação do complemento, permitindo a fagocitose de micro-organismos opsonizados; a ativação de neutrófilos e a atividade citolítica das células NK (SCHOENBORN; WILSON, 2007) (Figura 18).

A liberação de INF- γ por linfócitos T é ativada durante a infecção pelo DENV (WAGENNAR; MAIRUHU; VAN GORP, 2004). Foi visto que esta citocina é significativamente mais vista no plasma de pacientes com dengue grave, quando comparados com pacientes com dengue não grave (BOZZA et al., 2008; HARAPAN et al., 2013). Altos níveis de INF- γ têm sido associados à severidade da dengue (LIBRATY et al., 2002) e foram observados em pacientes da Ásia e da América Latina (AZEREDO et al., 2006). A produção de INF- γ pelas células Th1 ativa a produção de TNF- α , fator tecidual, fator ativador de plaquetas, dentre outros mediadores. Estes participam da ativação das plaquetas e células endoteliais, levando ao consumo das primeiras, ao aumento da permeabilidade endotelial, à hipotensão e conseqüentemente ao choque (MANGADA; ROTHMAN, 2005; MANDAGA et al., 2002).

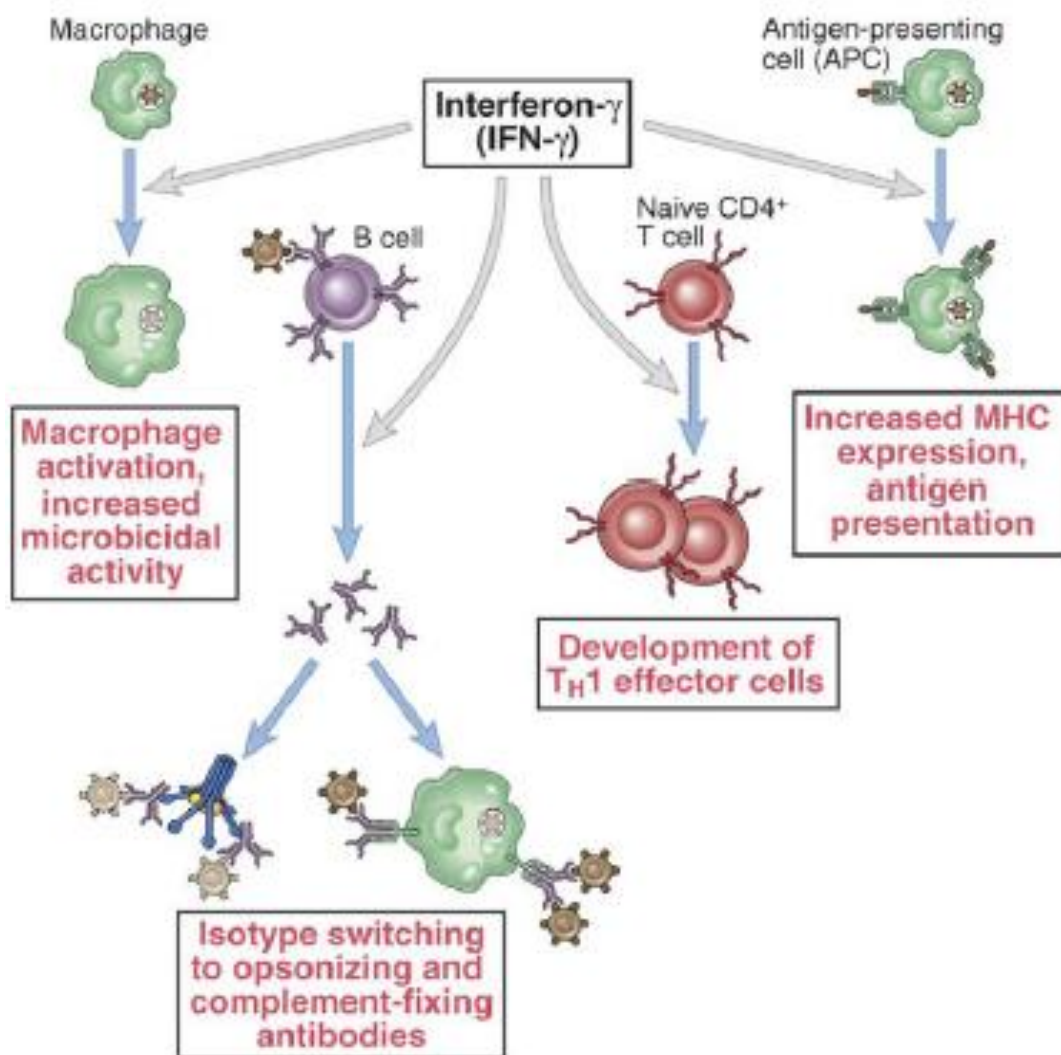


Figura 18. Esquema mostrando algumas funções biológicas da citocina INF- γ .
 Fonte: Elsevier. Abbas et al.: Cellular and Molecular Immunology.
 Disponível em: www.studentconsult.com.

3.7 POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA DENGUE E EM OUTRAS INFECÇÕES

Como visto, a exposição ao DENV provoca uma grande variedade de respostas imunológicas geneticamente controladas no hospedeiro. Estudos epidemiológicos em alguns países confirmam que SNPs em genes que codificam moléculas imunomoduladoras e envolvidos na entrada e na replicação viral (Fc γ RIIa, VDR, CD209, IL-4, IL-6, TNF- α , INF- γ , entre outros) desempenham importante papel na susceptibilidade e resistência à dengue e na severidade da doença (ALAGARASU et

al., 2012; HARAPAN et al., 2013; WAGENAAR; MAIRUHU; VAN GORP, 2004). Acredita-se que o tempo de permanência dos sintomas nos pacientes após a fase aguda da doença, já verificada em vários estudos (GARCÍA et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2005; LOW et al., 2006; SEET; QUEK; LIM, 2007; TEIXEIRA et al., 2010; TRISTÃO-SÁ et al., 2012) também tenha bases genéticas. Somente um estudo verificou a relação de um desses SNPs com a persistência de sintomas da dengue após a fase aguda da doença (GARCÍA et al., 2011).

Foi visto que a presença de certos genótipos de genes que codificam citocinas e de genes que codificam moléculas envolvidos na resposta imune influencia o resultado da infecção pelo DENV (STEPHENS, 2010; TUMANGGER; JAMIL, 2010). Variações na resposta imune como consequência de SNPs nos genes FcγRIIa, VDR e CD209 podem desempenhar um papel importante no caminho que leva aos sintomas da dengue e conseqüentemente no resultado da infecção (SWAMINATHAN; KHANNA, 2009). SNPs em genes que codificam citocinas estão correlacionados com as suas produção e função, potencialmente conferindo flexibilidade para a resposta imune. O estudo desses SNPs como fatores genéticos do hospedeiro pode auxiliar na obtenção de importantes conhecimentos e no desenvolvimento de intervenções terapêuticas e preventivas contra a dengue.

3.7.1 SNP no gene FcγRIIa

O gene FcγRIIa, que codifica o receptor FcγRIIa (CD32) se localiza na região 1q23 e contém sete éxons (PROVENZANO, 2008). Polimorfismos alélicos neste gene geram diferentes isoformas que podem alterar sua afinidade de ligação às subclasses de IgG. O SNP denominado *-131H/R* (rs1801274), na posição 494 da região codificante do éxon 4 (Figura19), altera o AA na posição 131, resultando em duas formas codominantemente expressas de FcγRIIa (SALMON et al., 1992; TATE et al., 1992). O alelo normal, com códon CAT e codificação de histinina (*H*) na posição 131, confere a capacidade de ligação do receptor a IgG2, além de aumentar a afinidade de ligação a IgG3. Já o alelo raro, com códon CGT e codificação de Arginina (*R*) na posição 131,

resulta na ligação eficiente do receptor a IgG1 e IgG3, não se ligando a IgG2 nem a IgG4 (BROUWER et al., 2004; GARCÍA et al., 2011; PROVENZANO, 2008; SALMON et al., 1992; TATE et al., 1992; VAN DE WINKEL; CAPEL, 1993; WARMENRDAM et al., 1991). Assim, variantes polimórficas influenciam na variabilidade da resposta imune e, portanto na patogênese da dengue. Estudos mostram a associação entre o alelo *R* e a proteção recessiva contra o desenvolvimento da dengue grave (COFFEY et al., 2009; LOKE et al., 2002). As subclasses IgG1 e IgG3 são as IgGs predominantes na dengue (KORAKA et al., 2001) e o genótipo *R/R* promove uma ligação eficiente entre o receptor e essas IgGs (VAN DE WINKEL; CAPEL, 1993; VAN SORGE; VAN DER POL; VAN DE WINKEL, 2003). Conseqüentemente, o sinal gerado após a interação entre FcγRIIIa e o complexo DENV/IgG1 ou DENV/IgG3 pode estar associado com uma formação eficiente de fagolisossomos, eliminação dos ICs e, conseqüentemente, com o controle da disseminação viral (FORTHAL; MOOG, 2009; ISRAELSSON et al., 2008; MOI et al., 2010). Isso explica a proteção conferida pelo genótipo *R/R*. Um estudo realizado por García et al. (2011), analisou a relação entre esse SNP e a persistência de sintomas da dengue dois anos após a infecção, que ocorreu em 55 dos 97 pacientes do estudo. Os autores associaram a persistência de sintomas clínicos da dengue na fase de convalescença com o genótipo *H/H* ($p=0,027$), sugerindo um distúrbio auto-imune como explicação para os sintomas clínicos da dengue persistirem.

Sendo assim, a persistência de sintomas clínicos após a fase aguda da dengue pode ser influenciada pelo SNP *-131H/R* no gene FcγRIIIa (GARCÍA et al., 2010). Por isso, mais estudos relacionando esse SNP com a persistência de sintomas da dengue são necessários para um melhor conhecimento e possível uso dessa relação na melhoria da prevenção e terapia contra a dengue. Além da dengue, esse SNP tem sido associado à susceptibilidade a outras infecções como doença meningocócica (LOKE et al., 2002), infecção por *Streptococcus pneumoniae* (BROUWER et al., 2004) e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (do inglês: *Human Immunodeficiency Virus* - HIV) (YUAN et al., 2003). O genótipo *R/R* tem sido associado à proteção contra infecções causadas por patógenos intracelulares (BOSSUY et al., 2007; COOKE et al., 2003; YEE et al., 2000).

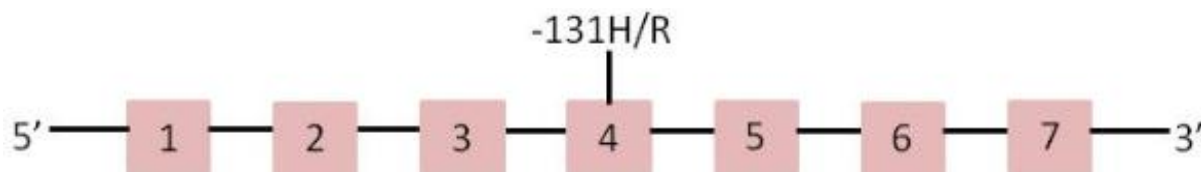


Figura 19. Representação esquemática do gene FcγRIIIa. Os éxons são mostrados em rosa. O tamanho real dos éxons não foi levado em consideração na confecção da ilustração.

3.7.2 SNP no gene CD209

Dentre os fatores genéticos do hospedeiro envolvidos na patogênese da infecção pelo DENV também estão as variações alélicas no promotor do gene CD209. Esse gene é localizado na região 19p13.2-3 e possui 7 éxons (SAKUNTABHAI et al., 2005) (Figura 20). Vários SNPs no promotor do gene CD209 foram descritos e dentre esses, o -336A/G (rs4804803) é importante por afetar a atividade transcricional do gene (MEI-SHU, 2007). Acredita-se que a variante guanina (G) na posição 336 na região promotora do gene CD209 esteja associada com a proteção dominante contra a dengue não grave, mas não contra a dengue grave (COFFEY et al., 2009; SAKUNTABHAI et al., 2005). A menor expressão do CD209, contendo o G na posição 336 do promotor, pode resultar na menor susceptibilidade das DCs ao DENV (NAVARRO-SANCHEZ et al., 2003; TASSANEETRITHEP et al., 2003), o que protegeria somente contra a dengue não grave, uma vez que processos patofisiológicos distintos podem prevalecer na dengue grave (SAKUNTABHAI et al., 2005). Devido a essa influência do gene CD209 na patogênese da dengue e na orientação da doença (grave ou não grave), acredita-se que SNPs no promotor desse gene também podem estar associados à persistência de sintomas clínicos da dengue na fase de convalescença dessa doença. Além da dengue, o SNP -336A/G também tem sido associado a: infecções por vírus como HIV, vírus da hepatite C (do inglês: *Hepatitis C Virus* - HCV), citomegalovírus, vírus Ebola e SARS coronavírus; infecções por bactérias como a *Micobacterium tuberculosis* e por parasitas como *Leishmania* e *Schistosoma mansoni* (HALARY et al., 2002; KLIMSTRA et al., 2003; TAILLEUX et al., 2003; VAN KOOYK; APPELMELK; GEIJTENBEEK, 2003; YANG et al., 2004).

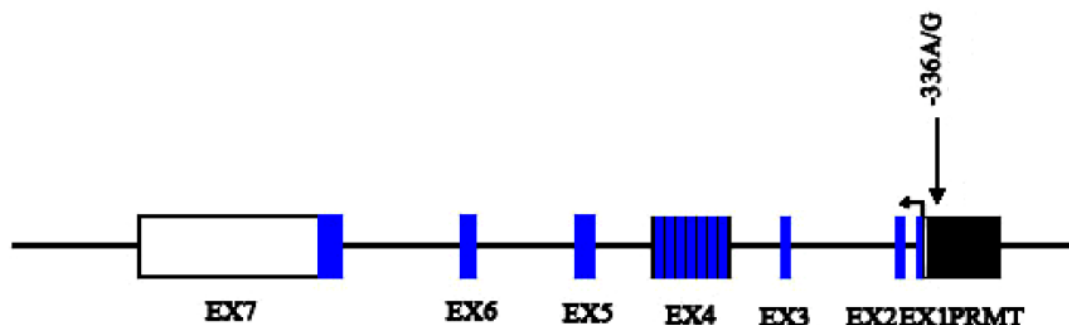


Figura 20. Representação esquemática do gene CD209. A região promotora está em preto, os éxons em azul e a região não traduzida está em branco.

Fonte: adaptada de Mei-Chu, 2007.

3.7.3 SNP no gene VDR

Um componente ligado ao sistema imune e que também influencia na severidade da dengue é o SNP denominado *TaqI* (rs731236) no gene VDR, que codifica o receptor de mesmo nome, VDR. Esse gene é localizado na região 12q13-14 e possui 11 éxons (LOKE et al., 2002). A troca de timina (*T*) para citosina (*C*) no éxon 9, códon 352 e posição 1056 do gene VDR (Figura 21), é associada com a proteção ou susceptibilidade a determinadas infecções (BELLAMY et al., 1999; GENNARI et al., 1997; ROY et al., 1999). A expressão do VDR pode afetar a susceptibilidade ao desenvolvimento da dengue grave, uma vez que age direta e indiretamente em células alvo da infecção e replicação do DENV (HALTEAD; O'ROURKE; ALLISON, 1977). O alelo com *C* foi associado à proteção contra dengue grave, de modo significativo (COFFEY et al., 2009). Do mesmo modo que o SNP *TaqI* está associado à dengue grave, também pode estar relacionado às manifestações clínicas da dengue após a fase aguda da doença. SNPs no gene VDR também tem sido associados à tuberculose pulmonar (BELLAMY et al., 1999; ROY et al., 1999), à doença periodontal (BORGES, 2006; DE SOUZA, 2007) e à doença renal crônica (DE SOUZA, 2007).

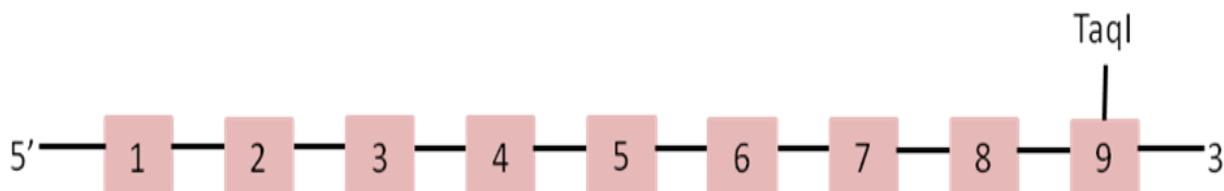


Figura 21. Representação esquemática gene VDR. Os éxons estão em rosa. O tamanho real dos éxons não foi levado em consideração na confecção da ilustração.

3.7.4 SNP no gene TNF- α

Outra variável do sistema imune que influencia nos sintomas clínicos da dengue é o polimorfismo no promotor do gene TNF- α , que codifica a citocina TNF- α (FERNANDEZ-MESTRE et al., 2004). Esse gene é localizado na região MHC de classe III, no local 6p21.1–21.3 (BOIN et al., 2001) e possui 4 éxons (Figura 22). O SNP denominado -308A/G (rs1800629), localizado 308 nucleotídeos antes do sítio de início da transcrição, varia entre o alelo comum com adenina (A) e o alelo mais raro com G. Ele afeta a transcrição da citocina pró-inflamatória TNF- α , causando variações na sua produção e, conseqüentemente, nas respostas inflamatórias (REYNARD; TURNER; NAVARRETE, 2000). Estudos mostram que o alelo A é um forte ativador transcricional, associado com altos níveis de TNF- α , (WILSON et al., 1997). Altos níveis de TNF- α têm sido associados à dengue grave (AZEREDO et al., 2001; GAGNON et al., 2002) e, segundo Perez et al. (2010), essa associação é devido à grande influência do TNF- α no aumento da permeabilidade vascular. De modo geral, os estudos mostram que há uma relação direta entre o grau de ativação de citocinas e a severidade da dengue. O elevado nível de expressão de TNF- α está associado ao aumento da morbidade e mortalidade em várias infecções (BOIN et al., 2001) e à maior susceptibilidade ao desenvolvimento da dengue grave (PEREZ et al., 2010). Desse modo, também é importante verificar a relação entre o SNP no promotor do gene da citocina TNF- α e persistência de sintomas clínicos da dengue na fase de convalescença. O genótipo AA, que promove o aumento da produção de TNF- α , também tem sido associado ao aumento da morbidade e mortalidade de várias outras infecções como sepse, malária, doença obstrutiva pulmonar crônica, leishmaniose, hepatite, dentre outras infecções (CZAJA et al., 1999; KNIGHT et al., 1999; LI et al., 1999; MIRA et al., 1999, ROOD et al., 2000).

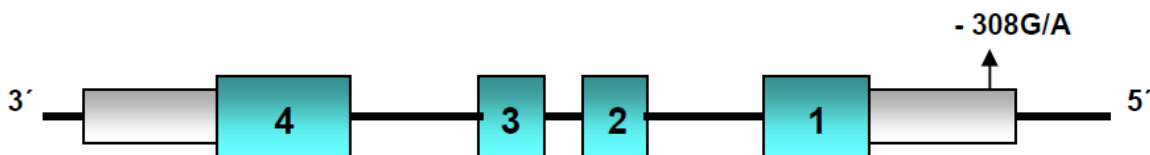


Figura 22. Representação esquemática do gene TNF- α . Os éxons estão em azul e a região promotora em cinza.

Fonte: Conde et al. (2010).

3.7.5 SNP no gene IL-4

O gene que codifica a IL-4 está localizado na região 5q31.1 e possui 4 éxons (CHU et al., 2012). O SNP denominado *-590C/T* (rs2243250), localizado no promotor do gene tem sido associado à redução do risco do desenvolvimento de infecções graves (HUNT et al., 2000). A substituição de uma *C* por uma *T* na posição -590 desse gene aumenta a produção de IL-4 (Figura 23) (BORISH et al., 1995; HUNT et al., 2000). Altos níveis plasmáticos de IL-4 têm sido associados à dengue grave (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009). Sua influência na patogênese da dengue incentiva a realização de estudos sobre sua associação com a persistência de sintomas clínicos da dengue após a fase aguda da infecção. Estudos têm associado esse SNP com malária (LOKOSSOU et al., 2013), infecção pelo vírus da influenza (MORAN et al., 1996); leishmaniose (STAGER et al., 2003), dentre outras infecções.

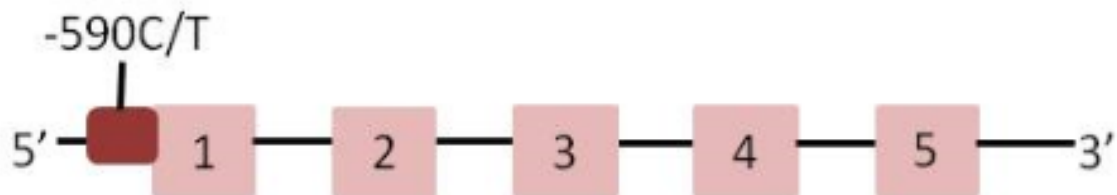


Figura 23. Representação esquemática do gene IL-4. Os éxons estão representados em rosa e a região promotora em vinho. O tamanho real dos éxons não foi levado em consideração na confecção da ilustração.

3.7.6 SNP no gene IL-6

O gene que codifica a IL-6 é localizado na região 7p21.24 e possui 5 éxons (BOWCOCK et al., 1988). SNPs no promotor do gene IL-6 são responsáveis por variações transcricionais que alteram os níveis circulantes dessa citocina (FISHMAN et al., 1998). O SNP -174G/C (rs1800795) se localiza na posição -174 do sítio de início de transcrição (Figura 24) e envolve a substituição de uma G por uma C (HONSAWEK et al., 2011). O alelo G é caracterizado por promover maior produção de IL-6 e tem sido associado à proteção ao desenvolvimento de sintomas clínicos da dengue (MOREIRA et al., 2008). Esta associação foi baseada em duas atividades biológicas da IL-6: a) esta citocina atua na erradicação do DENV por estimular a resposta imune Th2 e b) esta citocina promove a diminuição dos sintomas consequentes da infecção, por inibir a fase aguda da resposta inflamatória (MOREIRA et al., 2008). Por ter essa influência na patogênese da dengue, acredita-se que esse SNP também possa ter relação com a ocorrência de persistência de sintomas clínicos da dengue na fase de convalescença. O SNP -174G/C tem sido associado também à infecção pelo *M. tuberculosis* (LOPES, 2012) e pelo papilomavírus humano (NOGUEIRA DE SOUZA et al., 2006), à sepse (CARREGARO, 2008), dentre outras infecções.

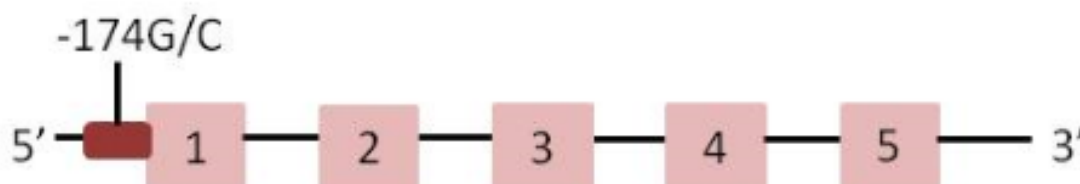


Figura 24. Representação esquemática do gene IL-6. Os éxons estão em rosa e a região promotora em vinho. O tamanho real dos éxons não foi levado em consideração na confecção da ilustração.

3.7.7 SNP no gene INF- γ

O gene humano INF- γ está localizado na região 12q24.1 e possui 4 éxons (BARON, 2002). O SNP +874T/A (rs2430561) está localizado no íntron 1 (Figura 25),

coincidindo com o local de ligação do fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês: *Factor Nuclear Kappa B* - NF- κ B). Esse SNP tem sido associado a diversas infecções, principalmente àquelas provocados por patógenos intracelulares (CARDOSO et al., 2010). O alelo selvagem *T* foi associado à alta produção de INF- γ (CARDOSO et al., 2010; LIU et al., 2006; NATIVIDAD et al., 2005; PRAVICA et al., 2000). Altos níveis plasmáticos de INF- γ têm sido associados à dengue grave (LIBRATY et al., 2002). Esse SNP também tem sido associado a infecções por *M. tuberculosis* (LÓPEZ-MADUERUELO et al., 2003), *M. leprae* (CARDOSO et al., 2010), salmonela, *Leishmania* e clamídia (AGNELLO; GADINA, 2006), dentre outras infecções.

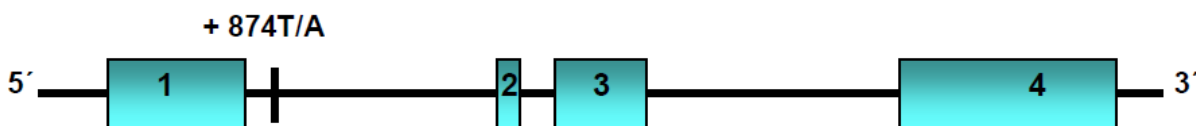


Figura 25. Representação esquemática do gene do INF- γ . Os éxons estão em azul.
Fonte: Conde (2010).

3.8 ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL E DE ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS INFECCIOSAS

As populações podem diferir quanto às frequências alélicas e genotípicas, de modo que alelos ou genótipos muito comuns em um grupo podem ser raros ou mesmo ausentes em outro, especialmente quando as populações analisadas são relativamente isoladas. Alguns polimorfismos que melhor caracterizam grupos étnicos podem ser utilizados como marcadores em diversas áreas (BELTRAME, 2008).

A população brasileira é de origem heterogênea, formada pela miscigenação de ameríndios, europeus e africanos, e mais recentemente, de imigrantes principalmente da Europa e da Ásia (BELTRAME, 2008). A população do ES, segundo o IBGE, é composta de 1,7 milhão de brancos (48,6%), 1,5 milhão de pardos (42,2%), 293 mil negros (8,4%) e 0,8% de amarelos (21,9 mil) ou indígenas (9 mil) (IBGE, 2007). É notável a presença dos Pomeranos na região serrana do Estado. A terceira maior

população Pomerana do mundo se localiza nessa região, sendo proveniente de imigrantes do norte europeu (DOMINGUES et al., 2006). Hábitos culturais sugerem um considerável grau de endogamia nessa população de origem pomerana, mesmo que alguns estudos demonstrem algum fluxo gênico entre as duas populações (DETTOGNI et al., 2013; STUR et al., 2012).

O mapeamento de SNPs em genes potencialmente envolvidos nas respostas imunes a infecções e a obtenção de suas frequências pode auxiliar no conhecimento da patofisiologia de infecções e na criação de métodos de prevenção e terapia mais efetivos. Uma vez que a frequência alélica e genotípica dos SNPs é específica de cada população, é importante a realização de estudos em diversas regiões geográficas de modo a permitir o conhecimento e uso do perfil genético específico das diferentes populações.

O ES, assim como todo o sudeste do Brasil, apresenta uma alta prevalência de dengue e várias outras doenças infecciosas, sendo importante o estudo de caracterização das frequências alélica e genotípica de SNPs em genes imunomoduladores na população do ES, inclusive em populações possivelmente isoladas dentro do estado. Além disso, são importantes estudos de associação desses SNPs com uma das mais importantes doenças infecciosas do ES, a dengue. Sabendo-se que estudos de associação de SNPs em genes do sistema imune com sintomas clínicos da dengue na fase aguda são frequentes, estudos que analisem essa associação na fase de convalescença são necessários, principalmente tendo-se em vista o impacto individual e social que a persistência de sintomas clínicos da dengue causa na população.

O maior potencial para uma rápida tradução clínica desses estudos provavelmente virá do campo da farmacogenômica. Atualmente, um dos melhores exemplos é a terapêutica para o HIV associada ao alelo *HLA-B* 5701*. Ensaio clínicos demonstraram que os testes genéticos auxiliam na prevenção da hipersensibilidade provocada pelo medicamento contra o HIV, denominado abacavir. Agora, testes genéticos prévios à prescrição do abacavir são recomendados em diretrizes clínicas e são amplamente praticados (COLOMBO et al., 2008; HETHERINGTON et al., 2002; MALLAL et al., 2002; MARTIN et al., 2004; YOUNG et al., 2008). Outro exemplo bem

estudado é o tratamento contra o HCV, onde é feita a terapia de combinação do IFN- α com o medicamento antiviral denominado ribavirina. Vários estudos de associação em diferentes populações relataram fortes associações entre a resposta ao tratamento e variações genéticas dos pacientes (GE et al., 2009; RAUCH et al., 2010; SUPPIAH et al., 2009; TANAKA et al., 2009). A farmacogenômica também propõe a possibilidade da variação genética no receptor “Toll – like” - NF-kB (TLR - NF-kB) poder influenciar do tratamento da septicemia e das estratégias terapêuticas poderem ser destinadas à manipulação da via em que esta molécula é envolvida (CHAPMAN; HILL, 2012).

Apesar desses avanços, é pouco provável que o uso de informações genéticas altere a prática clínica em futuro próximo; o valor preditivo da avaliação de risco de base genética continua pobre (MANOLIO, 2010), o que pode ser visto pelas poucas melhorias no atendimento clínico que ocorreram até a presente data. No entanto, é certo que estudos de genética do hospedeiro sugerem o potencial uso de seus resultados na clínica. A implementação da genética na prática clínica provavelmente é desafiadora e pode-se argumentar que a pesquisa sobre as causas adquiridas das infecções elucidam resultados mais diretamente modificáveis e, portanto, podem ter um impacto clínico mais direto que resultados genéticos, particularmente nas regiões de baixa renda. Neste contexto, é essencial que os avanços na compreensão da genética de doenças infecciosas humanas sejam vistos não como um ponto final de pesquisa, mas como uma importante base para abordagens inovadoras no sentido de melhorar os cuidados aos pacientes. O grande desafio é promover o investimento em genética humana e traduzir resultados sobre a genética do paciente em estratégias preventivas melhoradas e novas terapias (CHAPMAN; HILL, 2012)

4 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda. p. 354, 2007.

AGNELLO, D.; GADINA, M. The biology of cytokines: general principles, properties, and lessons from animal models. In: VANDENBROECK, K. (Ed.). **Cytokine gene polymorphisms in multifactorial conditions**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, p. 3-33, 2006.

ALAGARASU, K. et al. Elevated levels of vitamin D and deficiency of mannose binding lectin in dengue hemorrhagic fever. **Virology Journal**, v. 9, p. 86, 2012.

ALCON, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.

ALEN, M.; SCHOLS, D. **Broad Antiviral Activity of Carbohydrate-Binding Agents Against Dengue Virus Infection, Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology**. In: CHUAN-FA, C. (Ed.). *InTechOpen*, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/carbohydrates-comprehensive-studies-on-glycobiology-and-glycotechnology/broad-antiviral-activity-of-carbohydrate-binding-agents-against-dengue-virus-infection>.

ALLISON, S.L. et al. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. **Journal of Virology**, v. 69, n.2, p.695-700, 1995.

ALMOND, J. et al. Accelerating the development and introduction of a dengue vaccine for poor children, 5-8 December 2001, Ho Chi Minh City, VietNam. **Vaccine**, v. 20, n. 25-26, p. 3043-3036, 2002.

ALVAREZ, D.E. et al. Structural and functional analysis of dengue virus RNA. **Novartis Foundation Symposium**, v. 277, p. 120-132, 2006.

AUCAN, C. et al. High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to Plasmodium falciparum malaria. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1252-1258, 2000.

AUNG-KHIN, M. et al. Changes in the tissues of the immune system in dengue hemorrhagic fever. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 256, 1975.

ATRASHEUSKAYA, A. et al. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, p. 33-42, 2003.

AVIRUTNAN, P. et al. Complement-mediated neutralization of dengue virus requires mannose-binding lectin. **mBio**, v. 2, n. 6, 2011.

AZEREDO, E.L. et al. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 143, n. 2, p. 345-356, 2006.

AZEREDO, E.L. et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. **Immunobiology**, v. 204, n. 4, p. 494-507, 2001.

BALSITIS, S.J. et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 3, p. 416-424, 2009.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.

BANCROFT, T.L. On the etiology of dengue fever. **Australasian Medical Gazette**, v. 25, p. 17-18, 1906.

BANDYOPADHYAY, S.; LUM, L.C.; KROEGER, A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. **Tropical Medicine & International Health**, v.11, n. 8, p. 1238-135, 2006.

BARON, J.L. Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. **Immunity**, v. 16, n.4, p. 538-594, 2002.

BASILIO-DE-OLIVEIRA, C.A. et al. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: an Official Publication of The Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 9, n.4, p. 341-347, 2005.

BATISTA, W.C. **Mapeamento das arboviroses no estado de Rondônia-Manaus**. 110 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

BELLAMY, R. et al. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n.3, p. 721-724,1999.

BELTRAME, M.H. **Estudo de populações de diferentes ancestralidades e evolução de polimorfismos nos genes CD80 e CD86**. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BERNASCONI, S. et al. Effects of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) on expression of adhesion molecules and production of cytokines in blood monocytes and ovarian cancer-associated macrophages. **International Journal of Cancer**, v. 60, n. 3, p. 300-307, 1995.

BHAMARAPRAVATI, N.; TUCHINDA, P.; BOONYAPAKNAVIK, V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 61, n. 4, p. 500-510, 1967.

BLACKLEY, S. et al. Primary human splenic macrophages, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus infection in vitro. **Journal of Virology**, v. 81, n. 24, p. 13325-13334, 2007.

BOIN, F. et al. Association between -G308A tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v.6, n. 1, p. 79=82, 2001.

