

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

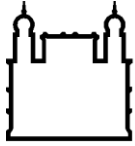
Doutorado em Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular

**INFLUÊNCIA GENÉTICA DURANTE A INFECÇÃO POR
DENGUE: POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA ASSOCIADOS À DENGUE GRAVE
E SEUS EFEITOS FUNCIONAIS.**

CAROLINE XAVIER DE CARVALHO

Rio de Janeiro

Janeiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Caroline Xavier de Carvalho

Influência genética durante a infecção por dengue: Polimorfismos de base única associados a dengue grave e seus efeitos funcionais.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Orientador (es): Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2017

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C331 Carvalho, Caroline Xavier de

Influência genética durante a infecção por dengue: polimorfismos de base única associados à dengue grave e seus efeitos funcionais / Caroline Xavier de Carvalho. – Rio de Janeiro, 2017.
xviii, 139 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.
Bibliografia: f. 68-81

1. Dengue. 2. CLEC5A. 3. DCSIGN. 4. SNPs. 5. Caso controle. 6. Dengue grave. 7. Polimorfismos genéticos. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: CAROLINE XAVIER DE CARVALHO

INFLUÊNCIA GENÉTICA DURANTE A INFECÇÃO POR DENGUE: POMIMORFISMOS DE BASE ÚNICA ASSOCIADOS À DENGUE GRAVE E SEUS EFEITOS FUNCIONAIS.

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

em colaboração com Dr^a Claire Fernandes Kubelka

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Thiago Moreno Souza (IOC) - **Presidente**

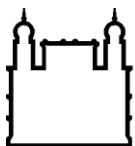
Prof. Dr^a. Verônica Marques Zembrzuski (IOC)

Prof. Dr^a. Cynthia Chester Cardoso (UFRJ)

Prof. Dr. Adalberto Rezende Santos (IOC)

Prof. Dr^a Luciana de Barros Arruda (UFRJ)

Rio de Janeiro, 31 de janeiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

*Dedico esta tese aos meus pais,
por toda ajuda e por serem as únicas pessoas essenciais para que eu chegasse até aqui,
com a oportunidade de estudar por tantos anos.*

Agradecimentos

Todas as bolsas que tive durante a vida acadêmica foram conseguidas através da minha aprovação e classificação nos processos seletivos, resultado do meu trabalho, estudo e dedicação. Dessa forma agradeço a Pós graduação em Biologia Celular e Molecular e ao Instituto Oswaldo Cruz e a CAPES pelo financiamento das bolsas e auxílios para participação em congressos.

A todos os queridíssimos colegas do pavilhão da Hanseníase pela companhia durante esses anos, pelos momentos de amizade, alegria, descontração, lanchinhos, Lamicel noturno e etc. Especialmente ao André, Fabricio, Chyntia, Jéssica, Roberta e João pela compreensão e por terem ouvido meus problemas tantas vezes.

Aos queridos colegas do laboratório de Imunologia viral (LIV) pela companhia e amizade: Márcio, Cintia Mello, Jéssica, Cintia Marinho, Iury, Mariana, Luciana e Nieli. Novamente a Luciana, Nieli e Mariana também por toda ajuda e dicas com os experimentos.

A Fernanda Kehdy pela ajuda com as análises genéticas, pela companhia, conversas, ajuda e principalmente junto com a Brunna por sempre me tratarem bem.

A Paula, pela ajuda, pelos conselhos e pela tentativa de colaboração com os experimentos de micro RNAs que embora muito interessantes não conseguimos dar prosseguimento.

Ao Thiago pelas conversas e amizade e companhia ao longo desses 7 anos e junto com Leonardo também pela companhia, pela ajuda e discussões de técnicas, experimentos e resultados.

Aos demais colegas do laboratório pela companhia e ajuda: Priscila Ellen, Mayara, Rychelle, Thyaguinho.

Ao Dr Milton Moraes pela ajuda com as análises, com a correção da tese e dos artigos e gastos financeiros com os experimentos.

A Dr^a Claire Kubelka pela suporte com experimentos de citometria e por todas as colaborações que permitiram a execução do trabalho.