BOONNAK, K. et al. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Journal of Virology**, v. 82, n. 8, p. 3939-3951, 2008.

BOONPUCKNAVIG, S. et al. Immunofluorescent staining of the surfaces of lymphocytes in suspension from patients with dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Pathology**, v. 85, n. 1, p. 37-48, 1976.

BORGES, M.A.T. **Perfil microbiológico associado ao polimorfismo do gene do receptor da vitamina D (VDR) em indivíduos periodontalmente saudáveis e com periodontite crônica**. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Guarulhos, São Paulo, 2006.

BORISH, L. et al. SSC polymorphisms in interleukin genes. **Human Molecular Genetics**, v. 4, n. 5, p. 974, 1995.

BOSSUYT, X. et al. Coexistence of (partial) immune defects and risk of recurrent respiratory infections. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 124-130, 2007.

BOWCOCK, A.M. et al. The human "interferon-beta 2/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6" gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21. **Genomics**, v. 3, n. 1, p. 8-16, 1988.

BOZZA, F.A. et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC Infectious Diseases**, v. 8, p. 84, 2008.

BURKE, D.S.; MONATH, T.P. Flavivirus: The viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). **Lippincott Williams and Wilkins**. Philadelphia: Fields Virology, p.1043-1125, 2001.

BRESSANELLI, S. et al. Duquerroy S, Lescar J, et al. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 4, p. 728-738, 2004.

BROWER, K.C. et al. Polymorphism of Fc receptor IIa for IgG in infants is associated with susceptibility to perinatal HIV-1 infection. **Aids**, v. 18, n. 8, p. 1187-1194, 2004.

CANGANELLA, F.; KATO, C.; HORIKOSHI, K. Effects of micronutrients on growth and starch hydrolysis of *Thermococcus guaymasensis* and *Thermococcus aggregans*. **Microbiological Research**, v.154, n. 4, p. 307-312, 2000.

CARDIER, J.E. et al. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. **Cytokine**, v. 30, n. 6, p. 359-365, 2005.

CARDOSO, C.C. et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. **Human Genetics**, v. 128, n. 5, p. 481-490, 2010.

CARREGARO, F. **Estudo de polimorfismos genéticos na susceptibilidade e na resposta à sepse**. 34 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CERAMI, A. Tumor necrosis factor as a mediator of shock, cachexia and inflammation. **Blood Purification**, v. 11, n. 2, p. 108-117, 1993.

CHAKRAVARTI, A.; KUMARIA, R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 1, p. 25-30, 2006.

CHAMBERS, T.J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHAMBERS, T.J. et al. Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis: report of a World Health Organization meeting. **Vaccine**, v. 15, n. 14, p. 1494-14502, 1997.

CHAMPMAN, S.J.; HILL, A.V. Human genetic susceptibility to infectious disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 3, p. 175-188, 2012.

CHANG, G.J. Molecular biology of dengue virus. In: GUBLER, D.J.; KUNO, G. (Eds.). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International, p.175-197, 1997.

CHAREONSIRISUTHIGUL, T.; KALAYANARROJ, S.; UBOL, S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-

inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. **The Journal of General Virology**, v. 88, p. 365-375, 2007.

CHATURVEDI, U.C. et al. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. **Journal of Medical Virology**, v. 59, n.3, p. 335-340, 1999.

CHATURVEDI, U.C. et al. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.28, n. 3, p. 183-188, 2000.

CHATURVEDI, U.C. Tumour necrosis factor & dengue. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 1, p. 11-14, 2006.

CHATURVEDI, U.C.; NAGAR, R.; SHIVASTAVA, R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 155-166, 2006.

CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature Medicine**, v. 3, n. 8, p. 866-871, 1997.

CHEN, R.F. et al. Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.44, n. 1, p. 43-50, 2005.

CHEN, R.F. et al. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 11, p. 1106-1113, 2007.

CHEN, H.L. et al. Evolution of dengue virus type 2 during two consecutive outbreaks with an increase in severity in southern Taiwan in 2001-2002. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 4, p. 495-505, 2008.

CHINNAWIROTPISAN, P. et al. Detection of concurrent infection with multiple dengue virus serotypes in Thai children by ELISA and nested RT-PCR assay. **Archives of Virology**, v. 153, n. 12, p. 2225-2232, 2008.

CHU, H. et al. Polymorphisms in the IL-13 and IL-4R genes are associated with the development of renal cell carcinoma. **Annals of Oncology: Official Journal of The European Society for Medical Oncology**, v. 23, n. 8, p. 2114-2121, 2012.

CHU, J.J.; NG, M.L. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10543-10555, 2004.

CLERICI, M.; SHEARER, G.M. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. **Immunology Today**, v. 14, n. 3, p. 107-111, 1993.

CLYDE, K.; KYLE, J.L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.

COFFEY, L.L. et al. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes and infection/Instituto Pasteur**, v. 11, n. 2, p. 143-156, 2009.

COLOMBO, S. et al. The HCP5 single-nucleotide polymorphism: a simple screening tool for prediction of hypersensitivity reaction to abacavir. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 6, p. 864-867, 2008.

CONDE, S.R.S.S. **Correlação dos níveis séricos e dos polimorfismos nos genes de citocinas (TNF- α , INF- γ , TGF- β 1 e IL-10) com a apresentação clínica da hepatite B crônica**. 167 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Belém-Pará, 2010.

CONSTANT, S.L.; BOTTOMLY, K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 297-322, 1997.

COOKE, G.S. et al. Association of Fc γ receptor IIa (CD32) polymorphism with severe malaria in West Africa. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 6, p. 565-568, 2003.

CZAJA, A. J. et al. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. **Gastroenterology**, v. 117, p. 645-652, 1999.

DA CUNHA, R.V. et al. Secondary dengue infection in schoolchildren in a dengue endemic area in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 6, p. 517-521, 1995.

DA FONSECA, B.A.; FONSECA, S.N. Dengue virus infections. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 14, n. 1, p. 67-71, 2002.

DAERON, M. Structural bases of Fc γ R functions. **International Reviews of Immunology**, v. 16, n. 1-2, p. 1-27, 1997.

DANIEL, C. et al. 22-ene-oxa-vitamin D: a new vitamin D analogue with profound immunosuppressive capacities. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, p. 343-349, 2005.

DE PAULA, S.O.; FONSECA, B.A. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious**

Diseases: an Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases, v. 8, n. 6, p. 390-398, 2004.

DEEN, J.L. et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. **Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 170-173, 2006.

DE SOUZA, C.M. **Análise da associação entre polimorfismos no gene do receptor da vitamina D (VDR) e a susceptibilidade à doença renal crônica e à doença periodontal**. 63 f. Tese (Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2007.

DETOGNI, R.S. et al. Polymorphic genetic variation in immune system genes: a study of two populations of Espírito Santo, Brazil. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 8, p. 4843-4849, 2013.

DEUBEL, V. Recent advances and prospective researches on molecular epidemiology of dengue viruses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, suppl. 5, p. 133-136, 1992.

DEWI, B.E.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. **Journal of Virological Methods**, v. 121, n.2, p. 171-180, 2004.

DIAMOND, M.S. et al. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. **Journal of Virology**, v. 74, n. 11, p. 4957-4966, 2000.

DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Molecular Immunology**, v. 39, p. 531-536, 2002.

DITTMER, U.L.F. et al. Role of Interleukin-4 (IL-4), IL-12, and Gamma Interferon in Primary and Vaccine-Primed Immune Responses to Friend Retrovirus Infection. **Journal of Virology**, v.75, n.2, p. 654-660, 2001.

DOMINGUES, R.B. et al. Prevalence and impact of headache and migraine among pomeranians in Espírito Santo, Brazil. **Arquive of Neuro-psiquiatria**, v. 64, n. 4, p. 954-957, 2006.

DOS SANTOS, F.B. et al. Complete nucleotide sequence analysis of a Brazilian dengue virus type 2 strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 991-995, 2002.

DURBIN, A.P. et al. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. **Virology**, v. 376, n. 2, p. 429-435, 2008.

EDGIL, D.; POLACEK, C.; HARRIS, E. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. **Journal of Virology**, v. 80, n. 6, p. 2976-2986, 2006.

FERNANDEZ-MESTRE, M.T. et al. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 4, p. 469-472, 2004.

FIGUEIREDO, L.T.M.; CARLUCCI, R.H.; DUARTE, G. Study on an enzyme immunoassay for dengue IgG and IgM antibodies detection using infected mosquito cells as antigen. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 702-707, 1989.

FIGUEIREDO, L.T.M. Dengue in Brazil: history, epidemiology and research. **Virus Reviews & Research**, v. 1, n 1-2, p. 9-16, 1996.

FIGUEIREDO, L.T.M.; FONSECA, B.A.L. Dengue. In: VERONESI, R.; FOCCACIA, R. (Ed.). **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, p. 201-214, 1996.

FIGUEIREDO, L.T. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and infection/Institut Pasteur**, v. 2, n. 13, p. 1643-1649, 2002.

FIGUEIREDO, L.T.M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 203-10, 2006.

FIGUEIREDO, L.T.M. Dengue in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 285-285, 2012.

FINSTERER, J.; KONGCHAN,K. Severe, persisting, steroid-responsive Dengue myositis. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of The Pan American Society for Clinical Virology**, v. 35, n. 4, p. 426-428, 2006.

FISHMAN, D. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 7, p. 1369-1376, 1998.

FORATTINI, O.P. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) indentification in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, p. 244-245, 1986.

FORTHAL, D.N.; MOOG, C. Fc receptor-mediated antiviral antibodies. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 4, p. 388-393, 2009.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - BRASIL. **Dengue: Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento**. FNS-BRASIL, v. 176, p. 1-20, 2002.

GAGNON, S.J. et al. Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. **Journal of Medical Virology**, v. 67, n. 1, p. 41-46, 2002.

GAMBLE, J. et al. Age-related changes in microvascular permeability: a significant factor in the susceptibility of children to shock? **Clinical Science**, v. 98, n. 2, p. 211-216, 2000.

GARCÍA, G. et al. Asymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the FcγRIIIa polymorphism. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 6, p. 1153-1156, 2010.

GARCÍA, G. et al. Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. **International Journal of Infectious Diseases: Official Publication of The International Society for Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. e38-43, 2011.

GASPERINO, J. et al. Fulminant liver failure secondary to haemorrhagic dengue in an international traveller. **Liver International: Official Journal of The International Association for the Study of the Liver**, v. 27, n. 8, p. 1148-1151, 2007.

GAZZINELLI, R.T.; GIENSE, N.A.; MORSE, H.C. In vivo treatment with interleukin 12 protects mice from immune abnormalities observed during murine acquired immunodeficiency syndrome (MAIDS). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 6, p. 2199-2208, 1994.

GE, D. et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**, v. 461, n. 7262, p. 399-401, 2009.

GENNARI, L. et al. Vitamin D receptor genotypes and intestinal calcium absorption in postmenopausal women. **Calcified Tissue International**, v. 61, n. 6, p. 46-463, 1997.

GOMES, A.C. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programa de vigilância entomológica. **Instituto de Educação Superior Unyahna de Salvador**, v. 7, p. 49-57, 1998.

GONZÁLEZ, D. et al. Evaluation of some clinical, humoral and imagenological parameters in patients of dengue haemorrhagic fever six months after acute illness. **Dengue Bulletin**, v. 29, 2005.

GREEN, S. et al. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. **Journal of Medical Virology**, v. 59, n. 3, p. 329-334, 1999.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D.J.; KUNO, G.; WATERMAN, S.H. Neurologic disorders associated with dengue infection. In: **Proceedings of the International Conference on Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever**. Kuala Lumpur: University of Malaysia Press, p. 290-306, 1983.

GUBLER, D.J. et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 1, p. 158-165, 1984.

GUBLER, D.J.; CLARCK, G.G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 55-57, 1995.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D.J.; KUNO, G. (Ed.). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International, p. 1-22, 1997.

GUBLER, D.J.; MELTZER, M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. **Advances in Virus Research**, v. 53, p. 35-70, 1999.

GUBLER, D.J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.

GUBLER, D.J. Dengue/dengue hemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Foundation Symposium**, v. 277, p. 3-16, 2006.

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

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G.; BRAVO, J. La emergencia de la fiebre hemorragica del dengue en las Americas: re-emergencia del dengue. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 52, p. 5-13, 1999.

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G.; HALSTEAD, S.B. Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? **Lancet**, v. 355, n. 9218, p. 1902-1903, 2000.

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2002.

GUZMÁN, M.G. et al. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **International Journal of Infectious Diseases: Official Publication of The International Society for Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 118-124, 2002.

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2003.

GRAHAM, H. The dengue: a study of its pathology and mode of propagation. **Journal of Tropical Medicine**, v. 6, p. 209, 1903.

HALARY, F. et al. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. **Immunity**, v. 17, n. 5, p. 653-664, 2002.

HALSTEAD, S.B. et al. Hemorrhagic fever in Thailand; recent knowledge regarding etiology. **Japanese Journal of Medical Science & Biology**, v. 20, suppl. 96-103, 1967.

HALSTEAD, S.B.; SIMASTHIEN, P. Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 42, n. 5, p. 276-292, 1970.

HALSTEAD, S.B.; O'ROURKE, E.J.; ALLISON, A.C. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 1, p. 218-229, 1977.

HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476-481, 1988.

HALSTEAD, S.B. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. **World Health Statistics Quarterly Rapport Trimestriel de Statistiques Sanitaires Mondiales**, v. 45, n. 2-3, p. 292-298, 1992.

HALSTEAD, S. Pathophysiology and pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. In: THONGCHAROEN, P. (Ed.). **Monograph on dengue/dengue hemorrhagic fever**. SEARO: WHO Regional Publication, n. 22, p. 80-103, 1993.

HALSTEAD, S.B. et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 3, p. 180-183, 2001.

HALSTEAD, S.B.; DEEN, J. The future of dengue vaccines. **Lancet**, v. 360, n. 9341, p. 1243-1245, 2002.

HALSTEAD, S.B. Dengue. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.

HAMMON, W.M. Dengue hemorrhagic fever--do we know its cause? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 22, n. 1, p. 82-91, 1973.

HARAPAN, H. et al. Non-HLA gene polymorphisms and their implications on dengue virus infection. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 14, p. 1-11, 2013.

HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**, v. 115, n. 1, p. 1-20, 2005.

HEINZ, F.X.; ALLISON, S.L. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. **Current Opinion in Microbiology**, v.4, p. 450-455, 2001.

HENCHAL, E.A.; PUTNAK, J.R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HETHERINGTON, S. et al. Genetic variations in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1121-1122, 2002.

HILL, A.; LOBIGS, M.; BLANDEN, R. The Cellular Immune Response to Flaviviruses. In: Marcel D. (Ed.). **Viruses and Cellular Immune Response**. New York: Marcel Dekker, p. 263-2887, 1993.

HIRSCH, A. Dengue, a comparatively new disease: its symptoms. Handbook of geographical and historical pathology. **The Sydenham Society**, v. 1, p.55-81, 1883.

HO, L.J. et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. **Journal of Immunology**, v. 166, . n. 3, p. 1499-1506, 2001.

HO, L.J. et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus activates and primes T cells towards Th0-like phenotype producing both Th1 and Th2 cytokines. **Immunological Investigations**, v. 33, n. 4, p. 423-437, 2004.

HOLMES, E.C. The evolutionary biology of dengue virus. **Novartis Foundation Symposium**, v.277, p. 177-187, 2006.

HONSAWEK, S. et al. Association of the IL-6 -174G/C gene polymorphism with knee osteoarthritis in a Thai population. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 3, p. 1674-1680, 2011.

HUANG, C.Y. et al. The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion. **Virology**, v. 396, n. 2, p. 305-315, 2010.

HUERRE, M.R. et al. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. **Virchows Archiv: an International Journal of Pathology**, v. 438, n. 2, p. 107-115, 2001.

HUNT, P.J. et al. Cytokine gene polymorphisms in autoimmune thyroid disease. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 5, p. 1984-1988, 2000.

INNIS, B.L. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 4, p. 418-427, 1989.

INNIS, B. Dengue and dengue hemorrhagic fever. In: PORTERFIELD, J.S.(Ed.). **Exotic Viral Infections**. London: Kass Handbook Infectious Diseases, p. 103-146, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Contagem da População**. Rio de Janeiro: IBGE, 2007.

ISRAELSSON, E. et al. Differences in Fc gamma receptor IIa genotypes and IgG subclass pattern of anti-malarial antibodies between sympatric ethnic groups in Mali. **Malaria Journal**, v. 15, p. 175, 2008.

JACOBS, M.; YOUNG, P. Dengue vaccines: preparing to roll back dengue. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 4, n. 2, p. 168-172, 2003.

JATANASEN, S.; THONGCHAROEN, P. Dengue hemorrhagic fever in southeast Asian countries. In: THONGCHAROEN P. (Ed.) **Monograph on dengue/dengue hemorrhagic fever**. SEARO: WHO Regional Publication, n. 22, p. 23-30, 1993.

JESSIE, K. et al. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 4, p. 1411-1418, 2004.

JOSEPH, R.W. et al. Vitamin D receptor upregulation in alloreactive human T cells. **Human Immunology**, v. 73, n. 7, p. 693-398, 2012.

JUFFRIE, M. et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 70-75, 2001.

KANAGAWA, O. et al. Resistance of mice deficient in IL-4 to retrovirus-induced immunodeficiency syndrome (MAIDS). **Science**, v. 262, n. 5131, p. 240-242, 1993.

KANGWANPONG, D.; BHAMARAPRAVATI, N.; LUCIA, H.L. Diagnosing dengue virus infection in archived autopsy tissues by means of the in situ PCR method: a case report. **Clinical and Diagnostic Virology**, v. 3, n. 2, p. 165-172, 1995.

KELSALL, B.L. et al. Dendritic cells at the host-pathogen interface. **Nature Immunology**, v.3, p. 699-702, 2002.

KIELIAN, M. Class II virus membrane fusion proteins. **Virology**, v. 344, .n 1, p. 38-47, 2006.

KIMURA, T.; OHYAMA, A. Association between the pH-dependent conformational change of West Nile flavivirus E protein and virus-mediated membrane fusion. **The Journal of General Virology**, v. 69, p. 1247-1254, 1988.

KING, A.I.B. et al. B cell are the principal circulating mononuclear cell infected by dengue virus. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.5, A988, 1991.

KNIGHT, J.C. et al. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. **Nature Genetics**, v. 22, p. 145-150, 1999.

KLIMSTRA, W.B. et al. DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses. **Journal of Virology**, v. 77, n. 22, p. 12022-12032, 2003.

KONISHI, E.; KOSUGI, S.; IMOTO, J. Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. **Vaccine**, v. 24, n. 12, p. 2200-2207, 2006.

KORAKA, P. et al. Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v, 39, n. 12, p. 4332-4338, 2001.

KOURI, G.P.; GUZMÁN, M.G.; BRAVO, J.R. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 821-823, 1987.

KUUHN, R.J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-125, 2002.

KURANE, I. et al. Human immune responses to dengue viruses. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 21, n. 4, p. 658-662, 1990.

KURANE, I.; ENNIS, F.E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. **Seminars in Immunology**, v. 4, n. 2, p. 121-127, 1992.

LEE, I.K. et al. Increased production of interleukin-4, interleukin-10, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by type 2 diabetes' mononuclear cells infected with dengue virus, but not increased intracellular viral multiplication. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 965853, 2013.

LEITMEYER, K.C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, 1999.

LI, K. et al. Association between -308 tumor necrosis factor promoter polymorphism and bronchial hyper reactivity in asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 29, p. 1204-1208, 1999.

LI, L. et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1830-1834, 2008.

LIBLAU, R. S.; SINGER, S.M.; MCDEVITT, H.O. Th1 and Th2 CD41 T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. **Immunology Today**, v.16, p.34-38, 1995.

LIBRATY, D.H. et al. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 3501-3508, 2001.

LIBRATY, D.H. et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 9, p. 1213-1221, 2002.

LIM, M.; GOH, H.K. Rhabdomyolysis following dengue virus infection. **Singapore Medical Journal**, v. 46, n. 11, p. 645-646, 2005.

LIMON-FLORES, A.Y. et al. Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 86, n. 5, p. 323-334, 2005.

LIU, C.J. et al. Role of hepatitis B viral load and basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 9, p. 1258-1265, 2006.

LOBO, M.R.G. et al. Citocinas na dengue: inovações do sistema imune. **Scientia Amazonia**, v. 3, n. 1, 2014.

LOKE, H. et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 1, p. 102-106, 2002.

LOKOSSOU, A.G. et al. Association of IL-4 and IL-10 maternal haplotypes with immune responses to *P. falciparum* in mothers and newborns. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p, 215, 2013.

LOPES, F.H.A. **Níveis séricos de interleucina-6 e polimorfismo -174 GC do gene dessa citocina em infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis***. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

LÓPEZ, MADUERUELO, D. et al. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, p. 970-975, 2003.

LOW, J.G. et al. Early Dengue infection and outcome study (EDEN) - study design and preliminary findings. **Annals of the Academy of Medicine, Singapore**, v. 35, n. 11, p. 783-789, 2006.

MABALIRAJAN, U. et al. Th(2) immune response in patients with dengue during defervescence: preliminary evidence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 6, p. 783-785, 2005.

MACDONALD, P.N.; DOWD, D.R.; HAUSSLER, M.R. New insight into the structure and functions of the vitamin D receptor. **Seminars in Nephrology**, v. 14, n. 2, p. 101-118, 1994.

MACKENZIE, J.S.; GUBLER, D.J.; PETERSEN, L.R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**, v. 10, suppl. 12, p. s98-109, 2004.

MALAVIGE, G. et al. Dengue viral infections. **Postgraduate Med J**, v. 80, n. 948, p. 588-601, 2004.

MALLAL, S. et al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. **Lancet**, v. 359, n. 9308, p. 727-732, 2002.

MANGADA, M.M. et al. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 12, p. 1697-1673, 2002.

MANGADA, M.M.; ROTHMAN, A.L. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 4, p. 2676-2683, 2005.

MANOLIO, T.A. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 2, p. 166-176, 2010.

MARSHAL, I.J.S.; JAWADAT, D.M. Mast Cell in innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.114, p. 21-27, 2004.

MARCHETTE, N.J. et al. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. 3. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 128, n. 1, p. 23-30, 1973.

MARTIN, A.M. et al. Predisposition to abacavir hypersensitivity conferred by HLA-B*5701 and a haplotypic Hsp70-Hom variant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 12, p. 4180-4185, 2004.

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

MARTINEZ, E. Dengue hemorragica en criancas. Ed. José Marti. **La Habana**, p. 1-180, 1992.

MENÉNDEZ, G.G. **Polimorfismo del Receptor FcγRIIIa. Influencias en La patogénesis y en la evolución de la infección por virus dengue.** 124 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Ciudad de la Habana, 2010.

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

MEI-SHU, X. **Association of DC-SIGN (CD209) gene polymorphisms with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS).** 126 f. Dissertação (Mestrado) - The University of Hong Kong, China, 2007.

MIAGOSTOVICH, M.P. et al. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 14, n. 3, p. 183-189, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relatório final de reunião técnica do programa de combate à febre amarela e dengue.** Brasília: MS, 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico - edição especial.** Brasília: MS, 1999.

MIRA, J.P. et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism with shock susceptibility and mortality: a multicenter study. **Journal of The American Medical Association**, v. 282, p. 562-568, 1999.

MITCHELL, D.A.; FADDEN, A.J.; DRICKMAE, K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR - Subunit organization and binding to multivalent ligands. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 28939-28945, 2001.

MODIS, Y. et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 2, p. 6986-6991, 2003.

MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313-319, 2004.

MOI, M. L. et al. Involvement of the Fc receptor IIA cytoplasmic domain in antibody dependent enhancement of dengue virus infection. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 103-111, 2010.

MONATH, T.P. Flaviviruses. In: FIELDS, B.M.; KNIPE, D.M. (Ed.). **Virology**. New York: Raven press, p. 763-814, 1990.

MONATH, T. P.; HEINZ, F. X. In: FIELDS, B.M.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). **Flaviviruses**. Philadelphia: Lippincott Raven, p. 961-1034, 1996.

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

MORAN, T.M. et al. Interleukin-4 causes delayed virus clearance in influenza virus-infected mice. **Journal of Virology**, v. 70, n. 8, p. 5230-5235, 1996.

MORAWETZ, R.A. et al. Resistance to murine acquired immunodeficiency syndrome (MAIDS). **Science**, v. 265, n. 5169, p. 264-266, 1994.

MORENS, D.M. et al. Growth of dengue type 2 virus isolates in human peripheral blood leukocytes correlates with severe and mild dengue disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, n. 5, p. 644-651, 1991.

MOREIRA, S.T. et al. The possible protective role of the IL6⁻¹⁷⁴GC genotype in dengue fever. **The Open Tropical Medicine Journal**, v. 1, p. 87-91, 2008.

MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, v. 7, n. 3, p. 138-146, 1996.

MOSSO, C. et al. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. **Virology**, v. 378, n. 1, p. 193-199, 2008.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R.J.; ROSSMANN, M.G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13-22, 2005.

MURPHY, K. **Janeway's Immunobiology**. 8. ed. London and e New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2011.

NAGPAL, S.; NA, S.; RATHANACHALAM, R. Non calcemic actions of vitamin D receptor ligands. **Endocrinology Reviews**, v. 26, p. 662-687, 2005.

NATIVIDAD, A. et al. Risk of trachomatous scarring and trichiasis in Gambians varies with SNP haplotypes at the interferon-gamma and interleukin-10 loci. **Genes and Immunity**, v.6, n. 4, p. 332-340, 2005.

NAVARRO-SANCHEZ, E. et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO Reports**, v. 4, n. 7, p. 723-728, 2003.

NAVARRO-SANCHEZ, E.; DESPRES, P.; CEDILLO-BARRON, L. Innate immune responses to dengue virus. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 5, p. 425-435, 2005.

NELMS, K. et al. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 701-738, 1999.

NGUYEN, T.L.; NGUYEN, T.H.; TIEU, N.T. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. **Research in Virology**, v. 148, n. 4, p. 273-277, 1997.

NIMMANNITYA, S. Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 18, n. 3, p. 392-297, 1987.

NIMMANNITYA, S. Clinical manifestations of dengue/dengue haemorrhagic fever. In: WHOROFSE, A. (Ed.). **Monograph on dengue/dengue haemorrhagic fever**. New Delhi, 1993.

NOGUEIRA, R.M. et al. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 2, p. 253, 1990.

NOGUEIRA, R.M. et al. Fatal primary dengue infections in Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 4, p. 418, 1999.

NOGUEIRA DE SOUZA, N.C. et al. Interleukin-6 polymorphisms and the risk of cervical cancer. **International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of The International Gynecological Cancer Society**, v. 16, n. 3, p. 1278-1282, 2006.

OGAWA, Y.; GRANT, J.A. Mediators of anaphylaxis. **Immunology and Allergy Clinics of North American**, v.27, p. 249-260, 2007.

OMI, K. et al. Fcγ receptor IIA and IIIB polymorphisms are associated with susceptibility to cerebral malaria. **Parasitology International**, v. 51, n. 4, p. 361-366, 2002.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Ecología, biología y control del Aedes albopictus (Skuse)**. Washington: OPS, 1987.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control**. Washington: PAHO, 1994.

PEELING, R.W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, suppl. 12, p. s30-38, 2010.

PENNA, M.L. A challenge for the public health system in Brazil: dengue control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 305-309, 2003.

PEREZ, A.B. et al. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. **Human immunology**, v. 71, n. 11, p. 1135-1140, 2010.

PETERLIK, M.; CROSS, H.S. Vitamin D and calcium predispose for multiple chronic diseases. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, p. 290-304, 2005.

PETZL-ERLER, M.L. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 51, p. 199-211, 1999.

PEURTA-GUARDO, H. et al. The 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ reduces dengue virus infection in human myelomonocyte (U937) and hepatic (Huh-7) cell lines and cytokine production in the infected monocytes. **Antiviral Research**, v. 94, n. 1, p. 57-61, 2012.

PFEFFER, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 3-4, p. 185-191, 2003.

PHUONG, C.X. et al. Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children: is the world health organization classification system helpful? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 2, p. 172-179, 2004.

PINTO, L.M. et al. Increased pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 387-394, 1999.

PORTERFIELD, J.S. Antibody-dependent enhancement of viral infectivity. **Advances in Virus Research**, v. 31, p. 335-355, 1986.

PRAVICA, V. et al. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. **Human Immunology**, v. 61, n. 9, p. 863-866, 2000.

PROVENZANO, J. C. **Influência do polimorfismo genético do receptor Fc γ RIIIb no resultado do tratamento endodôntico**. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, 2008.

PROVVEDINI, D.M. et al. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. **Science**, v. 221, p. 1181-1183, 1983.

RANDOLPH, V.B.; STOLLAR, V. Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. **The Journal of General Virology**, v. 71, p. 1845-1850, 1990.

RATCLIFF, F.; HARRISON, B.D.; BAULCOMBE, D.C. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. **Science**, v. 276, n. 5318, p. 1558-15560, 1997.

RAUCH, A. et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. **Gastroenterology**, v. 138, n. 4, p. 1338-1345, 45 e1-7, 2010.

RAVETCH, J.V.; BOLLAND, S. IgG Fc receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 275-290, 2001.

RAVIPRAKASH, K. et al. A chimeric tetravalent dengue DNA vaccine elicits neutralizing antibody to all four virus serotypes in rhesus macaques. **Virology**, v. 353, n. 1, p. 166-173, 2006.

RESTREPO, B.N. et al. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in infants with and without dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 6-10, 2008.

REY, F.A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 12, p. 6899-6901, 2003.

REYNARD, M.P.; TURNER, D.; NAVARRETE, C.V. Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. **European Journal of Immunogenetics: Official Journal of The British Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, v. 27, n. 4, p. 241-249, 2000.

RICO-HESSE, R. et al. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. 96-101, 1998.

RICO-HESSE, R. Dengue virus virulence and transmission determinants. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.338, p. 45-55, 2010.

RIGBY, W.F. et al. Differentiation of a human monocytic cell line by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol): a morphologic phenotypic and functional analysis. **Blood**, v. 64, p. 1110-1115, 1984.

ROCCO, I.M.; KAVAKAMA, B.B.; SANTOS, C.L. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 55-57, 2001.

ROEHRING, J.T. Immunochemistry of dengue viruses. In: GUBLER, D.J.; KUNO, G. (Ed.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York: CAB Inter, 1997.

ROMAGNANI, S. Lymphokine production by human T cells in disease states. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 227-257, 1994.

ROOD, M. J. et al. TNF-308A and HKA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatology**, v. 43, p. 129-134, 2000.

ROSEN, L.; DROUET, M.T.; DEUBEL, V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 5, p. 720-724, 1999.

ROTHMAN, A.L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532-543, 2011.

ROY, S. et al. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 1, p. 187-191, 1999.

RUSSEL, P.K. Immunopathologic mechanisms in the dengue shock syndrome. In: AMOS, B. (Ed.). **Progress in immunology**. New York: Academic Press, p. 831-838, 1971.

SAKUNTABHAI, A. et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nature Genetics**, v.37, n, 5, p. 507-513, 2005.

SALMON, J.E. et al. Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 89, n, 4, p. 1274-1281, 1992.

SARIOL, C.A. et al. Detection and genetic relationship of dengue virus sequences in seventeen-year-old paraffin-embedded samples from Cuba. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n, 6, p. 994-1000, 1999.

SCHATZMAYR, H.G.; NOGUEIRA, R.M.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P. A outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 245-246, 1986.

SCHILLING, S. et al. Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 31, n. 3, p. 179-184, 2004.

SCHOENBORN, J.R.; WILSON, C.B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Advances in Immunology**, v. 96, p.41-101, 2007.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. **Plano Estadual de Contingência da dengue. Governo do Estado do Espírito Santo**. Espírito Santo: SESA, 2010.

SEET, R.C.; QUEK, A.M.; LIM, E.C. Post-infectious fatigue syndrome in dengue infection. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of The Pan American Society for Clinical Virology**, v. 37, n. 1, p. 1-6, 2007.

SENEVIRATNE, S.; MALAVIGE, G.; DE SILVA, H. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 7, p. 608-614, 2006.

SILER, J.F.; HALL, M.; HITCHENS, A.P. Dengue, its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. **The Philippine Journal of Science**, v. 29, p.1-302, 1926.

SITBON, M. et al. Use of a focal immunofluorescence assay on live cells for quantitation of retroviruses: distinction of host range classes in virus mixtures and biological cloning of dual-tropic murine leukemia viruses. **Virology**, v. 141, n. 1, p. 110-118, 1985.

SHEN, B.Q. et al. Vascular endothelial growth factor KDR receptor signaling potentiates tumor necrosis factor-induced tissue factor expression in endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 5281-5286, 2001.

SPELLBERG, B.; EDWARDS, J.E.. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. **Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of The Infectious Diseases Society of America**, v. 32, n. 1, p. 76-102, 2001.

STAGER, S. et al. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4804-4807, 2003.

STEPHENS, H.A. HLA and other gene associations with dengue disease severity. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 338, p. 99-114, 2010.

STIASNY, K.; KIERMAYR, S.; HEINZ, F.X. Entry functions and antigenic structure of flavivirus envelope proteins. **Novartis Foundation Symposium**, v. 277, p. 57-65, 2006.

STIASNY, K. et al. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. **Amino Acids**, v. 41, n. 5, p. 1159-1163, 2011.

STEINMAM, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annual Review of Immunology**, v. 9, p. 271-296, 1991.

STEPHENSON, J.R. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. **Bulletin WHO**, v. 83, n. 4, p. 308-314, 2005.

STUR, E. et al. Polymorphism analysis of MTHFR, factor II, and factor V genes in the Pomeranian population of Espirito Santo, Brazil. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 16, n. 3, p. 219-222, 2012.

SUAYA, J.A. et al. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 5, p. 846-855, 2009.

SUKSANPAISAN, L.; SUSANTAD, T.; SMITH, D.R. Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. **Journal of Biomedical Science**, v. 16, p. 17, 2009.

SUPPIAH, V. et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. **Nature Genetics**, v. 41, n. 10, p.1100-1104, 2009.

SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Dengue: recent advances in biology and current status of translational research. **Current Molecular Medicine**, v. 9, n. 2, p. 152-173, 2009.

TAILLEUX, L. et al. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 1, p. 121-127, 2003.

TANAKA Y. et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Nature Genetics**, v. 41, n. 10, p. 1105-1109, 2009.

TASSANEETRITHEP, B. et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 7, p. 823-829, 2003.

TATE, B.J. et al. Expression of the high responder/non-responder human Fc gamma RII. Analysis by PCR and transfection into FcR-COS cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 70, p. 79-87, 1992.

TAUIL, P.L. Critical aspects of dengue control in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-671, 2002.

TEIXEIRA, L.A. et al. Persistence of dengue symptoms in patients in Uberaba, Minas Gerais State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, p. 624-630, 2010.

TERRY, C.F.; LOUKACI, V.; GREEN, F.R. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 18138-18144, 2000.

TIMOFEEV, A.V.; BUTENKO, V.M.; STEPHENSON, J.R. Genetic vaccination of mice with plasmids encoding the NS1 non-structural protein from tick-borne encephalitis virus and dengue 2 virus. **Virus Genes**, v. 28, n. 1, p. 85-97, 2004.

TORRES, C. et al. Immunophenotype of vitamin D receptor polymorphism associated to risk of HIV-1 infection and rate of disease progression. **Current HIV Research**, v. 8, n. 6, p. 487-492, 2010.

TRISTÃO-SÁ, R. **Estudo prospectivo para avaliação das alterações clínicas e laboratoriais em casos de dengue**. 185 f. Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

TRISTÃO-SÁ, R. et al. Clinical and hepatic evaluation in adult dengue patients: a prospective two-month cohort study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 6, p. 675-681, 2012.

TUMANGGER, H.; JAMIL, K.F. Contribution of genes polymorphism to susceptibility and outcome of sepsis. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 11, p. 97-103, 2010.

VAN DE WINKEL, J.G.; CAPEL, P.J. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. **Immunology Today**, v. 14, n. 5, p. 215-221, 1993.

VAN DER SCHAAR, H.M. et al. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 12, p. e1000244, 2008.

VAN KOOYK, Y.; APPELMELK, B.; GEIJTENBEEK, T.B. A fatal attraction: Mycobacterium tuberculosis and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 153-159, 2003.

VAN SORGE, N.M.; VAN DER POL, W.L.; VAN DE WINKEL, J.G. FcγR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. **Tissue Antigens**, v. 61, n. 3, p. 189-202, 2003.

VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annual Review of Immunology**, v. 10, p. 411-452, 1992.

VAUGHN, D.W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 2, p. 2-9, 2000.

VIDYARANI, M. et al. 1, 25 Dihydroxyvitamin D3 modulated cytokine response in pulmonary tuberculosis. **Cytokine**, v. 40, n. 2, p. 128-134, 2007.

VONESSEN, M.R. et al. Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. **Nature Immunology**, v. 11, p. 344–349, 2010.

WAGENAAR, J.F.P.; MAIRUHU, A.T.A.; VAN GORP, E.C.M. Genetic influences on dengue virus infections. **Dengue Bulletin**, v.28, p. 126-134, 2004.

WALLACH, D. et al. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 331-367, 1999.

WANG, W.K. et al. Quantitative competitive reverse transcription-PCR for quantification of dengue virus RNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3306-3310, 2000.

WARMERDAM, P.A. et al. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 4, p. 1338-1343, 1991.

WESTAWAY, E.G. et al. Flaviviridae. **Intervirolgy**, v. 24, n. 4, p. 183-192, 1985.

WHITEHEAD, S.S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.

WILSON, A.G. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 3195-3199, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Technical guides for diagnosis, treatment, surveillance, prevention and control of dengue haemorrhagic fever**. Geneva: WHO, 1975.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control**. Geneva: WHO, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment prevention and control**. Geneva: WHO, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Division of control of tropical diseases**. Geneva: OMS, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **State of the art of new vaccines: research and development initiative for vaccine research**. GENEVA: WHO, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Epidemic and Pandemic Alert and Response. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.** Geneva: WHO, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** GENEVA: WHO, 2012.

WU, S.J. et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, v. 6, n. 7, p. 816-820, 2000.

XU, H. et al. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2872-2878, 2006.

YANG, Z.Y. et al. pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. **Journal of Virology**, v. 78, n. 11, p. 5642-5650, 2004.

YEE, A.M. et al. Association between FcγRIIIa-R131 allotype and bacteremic pneumococcal pneumonia. **Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of The Infectious Diseases Society of America**, v. 30, n. 1, p. 25-28, 2000.

YEH, W.T. et al. Implications of previous subclinical dengue infection but not virus load in dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 84-90, 2006.

YEN, Y.T. et al. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. **Journal of Virology**, v. 82, n. 24, p. 12312-12324, 2008.

YOUNG, P.R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053-1057, 2000.

YOUNG, B. et al. First large, multicenter, open-label study utilizing HLA-B*5701 screening for abacavir hypersensitivity in North America. **Aids**, v. 22, n. 13, p. 1673-1675, 2008.

YUAN, F.F. et al. FcγRIIIA polymorphisms in Streptococcus pneumoniae infection. **Immunology and Cell Biology**, v. 81, n. 3, p. 192-195, 2003.

ZAGNE, S.M. et al. Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 6, p. 677-679, 1994.

ZHANG, Y. et al. Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 11, p. 2604-2613, 2003.

ZHANG, Y. et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure**, v. 12, n. 9, p. 1607-1618, 2004.

ZHU, K.J.; ZHOU, W.F.; ZHENG, M. [1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues modulate the phagocytosis of human monocyte-derived dendritic cells]. **Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica**, v. 37, n. 2, p. 94-97, 2002.

5 ARTIGOS DEVIRADOS DA TESE

5.1 MANUSCRITO 1

Manuscrito intitulado “*Polymorphic Genetic Variation in Immune system genes: a study of two populations of Espirito Santo, Brazil*”, publicado (Online first) pela revista *Molecular Biology Reports*.

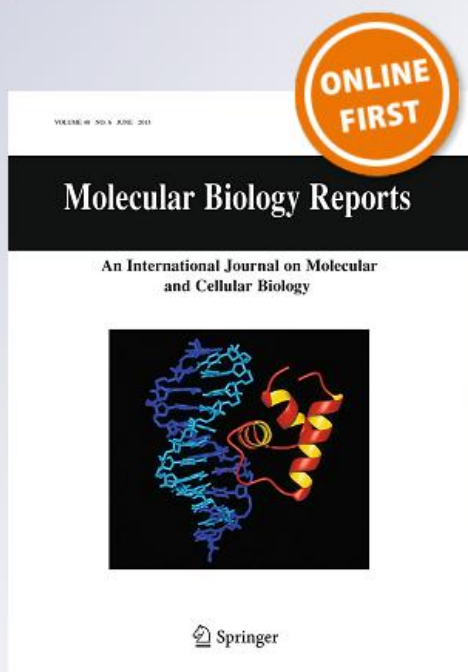
Polymorphic genetic variation in immune system genes: a study of two populations of Espirito Santo, Brazil

Raquel Spinassé Dettogni, Ricardo Tristão Sá, Thaís Tristão Tovar & Iúri Drumond Louro

Molecular Biology Reports
An International Journal on Molecular and Cellular Biology

ISSN 0301-4851

Mol Biol Rep
DOI 10.1007/s11033-013-2582-7



 Springer

Polymorphic genetic variation in immune system genes: a study of two populations of Espirito Santo, Brazil

Raquel Spinassé Dettogni · Ricardo Tristão Sá ·
Thaís Tristão Tovar · Iúri Drumond Louro

Received: 26 September 2012 / Accepted: 29 April 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Mapping single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes potentially involved in immune responses may help understand the pathophysiology of infectious diseases in specific geographical regions. In this context, we have aimed to analyze the frequency of immunogenetic markers, focusing on genes CD209 (SNP -336A/G), Fc γ RIIa (SNP -131H/R), TNF- α (SNP -308A/G) and VDR (SNP Taq I) in two populations of the Espirito Santo State (ES), Brazil: general and Pomeranian populations. Peripheral blood genomic DNA was extracted from one hundred healthy individuals of the general population and from 59 Pomeranians. Polymorphic variant identification was performed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). SNP genotype frequencies were in Hardy–Weinberg Equilibrium. There was no statistically significant difference in allelic and genotypic distributions between the two populations studied. Statistically significant differences were observed for SNP genotype distribution in genes CD209, TNF- α and VDR when comparing the ES populations with other Brazilian populations. This is the first report of CD209, Fc γ RIIa, TNF- α and VDR allelic frequencies for the general and Pomeranian populations of ES.

Keywords Polymorphisms · Immune system · Infectious diseases · Espirito Santo-Brazil

Introduction

Small genetic variations such as SNPs can influence gene expression and change protein structure or function. SNPs located in the promoter or other regulatory regions may affect gene transcription and alter variability in the immune response. The presence of certain alleles may contribute to the susceptibility or host resistance for different infectious diseases caused by viruses [1], bacteria [2] and protozoa [3–5].

SNPs in genes CD209, Fc γ RIIa, TNF- α and VDR affect the immune response for various infections [1, 6–8]. Gene and protein nomenclature are shown in Table 1.

Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN, encoded by CD209) is mainly expressed in dendritic cells (DC) and plays an important role in some infectious diseases [9–11]. DCs can be targets for pathogens, in an attempt to impair the initial immune response in early infection [12]. Among SNPs in the CD209, the guanine (G) to adenine (A) transition at position 2336 within the CD209 gene promoter (SNP -336 A/G) has been suggested to affect transcriptional activity of DC-SIGN [8]. Association studies have been performed between CD209 gene polymorphisms and pathogens: viruses such as human immunodeficiency virus-1 (HIV-1), hepatitis C virus (HCV), cytomegalovirus, Ebola virus and SARS-coV; bacteria such as *Mycobacterium tuberculosis* and parasites such as *Leishmania* and *Schistosoma mansoni* [13–17]. SNP -336A/G has been associated with the susceptibility to HIV [18], *M. tuberculosis* [19], HCV [20], and dengue [8].

Fc γ leukocyte receptors are essential for the immune defense against pathogens. Antibody binding to the Fc-receptors causes

R. S. Dettogni · T. T. Tovar · I. D. Louro (✉)
Núcleo de Genética Humana e Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Campus de Maruípe, Vitória, ES 29040-090, Brazil
e-mail: iurilouro@yahoo.com

R. T. Sá
Departamento de Clínica Médica, Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Av. Nossa Senhora da Penha, 2190, Santa Luíza, Vitória, ES 29045-402, Brazil

Table 1 SNPs associated with response to infectious diseases

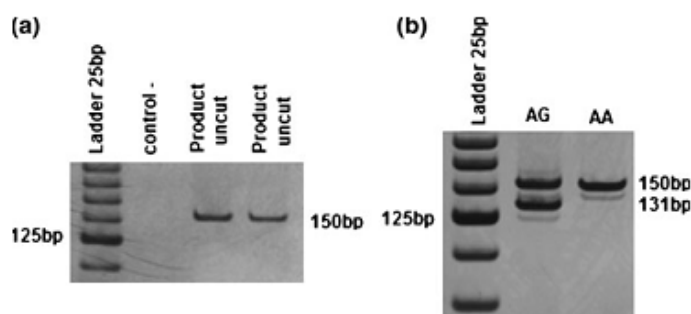
Gene	Protein	SNP	rs number	Reference allele	Variant allele
CD209	Dendritic cell-specific	-336 A/G	4804803	A	G
Fc γ RIIa	Fc gama	-131 H/R	1801274	A	G
TNF- α	Tumor necrosis factor	-308 A/G	1800629	G	A
VDR	Vitamin D receptor	Taq I	731236	T	C

Table 2 Primer sequences and RFLP conditions

Gene	SNP	Primer sequence	Product size	Restriction enzyme	Digestion pattern	Reference
CD209	-336 A/G (rs4804803)	5'-CAGAGCATG GACAGG GAGCAAG-3'	150 bp	MscI	Allele G—19 bp + 131pb	[8]
		5'- GGATGTACGTCTGCAGTGTG-3'			Allele A—150 bp	
Fc γ RIIa	-131 H/R (rs1801274)	5'- GGAAAATCCAGAAATTCTCGC-3'	366 bp	BstUI	Allele H—343 bp	[39]
		5'- CAACAGCCTGACTACCTATTACGCGGG-3'			Allele R—322 bp	
TNF- α	-308 A/G (rs1800629)	5'- AGGCAATAGTTTTGAGGGCCAT-3'	107 bp	NcoI	Allele A—107 bp	[40]
		5'- TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'			Allele G—87 bp + 20 bp	
VDR	Taq I (rs731236)	5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3'	340 bp	TaqI	Allele T—340 bp	[41]
		5'-GGATGTACGTCTGCAGTGTG-3'			Allele C—293 bp + 47pb	

bp base pairs

Fig. 1 CD209 genotypes.
a amplified DNA products.
b MscI digestion of PCR products. bp base pairs; Ladder: 25 bp molecular weight marker



important biological consequences, e.g. antibody dependent cell-mediated cytotoxicity or inhibition and phagocytosis [21]. Fc γ RIIa has two co-dominantly expressed alleles, R131 (G at position 494) and H131 (A at position 494), which differ in their ability to bind immunoglobulin G (IgG) subclasses. Cells expressing H131 bind more efficiently to IgG2 and IgG3 than those expressing the R131 variant [22]. This SNP has been associated with susceptibility and severity of some infectious disease such as meningococcal disease, *Streptococcus pneumoniae* infections, dengue fever and HIV infection [1, 23–25]. RR genotype seems to be associated with protection against intracellular pathogen infections [2, 26, 27].

TNF- α is a pleiotropic pro-inflammatory cytokine, with effects on apoptosis and activation of target cells involved in the amplification of immunological cellular processes [28]. Among several TNF- α gene polymorphisms, the SNP located at nucleotide position 308 (G or A) has been shown

to directly affect TNF- α expression [29]. The AA genotype has been significantly associated with higher TNF- α production and in some cases with increased morbidity and mortality in sepsis, malaria, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), leishmaniasis, systemic lupus erythematosus (SLE), type 1 autoimmune hepatitis and other immune mediated disorders (asthma and contact dermatitis) [30–34].

The vitamin D receptor (VDR) mediates the immunoregulatory effects of the hormonal form of vitamin D, which includes activating monocytes, stimulating cellular immune responses, suppressing immunoglobulin production and lymphocyte proliferation [35]. The TT genotype of VDR Taq I SNP (substitution of a thymine (T) for a cytosine (C) at position 352) [36] has been recently associated with tuberculoid leprosy, enhanced clearance of hepatitis B infection and resistance to pulmonary tuberculosis [37, 38].

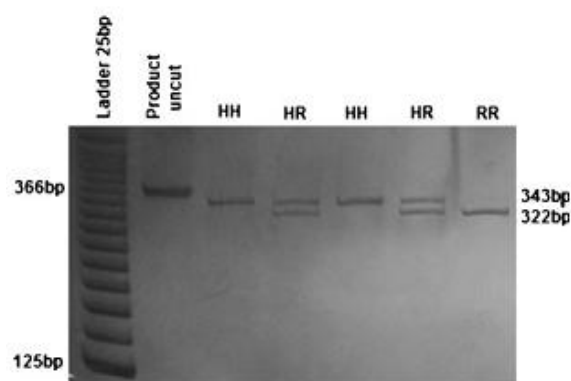


Fig. 2 Fc γ RIIIa genotypes. **a** amplified DNA products and BstUI PCR product digestion. *bp* base pairs; Ladder: 25 bp molecular weight marker

SNP frequency characterization of genes encoding immune mediators may aid in the creation of alternative methods for diagnosis, vaccine development or more effective therapies according to the population genetic profile. SNP frequencies are population specific, reason because we decided to characterize the general population

and the Pomeranian subpopulation of ES, Brazil, for 4 SNPs in immune system genes.

Materials and methods

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of ES and all patients signed an informed consent (Protocol n^o190/11).

Sample

Five milliliters (ml) of peripheral blood were collected from 100 healthy volunteers of the ES general population. As for the 59 healthy Pomeranian volunteers of Santa Maria de Jetibá, ES, 3–5 peripheral blood drops were collected on FTA[®] Elute Cards (Whatman, USA).

SNP genotyping

Genomic DNA was isolated using phenol/chloroform extraction or following FTA[®] Elute Card manufacturer's recommendations (Whatman, USA). CD209, Fc γ RIIIa, TNF- α and VDR alleles were detected by PCR-RFLP.

Fig. 3 TNF- α genotypes. **a** amplified DNA products. **b** NcoI digestion of PCR products. *bp* base pairs; Ladder: 25 bp molecular weight marker

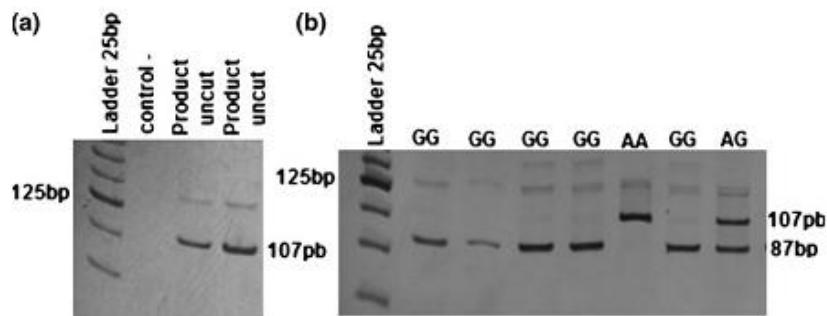


Fig. 4 VDR genotypes. **a** amplified DNA products. **b** Taq I digestion of PCR products. *bp* base pairs; Ladder: 25 bp molecular weight marker

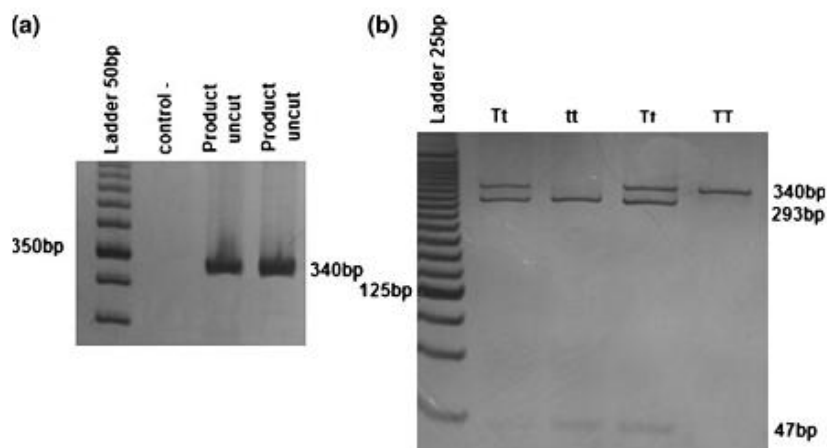


Table 3 Allele and genotype SNP frequencies

Allele/genotype	General population (n = 100)	Pomeranian population (n = 59)
<i>CD209: -336 A/G</i>		
A	62.5 (125)	80.5 (95)
G	37.5 (75)	19.5 (23)
AA	61 (61)	66.1 (39)
AG	36 (36)	28.8 (17)
GG	3 (3)	5.1 (3)
<i>FcγRIIa: -131 H/R</i>		
H	48 (96)	50.8 (60)
R	52 (104)	49.2 (58)
HH	21 (21)	22 (13)
HR	54 (54)	57.6 (34)
RR	25 (25)	20.4 (12)
<i>TNF-α: -308 A/G</i>		
A	20 (40)	17.8 (21)
G	80 (160)	82.2 (97)
AA	5 (5)	3.4 (2)
AG	30 (30)	28.8 (17)
GG	65 (65)	67.8 (40)
<i>VDR: Taq I</i>		
T	63.5 (127)	66.1 (78)
C	36.5 (73)	33.9 (40)
TT	41 (41)	44.07 (26)
TC	45 (45)	44.07 (26)
CC	14 (14)	11.9 (7)

Numbers in parenthesis represents allele or genotype counts

Primer sequences, restriction enzymes and conditions are shown in Table 2.

Statistical analysis

SNP allele and genotype frequencies were determined by direct counting. *P* values <0.05 were considered statistically significant. Chi square test was used to determine whether a genotype was at HWE, using Chi square HWE equilibrium test calculator for biallelic markers (<http://www.genes.org.uk/software/hardy-weinberg.shtml>). Fisher's exact test was performed using *Graphpad Prism*® version 5.0 (www.graphpad.com).

Results

Representative genotyping results are shown in Figs. 1, 2, 3 and 4.

SNP allele and genotype frequencies for genes *CD209*, *FcγRIIa*, *TNF-α* and *VDR* in the Pomeranian and general populations of ES are given in Table 3. All polymorphisms

Table 4 *p*- and χ^2 values for HWE calculations in both populations was performed by χ^2 -test

Gene/SNP	χ^2/p value (General population)	χ^2/p value (pomeranian population)
<i>CD209/-336 A/G</i>	0.72/0.40	0.40/0.53
<i>FcγRIIa/-131 H/R</i>	0.67/0.41	1.38/0.24
<i>TNF-α/-308 A/G</i>	0.39/0.53	0.01/0.92
<i>VDR/Taq I</i>	0.09/0.76	0.02/0.89

Table 5 Allele and genotype frequencies, *p* value calculated by Fischer's exact test

Genotype/Allele	<i>p</i> value (General population vs. Pomeranians)
<i>CD209: -336 A/G</i>	
A and G	0.32
AA	0.61
AG	0.39
GG	0.67
<i>FcγRIIa: -131 H/R</i>	
H and R	0.64
HH	1.0
HR	0.74
RR	0.57
<i>TNF-α: -308 A/G</i>	
A and G	0.66
GG	0.86
AG	1.0
AA	1.0
<i>VDR: Taq I</i>	
T and C	0.72
TT	0.74
TC	1.0
CC	0.81

were at HWE equilibrium among Pomeranian and non-Pomeranian individuals (*p* > 0.05, Table 4). Genotype and allele frequencies were not significantly different between the two populations (*p* > 0.05, Table 5).

Discussion

This study aimed to characterize the general and Pomeranian populations of ES, Brazil as for 4 SNPs in genes important for the immune response to infections.

Allelic frequencies for all SNPs were in HWE equilibrium. There was no statistically significant difference in allelic and genotypic distributions between the two populations. This result confirms data of Stur et al. [42] which reported gene flow between the general and Pomeranian populations of ES.

Table 6 SNPs frequencies in association studies of various ethnic groups (healthy individuals). *P* values calculated by Fischer's exact test

SNP	Population	Sample size	Genotype	Frequency	<i>p</i> value (population of column 2 vs. general population of ES)	<i>p</i> value (population of column 2 vs. pomeranian population of ES)	Reference
CD209: -336 A/G	Taiwanese	120	AA	111	<0.0001*	<0.0001*	[43]
			AG	9	<0.0001*	0.0004*	
			GG	0	0.1	0.03*	
	South African	360	AA	137	<0.0001*	<0.0001*	[19]
			AG	156	0.21	0.04*	
			GG	67	<0.0001*	0.008*	
	Brazilian (Sao Paulo)	32	AA	18	0.68	0.37	[44]
			AG	9	0.52	1.0	
			GG	5	0.02*	0.12	
FcγRIIa: -131 H/R	African American	170	HH	44	0.38	0.6	[45]
			HR	73	0.1	0.07	
			RR	53	0.33	0.13	
	Caucasian	220	HH	69	0.06	0.15	
			HR	97	0.1	0.08	
			RR	54	1.0	0.6	
	Brazilian (Sao Paulo)	48	HH	13	0.41	0.65	[22]
			HR	25	0.2	0.7	
			RR	10	0.68	1.0	
TNF-α: -308 A/G	Italian	138	GG	109	0.02*	0.1	[6]
			GA	29	0.13	0.27	
			AA	0	0.01*	0.09	
	American (USA)	235	GG	164	0.44	0.75	[46]
			GA	67	0.79	1.0	
			AA	4	0.13	0.35	
	Brazilian (Minas Gerais)	43	GG	29	0.85	1.0	[47]
			GA	14	0.84	0.83	
			AA	0	0.32	0.51	
VDR: Taq I	Vietnamese	247	TT	231	<0.0001*	<0.0001*	[1]
			TC	15	<0.0001*	<0.0001*	
			CC	1	<0.0001*	<0.0001*	
	Indian	143	TT	70	0.24	0.54	[48]
			TC	62	0.89	1.0	
			CC	11	0.13	0.42	
	Brazilian (Rio de Janeiro)	40	TT	29	0.001*	0.007*	[49]
			TC	7	0.003*	0.009*	
			CC	4	0.78	1.0	

* Statistically significant values

For each SNP, we analyzed the difference in genotype distribution among ES populations and two other populations of different ethnic groups randomly selected and a population of southeast Brazil (Table 6).

CD209 gene SNP showed a significant difference in genotype distribution between the ES populations separately, as well as when they were compared with the population of Taiwan and South Africa. Moreover, the GG

genotype had a significant difference in distribution between the general ES and Sao Paulo populations.

FcγRIIa SNP genotype distribution was not different among ES populations and other populations analyzed.

Comparing TNF-α SNP genotype frequencies among ES populations and other 3 populations, there was a statistically significant difference in homozygous genotypes distribution between the general ES population and Italians.

VDR SNPs showed a significant difference in genotype distribution among ES populations and populations of Rio de Janeiro and Vietnam.

These variations indicate the need to characterize specific populations for SNP composition in genes important for the immune system in various regions of the world.

The ES state, as well as the entire southeastern Brazil, presents high prevalence of many infectious diseases. Thus, assessing the genetic diversity of immune system components may generate knowledge relevant to the understanding of how the population responds to infectious diseases such as dengue, tuberculosis, hepatitis, malaria, HIV and others.

Acknowledgments RSD was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) scholarships. This work was supported by FAPES.

References

- Loke H, Bethell D, Phuong CXT et al (2002) Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in Vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and Fcγ receptor IIA genes. *Am J Trop Med Hyg* 67:102–106
- Yee AMF, Phan HM, Zuniga R et al (2000) Association between FcγRIIa-R131 allotype and bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 30:25–28
- Aucan C, Traore Y, Tall F et al (2000) High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 68:1252–1258
- Omi K, Ohashi J, Patarapotikul J et al (2002) Fcγ receptor IIA and IIB polymorphisms are associated with susceptibility to cerebral malaria. *Parasitol Int* 51:361–366
- Shi YP, Nahlen BL, Kariuki S et al (2001) Fcγ receptor IIA (CD32) polymorphism is associated with protection of infants against high-density *Plasmodium falciparum* infection. *J Infect Dis* 184:107–111
- Boin F, Zanardini R, Piolo R et al (2001) Association between G308A tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 6:79–82
- Garcia G, Sierra B, Perez AB et al (2010) Asymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the FcγRIIa polymorphism. *Am J Trop Med Hyg* 82:1153–1156
- Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I et al (2005) A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet* 37:507–513
- Cambi A, Gijzen K, de Vries JM et al (2003) The C type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* 33:532–538
- Rappocciolo G, Jenkins FJ, Hensler HR et al (2006) DCSIGN is a receptor for human herpes virus 8 on dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 176:1741–1749
- Tassaneetrih B, Burgess TH, Granelli-Piperno A et al (2003) DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 197:823–829
- Rinaldo CR Jr, Piazza P (2004) Virus infection of dendritic cells: portal for host invasion and host defense. *Trends Microbiol* 12:337–345
- Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H et al (2002) Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans infection. *Immunity* 17:653–664
- Klimstra WB, Nangle EM, Smith MS et al (2003) DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell and mammalian cell-derived viruses. *J Virol* 77:12022–12032
- Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL et al (2003) DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 197:121–127
- Van Kooyk Y, Appelmelk B, Geijtenbeek TB (2003) A fatal attraction: mycobacterium tuberculosis and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. *Trends Mol Med* 9:153–159
- Yang ZY, Huang Y, Ganesh L et al (2004) pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DCSIGN. *J Virol* 78:5642–5650
- Martin MP, Lederman MM, Hutcheson HB et al (2004) Association of DC-SIGN promoter polymorphism with increased risk for parenteral, but not mucosal, acquisition of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 78:14053–14056
- Barreiro LB, Neyrolles O, Babb CL et al (2006) Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS Med* 3:e20. doi:10.1371/journal.pmed.0030020
- Ryan EJ, Dring M, Ryan CM et al (2010) Variant in CD209 promoter is associated with severity of liver disease in chronic hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 71:829–832
- Van der Pol WL, Van de Winkel JGJ (1998) IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease. *Immunogenetics* 48:222–232
- Bazilio AP, Viana VST, Toledo R et al (2004) FcγRIIa polymorphism: a susceptibility factor for immune complex-mediated lupus nephritis in Brazilian patients. *Nephrol Dial Transplant* 19:1427–1431
- Brouwer KC, Lal RB, Mirel LB et al (2004) Polymorphism of Fc receptor IIA for IgG in infants is associated with susceptibility to perinatal HIV-1 infection. *AIDS* 18:1187–1194
- Platonov AE, Shipulin GA, Vershinina IV et al (1998) Association of human Fc gamma RIIa (CD32) polymorphism with susceptibility to and severity of meningococcal disease. *Clin Infect Dis* 27:746–750
- Yuan FF, Wong M, Pererva N et al (2003) FcγRIIa polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Immunol Cell Biol* 81:192–195
- Bossuyt X, Moens L, Van Hoeyveld E et al (2007) Coexistence of (partial) immune defects and risk of recurrent respiratory infections. *Clin Chem* 53:1124–1130
- Cooke G, Aucan C, Walley AJ et al (2003) Association of FcγRIIa polymorphism with severe Malaria in West Africa. *Am J Trop Hyg* 69:565–568
- Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV et al (1997) MAP3K-related kinase involved in NF-κB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385:540–544
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL et al (1994) Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci* 94:3195–3199
- Czaja AJ, Cookson S, Constantini PK et al (1999) Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 117:645–652
- Knight JC, Udalova I, Hill AV et al (1999) A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 22:145–150
- Li Kam Wa TC, Mansur AH, Britton J et al (1999) Association between -308 tumor necrosis factor promoter polymorphism and

- bronchial hyper reactivity in asthma. *Clin Exp Allergy* 29: 1204–1208
33. Mira JP, Cariou A, Grall F et al (1999) Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 282:561–568
 34. Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E et al (2000) TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 43:129–134
 35. MacDonald PN, Dowd DR, Haussler MR (1994) New insight into the structure and functions of the vitamin D receptor. *Semin Nephrol* 14:101–118
 36. Gennari L, Becherini L, Masi L et al (1997) Vitamin D receptor genotypes and intestinal calcium absorption in postmenopausal women. *Calcified tissue Int* 61:460–463
 37. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T et al (1999) Tuberculosis and chronic hepatitis virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 179:721–724
 38. Roy S, Frodsham A, Saha B et al (1999) Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis* 179:187–191
 39. Jiang XM, Arepally G, Poncz M et al (1996) Rapid detection of the Fc gamma RIIA-H/R 131 ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J Immunol Methods* 199:55–59
 40. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI et al (1992) Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1:353
 41. Hennig BJW, Parkhill JM, Chapple ILC et al (1999) Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. *J Periodontol* 70:1032–1038
 42. Stur E, Silveira NA, Selvatici LS et al (2012) Polymorphism Analysis of MTHFR, Factor II and Factor V genes in the Pom-eranian population of Espirito Santo-Brazil. *Genet Test Mol Biomarkers* 16:219–222
 43. Wang L, Chen R-F, Liu J-W et al (2011) 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* 5:e934. doi:10.1371/journal.pntd.0000934
 44. Kashima S, Rodrigues ES, Azevedo R et al (2009) DC-SIGN (CD209) gene promoter polymorphisms in a Brazilian population and their association with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *J Gen Virol* 90:927–934
 45. Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S et al (1999) Variant genotypes of the low affinity Fc gamma Receptors in two control populations and a review of low affinity receptor polymorphisms in control and disease population. *Blood* 94:4220–4232
 46. Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD et al (2002) Relation between tumor necrosis factor polymorphism TNFa-308 and risk of asthma. *Eur J Hum Genet* 10:82–85
 47. Moreira PR, Costa JE, Gomez RS et al (2009) TNFA and IL10 gene polymorphisms are not associated with periodontitis in brazilians. *Open Dent J* 3:184–190
 48. Bhanushali AA, Laipal N, Kulkarni SS et al (2009) Frequency of fokI and taqI polymorphism of vitamin D receptor gene in Indian population and its association with 25 hydroxyvitamin D levels. *Indian J Hum Genet* 15:108–113
 49. Bezerra FF, Cabello GMK, Mendonça LMC et al (2008) Bone mass and breast milk calcium concentration are associated with vitamin D. *J Nutr* 138:277–281

5.2 MANUSCRITO 2

Manuscrito formato, submetido para revista *Human Immunology*, como pode ser verificado pelo e-mail da confirmação de submissão que se encontra ao final deste manuscrito.