A Dr^a Patrícia Moura e seus alunos pela colaboração com o caso controle de Recife.

A Dr^a Cynthia Chester pela cuidadosa revisão da tese e aos membros da banca que aceitaram meu convite.

Aos Drs. Marcelo Ribeiro e Antonio Pacheco pela ajuda com análises estatísticas.

Aos médicos Drs Rivaldo Venâncio, Luiz Paulo e Patrícia Brasil pela colaboração e coleta de amostras de pacientes.

A toda equipe do prédio do laboratório de Hanseníase: Cris, Augusto, Andrea, Seu Salles e Ana do LIV e todos os outros, sempre muito solícitos com questões administrativas, burocráticas e técnicas.

A todos os voluntários, sejam aqueles do ambiente de trabalho ou os pacientes, que doaram o sangue para realização dos estudos aqui apresentados.

Meus mais sinceros agradecimentos a todos que me ajudaram, além daquilo que se faz por obrigação profissional.

“O covarde nunca começa, o fracassado nunca termina e o vencedor nunca desiste”

Norman Vincent Peale

“E aqueles que foram vistos dançando foram julgados insanos por aqueles que não podiam ouvir a música”

Friedrich Nietzsche

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

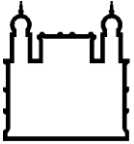
INFLUÊNCIA GENÉTICA DURANTE A INFECÇÃO POR DENGUE: POMIMORFISMOS DE BASE ÚNICA ASSOCIADOS À DENGUE GRAVE E SEUS EFEITOS FUNCIONAIS

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO/TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Caroline Xavier de Carvalho

De acordo com a organização Mundial da Saúde (OMS) a dengue é um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e outras regiões tropicais ao redor do mundo. Podendo ser transmitida por quatro diferentes sorotipos virais, a dengue pode se manifestar de forma assintomática, branda ou através de formas graves. Por ser uma doença multifatorial, diferenças genéticas entre os pacientes podem ser um dos principais fatores que contribuem para a gravidade da doença. O objetivo deste trabalho foi estudar essas diferenças utilizando metodologias epidemiológicas e análises funcionais usando a abordagem de genes candidatos. Dentre os SNPs estudados, o rs1285933 no gene *CLEC5A* foi associado ao risco de dengue grave em duas independentes populações de estudo provenientes das cidades do Rio de Janeiro e Recife (OR=2,25: p=0,03 e OR =2.64; p=0,01, respectivamente). Além disso, o SNP rs4804803 no gene do receptor *DC-SIGN* também foi associado ao desfecho de dengue em ambas as populações (OR=0,12 :p=0,04 e OR=2,01:p=0,04). Devido ao resultado genético encontrado, nós buscamos estudar a participação do gene *CLEC5A* na infecção por dengue e o efeito do SNP rs1285933 (C/T) na sua expressão. Nós encontramos o receptor *CLEC5A* mais expresso na superfície de monócitos infectados por dengue comparado aos monócitos não infectados (p<0,05) e correlacionado à produção de TNF nos sobrenadantes após 48 horas de infecção (Spearman=0,72; p=0,03). Monócitos de indivíduos TT para o SNP rs1285933 apresentaram uma menor expressão de *CLEC5A* em sua superfície comparado aos indivíduos CC (p<0,05) e não foram correlacionados com a produção de TNF. Em amostras de pacientes com dengue branda infectados com DENV4, a expressão RNA mensageiro de *CLEC5A* também foi correlacionada com a expressão de TNF (Spearman=0,65; p=0,0001) e vários outros mediadores. Devido aos resultados controversos para o SNP rs4804803 no gene *DC-SIGN*, nós realizamos uma meta-análise com subsequente atualização a fim de obter uma OR consenso. Os resultados mostraram que o SNP não está associado ao desfecho da dengue quando todos os estudos são combinados (OR_{alelo} = 1.36; p = 0.13; OR_{genotipo} = 0.58; p = 0.19; OR_{carreador} = 1.51; p = 0.06). Entretanto, a OR consenso para estudos asiáticos mostrou uma associação de risco (OR_{carreadores} = 2.50; p = 0.02) indicando que diferenças étnicas entre essas populações podem ser responsáveis pelas discrepâncias observadas. Os resultados encontrados confirmam a importância dos genes *CLEC5A* e *DC-SIGN* na imunopatogênese da dengue assim como o envolvimento do SNP rs1285933 nas vias de sinalização desencadeadas após a interação do vírus da dengue com o receptor *CLEC5A*. Outra abordagem que utilizamos foi estudar o perfil de expressão gênica em pacientes com dengue e outras infecções febris (OIF) dentre elas chikungunya, a fim de encontrar biomarcadores precoces de gravidade. Genes como *ALOX5AP*, *SOD2*, *IL23* e *BCL2* se destacaram como marcadores e sugerem um papel importante dessas vias na imunopatogênese diferencial de arbovirose. Tais genes podem servir como ponto de partida para estudos funcionais mais específicos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