Analysis of cytokine gene polymorphisms in two populations of Espirito Santo, Brazil.

Raquel Spinassé Dettogni^{1,5}, Ricardo Tristão-Sá², Thaís Tristão Tovar¹, Marcelo dos Santos³, Franciane Figueiredo da Silva⁴, Iúri Drumond Louro¹

¹Núcleo de Genética Humana e Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468 - Campus de Maruípe, 29040-090 – Vitória – ES – Brazil

²Departamento de Clínica Médica, Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Av. Nossa Senhora da Penha, 2190 – Santa Luíza, 29045-402 – Vitória – ES – Brazil

³Departamento de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Caicó, RN, 59300-000, Brazil

⁴Laboratório de Estatística, Departamento de Estatística, Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, S/N, 29060-900 – Goiabeiras – Vitória – ES – Brazil

⁵Corresponding author: Raquel Spinassé Dettogni

Telephone: +55-27-99848.4190

email: rasdett@yahoo.com.br

Keywords: Polymorphisms; Interleukin-4; Interleukin-6; Interferon-gamma; Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; Infectious diseases; Espirito Santo-Brazil.

Running title: Citokine gene polymorphisms in Espirito Santo.

Abstract

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in cytokine genes influence the outcome of many infectious diseases. The cytokine profile may represent a valuable tool for the characterization of immunological response patterns, helping in the identification of risk groups for development of severe infectious and in the development of more effective therapies and vaccines. Therefore, we have analyzed the frequency of SNP interleukin-4 (IL-4) *-590C/T* (rs2243250), an anti-inflammatory cytokine, and SNPs interleukin-6 (IL-6) *-174G/C* (rs1800795) and interferon-gamma (INF- γ) *+874A/T* (rs2430561), pro-inflammatory cytokines. These analyses were performed in the general population of the Espirito Santo State (ES), Brazil, as well as in the Pomeranian isolate population, in the same state. Peripheral genomic DNA was extracted from one hundred healthy individuals of the General population and from 59 Pomeranians. Polymorphic variant identification was performed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in both populations, except the IL-6 SNP in the general population ($p = 0.00$). We observed a statistically significant difference in IL-6 ($p = 0.03$) and INF- γ ($p = 0.07$) SNPs distributions between the two populations, allowing for the determination of distinct cytokine SNP profiles. The genetic distance between the two populations was not statistically significant ($F_{st} > 0.05$).

Keywords: Polymorphisms; Interleukin-4; Interleukin-6; Interferon-gamma; Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; Infectious diseases; Espirito Santo-Brazil.

1. Introduction

In most infectious diseases, the naturally acquired immune response results in the elimination of the infectious agent or in a persistent response mediated by proteins secreted during innate and adaptive immunological responses called cytokines [1,2]. Infection outcome depends on a balance between pro and anti-inflammatory cytokines [2,3].

Allelic variants or SNPs in cytokines genes have been shown to influence gene transcription and the pathogenesis of various infectious diseases [2,4-6]. Thus, SNPs in various well-known cytokines genes have been considered important host factors influencing infection response and clinical outcome [3]. Among the most studied anti-inflammatory cytokines is IL-4, whereas notorious pro-inflammatory cytokines are IL-6 and INF- γ . Nomenclature for gene, protein and SNPs are shown in Table 1.

Interleukin-4 is an anti-inflammatory cytokine which promotes T-helper type 2 (Th2) responses [7,8]. The IL-4 gene is located in region 5q31.1. A cytosine (C) to thymine (T) substitution in the gene promoter region, SNP -590C/T (2243250), may increase IL-4 production [9], altering immune response to various infections [10].

Interleukin-6 is a pro-inflammatory involved in the acute phase response, B-cell maturation, macrophage differentiation and T-helper type1 (Th1)/Th2 responses (IL-6 promotes Th2 differentiation and simultaneously inhibits Th1 differentiation) [11]. The IL-6 gene is mapped in region 7p21.24 and it is believed that the presence of guanine (G) on the promoter, SNP -174G/C (1800795), is associated with higher plasma IL-6 levels. This fact has been studied in several infectious diseases [12,13].

Interferon- γ is a pro-inflammatory cytokine secreted mainly by CD4⁺ Th1 cells, CD8⁺ T cells and natural killer cells [14]. This cytokine's main role is to induce macrophage-mediated microbicidal functions [15] and host defense against intracellular pathogens [14]. The INF- γ gene is located in the 12q24.1 region and SNP +874T/A (2430561) [16] has been a largely studied in infectious diseases (Cardoso *et al.*, 2010). The T allele correlates with high INF- γ expression, whereas the adenine (A) allele correlates with low INF- γ expression [17-19].

In the mountainous region of ES, is the third largest population of Pomeranian descent. These descendants immigrated originally from the north of Europe, and because of their preferential marriage, religious and other cultural habits, they show little or no reproductive mixing with local populations [20,21] suggesting a considerable degree of endogamy.

Population cytokine profile characterization may represent a valuable tool for the understanding of immunological response patterns, assisting in the identification of risk groups for development of severe infections, as well as in the

Abbreviations:

SNP - Single Nucleotide Polymorphism

PCR-RFLP - Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism

IL-4 - Interleukin-4

IL-6 - Interleukin-6

INF- γ - Interferon-gamma

IgG - Immunoglobulin type G

HWE - Hardy-Weimberg Equilibrium

ES - Espirito Santo

development of more effective therapies and vaccines. Characterization of two distinct populations in the same state allow us to understand the specificities found in the same geographical region and help us establish specific prevention and control strategies for each population.

2. Materials and Methods

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of ES and all patients signed an informed consent (Protocol n° 190/11).

2.1 Sample

Five milliliters (ml) of peripheral blood were collected from 100 healthy volunteers of the ES general population. As for the 59 healthy Pomeranian volunteers of Santa Maria de Jetibá, ES, 3-5 peripheral blood drops were collected on FTA® Elute Cards (Whatman, USA).

2.2 SNP genotyping

Genomic DNA was isolated using phenol/chloroform extraction or following FTA® Elute Card manufacturer's recommendations (Whatman, USA). Interferon- γ , IL-4 and IL-6 alleles were detected by PCR-RFLP. Primer sequences, restriction enzymes and conditions are shown in Table 2.

2.3 Statistical analysis

Genotypic frequencies were tested for HWE. The chi-square (χ^2) and Fisher exact tests were used for population difference analysis and confirmation was obtained by the Lilliefors test (significance considered when $p < 0.05$). The F-statistic model was used to evaluate genetic differentiation among populations. Statistical calculations were performed using Epi Info® v3.4.3, 2007 and Statsoft Statistica® v7.0.61.0 softwares.

3. Results

Representative genotyping results are show in Figures 1, 2 and 3. SNP allele and genotype frequencies for the three cytokine genes in the Pomeranian and General populations of ES are given in Table 3. Genotype frequencies were significantly different between the two populations for INF- γ ($p = 0.007$) and IL-6 ($p = 0.03$) genes (Table 3). All polymorphisms were at HWE in both populations, except the IL-6 SNP in the General population ($p = 0.00$) (Table 4). The genetic distance coefficient (F_{st}), a measure of population differentiation based on genetic polymorphisms, is described in Table 4. Our results showed no genetic distance between the two populations ($p > 0.05$)

4. Discussion

This study characterized the general and the Pomeranian populations of ES, Brazil for 3 SNPs in cytokines genes, one anti-inflammatory cytokine (IL-4) and two pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IFN- γ). These cytokines play important roles in the outcome of various diseases for participating in the host immune response to pathogens, in inflammatory processes, among other functions [7]. Because allelic and genotypic SNP frequencies are population specific [7,12,13, 22-24], population characterization studies may help determine specific genetic profiles, as well as specific regional response to infectious diseases, such as host resistance, susceptibility, severity and permanence of the clinical symptoms.

Interleukin-6 and IFN- γ SNPs were significantly different in the two populations. In contrast to what was observed in Dettogni et al. [25] and Stur et al. [26], in this study there was a difference in genotype frequencies among the two populations of ES. This observation leads us to conclude that although there is gene flow between the two populations, some SNP frequencies remain different. This suggests that these two populations may still have some degree of isolation. However, the F_{st} values demonstrate that the genetic distance between the two populations is not statistically significant, with values >0.05 , suggesting admixture of the two populations in question. Further studies with larger samples are needed.

Interleukin-6 SNP was not in HWE in the General population, but as in other studies [23,24], the most frequent genotype was the homozygous *GG*. It has been reported that many SNPs may not be in HWE for no obvious reasons, especially if the population is ethnically diverse [27]. Probably the wide genetic admixture of the Brazilian population and consequently of the General population of ES may have influenced our results. Dos Santos et al. [28] suggest that the Brazilian population is under a miscegenation process, which could explain the fact that this SNP genotypes are not in HWE.

The characterization of different populations has an important application: serves as reference for association studies of SNPs with characteristics of infectious disease, specifically. This is the first study to determine the frequencies of SNPs *-590C/T* (IL-4), *-174G/C* (IL-6) and *+874A/T* (IFN- γ) in the general and Pomeranian populations of ES, Brazil.

5. Acknowledgments

RSD was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) scholarships. This work was supported by FAPES.

6. References

- [1] Marty AM, Jahrling PB, Geisbert TW. Viral hemorrhagic fevers. *Clin Lab Med* 2006; 26: 345-386.
- [2] Medina TS, Costa SP, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, et al. Increased interleukin-10 and interferon-gamma levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malar J* 2011; 10: 264.
- [3] Lee JY, Kim HY, Kim KH, Kim SM, Jang MK, Park JY, et al. Association of polymorphism of IL-10 and TNF-A genes with gastric cancer in Korea. *Cancer Lett* 2005; 225: 207-214.
- [4] Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun* 1999; 1: 3-19.
- [5] Hurme M, Lahdenpohja N, Santtila S. Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune diseases. *Ann Med* 1998; 30: 469-473.
- [6] Rad R, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, et al. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 2004; 53: 1082-1089.
- [7] Dittmer U, Peterson KE, Messer R, Stromnes IM, Race B, Hasenkrug KJ. Stromnes IM, Race B, Hasenkrug KJ. Role of interleukin-4 (IL-4), IL-12, and gamma interferon in primary and vaccine-primed immune responses to Friend retrovirus infection. *J Virol* 2001; 75: 654-660.
- [8] Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 1995; 16: 34-38.
- [9] Chu H, Wang M, Yan F, Zhong D, Shi D, Ma L, et al. Polymorphisms in the IL-13 and IL-4R genes are associated with the development of renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2012; 23: 2114-2121.
- [10] Moran TM, Isobe H, Fernandez-Sesma A, Schulman JL. Interleukin-4 causes delayed virus clearance in influenza virus-infected mice. *Journal of virology* 1996; 70: 5230-5235.
- [11] Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 2001; 39: 531-536.
- [12] Fernandez-Real JM, Vendrell J, Richart C, Gutierrez C, Ricart W. Platelet count and interleukin 6 gene polymorphism in healthy subjects. *BMC Med Genet* 2001; 2: 6.
- [13] Honsawek S, Deepaisarnsakul B, Tanavalee A, Yuktanandana P, Bumrungrpanichthaworn P, Malila S, Saetan N. Association of the IL-6 -174G/C gene polymorphism with knee osteoarthritis in a Thai population. *Genet Mol Res* 2011; 10: 1674-1680.
- [14] Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, Venturini J, et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum Genet* 2010; 128: 481-490.
- [15] Nathan CF, Prendergast TJ, Wiebe ME, Stanley ER, Platzer E, Remold HG, et al. Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-gamma. *J Exp Med* 1984; 160: 600-605.
- [16] Kimkong I, Nakkuntod J, Sodsai P, Hirankarn N, Kitkumthorn N. Association of interferon-gamma gene polymorphisms with susceptibility to oral lichen planus in the Thai population. *Arch Oral Biol* 2012; 57: 491-494.
- [17] Lopez-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, González A, Codoceo R, Madero R, et al. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 970-975.

- [18] Murray CJ, Styblo K, Rouillon A. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1990; 65: 2-20.
- [19] Vallinoto AC, Graça ES, Araujo MS, Azevedo VN, Cayres-Vallinoto I, Machado LFA, et al. IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection and clinical manifestation of tuberculosis. *Hum Immunol* 2010; 71: 692-696.
- [20] Bahia J. A “lei da vida”: confirmação, evasão escolar e reinvenção da identidade entre os pomeranos. *Educ Pesqui* 2001; 27: 69-82.
- [21] Domingues RB, Aquino CCH, Santos JG, Silva ALP, Kuster GW. Prevalence and impact of headache and migraine among Pomeranians in Espírito Santo, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2006; 64: 954-957.
- [22] Ben Selma W, Harizi H, Bougmiza I, Hannachi N, Ben Kahla I, Zaineni R, et al. Interferon gamma +874T/A polymorphism is associated with susceptibility to active pulmonary tuberculosis development in Tunisian patients. *DNA Cell Biol* 2011; 30: 379-387.
- [23] Moreira ST, Cardoso DM, Visentainer JE, Fonsar UJV, Moliterno RA. The Possible Protective Role of the IL6-174GC Genotype in Dengue Fever. *Open Trop Med J* 2008; 1: 87-91.
- [24] Pieroni F, Lourenço DM, Morelli VM, Maffei FH, Zago MA, Franco RF. Cytokine gene variants and venous thrombotic risk in the BRATROS (BRAZILIAN THROMBOSIS STUDY). *Thromb Res* 2007; 120: 221-229.
- [25] Dettogni RS, Tristão-Sa R, Tovar TT, Louro ID. Polymorphic genetic variation in immune system genes: a study of two populations of Espírito Santo, Brazil. *Mol Biol Rep* 2013; 40: 4843-4849.
- [26] Stur E, Silveira AN, Selvatici LS, Alvez LNR, Wolfgramm EV, Tovar TT, et al. Polymorphism analysis of MTHFR, factor II, and factor V genes in the Pomeranian population of Espírito Santo, Brazil. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16: 219-222.
- [27] Weinberg CR, Morris RW. Invited commentary: Testing for Hardy-Weinberg disequilibrium using a genome single-nucleotide polymorphism scan based on cases only. *Am J Epidem* 2003; 158: 401-403.
- [28] dos Santos M, Stur E, Maia LL, Agostini LP, Peterle GT, Mendes SO, et al. Genetic variability of inflammatory genes in the Brazilian population. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 17: 844-848.

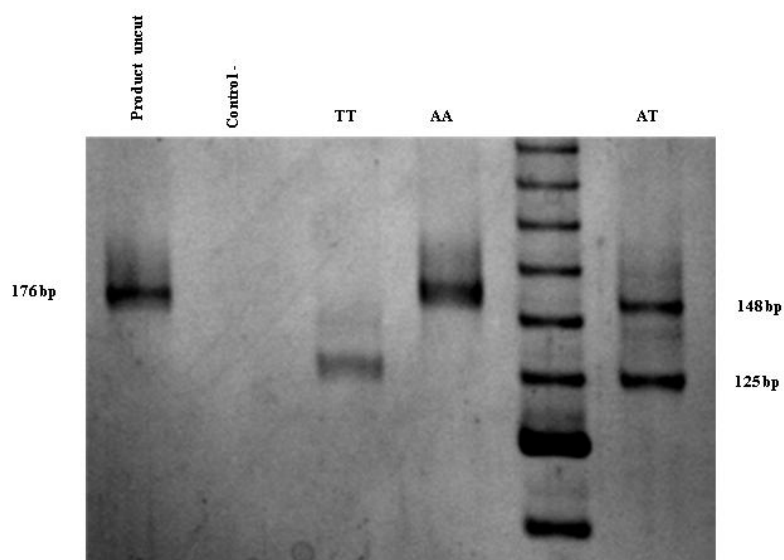


Fig. 1 INF- γ genotypes. Amplified DNA products and HinfI PCR products digestion. bp: base pairs; Ladder: 25 bp molecular weight marker.

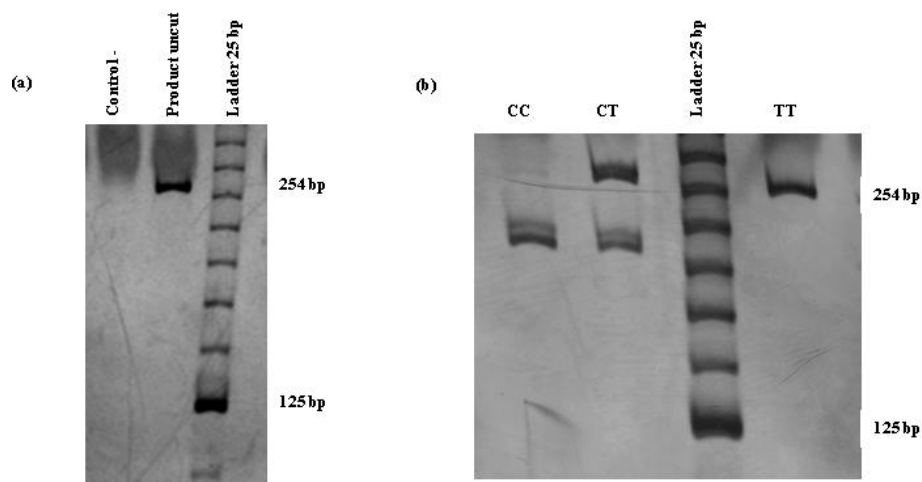


Fig. 2 IL-4 genotypes. a) amplified DNA products. b) BsmFI PCR products digestion. bp: base pairs; Ladder: 25 bp molecular weight marker.

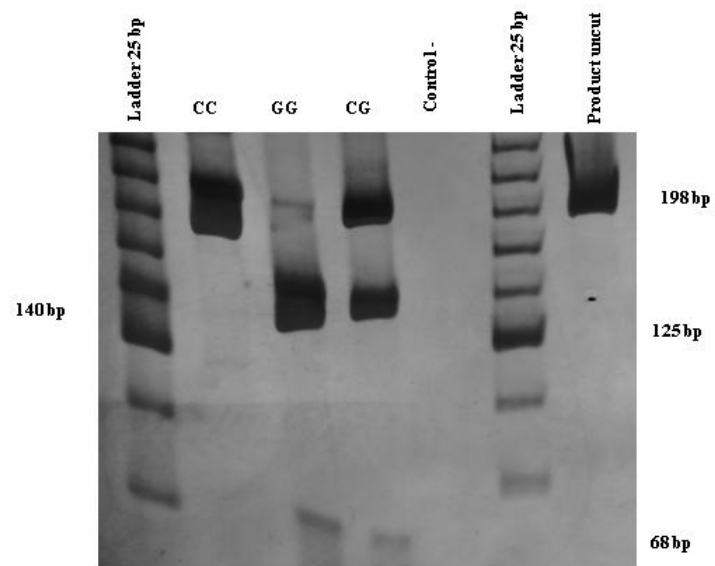


Fig. 3 IL-6 genotypes. Amplified DNA products and SfaNI PCR products digestion. bp: base pairs; Ladder: 25 bp molecular weight marker.

Table 1 Single Nucleotide Polymorphisms in cytokine genes.

Gene	Protein	SNP	rs number	Reference allele	Variant allele
INF- γ	Interferon gamma	+874A/T	2430561	A	T
IL-4	Interleukin-4	-590C/T	2243250	C	T
IL-6	Interleukin-6	-174G/C	1800795	G	C

SNP: Single Nucleotide Polymorphism.

Table 2 Primer sequences and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism conditions.

Gene	SNP	Primer sequence	Product size	Restriction enzyme	Digestion pattern	Reference
INF- γ	+874A/T (rs2430561)	5'-GATTTTATTCTTACAACACAAAATCAAGAC-3' 5'-GCAAAGCCACCCCACTATAA-3'	176 bp	HinfI	Allele T-148 bp + 28 bp Allele A-176 bp	Ben Selma <i>et al.</i> , 2011
IL-4	-590C/T (rs2243250)	5'-ACTAGGCCTCACCTGATACG-3' 5'-GTTGTAATGCAGTCCTCCTG-3'	254 bp	BsmFI	Allele C-210 bp + 44 bp Allele T-254 bp	Lee <i>et al.</i> , 2005
IL-6	-174G/C (rs1800795)	5'-TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT-3' 5'-CTGATTGGAAACCTTATTAAG-3'	198 bp	SfaNI	Allele G-140 bp + 68 bp Allele C-198 bp	Fernandez-Real <i>et al.</i> , 2001

bp: base pairs. SNP: Single Nucleotide Polymorphism.

Table 3 Genotype frequencies of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes.

Genotype	General population (n = 100) n (%)	Pomeranian population (n = 59) n (%)	p (General population vs Pomeranian population)
INF- γ : +874A/T			0.007*
AA	49 (49)	24 (14)	
AT	36 (36)	56 (33)	
TT	15 (15)	20 (12)	
IL-4: -590C/T			0.053
CC	38 (38)	58 (34)	
CT	45 (45)	32 (19)	
TT	17 (17)	10 (6)	
IL-6: -174G/C			0.03*
GG	59 (59)	37 (22)	
GC	26 (26)	41 (24)	
CC	15 (15)	22 (13)	

* Statistically significant. p: significance value

Table 4 Hardy-Weinberg equilibrium analysis.

Gene/SNP	HWE		F _{st}
	x ² /p (General population)	x ² /p (Pomeranian population)	
INF-γ/+874A/T	3.45/0.06	0.85/0.36	>0.05
IL-4/-590C/T	0.34/0.56	1.68/0.19	>0.05
IL-6/-174G/C	12.61/0.00*	1.65/0.20	>0.05

Equilibrium was assumed when $p > 0.05$. * Statistically significant. χ^2 : Chi-square. p: Significance value. F_{st}: Genetic distance coefficient. HWE: Hardy-Weinberg equilibrium.

5/1/2015

Imprimir

Assunto: Submission Confirmation

De: Human Immunology (ees.him.0.2e687f.f67ef03a@eesmail.elsevier.com)

Para: rasdett@yahoo.com.br; rasdett@hotmail.com;

Data: Segunda-feira, 5 de Janeiro de 2015 13:57

Dear Raquel,

Your Research Article submission entitled "Analysis of cytokine gene polymorphisms in two populations of Espirito Santo, Brazil." has been received by Human Immunology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/him/>.

Your username is: rasdett@yahoo.com.br

Your password is: *****

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Human Immunology

5.3 MANUSCRITO 3

Manuscrito formato, submetido para revista *Human Immunology*, como pode ser verificado pelo e-mail da confirmação de submissão que se encontra ao final deste manuscrito.

Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons

Raquel Spinassé Dettogni^{1,5}, Ricardo Tristão-Sá², Marcelo dos Santos³, Franciane Figueiredo da Silva⁴, Iúri Drumond Louro¹

¹Núcleo de Genética Humana e Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468 - Campus de Maruípe, 29040-090 – Vitória – ES – Brazil

²Departamento de Clínica Médica, Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Av. Nossa Senhora da Penha, 2190 – Santa Luíza, 29045-402 – Vitória – ES – Brazil

³Departamento de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Caicó, RN, 59300-000, Brazil

⁴Laboratório de Estatística, Departamento de Estatística, Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, S/N, 29060-900 – Goiabeiras – Vitória – ES – Brazil

⁵Corresponding author: Raquel Spinassé Dettogni

Telefone: +55-27-99848.4190

email: rasdett@yahoo.com.br

Keywords: Immune system SNPs; receptors; cytokines; dengue; symptoms persistent.

Running title: Immune system and dengue persistent symptoms.

Abstract

This study was undertaken to determine the prevalence of dengue clinical symptom persistence during 60 days of disease follow up, in patients of Espírito Santo state (ES)-Brazil and to evaluate the relation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Fc γ R2a, CD209, VDR, TNF- α , IL-4, IL-6 and IFN- γ genes with symptom persistence. During 2012-2013, 96 blood samples from individuals diagnosed with symptomatic dengue were collected. Clinical symptom persistence in 60 days of follow-up was assessed by a clinical and epidemiological questionnaire filled in 4 interviews. SNP genotyping was performed by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). In two months of monitoring the dengue infection, we observed that symptoms persisted in 38.5% (37/96) of dengue patients at the end of the first month (D30) and in 11.5% (11/96) of dengue patients at the end of the second month (D60). Our results show an association between Fc γ R2a, TNF- α and IL-6 gene SNPs and symptom persistence and an association trend with CD209, IL-4 and IFN- γ gene SNPs. Our findings may contribute to the development of effective therapies and vaccines against the dengue virus (DENV) and help in the selection of risk groups for symptoms persistence.

Keywords: Immune system SNPs; receptors; cytokines; dengue; symptoms persistent.

1. Introduction

Clinically, dengue symptoms are characterized by a maximum duration of 14 days despite complaints of longer symptoms [1-6]. Although the acute manifestations of dengue are well known, few studies have assessed the long-term consequences of dengue infection [3]. Several studies have correlated immune system SNPs with protection or susceptibility to the development of severe dengue, not severe dengue or both, demonstrating the importance of host immune gene variants in its pathogenesis [7-10]. There is a lack of reports about clinical symptoms persistence and patient's immune system genetic characteristics [1]. Evidences from several epidemiological studies indicate that host genetic factor, such as innate and adaptative immunity variants, play an important role in DENV infection susceptibility, protection, outcome and severity [11].

Candidate immune system gene variants involved in the pathogenesis of dengue and possibly with persistence of clinical symptoms are: FcγR2a (FcγRIIa); Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN) and Vitamin D Receptor (VDR); pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and interferon-gamma (INF-γ) and anti-inflammatory cytokine interleukin-4 (IL-4).

FcγRIIa (CD32) is a cell surface receptor on immune cells, that binds to the fragment crystallisable (Fc) portion of immunoglobulins type G (IgGs) and is essential for infection defense [12]. Binding of the FcγRIIa receptor to IgG opsonized DENV can activate phagocytes, which triggers a variety of biological responses [13]. Furthermore, DENV uses this receptor to amplify their infection by a mechanism called antibody-dependent enhancement (ADE). The gene encoding FcγRIIa is located on 1q23 region and the SNP *-131 H/R* (rs1801274) at position 494 (A or G) changes the amino acid at position 131, resulting in two forms of FcγRIIa [14]: the normal allele with *CAT* codon encoding histidine (*H*) confers the ability to bind the IgG2 and IgG3 and the variant allele with *CGT* codon encoding arginine (*R*) results in efficient receptor binding IgG1 [8,13,14]. Dengue studies show the association between the *R* allele and recessive protection against development of severe dengue [9].

The CD209 gene is located on 19p13. 2-3 region and encodes the receptor DC-SIGN (aka CD209). This molecule is a DENV attachment receptor, essential for infection of DCs [15]. Several SNPs in the CD209 promoter have been described, of which *-336 A/G* (rs4804803) affects the gene transcription [16]. It is believed that the variant guanine (*G*) at position 336 in the promoter region is associated with dominant protection against non-severe dengue [10].

VDR influences the immunoregulatory effects of 1, 25 dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)₂D3), participating in the differentiation, development and effector function of T lymphocytes, monocyte activation, the suppression of IgG production and of proliferation of B lymphocytes [17]. The VDR gene is located on 12q13-14 region and its SNP *TaqI* (rs731236) exchange a thymine (T) for a cytosine (C) in exon 9 [9]. VDR expression affects the susceptibility to severe dengue [17]. The C allele was associated with protection against severe dengue [11].

TNF- α is a pleiotropic pro-inflammatory cytokine, with effects on activation of target cells involved in the amplification of innate and adaptative immunity [18]. The TNF- α gene is located on chromosome 6p21 and SNP -380 G/A (rs1800629) has been shown to directly affect TNF- α expression [19]. Studies in various populations have shown an association between the A allele (high production of TNF- α) and severe dengue [20].

The IL-4 is an anti-inflammatory cytokine which promotes T helper type 2 (Th2) responses, stimulating B-cell proliferation and differentiation to produce predominantly IgG1 and IgE antibodies, as well as suppresses T helper type 1 (Th1) responses [8]. IL-4 gene is located on chromosome 5q31.1 [21]. The C to T substitution in the promoter of the gene, SNP -590 C/T (2243250), can increase IL-4 expression [21]. Higher IL-4 plasma levels have been found in patients with severe dengue [22] and this association includes the shift from Th1 response found in non-severe dengue to the severe dengue Th2 response [23].

IL-6 is a pleiotropic pro-inflammatory cytokine, mediator of fever and acute-phase reactions and is produced during innate and adaptive immune responses by T and B lymphocytes, macrophages, monocytes and fibroblasts [22, 23]. IL-6 gene is mapped to chromosome 7p21.24 and it is believed that the G allele of promoter, SNP -174 G/C (1800795), is associated with higher IL-6 plasma levels [24, 25]. Results of Moreira et al. [25] suggest a protective role of GG genotype.

The INF- γ is a pro-inflammatory cytokine secreted mainly by Th1-type CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and natural killer (NK) cells [26]. INF- γ gene is located in the 12q24.1 region and SNP +874 T/A (2430561) influences the synthesis of INF- γ at transcriptional and post-transcriptional levels [27]. T and A alleles correlates with high and low INF- γ expression, respectively [27]. A higher level of INF- γ has been associated with dengue severity [28].

This study was undertaken to evaluate symptom persistence in a 60 days follow-up period after symptom onset. Given the effect of SNPs in Fc γ RIIa, CD209, VDR, TNF- α , IL-4, IL-6 and INF- γ genes in symptomatic dengue disease [8, 9, 11] we carried out a genetic analyses to analyze whether persistence of clinical manifestations is associated with patient's immunological genetic profile. SNPs characteristics are show in Table 1.

SNP profiles may serve as immunogenetic markers associated with long-term consequences of dengue infection and consequently, early identification of patients with worse prognosis and delayed healing

2. Materials and methods

2.1. Samples

This study was approved by the Research Ethics Committee of Federal University of ES and all patients signed a written informed consent (Protocol n° 190/11).

Three hundred and fifteen individuals over 18 years old volunteered to participate in this study. Volunteers were patients in emergency care units of Grande Vitória, ES, Brazil, during the period of November 2012 to February 2013, as they were under investigation for clinical dengue according to the World Health Organization (WHO). Of these, 219 were excluded because they tested negative for dengue, did not accept to continue in the study or were unable to contact throughout the data collection. Dengue laboratory confirmation was obtained for 96 participants using immunochromatographic rapid test (Bioeasy/Abon) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). When necessary, ELISA was used to quantify IgG antibodies against DENV. There was no stratification of disease seriousness and viral serotype. Patients with previous dengue infection were classified as secondary dengue.

Each volunteer provided a 5 ml blood sample in tubes containing ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) and was interviewed to evaluate the persistence of 37 clinical symptoms in 4 interviews at the following days: 1) D0 – initial onset of symptoms; 2) D15 -15 days after D0; 3) D30 - 30 days after D0 and D60 - 60 days after D0. Collected information included date of onset, clinical characteristics, laboratory evidence, medicine and vaccination against yellow fever.

2.2. SNP genotyping

Genomic DNA was isolated from the whole blood using the QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, USA), following manufacture's recommendations. SNPs in *FcγRIIa*, *CD209*, *VDR*, *TNF-α*, *IL-4*, *IL-6* and *INF-γ* genes were detected by PCR-RFLP. Primer sequences, restriction enzymes and PCR conditions are shown in Table 2.

2.3. Statistical analysis

The chi-square (χ^2) and Fisher exact test were used to assess associations. The confirmation was obtained by the Lilliefors test (considered significant when $p < 0.05$). Statistical calculations were performed using Epi Info[®] v3.4.3, 2007 and Statsoft Statistica v7.0.61.0[®].

3. Results

3.1. Sample description

The average age of dengue patients was 37.4 (SD \pm 14.1), varying from 18 to 76 years. Females accounted for 66.7% (64/96) and males accounted for 33.3% (32/96) of all patients. Of 96 participants, 45 had primary and 51 had secondary dengue. During the acute phase, 51 patients used only acetaminophen, 30 used acetaminophen and dipyrone, 3 used only dipyrone and 12 were unable to provide this information (Table 3).

In two months of monitoring and following dengue infection in 96 patients, we observed that 38.5% (37/96) of dengue patients reported having at least one clinical symptom at D30, whereas 11.5% (11/96) reported this D60. Clinical manifestations were grouped as: dermatological; neurological, psychological and behavioral; respiratory; gastrointestinal; musculoskeletal; constitutional and other symptoms. Dengue clinical characteristics are shown in Table 4. All 37 symptoms were reported by at least one patient on D0. On D15, only the bleeding gum was not present. On D30, 75.7% of symptoms were present and the most common symptoms were myalgia, asthenia and indisposition. On day D60, this percentage drops to 56.8% and the most common symptoms were myalgia, asthenia and lethargy.

We observed an association trend between female gender and persistence of clinical symptoms on D30 ($p = 0.057$) and between secondary infection and persistence of symptoms on D60 ($p = 0.064$) (Table 5). In a more detailed analysis, which stratified the persistence of symptoms on D30 and D60 of primary and secondary dengue, we observed for D30 an association between female gender and persistence of symptoms for primary dengue ($p = 0.044$) and an association trend between higher age and persistence of symptoms in secondary dengue ($p = 0.053$) (Table 6). On D60, we found no association between persistence of symptoms and epidemiological characteristics (data not shown).

By analyzing the relationship between the classes of clinical symptoms and infection history and the medication used in the acute phase, we observed an association trend between musculoskeletal symptoms and secondary infection ($p = 0.057$), as well as between constitutional symptoms and secondary infection ($p = 0.041$) (Table 7). Stratification of categories and consequent reduction of the sample size did not allow similar analysis for D60. There was no association between the classes of clinical symptoms and the medication used in the acute phase.

3.2. SNPs and persistent clinical symptoms

SNPs genotype distribution in symptomatic dengue patients remained similar to the normal ES population genotype distribution, as demonstrated in previous studies performed by us like Dettogni et al. [29] and other work not yet published.

No statistically significant associations between studied SNPs and persistence of symptoms were observed (Table 8). However, we found an association trend between the presence of the A allele of the SNP -308 A/G (in TNF- α gene) and non-persistence of symptoms on D30 ($p = 0.057$) and between the presence of the C allele of SNP -590 C/T (in IL-4 gene) and non-persistence of symptoms on D30 ($p = 0.064$) (Table 8).

Studying D30 separately, revealed an association between SNP *-131 H/R* (in *FcγRIIIa* gene) and the persistence of symptoms in secondary dengue ($p = 0.046$), being the presence of the *H* allele associated with non-persistence of symptoms ($p = 0.014$) (Table 9). We also noticed an association trend between SNP *-308 A/G* (in *TNF-α* gene) and persistence of symptoms in secondary dengue ($p = 0.079$), being the *A* allele associated with non-persistence of symptoms ($p = 0.025$). Furthermore, we found an association trend between the *A* allele of SNP *+874 T/A* (in *INF-γ* gene) and the non-persistence of symptoms in primary dengue ($p = 0.064$). In secondary dengue, this allele tended to be associated with the persistence of symptoms ($p = 0.076$) (Table 9).

Studying D60 separately showed only an association trend between the *A* allele at SNP *-336 A/G* (in the *CD209* gene) and non-persistence of symptoms in primary dengue ($p = 0.055$) (Table 10).

We also found an association between the *C* allele at SNP *-174 G/C* (in *IL-6* gene) and persistence of dermatological symptoms ($p = 0.005$) and an association between *GG* genotype at SNP *-308 A/G* (in *TNF-α* gene) and persistence of neurological, psychological or behavioral manifestations ($p = 0.038$) (Table 11).

4. Discussion

This study examines the hypothesis that SNPs in *FcγRIIIa*, *CD209*, *VDR*, *TNF-α*, *IL-4*, *IL-6* and *INF-γ* genes may be inheritable factors influencing the persistence of clinical dengue symptoms at 30-60 days after onset of symptoms.

Our results show that 38.5% (D30) and 11.5% (D60) of patients had persistence of at least one clinical symptom. Most persistent symptoms on D30 and D60 are musculoskeletal, neurological, psychological or behavioral, related to the fatigue syndrome, such as myalgia, arthralgia, asthenia, lethargy, irritability and malaise. Myalgia was the most common symptom on D30 (21.9%) as on D60 (7.3%). Similarly, Seet, Quek and Lim [4] demonstrated the persistence of fatigue in 25% of patients and González et al. [2] and Tristão-Sá et al. [6] demonstrated that the symptoms related to fatigue are the most persistent.

Age, gender, reinfection, acute phase medication, race and viral characteristics may influence dengue outcome of [30]. In our study, we have found a longer persistence of symptoms in females patients, which is in agreement with García et al. [1] and Tristão-Sá et al. [6]. Women may be at higher risk of symptom persistence due to hormonal, endocrine [31] and genetic [32] factors. After stratification of persistent symptoms in 7 classes, we checked a possible relationship between musculoskeletal symptoms and secondary infection, as well as between constitutional symptoms and secondary infections. In a secondary infection, preexisting antibodies increases the infective process of monocytes and macrophages, which activate T lymphocytes and together produce high levels of cytokines associated with symptoms [22], yielding more intense constitutional symptoms. Amplification of immune complexes (ICs) and their ineffective removal by various processes, causes ICs deposition on tissues [22], contributing to the persistence of musculoskeletal symptoms.

Fc γ RIIa gene was associated with persistence of clinical symptoms on D30. This may be due to the ADE phenomenon, which is based on cross-reactive non-neutralizing antibodies in patient's serum, which enhance viral entry of different dengue serotypes via Fc γ RIIa [33]. No associations were found on D60, probably, due to reduced stratification of the data series. In contrast with García et al. [1], our study found an association between the *H* allele and non-persistent of symptoms. According to García et al. [1], increased in the binding affinity to IgG1 (favored by *R* allele) lead to a larger elimination of ICs and better recovery from infection. However, as the IgG3 is also prevalent in dengue infection, elimination of IgG3 ICs (favored by *H* allele) can have great influence on symptom persistence. Although IgG3 appears before IgG1 during DENV infection, they are both present after the initial appearance of IgG1 [34] and, according to Rodrigo et al. [35], IgG3 has greater neutralizing activity than IgG1. Likewise, some studies suggest that one allele is associated with susceptibility to certain infections, while others have suggested a protective role for the same allele. This discrepancy is not yet understood and may be due to different genetic backgrounds or by differences in pressure pathogen [36]. There are known differences in infection susceptibility among different ethnic groups, which may be associated with different levels of IgG subclasses among populations. Why these differences occur is still not clear [36]. In addition, affinity of IgG subclasses to Fc γ RIIa receptor genotypes is still a matter of debate [13]. Participation of Fc γ RIIa receptor in the immune regulation of dengue pathogenesis, as well as its structural and functional diversity, make these molecules putative targets for immunotherapy [37].

Considering the CD209 gene, we have found an association trend between non-persistence of symptoms at D60, in primary dengue patients, and the *A* allele. According with Sakuntabhai et al. [10], the *G* allele is associated with protection against the non-severe dengue. DC-SIGN has been described as the most important receptor for DENV in human DCs [10]. By regulating viral entry and the immune system, this receptor is considered a target for antiviral therapy. Position -336 (SNP -336 *A/G*) affects Sp1 binding, modulating CD209 transcriptional activity [10]. Some studies have linked the *G* allele protection against infections [10], suggesting that the presence of the *G* allele leads to lower expression of DC-SIGN receptor and lower DC exposure to DENV, fewer infected cells, less T cell activation and less cytokines production; hence a better prognosis and fewer symptoms. Other studies however, associated the *A* allele with protection against infections [10], possibly because increased expression of DC-SIGN leads to increased activation of phagocytic cells and better infection control. This hypothesis could be an explanation for the association between the *A* allele and non-persistent symptoms.

The *TaqI* SNP was not associated with persistence of symptoms in this study, but further studies are needed to confirm this result, since there is sufficient evidence that the VDR is functionally important in dengue infection [7, 9].

Cytokines are responsible for the symptoms, pathological alterations and infection outcome, depending on the resulting pro or anti-inflammatory activity. TNF- α , IL-4, IL-6 and IFN- γ are able to mediate this process and their expression and activity can be affected by SNPs tested in this study.

We observed an association trend between TNF- α *A* allele and non-persistence of symptoms on D30. When we stratified the sample according to previous dengue history, this association was significant for secondary dengue. The *A* allele is associated with increased production of TNF- α and has been linked to severe dengue [20]. Our results suggest that the mechanisms causing symptoms presence or severity during the acute phase are different from those that cause persistence in the convalescent phase. The main functions of TNF- α is to recruit neutrophils and monocytes to the site of infection and activate these cells to eradicate infectious agents, as well to activate caspases to trigger apoptosis [38]. Their potent biological action causes tissue damage locally and hypotension and shock systemically [38]. Due to its biological actions, we expected to find an association between high levels of this cytokine and more persistent symptoms, but the opposite was found. We believe that the increased production of TNF- α in patients with *A* allele may result in a more effective immune response against DENV in the acute phase, by increased viral clearance. Thus, *A* allele patients would be more likely to clear symptoms early. Our results show an association between the *GG* genotype and the persistence of neurological, psychological and behavioral symptoms. Interestingly, this is in agreement with our finding that the other allele may be associated with non-persistence of symptoms. TNF- α has been investigated in neuropsychiatric disorders due to its effect on the central nervous system [39].

A tendency of association with non-persistence of symptoms at D30 was found for IL-4 *C* allele (responsible for a lower production of IL-4). Successful immune response requires a balanced Th1 and Th2 response [40]. Among cytokines released by Th2 cells, IL-4 can delay viral clearance and play a detrimental role against infection [40]. Chaturvedi et al. [23] showed a Th1-Th2 shift after 4 days of infection, which is associated with disease severity. Thus, low IL4 levels are related to a better prognosis. Furthermore, Granelli-Piperno et al. [41] found that IL-4 induces the expression of DC-SIGN.

No association between IL-6 SNP *-174 G/C* and persistence of symptoms was found, but we found an association between the *C* allele and the persistence of dermatological symptoms on D30 was detected. Some studie [42] found high levels of IL-6 in plasma of individuals with severe dengue. On the order hand, Moreira et al. [25] found a protective effect of *GG* genotype against dengue clinical symptoms, possibly because IL-6 decreases acute inflammatory response through induction of pro-inflammatory cytokine antagonists [43]. Of five studied dermatological symptoms, four are directly or indirectly related to bleeding (petechiae, exanthema, bleeding gum and pruritus). It is known that IL-6 induces megakaryocytes differentiation and potentiates the coagulation cascade [11]. Thrombocytopenia or platelet due to lower IL-6 production (*C* allele) could result in increased capillary fragility, petechiae, gum bleeding and exanthema [44]. Pruritus usually accompanies exanthema. These observations explain the *C* allele to be related to the persistence of these clinical manifestations.

We show an association trend between the *A* allele of INF- γ SNP and non-persistence of symptoms at D30, in primary dengue and a tendency of association between the same allele and persistence of symptoms in secondary dengue. The *T* allele is responsible for the increased production of INF- γ and a high level of this cytokine has been associated with severe dengue [45]. INF- γ can activate the expression of Fc γ receptors on monocytes and

macrophages [46], increasing the number of infected cells, which together with increased expression major histocompatibility complex class II (MHC-II), contributes to a worse prognosis or chronic disease. This can explain why the A allele (lower production of IFN- γ) was related to non-persistence of symptoms. However, in secondary dengue, the A allele was associated with persistent symptoms. The ambiguity of IFN- γ SNP effect can be due to differences in plasma concentration of IFN- γ between primary and secondary dengue, which was described by Restrepo et al. [46], who found higher levels of this cytokine in patients with primary dengue.

Our results show a significant persistence of dengue clinical symptoms 60 days after the onset of the disease, which was associated with Fc γ RIIa, TNF- α and IL-6 gene SNPs and possibly associated with IL-4, CD209 and IFN- γ gene SNPs. This is the first study to examine dengue clinical symptoms persistence in the ES (Brazil) population and the first study to examine the association between CD209, VDR, TNF- α , IL-4, IL-6 and IFN- γ gene SNPs and the persistence of symptoms.

5. Acknowledgments

RSD was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) scholarships. This work was supported by FAPES.

6. References

- [1] Garcia G, Gonzalez N, Perez AB, Sierra B, Aguirre E, Rizo D, et al. Long-term persistence of clinical symptoms in dengue infected persons and its association with immunological disorders. *Int J Infect Dis* 2011; 15(1):38-43.
- [2] González DMR., Castro O, Serrano T, Portela D, Vazquez S, Kourí G, et al. Evaluation of Some Clinical, Humoral and Imagenological Parameters in Patients of Dengue Haemorrhagic Fever Six Months after Acute Illness. *Dengue Bull* 2005; 29:79-84.
- [3] Low JG, Ooi EE, Tolfvenstam T, Leo YS, Hibberd ML, Ng LC, et al., Early Dengue infection and outcome study (EDEN) - study design and preliminary findings. *Ann Acad Med Singapore* 2006; 35(11):783-9.
- [4] Seet RC, Quek AM, Lim EC. Post-infectious fatigue syndrome in dengue infection. *J Clin Virol* 2007; 38(1):1-6.
- [5] Teixeira LA, Lopes JS, Martins AG, Campos FA, S. Miranzi SS, Nascentes GA. Persistence of dengue symptoms in patients in Uberaba, Minas Gerais State, Brazil. *Cad Saude Publica* 2010; 26(3): p. 624-30.
- [6] Tristao-Sa R, Kubelka CF, Zandonade E, Zagne SM, Rocha NS, Zagne LO, et al. Clinical and hepatic evaluation in adult dengue patients: a prospective two-month cohort study. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45(6):675-81.
- [7] Alagarasu K, Bachal RV, Bhagat AB, Shah PS, Dayaraj C. Elevated levels of vitamin D and deficiency of mannose binding lectin in dengue hemorrhagic fever. *Virol J* 2012; 9: 86.
- [8] Garcia G, Sierra B, Perez AB, Aguirre E, Rosado I, Gonzalez N, et al., Asymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the Fc γ RIIa polymorphism. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82(6):1153-6.

- [9] Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIA genes. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67(1):102-6.
- [10] Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet* 2005; 37(5):507-13.
- [11] Harapan H, Fajar JK, Wahyuniati N, Anand JR, Nambaru L, Jamil KF. Non-HLA gene polymorphisms and their implications on dengue virus infection. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2013; 14:1-11.
- [12] Omi K, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Naka I, Looareesuwan S, et al. Fc gamma receptor IIA and IIIB polymorphisms are associated with susceptibility to cerebral malaria. *Parasitol Int* 2002; 51(4):361-6.
- [13] van de Winkel JG, Capel PJ. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today*, 1993. 14(5):215-21.
- [14] Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL, Kimberly RP. Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest* 1992; 89(4):1274-81.
- [15] Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, et al. 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* 2003; 4(7):723-8.
- [16] Mei-Schu X. Association of DC-SIGN (CD209) gene polymorphisms with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). The University of Hong Kong: China 2007; p. 126.
- [17] Halstead SB, O'Rourke EJ, Allison AC. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. *J Exp Med* 1977; 146(1):218-29.
- [18] Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 1997; 385(6616):540-4.
- [19] Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, G. W. Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992; 1(5):353.
- [20] Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, et al. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* 2010; 71(11):1135-40.
- [21] Chu H, Wang M, Yan F, Zhong D, Shi D, Ma L, et al. Polymorphisms in the IL-13 and IL-4R genes are associated with the development of renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2012; 23(8):2114-21.
- [22] Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(4):564-81.
- [23] Chaturvedi UC, Elbishbishi EA, Agarwal R, Raghupathy R, Nagar R, Tandon R, et al. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *J Med Virol* 1999; 59(3):335-40.
- [24] Fernandez-Real JM, Vendrell J, Richart C, Gutierrez C, Ricart W. Platelet count and interleukin 6 gene polymorphism in healthy subjects. *BMC Med Genet* 2001; 2:6.

- [25] Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. TNFA and IL10 gene polymorphisms are not associated with periodontitis in Brazilians. *Open Dent J* 2009; 3:184-90.
- [26] Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, Venturini J, et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum Genet* 2010; 128(5):481-90.
- [27] Kimkong I, Nakkuntod J, Sodsai P, Hirankarn N, Kitkumthorn N. Association of interferon-gamma gene polymorphisms with susceptibility to oral lichen planus in the Thai population. *Arch Oral Biol* 2012; 57(5):491-4.
- [28] Libraty DH, Endy TP, Hough HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis* 2002; 185(9):1213-21.
- [29] Dettogni RS, Tristão-Sa R, Tovar TT, Louro ID. Polymorphic genetic variation in immune system genes: a study of two populations of Espirito Santo, Brazil. *Mol Biol Rep* 2013; 40(8):4843-9.
- [30] de la Sierra BC, Kouri G, Guzman MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol* 2007; 152(3):533-42.
- [31] Harlow BL, Signorello LB, Hall JE, Dailey C, Komaroff AL. Reproductive correlates of chronic fatigue syndrome. *Am J Med* 1998; 105(3A): 94-9.
- [32] Prins JB, van der Meer JW, Bleijenberg G. Chronic fatigue syndrome. *Lancet* 2006; 367(9507):346-55.
- [33] Halstead SB, SimasthienP. Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. *Yale J Biol Med* 1970; 42(5):276-92.
- [34] Ferrante A, Beard LJ, Feldman RG. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9(8):16-24.
- [35] Rodrigo WW, Block OK, Lane C, Sukupolvi-Petty S, Goncalvez AP, Johnson S, et al. Dengue virus neutralization is modulated by IgG antibody subclass and Fcgamma receptor subtype. *Virology* 2009; 394(2):175-82.
- [36] Israelsson E, Vafa M, Maiga B, Lysen A, Iriemenam NC, Dolo A, et al. Differences in Fcgamma receptor IIa genotypes and IgG subclass pattern of anti-malarial antibodies between sympatric ethnic groups in Mali. *Malar J* 2008; 7:175.
- [37] Rouard H, Tamasdan S, Moncuit J, Moutel S, Michon J, Fridman WH, et al. Fc receptors as targets for immunotherapy. *Int Rev Immunol* 1997; 16(1-2):147-85.
- [38] Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; 115(1):1-20.
- [39] Duan S, Yin H, Chen W, Xing Q, chen Q, Guo T, et al. No association between the serotonin 1B receptor gene and schizophrenia in a case-control and family-based association study. *Neurosci Lett* 2005; 376(2): 93-7.
- [40] Moran TM, Isobe H, Fernandez-Sesma A, Schulman JL. Interleukin-4 causes delayed virus clearance in influenza virus infected mice. *J Virol* 1996; 70(8):5230-5.
- [41] Granelli-Piperno A, Pritsker A, Pack M, Shimeliovich I, Arrighi JF, Park CG, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J Immunol* 2005; 175(7):4265-73.

- [42] Juffrie M, Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(1):70-5.
- [43] Tilg H, Dinarello CA, Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today* 1997; 18(9):428-32.
- [44] Nachman RL, Rafii S. Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall. *N Engl J Med* 2008; 359(12):1261-70.
- [45] Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, et al. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol* 2006; 143(2):345-56.
- [46] Restrepo BN, Isaza DM, Salazar CL, Ramirez R, Ospina M, et al. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in infants with and without dengue. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41(1):6-10.
- [47] Jiang XM, Arepally G, Poncz M, Mackenzie SE. Rapid detection of the Fc gamma RIIA-H/R 131 ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J Immunol Methods* 1996; 199(1): 55-9.
- [48] Hennig BJ, Parkhill JM, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70(9):1032-8.
- [49] Lee JY, Kim HY, Kim KH, Kim SM, Jang MK, Park JY, et al. Association of polymorphism of IL-10 and TNF-A genes with gastric cancer in Korea. *Cancer Lett* 2005; 225(2): 207-14.
- [50] Ben Selma W, Harizi H, Bougmiza I, Hannachi N, Ben Kahla I, Zaineni R, et al. Interferon gamma +874T/A polymorphism is associated with susceptibility to active pulmonary tuberculosis development in Tunisian patients. *DNA Cell Biol* 2011; 30(6): 379-87.

Table 1. Single nucleotide polymorphisms associated with dengue.

Gene	Protein	SNP^a	rs number	Reference allele	Variant allele
<u>FcγRIIa</u>	Fc gamma	-131H/R	1801274	H (A)	R (G)
CD209	Dendritic cell-specific	-336A/G	4804803	A	G
VDR	Vitamin D receptor	<u>TaqI</u>	731236	T	C
TNF-α	Tumor necrosis factor	-308 A/G	1800629	G	A
IL-4	Interleukin-4	-590C/T	2243250	C	T
IL-6	Interleukin-6	-174G/C	1800795	G	C
INF-γ	Interferon gamma	+874A/T	2430561	A	T

^aSNP: Single nucleotide polymorphism.

Table 2. Primer sequences and reverse transcription-polymerase chain reaction conditions.

Gene	SNP ^b	Primer sequence	Product size	Restriction enzyme	Digestion pattern	Reference
<i>FcγRIIa</i>	-131 H/R (rs1801274)	5'-GGAAAATCCAGAAATTCTCGC-3' 5'-CAACAGCCTGACTACCTATTACGCGGG-3'	366bp	<i>Bst</i> UI	Allele H - 343 bp ^a Allele R - 322 bp	98
CD209	-336 A/G (rs4804803)	5'-CAGAGCATG GACAGG GAGCAAG-3' 5'-GGATGTACGCTGCAGTGTG-3'	150bp	<i>Msc</i> I	Allele G - 19 bp + 131 pb Allele A - 150 bp	12
VDR	<i>Taq</i> I (rs731236)	5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3' 5'-GGATGTACGCTGCAGTGTG-3'	340bp	<i>Taq</i> I	Allele T - 340 bp Allele C - 293 bp + 47 pb	99
TNF-α	-308 A/G (rs1800629)	5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'	107 bp	<i>Nco</i> I	Allele A - 107 bp Allele G - 87 bp + 20 bp	33
IL-4	-590 C/T (rs2243250)	5'-ACTAGGCCTCACCTGATACG-3' 5'-GTTGTAATGCAGTCTCTCTG-3'	254 bp	<i>Bsm</i> FI	Allele C - 210 bp + 44 bp Allele T - 254 bp	100
IL-6	-174 G/C (rs1800795)	5'-TGA CT TTCAGCTTTACTCTTTGT-3' 5'-CTGATTGGAAACCTTATTAAG-3'	198 bp	<i>Sfa</i> NI	Allele G - 140 bp + 68 bp Allele C - 198 bp	44
INF-γ	+874 A/T (rs2430561)	5'-GATTTTATTCTTACAACACAAAATCAAGAC-3' 5'-GCAAAGCCACCCACTATAA-3'	176 bp	<i>Hin</i> fI	Allele T - 148 bp + 28 bp Allele A - 176 bp	101

^abp: base pairs. ^bSNP: single nucleotide polymorphism.

Table 3. Dengue epidemiological characteristics.

Epidemiological characteristics	Total	
	N.	(%)
Gender		
Female	64	66.7
Male	32	33.3
Age, years		
≤ 20	13	13.5
21 - 30	20	20.8
31 - 40	24	25.0
41 - 50	19	19.8
> 50	20	20.8
Infection		
Primary	45	46.9
Secondary	51	53.1
Medication		
Dipyrrone	3	3.1
Acetaminophen	51	53.1
Acetaminophen + Dipyrrone	30	31.3
Not evaluable ^a	12	12.5

^aPatients were unable to provide.

Table 4. Clinical symptoms reported by 96 dengue patients of ES-Brazil during a two-month follow-up period.

Symptoms	D0 ^a		D15 ^b		D30 ^c		D60 ^d	
	N	%	n	%	N	%	n	%
Dermatological								
Pruritus	65	67.7	23	24.0	4	4.2	1	1.1
Exanthema	10	10.4	6	6.2	1	1.1	0	0.0
Petechiae	56	58.3	20	20.8	2	2.1	0	0.0
Alopecia	12	12.5	15	15.6	9	9.4	2	2.1
Bleeding gum	4	4.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Neurological, psychological and behavioral								
Dizziness	60	62.5	21	21.9	5	5.2	2	2.1
Lipothymia	11	11.5	3	3.1	1	1.1	0	0.0
Lethargy	64	66.7	28	29.2	13	13.5	5	5.2
Agitation	61	63.5	15	15.6	5	5.2	3	3.1
Unrest	46	47.9	15	15.6	6	6.2	3	3.1
Irritability	45	46.9	21	21.9	7	7.3	4	4.2
Respiratory								
Cough	34	35.4	9	9.4	1	1.1	1	1.1
Dyspnea	33	34.4	12	12.5	3	3.1	0	0.0
Coryza	23	24.0	4	4.2	0	0.0	0	0.0
Epistaxis	5	5.2	1	1.1	0	0.0	0	0.0
Gastrointestinal								
Abdominal pain	63	65.6	23	24.0	8	8.3	1	1.1
Diarrhea	41	42.7	5	5.2	0	0.0	0	0.0
Nausea	65	67.7	19	19.8	2	2.1	1	1.1
Vomiting	35	36.5	7	7.3	0	0.0	0	0.0
Jaundice	23	24.0	6	6.2	0	0.0	0	0.0
Dysgeusia	81	84.4	32	33.3	13	13.5	4	4.2
Melena	1	1.0	1	1.1	0	0.0	0	0.0
Hematemesis	21	21.9	5	5.2	1	1.1	0	0.0
Anorexia	83	86.5	32	33.3	11	11.5	2	2.1
Musculoskeletal								
Myalgia	91	94.8	50	52.1	21	21.9	7	7.3
Arthralgia	70	72.9	27	28.1	11	11.5	4	4.2
Constitutional								
Prostration	35	36.5	10	10.4	4	4.2	3	3.1
Headache	89	92.7	39	40.6	12	12.5	2	2.1
Retroorbital pain	81	84.4	29	30.2	9	9.4	1	1.1
Fever	89	92.7	13	13.5	3	3.1	0	0.0
Indisposition	87	90.6	38	39.6	14	14.6	4	4.2
Paresthesia	83	86.5	20	20.8	5	5.2	3	3.1
Asthenia	89	92.7	39	40.6	16	16.7	5	5.2
Chills	75	78.1	13	13.5	1	1.1	1	1.1
Other								
Hypotension	33	34.4	11	11.5	2	2.1	0	0.0
Hematuria	3	3.1	1	1.1	0	0.0	0	0.0
Metrorrhagia	7	7.3	2	2.1	0	0.0	0	0.0

^aD0: day of onset of symptoms. ^bD15: 15 days after D0. ^cD30: 30 days after D0. ^dD60: 60 days after

Table 5. Epidemiological characteristics and their association with persistence of dengue clinical symptoms.

Epidemiological characteristics	Persistence of symptoms								<i>p</i>	
	D30 ^b				D60 ^c					
	No		Yes		No		Yes			
N.	(%)	N.	(%)	<i>p</i> ^d	N.	(%)	N.	(%)	<i>p</i>	
Gender										
Female	33	58.9	31	77.5	0.057	55	66.3	9	69.2	0.833
Male	23	41.1	9	22.5		28	33.7	4	30.8	
Age - years										
≤20	10	17.9	3	7.5	0.388	13	15.7	0	0.0	0.111
21 - 30	11	19.6	9	22.5		18	21.7	2	15.4	
31 - 40	16	28.6	8	20.0		22	26.5	2	15.4	
41 - 50	9	16.1	10	25.0		16	19.3	3	23.1	
>50	10	17.9	10	25.0		14	16.9	6	46.2	
Infection										
Primary	30	53.6	15	37.5	0.120	42	50.6	3	23.1	0.064
Secondary	26	46.4	25	62.5		41	49.4	10	76.9	
Medication										
Dipyrrone	2	3.6	1	2.5	0.433	2	2.4	1	7.7	0.643
Acetaminophen	31	55.4	20	50.0		44	53.0	7	53.8	
Acetaminophen + Dipyrrone	14	25.0	16	40.0		25	30.1	5	38.5	
Not available ^a	9	16.1	3	7.5		12	14.5	0	0.0	

^aPatients were unable to provide. ^bD30: 30 days after onset of symptoms. ^cD60: 60 days after onset of symptoms. ^d*p*: Significance value.

Table 6. Epidemiological characteristics 30 days after disease onset.

Epidemiological characteristics	Persistent symptoms on D30 ^b													
	Primary dengue						<i>p</i> ^c	Secondary dengue						<i>p</i>
	Total		Não		Sim			Total		Não		Sim		
N.	(%)	N.	(%)	N.	(%)	N.	(%)	N.	(%)	N.	(%)			
Gender														
Female	30	66,7	17	56,7	13	86,7	0.044	34	66,7	16	61,5	18	72,0	0.428
Male	15	33,3	13	43,3	2	13,3		17	33,3	10	38,5	7	28,0	
Age - years														
≤ 20	9	20,0	7	23,3	2	13,3	0.532	4	7,8	3	11,5	1	4,0	0.053
21 - 30	10	22,2	8	26,7	2	13,3		10	19,6	3	11,5	7	28,0	
31 - 40	12	26,7	6	20,0	6	40,0		12	23,5	10	38,5	2	8,0	
41 - 50	7	15,6	5	16,7	2	13,3		12	23,5	4	15,4	8	32,0	
> 50	7	15,6	4	13,3	3	20,0		13	25,5	6	23,1	7	28,0	
Medication														
Dipyrone	1	2,2	1	3,3	0	0,0	0.391	2	3,9	1	3,8	1	4,0	0.945
Acetaminophen	27	60,0	19	63,3	8	53,3		24	47,1	12	46,2	12	48,0	
Acetaminophen + Dipyrone	10	22,2	5	16,7	5	33,3		20	39,2	9	34,6	11	44,0	
Not available ^a	7	15,6	5	16,7	2	13,3		5	9,8	4	15,4	1	4,0	

^aPatients were unable to provide. ^bD30: 30 after onset of symptoms. ^c*p*: Significance value.

Table 7. Epidemiological characteristics and their association with symptoms 30 days after disease onset.

Epidemiological characteristics	Classes of persistent symptoms - D30 ^b																				
	Dermatological			Neurological, psychological and behavior			Respiratory			Gastrointestinal			Musculoskeletal			Constitutional			Others		
	N.	(%)	<i>p</i> ^c	N.	(%)	<i>p</i>	N.	(%)	<i>p</i>	N.	(%)	<i>p</i>	N.	(%)	<i>p</i>	N.	(%)	<i>p</i>	N.	(%)	<i>p</i>
Infection																					
Primary	3	25.0	0.105	6	35.3	0.292	2	50.0	0.898	8	38.1	0.362	6	28.6	0.057	9	31.0	0.041*	2	100.0	0.128
Secondary	9	75.0		11	64.7		2	50.0		13	61.9		15	71.4		20	69.0		0	0.0	
Medication																					
Dipyrone	0	0.0	0.530	0	0.0	0.331	1	25.0	0.060	1	4.8	0.690	1	4.8	0.556	1	3.4	0.176	0	0.0	0.402
Acetaminophen	5	41.7		8	47.1		2	50.0		10	47.6		9	42.9		12	41.4		0	0.0	
Acetaminophen + Dipyrone	5	41.7		8	47.1		1	25.0		8	38.1		8	38.1		13	44.8		1	50.0	
Not evaluable ^a	2	16.7		1	5.9		0	0.0		2	9.5		3	14.3		3	10.3		1	50.0	

^aPatients were unable to provide. ^bD30: 30 days after onset of symptoms. ^c*p*: Significance value. *Statistically significant.

Table 8. Single nucleotide polymorphisms genotypes and its association with persistence of dengue clinical symptoms.

SNPs ^a / Genotypes	Persistence of symptoms											
	Total		D30 ^b				<i>P</i> ^d	D60 ^c				<i>p</i>
			No		yes			No		Yes		
N.	(%)	N.	(%)	N.	(%)	N.	(%)	N.	(%)	N.	(%)	
FcγRIIIa/-131 H/R												
<i>HH</i>	13	13,5	8	14,3	5	12,5	0,397	12	14,5	1	7,7	0,568
<i>HR</i>	63	65,6	39	69,6	24	60,0		55	66,3	8	61,5	
<i>RR</i>	20	20,8	9	16,1	11	27,5		16	19,3	4	30,8	
<i>HH+HR</i>	76	79,2	47	83,9	29	72,5	0,174	67	80,7	9	69,2	0,343
CD209/ -336 A/G												
<i>AA</i>	48	50,0	27	48,2	21	52,5	0,910	42	50,6	6	46,2	0,613
<i>AG</i>	40	41,7	24	42,9	16	40,0		35	42,2	5	38,5	
<i>GG</i>	8	8,3	5	8,9	3	7,5		6	7,2	2	15,4	
<i>AA+AG</i>	88	91,7	51	91,1	37	92,5	0,803	77	92,8	11	84,6	0,323
VDR/ <i>TaqI</i>												
<i>CC</i>	12	12,5	7	12,5	5	12,5	0,670	9	10,8	3	23,1	0,329
<i>CT</i>	48	50,0	26	46,4	22	55,0		41	49,4	7	53,8	
<i>TT</i>	36	37,5	23	41,1	13	32,5		33	39,8	3	23,1	
TNF-α/308 A/G												
<i>AA</i>	6	6,3	5	8,9	1	2,5	0,134	6	7,2	0	0,0	0,531
<i>AG</i>	26	27,1	18	32,1	8	20,0		23	27,7	3	23,1	
<i>GG</i>	64	66,7	33	58,9	31	77,5		54	65,1	10	76,9	
<i>AA+AG</i>	32	33,3	23	41,1	9	22,5	0,057	29	34,9	3	23,1	0,399
IL-4/ -590 C/T												
<i>CC</i>	37	38,5	22	39,3	15	37,5	0,124	31	37,3	6	46,2	0,817
<i>CT</i>	44	45,8	22	39,3	22	55,0		39	47,0	5	38,5	
<i>TT</i>	15	15,6	12	21,4	3	7,5		13	15,7	2	15,4	
<i>CC+CT</i>	81	84,4	44	78,6	37	92,5	0,064	70	84,3	11	84,6	0,980
IL-6/ -174 G/C												
<i>CC</i>	17	17,7	10	17,9	7	17,5	0,299	15	18,1	2	15,4	0,969
<i>CG</i>	35	36,5	17	30,4	18	45,0		30	36,1	5	38,5	
<i>GG</i>	44	45,8	29	51,8	15	37,5		38	45,8	6	46,2	
<i>CC+CG</i>	52	54,2	27	48,2	25	62,5	0,166	45	54,2	7	53,8	0,980
INF-γ/+ 87T/A												
<i>AA</i>	41	42,7	25	44,6	16	40,0	0,822	36	43,4	5	38,5	0,941
<i>AT</i>	42	43,8	23	41,1	19	47,5		36	43,4	6	46,2	
<i>TT</i>	13	13,5	8	14,3	5	12,5		11	13,3	2	15,4	
<i>AA+AT</i>	83	86,5	48	85,7	45	112,5	0,502	72	86,7	11	84,6	0,835

^a SNPs: Single nucleotide polymorphisms. ^bD30: 30 days after onset of symptoms. ^cD60: 60 days after onset of symptoms. ^d*p*: Significance value.