HOST GENETICS DURING DENGUE INFECTION: SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS ASSOCIATED TO SEVERE DENGUE AND ITS FUNCTIONAL EFFECTS

ABSTRACT

PHD THESIS IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

Caroline Xavier de Carvalho

According to World Health Organization (WHO) dengue is one of the most important disease in Brazil and other tropical areas around the world. Dengue can be transmitted for four different serotypes and can be present as asymptomatic, mild and severe dengue. Dengue is a multifactorial disease and genetic differences among the patients are an important factor for severity. Thus, the aim of this work was to study these differences using epidemiology methodologies and functional analysis using candidate genes approach. Among the studied SNPs, rs1285933 located in *CLEC5A* was associated to severe dengue in two independent populations from city of Rio de Janeiro and Recife (OR=2,25: p=0,03 e OR =2.64; p value=0,01, respectively). Additionally, the SNP rs4804803 located in *DCSIGN* gene was also associated with dengue outcome in both populations (OR=0,12 :p=0,04 e OR=2,01:p=0,04, respectively). Due to genetic results found, we studied the participation of *CLEC5A* during dengue infection and the effects of the SNP rs1285933 (C/T) in its expression. We observed *CLEC5A* more expressed in surface of monocytes infected with dengue virus than monocytes uninfected ($p < 0.05$) and this expression was correlated with TNF production on the supernatants after 48h of infection (Spearman=0.72; $p = 0.03$). Also, monocytes from individuals TT for SNP rs1285933 showed a lower *CLEC5A* expression than CC ($p < 0.05$), but were not correlated with TNF production. In blood samples from mild dengue patients infected with DENV4, RNA expression for *CLEC5A* was also correlated with TNF (Spearman=0.65; $p = 0.0001$) and other mediators. Due to controversial results for SNP rs4804803 at *DC-SIGN* gene, we performed a meta-analysis in order to obtain the updated consensus OR. The results showed that SNP is not associated with dengue outcome (OR_{allele} = 1.36; $p = 0.13$; OR_{genotype} = 0.58; $p = 0.19$; OR_{carrier} = 1.51; $p = 0.06$) when all populations were combined. However, the consensus OR for Asian studies showed this SNP associated with severity (OR_{carrier} = 2.50; $p = 0.02$). These results suggests that ethnic differences among populations studied can be responsible for observed discrepancies. The results found here reinforce the importance of *CLEC5A* and *DCSIGN* during dengue immunopathogenesis and the involvement of rs1285933 SNP in signaling pathways after interaction between dengue virus and *CLEC5A* receptor. Other approach that we used was to study gene expression profile in dengue and other febrile infection patients (OFI) in order to find early biomarkers for severity. *ALOX5AP*, *SOD2*, *IL23* e *BCL2* genes has highlighted as biomarkers and suggest an important role of these pathways in immunopathogenesis of arboviruses. These genes can be used as starting point for more specific functional studies.