Table 9. SNPs and their association with symptom persistence at D30.

SNPs/Genotypes	Persistence of symptoms - D30 ^a									
	Primary dengue					Secondary dengue				
	No		Yes		<i>p</i> ^b	No		Yes		<i>P</i>
N.	(%)	N.	(%)	N.		(%)	N.	(%)		
FcyRIIIa/-131 H/R										
<i>HH</i>	4	13,3	3	20,0	0.669	4	15,4	2	8,0	0.046*
<i>HR</i>	19	63,3	10	66,7		20	76,9	14	56,0	
<i>RR</i>	7	23,3	2	13,3		2	7,7	9	36,0	
<i>HH+HR</i>	23	76,7	13	86,7	0.429	24	92,3	16	64,0	0.014*
CD209/ -336 A/G										
<i>AA</i>	16	53,3	7	46,7	0.446	11	42,3	14	56,0	0.335
<i>AG</i>	13	43,3	6	40,0		11	42,3	10	40,0	
<i>GG</i>	1	3,3	2	13,3		4	15,4	1	4,0	
<i>AA+AG</i>	29	96,7	13	86,7	0.205	22	84,6	24	96,0	0.172
VDR/ <i>TaqI</i>										
<i>CC</i>	5	16,7	0	0,0	0.130	2	7,7	5	20,0	0.419
<i>CT</i>	14	46,7	11	73,3		12	46,2	11	44,0	
<i>TT</i>	11	36,7	4	26,7		12	46,2	9	36,0	
TNF-α/ -308 A/G										
<i>AA</i>	3	10,0	0	0,0	0.447	2	7,7	1	4,0	0.079
<i>AG</i>	7	23,3	4	26,7		11	42,3	4	16,0	
<i>GG</i>	20	66,7	11	73,3		13	50,0	20	80,0	
<i>AA+AG</i>	10	33,3	4	26,7	0.649	13	50,0	5	20,0	0.025*
IL-4/-590 C/T										
<i>CC</i>	11	36,7	6	40,0	0.500	11	42,3	9	36,0	0.195
<i>CT</i>	13	43,3	8	53,3		9	34,6	14	56,0	
<i>TT</i>	6	20,0	1	6,7		6	23,1	2	8,0	
<i>CC+CT</i>	24	80,0	14	93,3	0.245	20	76,9	23	92,0	0.139
IL-6/ -174 G/C										
<i>CC</i>	4	13,3	2	13,3	0.377	6	23,1	5	20,0	0.790
<i>CG</i>	8	26,7	7	46,7		9	34,6	11	44,0	
<i>GG</i>	18	60,0	6	40,0		11	42,3	9	36,0	
<i>CC+CG</i>	12	40,0	9	60,0	0.205	15	57,7	16	64,0	0.645
INF-γ/+87T/A										
<i>AA</i>	14	46,7	6	40,0	0.179	11	42,3	10	40,0	0.135
<i>AT</i>	15	50,0	6	40,0		8	30,8	13	52,0	
<i>TT</i>	1	3,3	3	20,0		7	26,9	2	8,0	
<i>AA+AT</i>	29	96,7	12	80,0	0.064	19	73,1	23	92,0	0.076
Total	30	66,7	15	33,3		26	51,0	25	49,0	

^aD30: 30 days after onset of symptoms. ^b*p*: Significance value. *Statistically significant.

Table 10. Single nucleotide polymorphisms and its association with persistence of dengue clinical symptoms on 60 days after onset of symptoms.

SNPs ^b /Genotypes	Persistence of symptoms – D60 ^a									
	Primary dengue					Secondary dengue				
	No		Yes		<i>p</i> ^c	No		Yes		<i>p</i>
	N.	(%)	N.	(%)		N.	(%)	N.	(%)	
FcyRIIa/-131 H/R										
<i>HH</i>	7	23.3	0	0.0	0.412	5	19.2	1	4.0	0.285
<i>HR</i>	26	86.7	3	20.0		29	111.5	5	20.0	
<i>RR</i>	9	30.0	0	0.0		7	26.9	4	16.0	
<i>HH+HR</i>	33	110.0	3	20.0	0.370	34	130.8	6	24.0	0.114
CD209/ -336 A/G										
<i>AA</i>	22	73.3	1	6.7	0.158	20	76.9	5	20.0	0.996
<i>AG</i>	18	60.0	1	6.7		17	65.4	4	16.0	
<i>GG</i>	2	6.7	1	6.7		4	15.4	1	4.0	
<i>AA+AG</i>	40	133.3	2	13.3	0.055	37	142.3	9	36.0	0.981
VDR/TaqI										
<i>CC</i>	5	16.7	0	0.0	0.807	4	15.4	3	12.0	0.148
<i>CT</i>	23	76.7	2	13.3		18	69.2	5	20.0	
<i>TT</i>	14	46.7	1	6.7		19	73.1	2	8.0	
TNF-α/ -308 A/G										
<i>AA</i>	3	10.0	0	0.0	0.852	3	11.5	0	0.0	0.459
<i>AG</i>	10	33.3	1	6.7		13	50.0	2	8.0	
<i>GG</i>	29	96.7	2	13.3		25	96.2	8	32.0	
<i>AA+AG</i>	13	43.3	1	6.7	0.931	16	61.5	2	8.0	0.259
INF-γ/+ 874 T/A										
<i>AA</i>	19	63.3	1	6.7	0.722	17	65.4	4	16.0	0.977
<i>AT</i>	19	63.3	2	13.3		17	65.4	4	16.0	
<i>TT</i>	4	13.3	0	0.0		7	26.9	2	8.0	
<i>AA+AT</i>	38	126.7	3	20.0	0.575	34	130.8	8	32.0	0.828
IL-4/-590 C/T										
<i>CC</i>	16	53.3	1	6.7	0.673	15	57.7	5	20.0	0.706
<i>CT</i>	20	66.7	1	6.7		19	73.1	4	16.0	
<i>TT</i>	6	20.0	1	6.7		7	26.9	1	4.0	
<i>CC+CT</i>	36	120.0	2	13.3	0.379	34	130.8	9	36.0	0.581
IL-6/-174 G/C										
<i>CC</i>	6	20.0	0	0.0	0.765	9	34.6	2	8.0	0.991
<i>CG</i>	14	46.7	1	6.7		16	61.5	4	16.0	
<i>GG</i>	22	73.3	2	13.3		16	61.5	4	16.0	
<i>CC+CG</i>	20	66.7	1	6.7	0.632	25	96.2	6	24.0	0.955
Total	42	93.3	3	6.7		41	80.4	10	19.6	

^aD60: 60 days after onset of symptoms. ^bSNPs: single nucleotide polymorphisms. ^c*p*: Significance value.

Table 11. Single nucleotide polymorphisms and its association with the classes of persistent derma clinical symptoms 30 days after onset of symptoms.

SNPs/ Genotypes	Classes of persistent clinical symptoms - D30*																					
	Dermatological			Neurological, psychological and behavior			Respiratory			Gastrointestinal			Musculoskeletal			Constitutional			Other			
	N.	(%)	<i>p</i> *	N.	(%)	<i>p</i>	N.	(%)	<i>p</i>	N.	(%)	<i>p</i>	N.	(%)	<i>p</i>	N.	(%)	<i>p</i>	N.	(%)	<i>p</i>	
FCγRIIIa/-131 H/R																						
GG	3	25.0	0.704	2	11.8	0.310	1	25.0	0.834	4	19.0	0.820	5	23.8	0.704	9	31.0	0.105	0	0.0	0.463	
AA+AG	9	75.0		15	88.2		3	75.0		17	81.0		16	76.2		20	69.0		2	100.0		
CD209/-336 A/G																						
GG	1	8.3	0.880	1	5.9	0.687	0	0.0	0.538	2	9.5	0.823	2	9.5	0.823	2	6.9	0.738	0	0.0	0.667	
AA+AG	13	108.3		16	94.1		4	100.0		19	90.5		19	90.5		27	93.1		2	100.0		
VDR/Tag1																						
CC	2	16.7	0.281	2	11.8	0.372	1	25.0	0.706	4	19.0	0.281	3	14.3	0.337	4	13.8	0.414	0	0.0	0.360	
CT	8	66.7		11	64.7		2	50.0		12	57.1		13	61.9		17	58.6		2	100.0		
TT	2	16.7		4	23.5		1	25.0		5	23.8		5	23.8		8	27.6		0	0.0		
TNF-α/-308 A/G																						
GG	7	58.3	0.513	15	88.2	0.038*	4	100.0	0.149	15	71.4	0.600	17	81.0	0.116	21	72.4	0.432	1	50.0	0.613	
AA+AG	5	41.7		2	11.8		0	0.0		6	28.6		4	19.0		8	27.6		1	50.0		
IL-4/-590 C/T																						
TT	2	16.7	0.915	3	17.6	0.800	0	0.0	0.379	3	14.3	0.848	2	9.5	0.384	3	10.3	0.349	1	50.0	0.176	
GG+GT	10	83.3		14	82.4		4	100.0		18	85.7		19	90.5		26	89.7		1	50.0		
IL-6/-174 G/C																						
GG	1	8.3	0.005*	6	35.3	0.336	3	75.0	0.232	7	33.3	0.193	7	33.3	0.193	9	31.0	0.056	0	0.0	0.189	
CC+CG	11	91.7		11	64.7		1	25.0		14	66.7		14	66.7		20	69.0		2	100.0		
INF-γ/+877A																						
TT	1	8.3	0.466	2	11.8	0.813	1	25.0	0.494	3	14.3	0.752	2	9.5	0.543	4	13.8	0.962	0	0.0	0.572	
AA+AT	13	108.3		15	88.2		3	75.0		18	85.7		19	90.5		25	86.2		2	100.0		
Total	12	12.5		17	17.7		4	4.2		21	21.9		21	21.9		29	30.2		2	2.1		

*SNP: single nucleotide polymorphism. *D30: 30 days after onset of symptoms. %: Significance value. *Statistically significant

8/7/2014

Imprimir

Assunto: Submission Confirmation

De: Human Immunology (ees.him.0.2a6f08.66dbe188@eesmail.elsevier.com)

Para: rasdett@yahoo.com.br; rasdett@hotmail.com;

Data: Terça-feira, 8 de Julho de 2014 14:44

Dear Raquel,

Your submission entitled "Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons" has been received by Human Immunology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/him/>.

Your username is: rasdett@yahoo.com.br

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/him/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Human Immunology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES GERAL E POMERANA DO ESPÍRITO SANTO-BRAZIL

Para a realização da caracterização das populações geral e Pomerana do ES quanto aos SNPs *-131 H/R*, *-336 A/G*, *TaqI*, *-308 A/G*, *-590 C/T*, *-174 G/C* e *+874 A/T* nos genes *FcγRIIa*, *CD209*, *VDR*, *TNF-α*, *IL-4*, *IL-6* e *INF-γ*, respectivamente, 100 indivíduos aparentemente saudáveis da Grande Vitória representaram a população geral e 59 indivíduos aparentemente saudáveis de Santa Maria de Jetibá representaram os pomeranos.

Quanto aos SNPs nos genes dos receptores *FcγRIIa*, *DC-SIGN* e *VDR*, suas frequências genótípicas encontradas estiveram em HWE em ambas populações e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nas distribuições alélicas e genótípicas entre as duas populações. As distribuições genótípicas dos SNPs nos genes *CD209* e *VDR* estiveram diferentes de outras populações brasileiras estudadas, de modo estatisticamente significativo. A distribuição genotípica do SNP no gene *CD209* na população geral do ES esteve diferente da encontrada na população de São Paulo e a distribuição genotípica do SNP no gene *VDR* esteve diferente, nas duas populações do ES, da população do Rio de Janeiro.

Quanto aos SNPs nos genes que codificam as citocinas *TNF-α*, *IL-4*, *IL-6* e *INF-γ*, suas frequências genótípicas encontradas estão em HWE, exceto para o SNP no gene *IL-6* na população geral do ES. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição genotípica dos SNPs nos genes *TNF-α* e *IL-4* entre as duas populações. Foi observada diferença estatisticamente significativa na distribuição genotípica dos SNPs nos genes *IL-6* e *INF-γ* entre as duas populações.

Embora haja fluxo gênico entre as duas populações, alguns SNPs podem permanecer com distribuições genótípicas ainda diferentes. Apesar disso, a distância genética entre as duas populações não foi estatisticamente significativa.

6.2 ANÁLISE DA PERSISTÊNCIA DE SINTOMAS CLÍNICOS DA DENGUE NO PERÍODO DE 60 DIAS DE ACOMPANHAMENTO APÓS INÍCIO DOS SINTOMAS

Para determinar a prevalência da persistência de sintomas clínicos da dengue, 96 indivíduos diagnosticados com dengue sintomática em 2012-2013 foram acompanhados por 60 dias após início dos sintomas por meio do preenchimento de um questionário clínico e epidemiológico em 4 entrevistas. Trinta e sete sintomas foram selecionados para terem a persistência estudada. Os sintomas dermatológicos, neurológicos, psicológicos, comportamentais, respiratórios, gastrointestinais, musculoesqueléticos, constitucionais, dentre outros, mais frequentes e característicos da dengue compuseram essa seleção.

Nesse período de acompanhamento, 38,5% dos indivíduos reportaram ter pelo menos um sintoma clínico da dengue 30 dias após início dos sintomas e 11,5% após 60 dias. Dos sintomas analisados, os mais persistentes foram os relacionados à síndrome da fadiga como mialgia, artralgia, astenia e mal-estar, sendo a mialgia o mais frequente.

A persistência de sintomas em 30 dias foi associada ao gênero feminino de modo estatisticamente significativa, no subgrupo de indivíduos com dengue primária e tendeu a estar associada à maior idade, no subgrupo de indivíduos com dengue secundária.

A persistência de sintomas em 60 dias apenas tendeu a estar associada à dengue secundária.

A medicação usada na fase aguda da infecção não esteve associada à persistência de sintomas clínicos da dengue na fase de convalescença.

Foi encontrada uma possível associação entre sintomas persistentes musculoesqueléticos e dengue secundária e uma associação entre sintomas constitucionais e dengue secundária.

6.3 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE SNPS NOS GENES FcγRIIa, CD209, VDR, TNF-α, IL-4, IL-6 e INF-γ E A PERSISTÊNCIA DE SINTOMAS CLÍNICOS DA DENGUE NA FASE DE CONVALESCÊNCIA

Para estudar a influência da genética do sistema imunológico do hospedeiro na persistência de sintomas clínicos da dengue na fase de convalescença, foram selecionados SNPs em três genes que codificam receptores (FcγRIIa, CD-SIGN e VDR) e em quatro genes que codificam citocinas (TNF-α, IL-4, IL-6 e INF-γ). Essas sete moléculas estão intimamente relacionadas à imunologia da dengue e sabe-se que os SNPs escolhidos influenciam na imunopatologia da dengue na fase aguda.

A distribuição genotípica dos SNPs estudados foi semelhante entre os indivíduos com dengue e os indivíduos representantes da população geral do ES.

O SNP *-131 H/R* no gene FcγRIIa, foi associado à persistência de sintomas em 30 dias, no subgrupo de indivíduos com dengue secundária. A presença do alelo *H* foi associada à não persistência de sintomas. Esse alelo apresenta frequência praticamente semelhante ao alelo *R* na população do ES, 48%.

A presença do alelo *A* do SNP *-336 A/G* no gene CD209 tendeu a estar associada à não persistência de sintomas em 60 dias, no subgrupo de indivíduos com dengue primária. Esse alelo é o mais frequente na população do ES, com frequência de 62,5%.

O SNP *TaqI* no gene VDR não esteve associado à persistência de sintomas.

O SNP *-308 A/G* no gene TNF-α tendeu a estar associado à persistência de sintomas em 30 dias e a presença do alelo *A* foi associada à não persistência de sintomas no subgrupo de indivíduos com dengue secundária. Foi encontrada uma associação entre o genótipo *GG* e a persistência de sintomas neurológicos, psicológicos e comportamentais em 30 dias. O alelo *A* é o menos frequente na população do ES, com frequência de 20%, tendo o genótipo *GG* a frequência de 65%.

Foi encontrada uma tendência à associação entre a presença do alelo *C* no SNP *-590 C/T* no gene IL-4 e a não persistência de sintomas em 30 dias. Esse alelo apresenta a frequência de 60,5% na população do ES.

A presença do alelo C do SNP -174 G/C no gene IL-6 foi associado à persistência de sintomas dermatológicos em 30 dias. Esse alelo é o menos frequente na população do ES, com frequência de 28%.

A presença do alelo A do SNP +874 A/T no gene INF- γ tendeu a estar associada à não persistência de sintomas em 30 dias, no subgrupo de indivíduos com dengue primária e à persistência de sintomas em 30 dias, no subgrupo de indivíduos com dengue secundária. Esse alelo está presente em 67% da população do ES.

Este é o primeiro estudo a determinar as frequências genotípicas dos SNPs -131 H/R, -336 A/G, *TaqI*, -308 A/G, -590 C/T, -174 G/C e +874 A/T nos genes Fc γ RIIIa, CD209, VDR, TNF- α , IL-4, IL-6 e INF- γ , respectivamente, no ES. Essa caracterização populacional do ES disponibilizou uma referência para o estudo de associação dos SNPs com a persistência de sintomas clínicos da dengue na fase de convalescença. Nossos resultados mostraram uma significativa persistência de sintomas clínicos da dengue 60 dias após o início dos sintomas, o que foi associado a SNPs nos genes Fc γ RIIIa, TNF- α and IL-6 e possivelmente associado a SNPs nos genes IL-4, CD209 and IFN- γ . Este foi o primeiro estudo a analisar a associação entre SNPs nos genes CD209, VDR, TNF- α , IL-4, IL-6 and IFN- γ e a persistência de sintomas clínicos da dengue. Esse perfil genético imunológico pode servir como marcador associado às consequências a longo prazo da infecção pelo DENV e, conseqüentemente, à identificação precoce de pacientes com pior prognóstico ou maior permanência dos sintomas. Nossos achados podem ainda, futuramente, contribuir para o desenvolvimento de terapias e vacinas contra o DENV.

Esse estudo inicia um avanço na compreensão da genética da imunologia da dengue e não deve ser considerado como um ponto final de pesquisa, mas como uma importante base para a melhora da prática clínica e conseqüentemente, do prognóstico dos pacientes.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 01 de setembro de 2011.

Do: Prof. Dr. Adauto Emmerich Oliveira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Prof. (a) Iuri Drumond Louro
Pesquisador (a) Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Relação entre presença e persistência de sintomas clínicos da dengue e características genéticas relacionadas ao sistema imunológico humano”**

Senhor (a) Pesquisador (a),

Informamos a Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa nº 190/11 intitulado: **“Relação entre presença e persistência de sintomas clínicos da dengue e características genéticas relacionadas ao sistema imunológico humano”** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada 31 de agosto de 2011.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Adauto Emmerich Oliveira'.

ANEXO 2

LIVRO 3:

BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGRO&INDÚSTRIA: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES

Parte APLICAÇÕES DIVERSAS PARA A INDÚSTRIA

CAPÍTULO 24

Desafios da Extração do RNA do Vírus da Dengue (Ligação e Extração ao DNA: Métodos, Aplicações e Limitações)

Raquel Spinassé Dettogni, Bióloga

Doutoranda em Biotecnologia (RENORBIO)

Núcleo de Genética Humana e Molecular

Universidade Federal do Espírito Santo

Iúri Drumond Louro, MD, PhD

Professor Associado

Núcleo de Genética Humana e Molecular

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO)

Universidade Federal do Espírito Santo

Resumo

O estudo dos vírus e o diagnóstico de doenças infecciosas têm sido revolucionados pelo desenvolvimento das técnicas moleculares, principalmente das aplicações que envolvem a reação em cadeia da polimerase. No caso do vírus da dengue, assim como em todos os vírus que possuem material genético de ácido ribonucleico, a amplificação do ácido desoxirribonucleico pela reação em cadeia da polimerase é precedida por uma reação de transcrição reversa. Nessa, ocorre a produção de um ácido desoxirribonucleico, usando o ácido ribonucleico viral como molde, que será usado nas reações moleculares subsequentes. Ainda antes da transcrição reversa, é necessária a extração/purificação do material genético viral, provavelmente o ponto mais crítico das análises genéticas. A sensibilidade e a qualidade da extração do material genético viral são cruciais para o sucesso das técnicas moleculares. Existem três principais grupos de métodos usados na extração do ácido ribonucleico viral: extração orgânica; extração baseada na adsorção do material genético e extração em gradiente isopícnico. Inúmeros protocolos baseados nesses três métodos já foram desenvolvidos e cada um apresenta vantagens e desvantagens que podem ser analisadas antes de um laboratório clínico ou de pesquisa iniciar as extrações. Nesse capítulo, serão discutidos os métodos de extração do ácido ribonucleico viral de diferentes amostras e suas particularidades, com ênfase no vírus da dengue. O processamento da amostra contendo o vírus será comentado, da extração do material genético às variadas análises moleculares, mostrando os desafios que são percorridos ao longo do processo para se conseguir um ácido ribonucleico viral de qualidade e, conseqüentemente, uma análise adequada.

Introdução

Em muitos países, a dengue é uma das doenças infecciosas mais preocupantes e frequentes desde o final do último século (1). Trata-se de uma arbovirose humana importante em termos de morbidade e mortalidade e constitui um problema de saúde pública no mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais favorecem a proliferação dos seus vetores, os mosquitos do gênero *Aedes*. Estima-se que acima de 2,5 bilhões de pessoas vivam em área de risco e mais de cem países possuem transmissão endêmica da doença (2, 3). Essa infecção pode ser assintomática ou promover quadros clínicos que variam de síndrome gripal leve conhecida como febre da dengue a uma doença grave e por vezes fatal denominada febre da dengue hemorrágica/síndrome de choque da dengue.

Os surtos de dengue são causados por quatro sorotipos antigenicamente distintos do vírus da dengue (DENV), denominados vírus da dengue tipo 1 - 4 (DENV - 1, DENV - 2, DENV - 3 e DENV - 4) (4). Esses vírus pertencem à família *Flaviviridae*, ao gênero *Flavivirus* e possuem genoma de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, de polaridade positiva, com aproximadamente 11 kilobases de tamanho e massa molecular de 4×10^6 daltons (5). O vírion dos flavivírus tem formato esférico e diâmetro de 40 - 60 nanômetros (nm) (**Figura 1**).

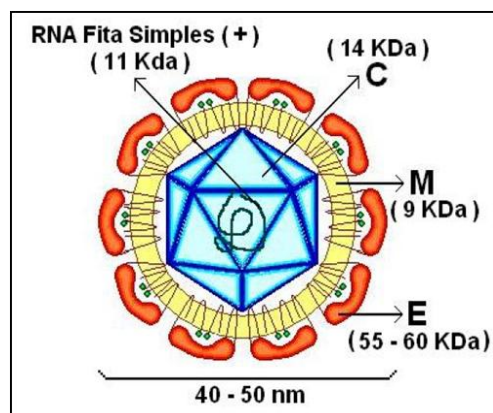


Figura 1. Morfologia do vírion de um *Flavivirus*. Kda - kilodaltons; C - proteína do capsídeo; M - proteína da membrana; E - proteína do envelope; nm - nanômetros. Fonte: (6).

A presença do DENV pode ser detectada para fins clínicos e de pesquisa por técnicas sorológicas e moleculares de isolamento viral. Os métodos sorológicos detectam anticorpos contra o DENV e podem ser realizados somente após a fase aguda da doença (após o sexto dia de

sintomas aproximadamente). Além disso, não permitem a sorotipagem e a quantificação viral (7, 8). O isolamento viral permite a detecção e a sorotipagem do DENV já na fase aguda da doença, porém, não permite a quantificação viral. O isolamento também apresenta a desvantagem de ter seu sucesso afetado por muitos problemas de manipulação e armazenamento das amostras, além de ter grande demanda de tempo, trabalho e instalações especiais. As metodologias moleculares, cujo objetivo é a detecção do genoma viral, tornaram-se excelentes ferramentas para diagnóstico e pesquisa do DENV, por serem mais rápidas e sensíveis que as outras metodologias (7-10). Com o uso de técnicas moleculares, podem ser feitos testes diagnósticos sensíveis e variados estudos específicos do genótipo viral, importantes em muitas áreas (11). Dentre os métodos moleculares para detecção de vírus com genoma de RNA, como o DENV, está a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (do inglês: *reverse transcription -polymerase chain reaction* – RT-PCR). Nessa técnica, a transcrição reversa produz ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir do RNA viral e a posterior PCR amplifica esse DNA. A RT-PCR apresenta várias modificações com etapas pós-reação em cadeia da polimerase (PCR) como *nested-PCR*, hibridização dos produtos com sondas de oligonucleotídeos tipo-específicas (Southern Blot/Dot Blot), reações de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (do inglês: *restriction fragment length polymorphism* - RFLP), eletroforese de campo pulsado (do inglês: *pulsed field gel electrophoresis* - PEGF), microarranjos de DNA e sequenciamento dos nucleotídeos dos produtos da PCR. Todas essas modalidades permitem rapidamente detectar e sorotipar o DENV na fase aguda da dengue. Uma modificação mais recente da RT-PCR é a RT-PCR em tempo real, que possui mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência, de modo que a amplificação, a detecção e a quantificação do DNA acontecem em uma única etapa. Essa metodologia permite, além de detectar e sorotipar o DENV nos primeiros dias de sintomas, quantificar o vírus, ou seja, medir a carga viral presente na amostra (9, 10). A RT-PCR em tempo real que disponibiliza resultados de quantificação se chama RT-PCR em tempo real quantitativa (do inglês: *quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction* - qRT-PCR) (12-18).

A primeira etapa necessária para a realização de qualquer metodologia molecular para estudo do DENV é a extração/purificação do RNA viral. A extração do RNA é um passo crítico para a detecção segura do vírus (19, 20) e é o elemento chave para o sucesso das análises moleculares.

Histórico

Na década de 60, Kurland e colaboradores desenvolveram o isolamento de RNA por centrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl) (21) e desde então, novos protocolos para extração de RNA de variadas amostras foram desenvolvidos. Modificações a esse método foram feitas, sendo umas das mais usadas e iniciais a ultracentrifugação em CsCl disponibilizada por Glisin e colaboradores em 1974 (22). Embora a extração por gradiente de CsCl tenha sido o primeiro método de purificação do RNA, atualmente é pouco usado, principalmente entre as formas comerciais de extração (21).

Em 1968, Kirky, Later e Chirgwin aperfeiçoaram a extração de RNA usando tiocianato de guanidina, um forte desnaturante, e β -mercaptoetanol (β -met), um agente redutor, em conjunto ou com extração por etanol ou com ultracentrifugação em CsCl (23). Posteriormente, Feramisco e colaboradores, em 1982, descreveram o sucesso da combinação da guanidina com fenol para a extração de RNA (24). Devido às várias desvantagens e baixa reprodutividade das técnicas desenvolvidas até então, foram necessários novos aperfeiçoamentos e em 1987 Piotr Chomczynski e Nicoletta Sacchi publicaram o método de extração orgânica com tiocianato ácido de guanidina - fenol - clorofórmio, no qual, em uma única etapa foi possível a extração do RNA dentro de 4 horas (25). Devido à sua maior agilidade, maior facilidade, sensibilidade, pureza do RNA, reprodutividade e diminuição da quantidade de amostra necessária, esse método tornou-se padrão ouro na extração de RNA, sendo usado como princípio de muitos reagentes comerciais (9, 21, 26, 27).

O conhecimento da capacidade do ácido nucleico de se ligar a partículas magnéticas, de sílica e de vidro na presença de agentes coatrópicos é anterior ainda ao desenvolvimento da primeira técnica de extração de RNA (26). Em 1982, Marko e colaboradores usaram essa propriedade para extração de ácido nucleicos por meio de partículas de vidro na presença de percolato de sódio (28). Em 1990, essa técnica foi aperfeiçoada por Boom e colaboradores (29) com uso de tiocianato de guanidina como agente coatrópico para ligação do ácido nucleico a partículas de sílica. Posteriormente, foram desenvolvidos vários protocolos de adsorção do RNA a esferas magnéticas. Devido a sua rapidez e facilidade, a técnica de Boom e colaboradores (29) foi usada como base para grande parte dos kits comercialmente disponíveis que usam minicolunas de sílica em tubos de ensaio para adsorção do ácido nucleico e isolamento do mesmo.

Extração de RNA do vírus da dengue

O RNA do DENV pode ser detectado em soro, plasma, líquido cerebrospinal e tecidos frescos ou fixados em parafina. Um estudo realizado por Mizuno e colaboradores em 2007 (30) detectou o DENV-1 em amostras de urina e saliva de um paciente com dengue, mostrando que outros tipos de amostras também podem ser usados. Prado e colaboradores em 2005 (31) conseguiram detectar o genoma viral em amostras de sangue coletado em papel de filtro, com manutenção da integridade do RNA por até 9 semanas após a coleta do sangue. Esse é um método de coleta fácil e vantajoso, porém, muitos laboratórios ainda não conseguem isolar com sucesso o genoma viral a partir do sangue em papel filtro, para isso, são necessários mais estudos para aprimoramento de um protocolo reprodutível.

O RNA pode estar presente nessas amostras em baixas titulações e a qualidade após a extração é crucial para as reações subseqüentes (7). Embora alguns vírus possam ser detectados no plasma, sem qualquer purificação anterior (32), esse não é o caso do DENV. Assim, é importante atenção especial à etapa de extração do seu RNA.

Qualidade da extração

Primeiramente, deve-se levar em consideração que o RNA é uma molécula instável e de fácil degradação, pois, além de ser fita simples, a presença do grupo hidroxila no carbono de número 2 na sua ribose (**Figura 2**) facilita a sua reação com enzimas degradativas. Como o pré-requisito para o funcionamento das técnicas moleculares é a extração de um RNA puro, íntegro e de qualidade (33), os métodos de extração de RNA são otimizados para a sua proteção durante todo o processo.

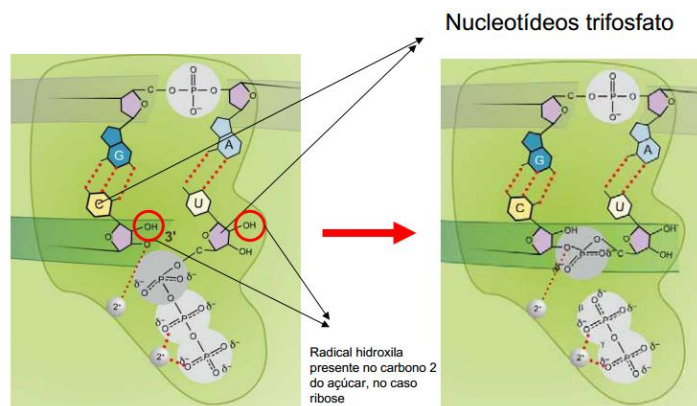


Figura 2. Esquema do ataque nucleofílico e formação da ligação fosfodiéster. Em vermelho estão destacadas as hidroxilas livres do carbono de número 2 das riboses.

Antes da extração, devem ser observadas as necessidades de cuidado na coleta e armazenamento das amostras. Para amostras de sangue, a extração deve ser procedida rapidamente após a coleta da amostra (entre 4 e 6 horas). Caso a extração não possa ser realizada nesse período, o sangue coletado em tubo sem gel separador de plasma deve ser centrifugado e o soro/plasma transferido para outro tubo dentre 4 e 6 horas para que seja congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração do RNA (34). O plasma de sangue coletado em tudo com gel separador pode ser mantido refrigerado por até 5 dias, quando então deve ser congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou submetido à extração do RNA. Tecidos devem ser congelados em nitrogênio líquido, embebidos em solução de preservação de RNA ou submetidos à extração do RNA em até 1 hora após a coleta (34). Geralmente, amostras de tecidos são coletadas de falecidos, sendo importante limitar o tempo entre o falecimento e a coleta (21). Amostras de líquido cerebrospinal devem sempre permanecer em banho de gelo e o RNA deve ser extraído em até 4 horas após a coleta (34) (**Figura 3**).

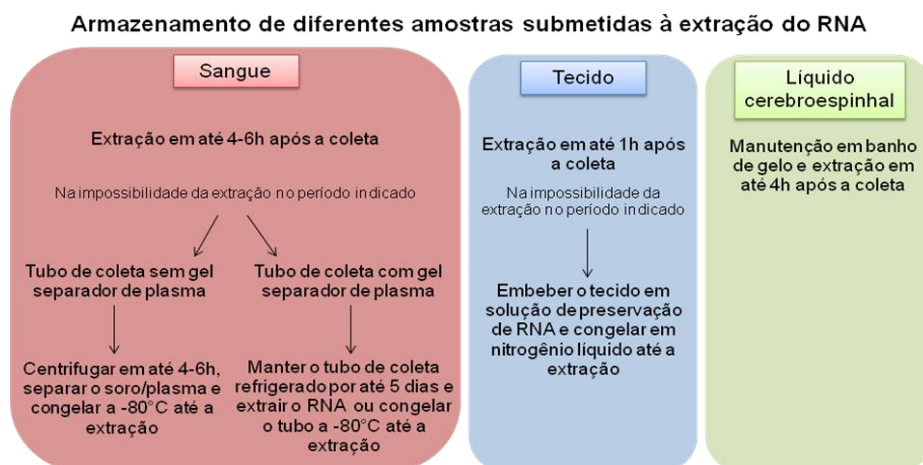


Figura 3. Fluxograma mostrando o período ideal para realização da extração do RNA após a coleta das diferentes amostras e o modo de armazenamento das mesmas até a extração.

Resultados moleculares falso-negativos (resultados negativos por erro na detecção do RNA e não pela ausência do vírus) são frequentemente causados por ação de ribonucleases (RNases), enzimas que degradam o RNA e impossibilitam a amplificação do DNA na PCR.

Essas enzimas são motivo de preocupação, uma vez que, além de possuírem grande capacidade de degradação, são estáveis, não precisam de cofatores, estão presentes em muitos locais (amostra, soluções, manipulador e ambiente) e são resistentes a vários tratamentos inclusive térmicos como fervura e autoclavagem (26, 35, 36). Por isso, durante todas as etapas de extração do RNA devem ser tomadas precauções rigorosas contra contaminação com RNAses: luvas devem ser usadas a todo o momento e trocadas frequentemente para evitar a contaminação com RNAses presentes na mão; todo material de plástico utilizado deve ser estéril, livre de RNAses e não deve ser reutilizado; é recomendado o uso de ponteiros com filtro; pipetas devem ser de uso exclusivo para extrações de RNA; vidrarias devem ser bem lavadas, tratadas com o inibidor de RNAses chamado dietilpirocarbonato (DEPC), autoclavadas e secas em estufa; utensílios tratados com DEPC devem ser posteriormente submetidos à total remoção do DEPC, pois esse pode inibir reações moleculares subsequentes; água e soluções a serem usadas devem ser tratadas com DEPC e autoclavadas (com exceção de soluções contendo tris(hidroximetil)aminometano, pois esse inativa o DEPC); se possível, as soluções devem ser filtradas em membrana de nitrocelulose (0,22 micrômetros - μm) para melhor retirada de RNAses; tubos, amostras e soluções devem ser abertos somente quando necessário e por fim, RNAses endógenas da amostra devem ser inativadas no primeiro passo de qualquer protocolo de extração de RNA (21). Em adição a esses cuidados, os protocolos podem usar um “sistema repórter”, um RNA sintético marcado com radiação, como, por exemplo, fósforo-32 (^{32}P). A recuperação desse RNA intacto ao final da extração indica que o protocolo funcionou corretamente, sem degradação por RNAses (21).

Outra importante consideração a se fazer sobre o RNA é que, uma vez extraído é recomendado que seja armazenado a -80°C e, idealmente, em alíquotas pois além de ser instável devido à degradação por RNAses, o RNA também é facilmente degradado por processos de congelamento seguidos de descongelamento. O congelamento do RNA em alíquotas permite que ele seja submetido apenas uma vez ao descongelamento (36).

Para evitar resultados falsos negativos ou até mesmo falsos positivos é recomendado o uso de controles positivos e negativos desde a extração do RNA (36). O controle positivo é uma amostra que se sabe que contém o vírus, de preferência uma amostra diluída para uma concentração viral que esteja no limite de detecção da técnica de extração. Esse controle é importante para a garantia da sensibilidade da técnica. Já o controle negativo, é uma amostra na qual se sabe que o vírus está ausente. Essa amostra sempre deve ser manipulada por último, após

as amostras serem analisadas e após os controles positivos, para a garantia de que não houve contaminação entre as amostras durante o processo de extração.

As técnicas de extração de RNA podem ser qualificadas quanto à quantidade e pureza do RNA por meio da espectrofotometria. Nessa análise, um espectrofotômetro como o NanoDrop (Thermo Scientific), por exemplo, mede a absorvância do RNA, o qual absorve a luz no comprimento de onda de 260 nm. Inicialmente uma alíquota da solução com o RNA extraído é diluída em água deionizada e submetida à leitura da absorvância pelo espectrofotômetro. A medida da absorvância a 260 nm (A_{260}) possibilita o cálculo da quantidade do RNA extraído por meio da fórmula $[RNA] = (A_{260} \times Fc \times fd)/1000$, onde Fc corresponde ao fator de conversão que é de valor 40 ($A_{260} \text{ nm}=1$ corresponde a 40 microgramas por mililitros ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de RNA); fd corresponde ao fator de diluição da amostra em água para a leitura do espectrofotômetro e o resultado é dividido por 1000 para uma concentração em microgramas por microlitro ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Proteínas absorvem a luz no comprimento de onda de 280 nm e o espectrofotômetro já disponibiliza a razão da A_{260} pela absorvância a 280nm (A_{280}) da solução de RNA. Razões A_{260}/A_{280} maiores ou iguais a 1,75 indicam que a técnica de extração do RNA conseguiu disponibilizar um RNA com pureza satisfatória. Uma razão com valor entre 1,8 e 2,0 é a ideal para qualquer análise de RNA, pois indica um alto grau de pureza da solução de RNA extraído. Já razões abaixo de 1,75 indicam presença de contaminantes como proteínas e DNA ou acidez da solução contendo o RNA, ou seja, indicam que a técnica de extração não disponibilizou um RNA com pureza satisfatória. Metodologias posteriores à extração do RNA mais simples como a RT-PCR conseguem ser realizadas com sucesso mesmo após uma extração de um RNA impuro, no entanto, técnicas mais elaboradas como sequenciamento ou medidas de expressão gênica com microarranjos requerem um RNA puro.

Métodos de extração do RNA

As variadas técnicas aplicadas na extração do RNA viral podem ser divididas em três grandes grupos: 1) técnicas baseadas no uso de fortes agentes desnaturantes e componentes orgânicos, como as técnicas derivadas da técnica de Chomczynski-Sacchi (1987) (25); 2) métodos baseados na adsorção do RNA a superfícies específicas na presença de sais caotrópicos, como os kits comercialmente disponíveis baseados na afinidade do RNA a membranas de sílica/gel chamadas colunas ou as técnicas derivadas da metodologia de Boom e colaboradores

(1990) (29) e 3) protocolos que exploram a separação do RNA em gradiente de centrifugação isopícnico (21, 26).

As técnicas de extração são variadas, mas usam etapas básicas para a extração do RNA. Inicialmente as membranas lipídicas são lisadas por uma solução detergente. Em seguida, é feita a purificação do RNA: remoção de restos celulares; desnaturação proteica; remoção de contaminantes como proteínas, DNA e fenol e separação do RNA dos outros componentes. Depois de purificado, o RNA é precipitado ou isolado e a última etapa é a dissolução ou eluição do RNA com água ou tampão. A eluição pode ser antecedida pela reidratação do RNA quando necessário.

Extração Orgânica

Nos protocolos de extração orgânica do RNA a amostra é lisada por agentes químicos desnaturantes como tiocianato de guanidina e redutores como o β -met (37, 38) e, posteriormente, a solução é submetida à extração orgânica com fenol e clorofórmio e à precipitação com álcool. A centrifugação da solução (amostra, fenol, clorofórmio e agente desnaturante) resulta na formação de três fases com cor, conteúdo e localização diferentes no tubo: uma fase aquosa superior de cor clara, que contém os ácidos nucleicos; uma pequena camada esbranquiçada intermediária, que contém proteínas dissolvidas em fenol e uma fase orgânica inferior de coloração rósea, que contém lipídeos dissolvidos em clorofórmio e fenol (**Figura 4**). Por precipitação com álcool, o RNA é recuperado da fase aquosa.



Figura 4. Fases formadas na extração orgânica do RNA.

O tiocionato de guanidina e o β -met desnaturam proteínas por quebra de ligações não covalentes que mantêm a estrutura terciária e quaternária das proteínas, fazendo-as precipitar, perder a estabilidade e conseqüentemente perderem a atividade biológica. O primeiro reagente é um agente caotrópico (39), que quebra ligações hidrofóbicas e o segundo é um agente redutor, que desfaz as ligações dissulfeto (40). Desse modo, ambos conseguem efetivamente inativar as RNAses presentes na amostra.

O fenol utilizado deve ser livre de nucleases e hidratado ou saturado com água. Esse fenol é uma solução de 72% de fenol e 28% de água, com pH ajustado para 4 (26). Esse pH ácido é importante para manter o RNA na fase aquosa e remover o DNA dessa fase, uma vez que a extração de ácidos nucleicos por fenol é pH dependente: em pH básico o DNA fica na fase aquosa e em pH ácido o DNA é desnaturado e precipita para a fase orgânica ficando somente o RNA na fase aquosa (41).

Clorofórmio é um solvente orgânico que, além de ajudar na desnaturação proteica e facilitar na formação das três fases, também tem o papel fundamental de remover o fenol residual da fase aquosa. O clorofórmio é em torno de 10 vezes mais solúvel em água que o fenol e, portanto, consegue separar o fenol da fase aquosa. O álcool isoamílico pode ser usado juntamente com o clorofórmio para ajudar na separação das fases, uma vez que diminui a formação de espuma (26).

O RNA é recuperado da fase aquosa por precipitação com etanol e sal catiônico. Após centrifugações, é formado um *pellet* esbranquiçado no fundo do tubo contendo o RNA. Essa coloração branca é devido à presença de sais precipitados juntamente com o RNA, os quais devem ser removidos por lavagens com etanol (21). O etanol induz a transições estruturais nas moléculas de RNA de modo a causar a formação de agregados que precipitam. Assim, ocorre a concentração do RNA e sua separação dos outros componentes da fase aquosa. Os sais catiônicos usados podem ser cloreto de sódio, acetato de sódio e acetato de amônio sendo os dois últimos preferenciais, pois o cloreto de sódio tem baixa afinidade pelo etanol, sendo mais difícil de ser retirado do *pellet* (26). O isopropanol pode ser usado no lugar do etanol na precipitação, sendo importante para casos onde a capacidade de volume do tubo usado na extração é limitada, pois a quantidade de isopropanol usada para precipitar certa concentração de RNA é menor que a quantidade de etanol necessária. No entanto, uma atenção especial deve ser dada ao se usar isopropanol, pois esse co-precipita sais com o RNA e é menos volátil que o etanol. Assim, o

pellet formado por precipitação com isopropanol precisa ser lavado com etanol para a retirada do isopropanol e sais (26).

O RNA extraído é dissolvido em água livre de RNAses ou tampões apropriados e deve ser armazenado em tubos estéreis, hidrofóbicos, não manipulados por mãos sem luvas e tratados com água com DEPC. O armazenamento deve ser feito em temperaturas de -80 °C ou menores, para garantir a inatividade de RNAses e a estabilidade do RNA (34).

A extração orgânica é realizada com variadas modificações e representa o “padrão ouro” nas rotinas de laboratório. A técnica de Chomczynski-Sacchi (1987) (25), uma das mais conhecidas técnicas de extração orgânica de RNA, foi desenvolvida para extração de RNA a partir de amostras de células cultivadas ou tecidos. Esses autores conseguiram purificar RNA não degradado e com boa quantificação dentro de 4 horas (25). Em seu protocolo, Chomzysnki e Sacchi usaram como solução desnaturante (Solução D), uma solução feita com 4 molar (M) de tiocianato de guanidina, 25 milimolar (mM) de citrato de sódio em pH 7,0, 0,5 % de sarcosil e 0,1 molar (M) de β -met ou β -mercaptoetanol . Inicialmente, a solução D é homogeneizada com a amostra e então são adicionados o acetato de sódio, o fenol saturado com água e uma mistura de clorofórmio com álcool isoamílico (na proporção 49:1). A mistura passa por resfriamento e uma centrifugação, após a qual, o RNA encontra-se na fase aquosa e os outros componentes nas fases intermediária e orgânica. A porção contendo o RNA é misturada com isopropanol e a precipitação do RNA é feita a -20 °C. O *pellet* de RNA formado após uma centrifugação é misturado com solução D e a precipitação é repetida. Após uma última centrifugação, o *pellet* de RNA é lavado com etanol 70-80 %, passa pela secagem e é dissolvido em dodesil sulfato de sódio 0,5 % (25).

Reagentes como TRI Reagente® (Sigma-Aldrich), TRIzol® Reagents (Invitrogen-Life Technologies), Brazol (LCG Biotecnologia), TRIsure (Bioline), dentre outros, são baseados na técnica de Chomczynski-Sacchi e estão comercialmente disponíveis. O TRI Reagente® e o TRIzol® LS Reagente permitem extração de RNA de origem viral a partir de plasma/soro humano e oferecem a possibilidade de extração simultânea do DNA e das proteínas presentes na amostra.

A extração orgânica apresenta algumas desvantagens como a possível separação incompleta das proteínas do RNA e a contaminação da fase aquosa pela fase orgânica. Além disso, as técnicas baseadas nesse tipo de extração podem ser demoradas, são trabalhosas, usam

reagentes perigosos, necessitam de muita vidraria e utensílios plásticos e por fim, podem ser inadequadas para manipulação de muitas amostras (7, 21). Por outro lado, essa é uma das técnicas que apresenta maior sensibilidade e pureza do RNA. É uma técnica adequada para purificação de RNAs pequenos (<200 nucleotídeos) e que serão usados posteriormente em métodos que requerem muita pureza do RNA.

Os reagentes comercialmente disponíveis baseados nessa técnica reduzem o tempo necessário para a extração do RNA e por isso permitem a extração do RNA de muitas amostras facilmente, no entanto podem não ter a mesma sensibilidade da extração orgânica realizada com reagentes preparados adequadamente no laboratório (26).

Métodos baseados na adsorção do RNA

Métodos baseados na adsorção do RNA usam a propriedade desse ácido nucleico de se ligar em superfícies como esferas magnéticas (42), sílica (21, 43), materiais de látex de poliestireno (44), matriz de celulose ou fibras de vidro (45), na presença de determinados sais ou agentes caotrópicos. Esses possuem a propriedade de desorganizar a estrutura tridimensional de ácidos nucleicos e proteínas, desnaturando essas macromoléculas. Dentre esses métodos, encontra-se a técnica de Boom e colaboradores (1990) (29), que usa esferas de sílica, kits que usam partículas de vidro como o High pure viral nucleic acid kit (Roche Applied Science), kits que usam esferas magnéticas como o InviMag[®] vírus RNA Mini Kit (STRATEC Molecular) e os kits comercialmente disponíveis que usam minicolunas de sílica.

Boom e colaboradores (29) desenvolveram um protocolo para extração de RNA de soro e urina, baseado em dois fundamentos: a inativação das RNAses pelo tiocianato de guanidina e a ligação do RNA a partículas de sílica ou diatomáceas (algas unicelulares cuja parede celular é de sílica) na presença de altas concentrações de tiocianato de guanidina. Nesse protocolo, a amostra é lisada por tiocianato de guanidina e é misturada às partículas de sílica para adsorção do RNA. Os complexos de RNA + sílica são sedimentados e os contaminantes retirados por centrifugação/descarte do sobrenadante. O RNA adsorvido à sílica é lavado com etanol e acetona e posteriormente é deixado para secar. Por fim, o RNA é eluído em um tampão aquoso livre de sal e a sílica é removida por centrifugação (7, 21, 29). De acordo com os autores do protocolo, essa técnica é barata, não exige muitos equipamentos do laboratório e disponibiliza RNA livre de RNAses, portanto, não degradado (7). Desvantagens desse método são a dificuldade na remoção

das partículas de sílica após a eluição do RNA e a baixa eficiência na extração de pequenos RNAs.

Os kits comercialmente disponíveis, baseados em colunas, representadas na **Figura 4**, permitem a extração de RNA em fase sólida a partir de pequenas quantidades de amostra (46). A amostra é adicionada à coluna e o RNA se liga à mesma em pH ácido e alta concentração de sal no tampão de ligação, o qual ainda pode conter agentes desnaturantes, detergentes, isopropanol e indicador de pH. A lavagem das colunas para purificação do RNA a elas aderido é feita com tampões de lavagem contendo fosfato de potássio ou etanol e o RNA é eluído com tampão de eluição ou água livre de RNAses (7, 21). As principais etapas da extração de RNA com uso de colunas estão ilustradas na **Figura 5**.



Figura 4. Colunas.

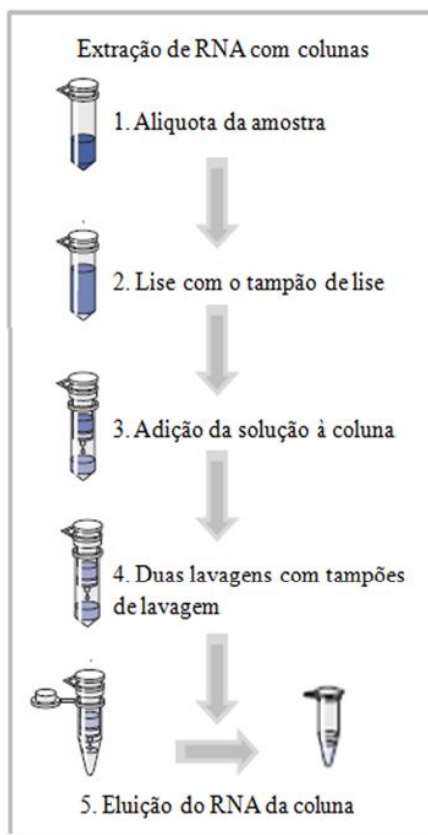


Figura 5. Principais etapas da extração de RNA com uso de colunas. 1. Uma pequena quantidade da amostra é adicionada a um microtubo. 2. A amostra é incubada com uma solução de lise para que ocorra a lise das membranas celulares e digestão proteica. 3. A solução resultante é adicionada à coluna e esta é centrifugada. O RNA permanecerá ligado à coluna. 4. Um tampão de lavagem é adicionado à coluna e esta centrifugada. O processo é repetido e assim, a coluna é lavada duas vezes para retirada de moléculas, diferentes do RNA, que possam a ela estar aderidas. A lavagem dupla permite que apenas o RNA permaneça ligado à coluna. 5. Um tampão de eluição (ou água livre de RNAses) é adicionado à coluna e esta é centrifugada. Ao final do processo, o RNA é eluído da coluna e encontra-se dissolvido no tampão.

Várias empresas disponibilizam kits baseados em colunas como a Qiagen, que apresenta 11 tipos de kits disponíveis para extração de RNA viral, a Invitrogen-Life Technologies (atual Thermo Fisher [Scientific](#) - Life Technologies) que possui o PureLink[®] RNA/DNA viral purification, a Axygen que possui o Kit de purificação de DNA/RNA viral, dentre várias outras.

O uso de coluna acelera, facilita, garante o lucro da extração e reduz o risco de contaminação durante o processo. No entanto, assim como a técnica de Boom e colaboradores (29), não é adequada para extração de pequenos RNAs. Alguns pesquisadores descrevem ainda que pode resultar na extração de RNA menos puro se comparada à extração orgânica (47). A principal desvantagem do uso de kits de colunas é o alto preço. Com o objetivo de solucionar esse problema, Siddappa e colaboradores (48) publicaram um artigo em 2007, no qual descreveram uma técnica para reutilizar as colunas para várias extrações (acima de 20 extrações), sem que elas percam a capacidade de adsorção ou purificação do ácido nucleico (48). Segundo esses autores, a incubação das colunas usadas em solução de ácido clorídrico (HCl) 1 M por 24 horas pode eficientemente eliminar qualquer ácido nucleico a elas ligado e deixá-las prontas para uso em uma nova extração. Como os kits fornecem o volume dos reagentes condizente com o número de colunas, os autores relatam que, com a composição correta das soluções necessárias, os laboratórios conseguem fazê-las para reutilizarem as colunas.

Extração de RNA por gradiente isopícnico

A extração de RNA por gradiente isopícnico ou por equilíbrio de gradiente de densidade, como também é chamada, consegue isolar o RNA por ultracentrifugação ou centrifugação em

altas velocidades por longo período de tempo, com uso de sais que apresentam gradiente de densidade como o CsCl ou trifluoroacetato de cério (CsTFA). Ao longo do processo de extração, o RNA se posiciona no gradiente de densidade desses sais, em uma faixa que corresponde à sua própria densidade (21) e assim pode ser isolado.

É usada uma grande concentração dos sais do metal pesado cério, cujos íons são lentamente levados para o fundo do tubo durante a centrifugação formando um gradiente contínuo de densidade na coluna líquida presente no tubo. Com o tempo, a tendência dos íons se concentrarem no fundo é contrabalanceada pela tendência deles se dispersarem por difusão, estabilizando o gradiente. À medida que o gradiente se forma, as moléculas de RNA são levadas para o fundo do tubo ou flutuam até encontrarem uma posição, onde sua densidade de flutuação equivale à sua densidade natural e onde ficam paradas com estabilidade (41).

Para a extração do RNA, inicialmente a amostra é misturada com tiocianato de guanidina e CsCl ou CsTFA e, posteriormente, submetida à centrifugação. A fração de densidade correspondente ao RNA é separada e o RNA é precipitado com etanol. O uso da guanidina permite, assim como nos outros métodos de extração, inibir a ação das RNAses. A sensibilidade e precisão do gradiente de densidade formado permite a separação de moléculas puras de RNA (21, 22). Essa técnica é tão sensível que pode separar RNAs com pequenas diferenças na composição de bases. As desvantagens desse método são a necessidade de tempo prolongado para centrifugação ou de uma ultracentrífuga.

Sistemas automatizados de extração de RNA

Existem empresas que disponibilizam equipamentos que permitem a extração de ácidos nucleicos de modo totalmente automatizado, ou com uso dos kits comerciais ou com protocolos próprios para os equipamentos. Com essas tecnologias, um maior número de amostras pode ser processado ao mesmo tempo e com menor possibilidade de erro.

Um sistema universal de extração automatizado de RNA da Qiagen chama-se BioRobot. Esse sistema é baseado na ligação do RNA à fase sólida, lavagem dessa e eluição do RNA e permite o processamento de 96 amostras por análise. A Qiagen também possui o sistema robótico QIAcube, que automatiza a extração com os kits baseados em coluna (www.qiagen.com).

A Invitrogen-Life Technologies possui o iPrep™, o qual faz extração automatizada de ácidos nucleicos usando a tecnologia de adsorção a esferas magnéticas. Esse equipamento permite o processamento de 12 amostras em até 30 min (www.lifetechnologies.com).

A Promega possui o sistema Maxuell®, que também usa a tecnologia de esferas magnéticas para extração de até 16 amostras em menos de 45 min (www.promega.com.br).

A Roche Diagnostics possui o equipamento MagnaPure, que realiza até 32 extrações por corrida (www.roche.com.br).

Além dessas empresas, outras também oferecem sistemas automatizados não só para extração do RNA, mas também para amplificação, quantificação e detecção do RNA como Roche Diagnostics que possui a plataforma Cobas® Ampliprep/Cobas TaqMan.

Embora esses equipamentos tenham custo elevado, manutenção dispendiosa e grande gasto de descartáveis e reagentes próprios, fornecem uma alternativa eficiente para laboratórios com alta demanda de análises.

Comparação entre as principais técnicas de extração de RNA

A técnica ideal de extração seria aquela que disponibilizasse grande quantidade de RNA puro e intacto, de modo rápido e reprodutível, com pouco custo e capaz de permitir extração de grande número de amostras simultaneamente. No entanto, nem todas as técnicas disponíveis apresentam todas essas qualidades juntas. Cada técnica tem vantagens e desvantagens que devem ser revisadas antes de um laboratório decidir qual delas lhe é mais adequada. Abaixo, será feito um resumo dos achados de vários trabalhos que comparam diferentes técnicas de extração de RNA quanto às características de quantidade e pureza do RNA, qualidade da inativação de RNAses, custo, rapidez e reprodutividade que cada técnica apresenta. Vale lembrar que dentro da mesma técnica, os variados protocolos também apresentam diferenças.

Poma e colaboradores (49) compararam três kits comerciais baseados em minicolunas de sílica quanto à quantidade de RNA recuperada, eficiência da posterior amplificação e presença de inibidores de reações moleculares no RNA extraído. Os kits comerciais foram QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen), PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen-Life Technologies) e NulceoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel). Segundo os autores, o kit da Invitrogen-Life Technologies apresentou maior eficiência na amplificação do RNA extraído por qRT-PCR, mesmo na presença de inibidores da PCR nas amostras. Isso se deve à maior capacidade desse kit

de eliminar contaminantes e, portanto, de purificar o RNA. Substâncias que inibem a PCR e devem ser eliminadas no processo de extração do RNA são: íons de ferro e cálcio, ácido húmico (50), tanino (51), grupo heme, heparina, anticorpos, lipídeos (52, 53) e tiocianato de guanidina. Essas variações na eficiência da amplificação do RNA entre kits de extração pode ser ocasionada por diferenças na natureza das colunas e dos tampões de lise e lavagem (49).

Kurar e colaboradores (54) compararam cinco protocolos para extração de RNA, sendo três baseados na extração orgânica (TRIzol - Invitrogen-Life Technologies, TRIidty – Applichem e EZ-RNA - Omega Bio-Tek) e dois baseados em colunas (UltraClean™- MO-BIO Laboratories e E.Z.N.A.[®] - Biological Industries). A comparação foi feita em relação à quantidade e qualidade do RNA e à eficiência da amplificação na RT-PCR. O protocolo que disponibilizou menor quantidade de RNA foi o EZ-RNA e o de maior quantidade o UltraClean™. Os protocolos baseados em colunas precisaram de digestão com enzima que digere DNA (DNase-I) pois apresentaram muita contaminação com DNA. Os cinco protocolos extraíram RNA puro (após digestão com DNase-I), diferindo na quantidade do RNA isolado (54). Quanto a esse fato, Deng e colaboradores (33) afirmaram que protocolos de extração de RNA orgânica podem ter menor contaminação com DNA quando a coleta da fase aquosa ocorre sem nenhum contato com as outras fases e o trabalho de Phongsisay e colaboradores (55) afirma que independente do protocolo, deve ser usada a digestão com DNase-I para evitar contaminação com DNA e futuros erros na interpretação da RT-PCR. No uso de colunas, o erro do manipulador é bem menos frequente e o processo de extração é simples, mas, como mostrado no trabalho de Kurar e colaboradores (54), a digestão com DNase-I é indispensável. Esses autores, assim como Bustin (56) ainda sugerem que o tratamento com DNase-I seja feito apenas na alíquota de RNA a ser usada na análise molecular, e que o RNA a ser armazenado não deve passar pela digestão até ser usado. Isso, para evitar que a solução de DNase-I, que pode estar contaminada com RNase, degrade também o RNA. Kurar e colaboradores (54) também sugerem que o melhor método para conservação do RNA extraído é a produção do cDNA complementar (cDNA) por transcrição reversa e o armazenamento deste, que é bem mais estável que o RNA.

Em 2011, Dettogni e Louro (7) compararam a extração do RNA do DENV-2 a partir de plasma humano com uso do QIAamp[®] UltraSens Virus Kit (Qiagen) e do método de Chomzynski e Sacchi (1987) (25). No estudo, de 47 amostras de pacientes com diagnóstico clínico da dengue, 34 foram positivas para a presença do DENV-2 pela RT-PCR com o RNA

extraído pela extração orgânica e 27 com o RNA extraído pelo Kit. Além disso, o estudo mostrou que a extração orgânica isolou RNA com quantificações maiores que o Kit (7).

De Paula e colaboradores (12) compararam três métodos para extração do RNA do DENV: QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit, método de Chomzynski-Sacchi e TRIzol[®]. De 100 amostras analisadas pela RT-PCR, nenhuma foi positiva após extração do RNA por TRIzol[®] ou pelo método de Chomzynski e Sacchi e seis foram positivas após extração do RNA pelo Kit. Assim, segundo os autores, o método mais indicado para extração do RNA para diagnóstico molecular da dengue é o QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit.

Um trabalho desenvolvido por Verheyden e colaboradores e publicado em 2003 (20) comparou três métodos para extração de RNA viral: método de Chomczynski-Sacchi, o kit PURE-SCRIPT[®] (Gentra Systems), baseado na precipitação diferencial do RNA e o QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit. Nesse trabalho, o método menos sensível foi o de Chomczynski-Sacchi e o mais indicado também foi o kit da Qiagen, por sensibilidade e rapidez na extração do RNA.

Fransen e colaboradores, em 1998 (19), publicaram um trabalho comparando sete diferentes métodos para extração do RNA do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os métodos foram: High Pure Viral (Boehringer), RNA kit (Mannheim), RNA Insta-Pure LS (Eurogentec), PANext RNA Extraction Kit I (NTL/PAN systems), QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit, técnica de Chomczynski-Sacchi, extração descrito por Boom e colaboradores em 1990 (29) e extração descrita por Mathy e colaboradores (1996) (57). O Estudo recomendou o kit da Qiagen como o método mais rápido, sensível e de preço acessível para extração do RNA de grande número de amostra.

Verhofstede e colaboradores em 1996 (27) compararam oito métodos para extração do RNA do HIV: TRIzol[®], técnica de Boom e colaboradores (29), RNeasy (Qiagen), NASBA (Organon Teknika), Isoquick (Microprobe), técnica de Chomczynski-Sacchi (25), RNAID (Bio-101) e Ultraspec (Biotex). Segundo o estudo, a técnica de Chomczynski-Sacchi foi o método que apresentou melhores resultados após análise por RT-PCR, com maior sensibilidade e reprodutividade. Os autores lembram, no entanto, que esse método é demorado, pouco vantajoso quando existem muitas amostras a serem analisadas e fácil de passar por erros de contaminação, mistura de amostras e manipulação. Para laboratórios de ampla escala, o estudo recomendou o uso do TRIzol[®], que consegue extrair o RNA com bons resultados em apenas 2 horas e com menor trabalho.

Fanson e colaboradores (2000) (47) compararam a extração do RNA de vírus causadores de hepatites por um método orgânico e pelo QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit. Nesse trabalho, o kit comercial apresentou uma sensibilidade aproximadamente dez vezes menor que a extração orgânica, apesar de ser finalizado em um tempo consideravelmente menor. Assim, os autores recomendam que: quando a sensibilidade é indispensável para análises futuras, a extração orgânica é a melhor escolha e caso um processo menos trabalhoso e demorado seja a prioridade, o kit baseado em colunas de sílica é o método mais indicado (47).

Inúmeros outros trabalhos científicos comparam diferentes técnicas para extração do RNA viral e apresentam conclusões variadas, ora indicando um método, ora indicando outro. Essa situação ocorre, pois há muitas variáveis envolvidas no sucesso ou não de alguma técnica. Um exemplo de variável que influencia nas conclusões dos trabalhos é a época específica em que os vírus estão presentes nas amostras. Uma técnica de extração somente terá sucesso caso a coleta da amostra seja feita no período adequado. O DENV, por exemplo, permanece na circulação sanguínea até o sexto dia de sintomas da dengue, após esse tempo a quantidade de vírus na circulação é tão pequena que a extração não é mais possível e o método de diagnóstico passa a ser a sorologia, para detecção de anticorpos contra o DENV. Assim, trabalhos que não coletaram as amostras no período certo podem ter cometido erros em suas conclusões. A comparação de métodos usando quantidades iniciais diferentes de amostra também pode levar a conclusões equivocadas como relatado por de Paula e colaboradores, que afirmaram que a quantidade inicial da amostra pode influenciar no resultado das análises moleculares, através da presença relativa de inibidores da PCR (12). Um terceiro exemplo importante de variável é a ocorrência de erros de manipulação durante o processo de extração, os quais podem levar a resultados falsos negativos, como já descrito anteriormente nesse capítulo, por degradação do RNA por RNAses, por pipetagem errada e etc.

De modo geral, com o auxílio dos variados trabalhos mostrando as vantagens e desvantagens de cada método disponível para extração do RNA viral, cada laboratório deve escolher dentre os métodos e protocolos o que mais atende às suas necessidades.

Possibilidades terapêuticas e/ou industriais

Qualquer técnica molecular para detecção de vírus com genoma de RNA, como o DENV, é iniciada, como já dito, pela etapa da transcrição reversa, onde uma enzima chamada

transcriptase reversa produz uma molécula de DNA usando o RNA viral como molde. Essa enzima atua como uma DNA polimerase dependente de RNA, ou seja, uma enzima que é capaz de realizar um processo contrário à transcrição comum às células, onde uma RNA polimerase DNA dependente produz uma molécula de RNA a partir de uma molécula de DNA. O isolamento da transcriptase reversa de um retrovírus (vírus com genoma de RNA e que utiliza a transcriptase reversa para a replicação do seu material genético), como o vírus da mieloblastose aviária (vírus AMV) ou o vírus da leucemia murina de Moloney (vírus MMLV), permitiu que a transcrição reversa fosse feita *in vitro*, em uma etapa anterior à PCR, a qual, então, amplifica o DNA. Inicialmente, em um tubo de polipropileno mistura-se o RNA extraído, um seguimento pequeno de ácido nucleico chamado *primer* que irá servir como iniciador para a enzima sintetizar o fragmento de interesse e água ultrapura. A solução é incubada a 75 °C para que o RNA seja aberto, ou seja, desenrolado e, portanto, esteja disponível para servir como molde para a síntese do DNA. Posteriormente adiciona-se ao tubo um tampão adequado para a atividade enzimática, a transcriptase reversa, didesoxinucleotídeos (dNTPs) e água ultrapura, se necessário. A solução é então incubada a uma temperatura ideal para a atividade enzimática, para a síntese do DNA e, posteriormente, a uma temperatura elevada, para que a enzima seja inativada e pare a síntese. A molécula de DNA de fita simples produzida *in vitro* pela transcrição reversa chama-se cDNA, o qual, amplificado, pode ser usado nas inúmeras técnicas moleculares.