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XII
APRESENTAÇÃO À ESTRUTURA DA TESE	1
CAPÍTULO 1	2
I-INTRODUÇÃO	2
1- HISTÓRICO EPIDEMIOLÓGICO DA DENGUE NO BRASIL E NO MUNDO	2
2- CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA DENGUE	4
3- TRANSMISSÃO E EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE.....	7
4- DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PREVENÇÃO	9
5- O VÍRUS, INFECÇÃO E INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO HUMANO	10
6- RESPOSTA IMUNE ASSOCIADA À PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE.....	15
7- MARCADORES DE GRAVIDADE.....	17
8- CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DO PACIENTE ASSOCIADAS À GRAVIDADE NA DENGUE	20
II- JUSTIFICATIVA	24
III- OBJETIVOS	25
1- OBJETIVO GERAL.....	25
2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
IV- DESENHO DE ESTUDO	26
CAPÍTULO 2	27
ESTUDO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA EM GENES CANDIDATOS DA RESPOSTA IMUNE E GRAVIDADE À DENGUE.	27
CAPÍTULO 3	28
CASO CONTROLE GENÉTICO E ESTUDO FUNCIONAL DO SNP RS1285933 NO GENE <i>CLEC5A</i> NA INFECÇÃO POR DENGUE	28
CAPÍTULO 4	29
-336 SNP NO GENE DCSIGN E SUA ASSOCIAÇÃO COM O DESFECHO DA DENGUE	29

CAPÍTULO 5	31
ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM DENGUE E OUTRAS INFECÇÕES FEBRIS	31
I- METODOLOGIA	33
1- AMOSTRAS UTILIZADAS.....	33
2- GENES SELECIONADOS	33
3- EXTRAÇÃO DE RNA	34
4- QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DE RNA E SÍNTESE DE cDNA	34
5- PCR MULTIPLEX.....	35
6- ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
II- RESULTADOS.....	36
1- CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES.....	36
2- ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM PACIENTES COM DENGUE, CHIKUNGUNYA E OUTRAS INFECÇÕES FEBRIS	37
CAPÍTULO 6	49
I- DISCUSSÃO	49
II- CONCLUSÕES	66
III- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO 1	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Classificação da dengue com base nos critérios da OMS (2009).....	5
Figura 2- Fases clínicas da dengue	7
Figura 3- Casos prováveis e taxa de incidência de dengue no Brasil nos anos de 2014, 2015 e 2016.	7
Figura 4 - Casos prováveis de dengue nas diferentes regiões do Brasil.....	8
Figura 5- Número de casos graves de dengue nas diferentes regiões do Brasil	9
Figura 6- genes diferencialmente expressos entre os grupos dengue com sinais de alerta (DVCA) e outras infecções febris (OIF) 2013.....	38
Figura 7- genes diferencialmente expressos entre os grupos dengue com sinais de alerta (DVCA) e outras infecções febris (OIF) 2016.....	38
Figura 8- genes diferencialmente expressos entre os grupos chikungunya (CHIK), dengue com sinais de alerta (DVCA) e OIF 2016.....	40
Figura 9 - Genes não diferencialmente expressos entre os grupos dengue Chikungunya e outras OIF	48
Figura 10 Modelo proposto para cascata de sinalização após ativação de DAP12.	56
Figura 11 Possíveis bins para SNPs no gene DC-SIGN em africanos.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estudos de associação do tipo caso controle para dengue.....	22
Tabela 2- Caracterização dos pacientes.....	37
Tabela 3 Genes diferencialmente expressos entre os grupos analisados. As informações foram coletadas no banco de dados Gene do NCBI	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DENV1,2,3 e 4: vírus da dengue

ZIKV: Zika vírus

CHIKV: chikungunya vírus

FHD: Febre hemorrágica da dengue

ORF: fase aberta de leitura, “open reading frame”

C: capsídeo

E: envelope

prM: proteína precursora de membrana

NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5: proteínas não estruturais

RNA: ácido ribonucleico

DCSIGN/ CD209: receptor de células dendríticas, “dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin”.