O diagnóstico das doenças transmitidas por vírus foi revolucionado pelo desenvolvimento das técnicas moleculares de detecção viral, principalmente as variadas formas de uso da PCR. Com sua sensibilidade, agilidade e facilidade na detecção de sequências genômicas virais, as técnicas moleculares têm hoje uma grande aplicação nos ramos clínico e científico. Uma grande mudança da PCR convencional foi a invenção da chamada PCR em tempo real, que como já dito, melhorou a contribuição da PCR ao diagnóstico viral, no sentido de ter maior sensibilidade, maior capacidade de amplificação genômica e ainda potencial de quantificar, além de qualificar, a sequência amplificada. Na qRT-PCR em tempo real, as sequências virais são além de detectadas, quantificadas a cada ciclo de amplificação por contínua determinação de um sinal de fluorescência que é diretamente proporcional à quantidade de DNA presente após cada ciclo da PCR.

A sensibilidade de muitas técnicas moleculares é grande o suficiente para conseguir detectar o vírus em amostras com até menos de 10 cópias virais, caso a amostra seja coletada na

época certa, armazenada corretamente e o método de extração seja eficiente (36, 58). Essa vantagem é importante na detecção dos vírus em formas assintomáticas e em pacientes submetidos a terapias, situações nas quais, possivelmente, a carga viral no paciente está baixa.

Em determinadas análises, uma única reação da PCR, de 25 a 40 ciclos, é capaz de detectar o vírus, porém em várias ocasiões a sensibilidade na detecção precisa ser maior. Nesses casos, são feitas outras técnicas moleculares além da PCR convencional, para que ciclos adicionais de amplificação possam aumentar em até 100 vezes a sensibilidade da detecção do vírus (36).

A PCR e suas variações têm grande importância não só no diagnóstico da dengue, mas também na vigilância epidemiológica e em estudos de eficácia de vacinas, testes e de drogas antivirais. Muitos protocolos da PCR são chamados de PCR Multiplex, pois possuem uma combinação de iniciadores para a DNA polimerase que permite detectar a presença dos quatro vírus da dengue de uma só vez, em um só tubo de ensaio. Com a PCR, amostras estocadas por longos períodos podem ter o vírus detectado e os sorotipos virais circulantes em um determinado momento de local podem ser identificados. Os protocolos da RT-PCR em tempo real permitem além de todas essas aplicações da PCR convencional, medir a carga viral de uma amostra. Assim, permite a obtenção de informações da dinâmica de uma infecção, da interação do homem com o vírus e da resposta de algum antiviral, o que é importante no prognóstico de um paciente, servindo como um guia do sucesso da terapia (9, 10, 59).

Além dessas técnicas importantes no diagnóstico, um método molecular pós-PCR, denominado sequenciamento nucleotídico, tem importante participação nos estudos virais. O sequenciamento de nucleotídeos dos produtos da PCR permite estudar a variabilidade genética das cepas virais, identificar a rota de origem de uma epidemia, determinar marcadores de virulência e fornece dados para que medicamentos possam acompanhar a alta frequência de mutação viral sem perder sua eficácia. Com as sequências virais estabelecidas por sequenciamento, também podem ser feitos estudos filogenéticos, que determinam a relação evolutiva entre organismos por meio de seus dados moleculares. Esses estudos podem classificar os quatro sorotipos do DENV em subtipos e genótipos virais, facilitando a caracterização do vírus circulante em uma epidemia (1).

Técnica passo-a-passo

Método de extração por tiocianato ácido de guanidina-fenol-clorofórmio desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987) (25), com modificações.

Chomczynski e Sacchi (25) desenvolveram o protocolo para extração de RNA a partir de células cultivadas ou tecidos e, com modificações, essa técnica pôde ser aperfeiçoada para extração de RNA do DENV a partir de plasma humano. A técnica desenvolvida para a extração do RNA do DENV a partir de plasma humano será descrita abaixo e ilustrada na **Figura 6**.

As soluções usadas no protocolo são: 1) solução desnaturante ou solução D (tiocianato de guanidina 4 M; citrato de sódio 25 mM, pH 7,0; sarcosil líquido 0,5 % e água deionizada). Para o preparo da solução estoque, os reagentes são dissolvidos por 10 min a 37 °C. A solução deve ser congelada ou usada em até três meses se mantida em temperatura ambiente; 2) β -met 0,1 M. Antes do uso da solução D no protocolo de extração, essa deve ser misturada com o β -met; 3) fenol saturado com água (20 mililitros (ml) de fenol de alto grau de pureza e 20 ml de água destilada). O fenol deve ser descongelado a 60°C e então adicionado à água e a solução é misturada por vortex. A solução é centrifugada a 600 x g por 10 min e posteriormente a parte aquosa é removida. O fenol saturado com água pode ser estocado por 30 dias a 4°C; 4) acetato de sódio 2 M pH 4,0 (acetato de sódio triidratado e água destilada). O acetato deve ser dissolvido na água e o pH ajustado com uso de ácido acético glacial; 5) clorofórmio; 6) álcool isoamílico; 7) isopropanol; 8) solução de glicogênio e 9) etanol 70 %.

Inicialmente, uma alíquota de 900 μ l de plasma é dividida igualmente em 3 tubos de polipropileno de 1,5 ml de capacidade (300 μ l de plasma em cada tubo). A solução D é descongelada a 37 °C e o β -met é adicionado à quantidade de solução D que será usada, na concentração de 0,1 M. Estando a solução preparada, 300 μ l de solução D (com o β -met) são adicionados aos tubos com o plasma e a mistura é homogeneizada. O próximo passo é o preparo da solução de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 49:1. Aos tubos são então adicionados: 600 μ l de fenol saturado com água; 60 μ l de acetato de sódio e 120 μ l de clorofórmio/álcool isoamílico. A mistura é homogeneizada em vortex por 10 segundos (s) e incubada a -20 °C por 15 min. Após esse tempo, os tubos são centrifugados a 13.150 x g por 15 min para a formação das três fases: a fase orgânica inferior, a fase aquosa superior e a fase esbranquiçada intermediária. A fase aquosa (aproximadamente 600 μ l) é transferida cuidadosamente para outros três tubos de polipropileno com capacidade de 1,5 ml e a eles é adicionado igual volume de isopropanol, ou seja, se em cada tubo forem adicionados 600 μ l de fase aquosa, também serão

adicionados 600 µl de isopropanol a cada tubo. Uma quantidade de 2,0 µl de solução de glicogênio pode ser acrescentada para facilitar a visualização do *pellet* de RNA que será formado no próximo passo. Para a precipitação do RNA, os tubos são incubados a -20 °C por 16 horas e posteriormente centrifugados a 13.150 x g por 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante é descartado e o *pellet* com o RNA estará formado e, se visível, terá aspecto esbranquiçado. Para hidratação do RNA é adicionado 1,0 ml de etanol 70 % aos tubos, os quais são centrifugados a 13.150 x g por 2 min. Esse etanol é então cuidadosamente descartado por completo e os tubos são virados com a abertura para baixo para secarem completamente à temperatura ambiente (aproximadamente 20 min). Estando os tubos secos, o RNA pode ser dissolvido: o *pellet* de um dos tubos é dissolvido em 30 µl de água livre de RNases e posteriormente o *pellet* dos outros dois tubos são dissolvidos com essa mesma água para concentrar o RNA dos três tubos em um só. Esse RNA extraído deve ser usado imediatamente nas análises moleculares ou armazenado a -80 °C para não ser degradado. Caso as análises moleculares não possam ser realizadas todas ao mesmo dia, uma opção é sintetizar o cDNA a partir do RNA extraído por transcrição reversa e então armazenar esse cDNA, que por ser estável, pode ficar a 4 °C sem ser degradado.

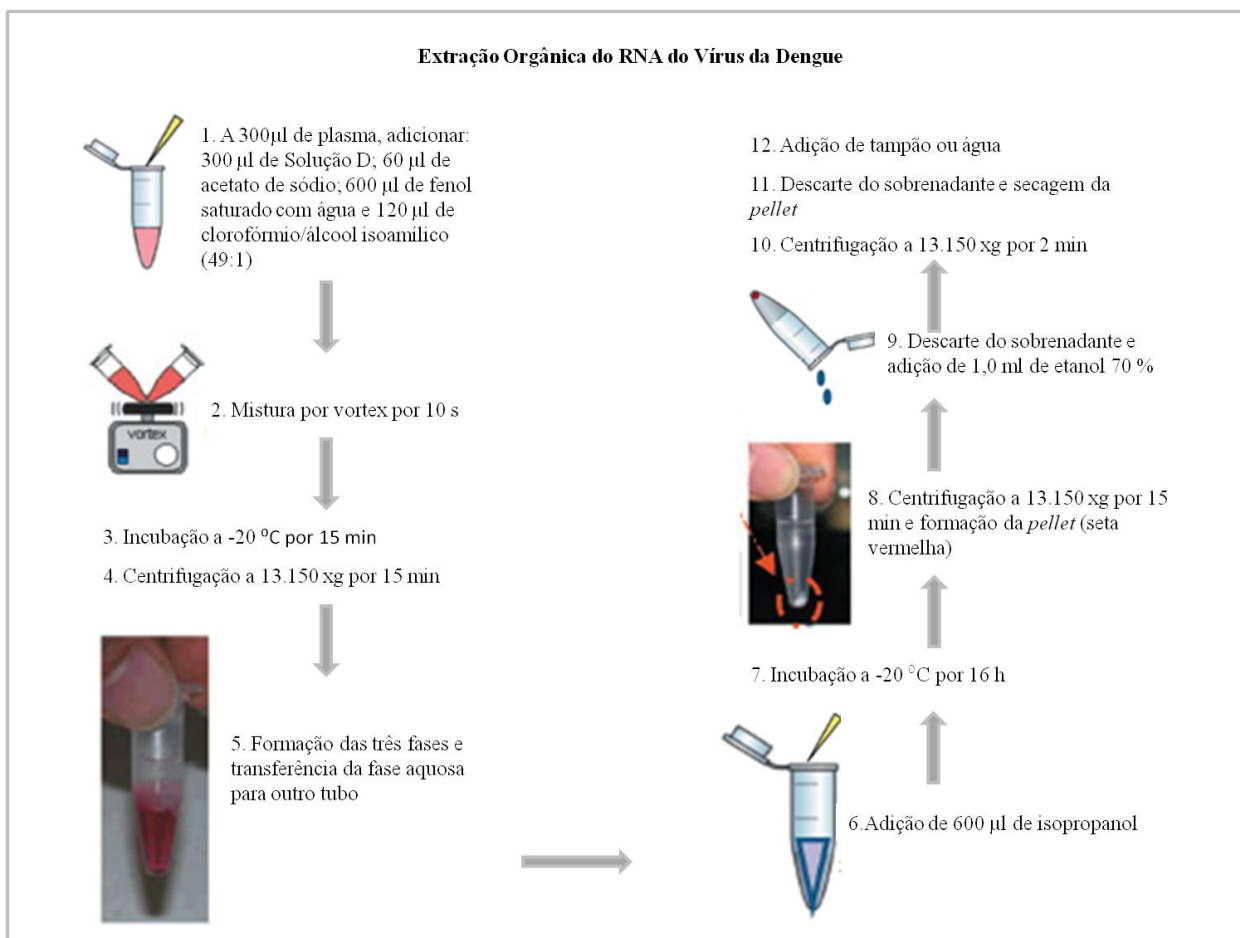


Figura 6. Etapas da extração orgânica do RNA do vírus da dengue.

Conclusões

Devido à falta de uma vacina eficaz e às dificuldades na erradicação do mosquito vetor, as opções para prevenção e controle das epidemias de dengue são limitadas. Assim, o rápido e eficiente diagnóstico molecular da dengue e a epidemiologia molecular viral são indispensáveis. Um diagnóstico precoce é importante para o início adequado do tratamento e acompanhamento dos pacientes. Estudos da genética viral são imprescindíveis para o desenvolvimento de vacinas e terapias, e para o conhecimento geral do vírus. Os estudos de vigilância epidemiológica e monitoramento viral são fundamentais para o conhecimento das epidemias, da circulação dos sorotipos e subtipos e, conseqüentemente, para a implementação de medidas de controle da infecção. Todas essas análises moleculares iniciam-se pela etapa crucial comentada neste capítulo, a extração do material genético viral. Assim, pode-se ver a importância do estudo detalhado dos métodos aplicados na extração do RNA, da comparação entre eles, do modo como

solucionar os problemas envolvidos no processo de extração, das necessidades especiais envolvidas na manipulação de RNA e por fim, da disponibilização de dados suficientes para que laboratórios clínicos e de pesquisa possam escolher o método mais adequado em suas extrações.

Perspectivas futuras

O rápido crescimento do número de publicações sobre análises moleculares tanto qualitativas como quantitativas demonstra o aumento da importância dessas análises nas áreas científica e clínica. Uma vez que a biologia molecular evoluiu e contribuiu de maneira importante para a pesquisa viral e para o diagnóstico das viroses, há um aumento da consciência sobre a necessidade da garantia da qualidade das análises moleculares. A natureza da PCR apresenta várias limitações difíceis de controlar, particularmente em virologia, onde a heterogeneidade do genoma viral, além da variedade de amostras, pode levar a desempenhos inadequados das análises. Assim, é clara a necessidade não só na garantia da qualidade, mas também do estabelecimento de processos moleculares totalmente automatizados, para reduzir o tempo de análise e, principalmente, os erros por variação de manipulador ou laboratório. Essas necessidades deverão levar a um aumento de estudos para melhorar a compreensão do que envolve as tecnologias moleculares e explorar ainda mais essas ferramentas a favor do controle das infecções virais.

Lista de abreviaturas

AMV - Vírus da Mieloblastose Aviária (do inglês: *Avian Myeloblastosis Virus*)

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico Complementar (do inglês: *Complementary Desoxiribonucleic Acid*)

DENV - Vírus da Dengue

DENV-1 - Vírus da Dengue tipo 1

DENV-2 - Vírus da Dengue tipo 2

DENV-3 - Vírus da Dengue tipo 3

DENV-4 - Vírus da Dengue tipo 4

DEPC - Dietilpirocarbonato

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês: *Desoxiribonucleic Acid*)

dNTP - Didesoxinucleotídeos

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês: *Human Immunodeficiency Virus*)

MMLV - Vírus da Leucemia Murina de Monoley (do inglês: *Monoley Murine Leukemia Virus*)

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: *Reaction Chain Polymerase*)

PEGF - Eletroforese de Campo Pulsado (do inglês: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

qRT-PCR - Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (do inglês: *Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*)

RFLP - Polimorfismos de Comprimento de Fragmento de Restrição (do inglês: *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNA - Ácido Ribonucleico (do inglês: *Ribonucleic Acid*)

RNAses - Ribonucleases

RPM - Rotação Por Minuto

RT-PCR - Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*).

β -met - β -mercaptoetanol

Referências

1. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *The Lancet infectious diseases*. 2002;2(1):33-42.
2. [WHO] WHO. State of the art of new vaccines: research and development initiative for vaccine research. World Health Organization. 2003:1-74.
3. Satish N VT, Abraham P, Sridharan G. Dengue fever: it's laboratory diagnosis with special emphasis on IgM detection. *WHO Dengue Bull* 2003;27:106-25.
4. Holmes EC. The evolutionary biology of dengue virus. *Novartis Foundation symposium*. 2006;277:177-87; discussion 87-92, 251-3.
5. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich S, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, et al. *Flaviviridae*. *Intervirology*. 1985;24(4):183-92.
6. WC B. Mapeamento das arboviroses no estado de Rondônia-Manaus. : Universidade Federal do Amazonas - UFAM; 2007.
7. Dettogni RS, Louro ID. Dengue virus RNA purification from human plasma: a comparison of two techniques. *Molecular biology reports*. 2011;38(8):4979-83.
8. Parida MM. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. *Journal of biosciences*. 2008;33(4):617-28.
9. Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular aspects of medicine*. 2006;27(2-3):254-98.
10. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(11):5189-98.
11. Zhong JF, Weiner LP, Burke K, Taylor CR. Viral RNA extraction for in-the-field analysis. *Journal of virological methods*. 2007;144(1-2):98-102.
12. De Paula SO, Nunes C, Matos R, de Oliveira ZM, Lima DM, da Fonseca BA. Comparison of techniques for extracting viral RNA from isolation-negative serum for dengue diagnosis by the polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*. 2001;98(2):119-25.
13. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(9):2634-9.
14. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(3):545-51.
15. V D. The contribution of molecular techniques to the diagnosis of dengue infection. In: Gubler DJ KG, editor. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. London: CAB International; 1997. p. 335-66.
16. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *The Journal of infectious diseases*. 2000;181(1):2-9.
17. Vorndam V, Kuno G, Rosado N. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. *Journal of virological methods*. 1994;48(2-3):237-44.
18. Wang WK, Lee CN, Kao CL, Lin YL, King CC. Quantitative competitive reverse transcription-PCR for quantification of dengue virus RNA. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(9):3306-10.
19. Fransen K, Mortier D, Heyndrickx L, Verhofstede C, Janssens W, van der Groen G. Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of seven different methods for extraction (part two). *Journal of virological methods*. 1998;76(1-2):153-7.
20. Verheyden B, Thielemans A, Rombaut B, Kronenberger P. RNA extraction for quantitative enterovirus RT-PCR: comparison of three methods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2003;33(4):819-23.

21. Vomelova I, Vanickova Z, Sedo A. Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia biologica*. 2009;55(6):243-51.
22. Glisin V, Crkvenjakov R, Byus C. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry*. 1974;13(12):2633-7.
23. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979;18(24):5294-9.
24. Feramisco JR, Smart JE, Burrige K, Helfman DM, Thomas GP. Co-existence of vinculin and a vinculin-like protein of higher molecular weight in smooth muscle. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257(18):11024-31.
25. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
26. Dettogni RS LI. Dengue Virus RNA Extraction Challenges. In: Zhou C LX, editor. *DNA Binding and DNA Extraction: Methods, Applications and Limitations*. New York: Nova Science Publishers; 2011. p. 155-64.
27. Verhofstede C, Franssen K, Marissens D, Verhelst R, van der Groen G, Lauwers S, et al. Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of eight different extraction methods. *Journal of virological methods*. 1996;60(2):155-9.
28. Marko MA, Chipperfield R, Birnboim HC. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Analytical biochemistry*. 1982;121(2):382-7.
29. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*. 1990;28(3):495-503.
30. Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;101(7):738-9.
31. Prado I, Rosario D, Bernardo L, Alvarez M, Rodriguez R, Vazquez S, et al. PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper. *Journal of virological methods*. 2005;125(1):75-81.
32. Ravaggi A, Primi D, Cariani E. Direct PCR amplification of HCV RNA from human serum. *PCR methods and applications*. 1992;1(4):291-2.
33. Deng MY, Wang H, Ward GB, Beckham TR, McKenna TS. Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 2005;17(6):574-8.
34. Melo MR MA, Barbosa IV, Romano P, Scholnik W. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2010;46(5):375-81.
35. Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*. 1997;276(5318):1558-60.
36. Ratcliff RM, Chang G, Kok T, Sloots TP. Molecular diagnosis of medical viruses. *Current issues in molecular biology*. 2007;9(2):87-102.
37. Gordon JA. Denaturation of globular proteins. Interaction of guanidinium salts with three proteins. *Biochemistry*. 1972;11(10):1862-70.
38. Nozaki Y, Tanford C. The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions. *The Journal of biological chemistry*. 1970;245(7):1648-52.
39. Mason PW, McAda PC, Mason TL, Fournier MJ. Sequence of the dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS1. *Virology*. 1987;161(1):262-7.
40. NELSON DL CM. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed; 2011.

41. Karp G. *Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos*. São paulo: Manole; 2005.
42. Ovcharenko D, Jarvis R, Hunicke-Smith S, Kelnar K, Brown D. High-throughput RNAi screening in vitro: from cell lines to primary cells. *Rna*. 2005;11(6):985-93.
43. Huang C, Zhang X, Lin Q, Xu X, Hu Z, Hew CL. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2002;1(3):223-31.
44. Iwami M, Tanaka A, Hano N, Sakurai S. Bombyxin gene expression in tissues other than brain detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ hybridization. *Experientia*. 1996;52(9):882-7.
45. Fenton RA, Chou CL, Stewart GS, Smith CP, Knepper MA. Urinary concentrating defect in mice with selective deletion of phloretin-sensitive urea transporters in the renal collecting duct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(19):7469-74.
46. Tolosa JM, Schjenken JE, Civiti TD, Clifton VL, Smith R. Column-based method to simultaneously extract DNA, RNA, and proteins from the same sample. *BioTechniques*. 2007;43(6):799-804.
47. Fanson BG, Osmack P, Di Bisceglie AM. A comparison between the phenol-chloroform method of RNA extraction and the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C/hepatitis G viral RNA from serum. *Journal of virological methods*. 2000;89(1-2):23-7.
48. Siddappa NB, Avinash A, Venkatramanan M, Ranga U. Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. *BioTechniques*. 2007;42(2):186, 8-92.
49. Poma HR, Davies C, Gutierrez Cacciabue D, Mora MC, Basombrio MA, Rajal VB. [Comparison of nucleic acid extraction efficiency using different commercial kits and qPCR. Effect of inhibitors]. *Revista Argentina de microbiologia*. 2012;44(3):144-9.
50. Schriewer A, Wehlmann A, Wuertz S. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. *Journal of microbiological methods*. 2011;85(1):16-21.
51. Kontanis EJ, Reed FA. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *Journal of forensic sciences*. 2006;51(4):795-804.
52. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*. 2006;27(2-3):95-125.
53. Nolan T, Hands RE, Ogunkolade W, Bustin SA. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Analytical biochemistry*. 2006;351(2):308-10.
54. Kurar E AM, Guzeloglu A, Ozsensoy Y, Semacan A. Comparison of Five different RNA isolation methods from equine endometrium for gene transcription analysis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2010;16(5):851-5.
55. Phongsisay V, Perera VN, Fry BN. Evaluation of eight RNA isolation methods for transcriptional analysis in *Campylobacter jejuni*. *Journal of microbiological methods*. 2007;68(2):427-9.
56. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*. 2002;29(1):23-39.
57. Mathy NL, Lee RP, Walker J. Removal of RT-PCR inhibitors from RNA extracts of tissues. *BioTechniques*. 1996;21(5):770, 2, 4.
58. Prada-Arismendy J CJ. Real time application in dengue studies. *Colombia Médica*. 2011;42(2):243-8.
59. Yeh HY, Yates MV, Chen W, Mulchandani A. Real-time molecular methods to detect infectious viruses. *Seminars in cell & developmental biology*. 2009;20(1):49-54.

Lista de palavras-chave

Vírus da dengue (DENV); RNA; Extração de RNA; Técnicas moleculares; Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR); reação em cadeia da polimerase (PCR); Ribonucleases (RNAses); Cloreto de céσιο (CsCl); Extração orgânica; Fenol; Clorofórmio; Chomczynski e Sacchi; Guanidina; Adsorção do RNA; Colunas; Sílica; Gradiente isopícnico; Diagnóstico; Sequenciamento.

APÊNDICE 1

Avaliação clínica – Persistência de sintomas clínicos da dengue

Número do paciente: (.....) Nome do paciente: _____

Sexo: M (.....) F () – Gestante: () Data de nascimento: ____/____/____

Raça/cor: Branco (.....) Preto () Pardo () Oriental () Indígena ()

Endereço completo - Rua: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: (.....)

Telefones: _____ E-mail: _____

Escolaridade: Não estudou (.....) Alfabetizado () Fundamental () Médio () Superior () Profissão: _____

Dengue anteriormente: Sim (.....) Não () Não tem certeza () Observações: _____

Vacina contra febre amarela: Sim (.....) Não () Quando: _____

Exames:

NS1 - Data: ____/____/____ Resultado: _____

IgM - Data: ____/____/____ Resultado: _____

Data: ____/____/____ Resultado: _____

IgG - Data: ____/____/____ Resultado: _____

Data: ____/____/____ Resultado: _____

Isolamento viral - Data: ____/____/____ Resultado: _____

Dengue primária (.....) Dengue secundária ()

Acompanhamento:

Local de atendimento: _____

Data de início dos sintomas: ____/____/____



	Fase aguda	15° dia	30° dia	60° dia
Data				
Febre				
Cefaleia				
Dor retro-orbital				
Mialgia				
Artralgia				
Anorexia				
Astenia				
Prostração				
Indisposição				
Dor abdominal				
Dispneia				
Parestesias				
Tontura				
Lipotímia				
Prurido				
Coriza				
Tosse				
Exantema				

<u>Petéquias</u>				
Náuseas				
Vômitos				
Diarreia				
Boca amarga				
Queda de cabelo				
Calafrios				
Icterícia				
Letargia				
Agitação				
Hipotensão				
Inquietação				
Irritabilidade				
<u>Gengivorragia</u>				
<u>Epistaxe</u>				
Hematúria				
Melena				
Hematêmese				
<u>Metrorragia</u>				

Acrescentar quanto tempo durou cada manifestação. Acrescentar intensidade dos sintomas: leve (L), médio (M) ou forte (F).

Uso de medicação para dengue: Sim () Não () Posologia: _____

Tempo de uso da medicação: _____

Observações: _____

APÊNDICE 2



Núcleo de Genética Humana e
Molecular - NGHM-UFES



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Indivíduos saudáveis)

I – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

Título do projeto: *“Caracterização populacional quanto a polimorfismos em genes do sistema imunológico e relação entre persistência de sintomas clínicos da dengue e características genéticas relacionadas ao sistema imunológico humano”*

Pesquisadores responsáveis:

Íuri Drumond Louro, professor doutor da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), CCHN, Dept de Biologia - UFES.

Raquel Spinassé Dettogni, estudante de doutorado da UFES, Núcleo de Biotecnologia, Programa de pós-graduação em Biotecnologia do Núcleo de pós-graduação da RENORBIO.

Descrição da pesquisa:

A dengue é uma infecção viral, transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* e endêmica em países tropicais e subtropicais. Estudos mostram que os sintomas clínicos, que podem aparecer durante a infecção pelo vírus da dengue, podem persistir nos pacientes após a fase aguda da doença. Acredita-se que a presença de sintomas clínicos da dengue durante a infecção e a persistência dos mesmos esteja relacionada ao sistema imunológico do paciente.

Objetivos:

O estudo irá analisar a relação dos sintomas presentes durante a infecção e dos sintomas persistentes na fase de convalescença com variantes genéticas de moléculas relacionadas ao sistema imunológico dos indivíduos. A sua participação no projeto será doar 5ml ou 3-5 gotas de seu sangue e autorizar a utilização desse para as análises dessa pesquisa.

Riscos e Benefícios esperados:

O único desconforto possível é proporcionado pela picada da agulha em seu braço. O risco mínimo, neste caso, se refere à possibilidade de um pequeno hematoma (roxo ou vermelhidão) no local da coleta de sangue além da possibilidade de dor mínima na região do procedimento. Todo material utilizado é descartável e a coleta será feita por um profissional capacitado, dessa forma, não haverá risco à sua saúde.

Esta pesquisa não trará benefícios diretos a você.

II - ESCLARECIMENTOS DADOS PELOS PESQUISADORES SOBRE GARANTIAS DO PARTICIPANTE DA PESQUISA:

1. O exame não terá custo algum e sua privacidade será mantida, seu nome e os resultados não serão fornecidos a nenhuma outra pessoa, a não ser a você ou a algum responsável.
2. Só terão acesso aos seus dados, os pesquisadores responsáveis pela execução das análises. Nenhuma empresa pública ou privada, como instituições de ensino e empresas seguradoras terão acesso às informações genéticas obtidas, resultando em sua total privacidade.
3. Você tem plena liberdade de não autorizar a coleta do seu sangue para ser usado nessa pesquisa e isso não lhe trará nenhum prejuízo. Portanto, o uso do material sanguíneo para essa pesquisa só será feito após você ler e entender as informações contidas nesse termo de consentimento.
4. Você terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo.
5. Todo e qualquer tipo de identificação, como o número de registro que cada participante receberá, será retirado das amostras durante o descarte para evitar qualquer identificação e desvio de informação genética.
6. Em caso de qualquer dúvida, esta poderá ser esclarecida pelos pesquisadores responsáveis pela execução do projeto.

III. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO:

Referências: Iúri Drumond Louro e Raquel Spinassé Dettogni

Endereço: Núcleo de Genética Humana e Molecular

Departamento de Biologia / CCHN – UFES

Av. Marechal Campos, 1468

Cep: 29040090 Vitória-ES

Telefone: (027) 3335-7253 / 3335-7255/ (027) 9848-4190

IV - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO VOLUNTÁRIO:

.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F

DATA NASCIMENTO:/...../..... IDADE:.....
 ENDEREÇO:.....
 Nº.....Complemento BAIRRO:.....
 CIDADE:.....ESTADO:.....
 CEP:.....TELEFONE:(.....).
 E-MAIL:

2.RESPONSÁVEL LEGAL (SE NECESSÁRIO)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO:/...../..... IDADE:.....
 ENDEREÇO:.....
 Nº.....Complemento BAIRRO:.....
 CIDADE:.....ESTADO:.....
 CEP:.....TELEFONE:(.....).

Declaro que, após ser esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

- () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

 Local e data

 Assinatura do participante/responsável

 Assinatura do pesquisador responsável
 Iúri Drumond Louro/Raquel Spinassé Dettogni

Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa do pelo telefone 33357211 ou pelo e-mail cep@ccs.ufes.br ou cep.ufes@hotmail.com

APÊNDICE 3



Núcleo de Genética Humana e
Molecular - NGHM-UFES



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Indivíduos que desenvolveram dengue sintomática)

I – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

Título do projeto: *“Caracterização populacional quanto a polimorfismos em genes do sistema imunológico e relação entre persistência de sintomas clínicos da dengue e características genéticas relacionadas ao sistema imunológico humano”*

Pesquisadores responsáveis:

Iúri Drumond Louro, professor doutor da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), CCHN, Dept de Biologia - UFES.

Raquel Spinassé Dettogni, estudante de doutorado da UFES, Núcleo de Biotecnologia, Programa de pós-graduação em Biotecnologia do Núcleo de pós-graduação da RENORBIO.

Descrição da pesquisa:

A dengue é uma infecção viral, transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* e endêmica em países tropicais e subtropicais. Estudos mostram que os sintomas clínicos, que podem aparecer durante a infecção pelo vírus da dengue, podem persistir nos pacientes após a fase aguda da doença. Acredita-se que a presença de sintomas clínicos da dengue durante a infecção e a persistência dos mesmos esteja relacionada ao sistema imunológico do paciente.

Objetivos:

O estudo irá analisar a relação dos sintomas presentes durante a infecção e dos sintomas persistentes na fase de convalescença com variantes genéticas de moléculas relacionadas ao sistema imunológico dos indivíduos. A sua participação no projeto será doar 5ml de seu sangue e autorizar a utilização desse para as análises dessa pesquisa.

Riscos e Benefícios esperados:

O único desconforto possível é proporcionado pela picada da agulha em seu braço. O risco mínimo, neste caso, se refere à possibilidade de um pequeno hematoma (roxo ou vermelhidão) no local da coleta de sangue além da possibilidade de dor mínima na região do procedimento. Todo material utilizado é descartável e a coleta será feita por um profissional capacitado, dessa forma, não haverá risco à sua saúde.

Esta pesquisa não trará benefícios diretos a você.

II - ESCLARECIMENTOS DADOS PELOS PESQUISADORES SOBRE GARANTIAS DO PARTICIPANTE DA PESQUISA:

1. O exame não terá custo algum e sua privacidade será mantida, seu nome e os resultados não serão fornecidos a nenhuma outra pessoa, a não ser a você ou a algum responsável.
2. Só terão acesso aos seus dados, os pesquisadores responsáveis pela execução das análises. Nenhuma empresa pública ou privada, como instituições de ensino e empresas seguradoras terão acesso às informações genéticas obtidas, resultando em sua total privacidade.
3. Você tem plena liberdade de não autorizar a coleta do seu sangue para ser usado nessa pesquisa e isso não lhe trará nenhum prejuízo. Portanto, o uso do material sanguíneo para essa pesquisa só será feito após você ler e entender as informações contidas nesse termo de consentimento.
4. Você terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo.
5. Todo e qualquer tipo de identificação, como o número de registro que cada participante receberá, será retirado das amostras durante o descarte para evitar qualquer identificação e desvio de informação genética.
6. Em caso de qualquer dúvida, esta poderá ser esclarecida pelos pesquisadores responsáveis pela execução do projeto.

III. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO:

Referências: Iúri Drumond Louro e Raquel Spinassé Dettogni

Endereço: Núcleo de Genética Humana e Molecular

Departamento de Biologia / CCHN – UFES

Av. Marechal Campos, 1468

Cep: 29040090 Vitória-ES

Telefone: (027) 3335-7253 / 3335-7255/ (027) 9848-4190

IV - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO VOLUNTÁRIO:

.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F

DATA NASCIMENTO:/...../..... IDADE:.....
 ENDEREÇO:.....
 Nº.....Complemento BAIRRO:.....
 CIDADE:.....ESTADO:.....
 CEP:.....TELEFONE:(.....).
 E-MAIL:

2.RESPONSÁVEL LEGAL (SE NECESSÁRIO)

.....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO.:/...../..... IDADE:.....
 ENDEREÇO:.....
 Nº.....Complemento BAIRRO:.....
 CIDADE:.....ESTADO:.....
 CEP:.....TELEFONE:(.....).

Declaro que, após ser esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

- () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

 Local e data

 Assinatura do participante/responsável

 Assinatura do pesquisador responsável
 Íluri Drumond Louro/Raquel Spinassé Dettogni

Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa do pelo telefone 33357211 ou pelo e-mail cep@ccs.ufes.br ou cep.ufes@hotmail.com