HSP70: heparan sulfato, receptor de manose, proteínas de choque térmico

CD14: receptor de monócitos, “cluster of differentiation 14”

Fcγ: receptores para imunoglobulinas G

RE: retículo endoplasmático

DC: células dendríticas

FD: febre diferenciada

SCD: síndrome do choque da dengue

OMS: organização mundial da saúde

WHO/TDR: World health organization/ tropical research disease

ADE: aumento de infecção dependente de anticorpos. “antibody dependent enhancement”

IgG: imunoglobulinas G

PCR: reação em cadeia da polimerase, “Polymerase Chain Reaction”

RT PCR: real time PCR

IL: interleucina

ICAM-1: molécula de adesão intracelular

VCAM-: molécula de adesão vascular

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

LBP: proteína ligadora de LPS

AST: aspartato transaminase

ALT: Alanina Aminotransferase
GZMA: granzima
IFTIM2: proteína induzida por interferon
NK: “natural killer”
PSME: proteassomo
CCL2, 4 e 5: CC chemokine ligand 4
THP1: linhagem monocítica humana
IFN: Interferon
TNF: fator de necrose tumoral
MHC: complexo principal de histocompatibilidade, “major histocompatibility complex”
CTL: linfócitos citotóxicos
MIP1 β : proteína inflamatória de macrófagos, “macrophage inflammatory proteins”
DNA: ácido desoxirribonucleico
PDCD4: proteína de morte celular, “Programmed cell death protein 4”
PBMCs: células mononucleares periféricas, “peripheral blood mononuclear cell”
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IP-10: inducible protein
PAF: fator de agregação plaquetária
TGF- β 1: “Transforming growth factor beta 1”
MIF: fator inibitório de macrófagos
CLEC5A: c-type lectin domain family 5 member A
TLR: receptores tipo *toll*
TREM: receptores extracelulares tipo lectina C, “triggering receptors expressed on myeloid cells”
MDL-1- myeloid DAP12 associating lectin
DAP-12: DNAX-activating protein of 12 kDa
NLRP3: proteína componente do inflamossomo, “NLR family pyrin domain containing 3”
RIG-1: retinoic acid-inducible gene 1
MDA-5: Melanoma Differentiation-Associated protein 5
SNPs: polimorfismos de base única, “single nucleotide polymorphisms”
HLA: antígeno leucocitário humano, do inglês “human leukocyte antigen”
GWAS: estudo de associação em todo o genoma inglês, *genome wide association study*
NKG2D: receptor presente em células NK e T
MIC A e B: MHC class I-related genes A/B
PLCE-1: phospholipase C, epsilon 1

APRESENTAÇÃO À ESTRUTURA DA TESE

Esta tese esta apresentada em formato de artigo e dividida em capítulos. O primeiro capítulo é referente à introdução, justificativa, objetivos e desenho de estudo. O Artigo apresentado no capitulo 2 foi publicado em 2013 com resultados obtidos em parte durante minha dissertação de mestrado (2012). Entretanto, as análises finais e a estruturação final do artigo foram realizadas durante meu doutorado, o que nos motivou a incluí-lo aqui como um capítulo. Além disso, esse artigo gerou os questionamentos que motivaram as investigações e geraram os resultados apresentados nos demais artigos (capítulos 3 e 4).

O capítulo 5 contém um estudo de análise de expressão gênica em dengue e outras doenças infecciosas e por fim o capítulo 6 é formado por discussão, conclusões e referências bibliográficas.

CAPÍTULO 1

I-INTRODUÇÃO

1- HISTÓRICO EPIDEMIOLÓGICO DA DENGUE NO BRASIL E NO MUNDO

As primeiras ocorrências bem documentadas sobre a dengue remetem as de Filadélfia em 1778 e Egito em 1779. Entretanto, os primeiros relatos de doenças com sintomas similares aos da dengue foram encontrados em uma enciclopédia durante a Dinastia Chinesa (265-420). Nessa época os chineses se referiam a doença como veneno da água, pois acreditavam que a transmissão envolvia insetos voadores associados à água (revisado por Gubler 1998). Em 1801 em Madrid, a ocorrência de uma síndrome com sintomas similares aos observados na Filadélfia recebeu o nome de dengue para descrever o estado melancólico dos pacientes (Barreto and Teixeira 2008). No período entre o final do século XVIII até o início do século XX ocorreram vários surtos isolados de dengue nas Américas, África, Ásia, Europa e Austrália. Durante esse período os surtos da doença pareciam ser mais restritos geograficamente, provavelmente devido à lentidão dos meios de transportes da época (Gubler,1997).

A transmissão pelo mosquito *Aedes aegypti* foi descrita pela primeira vez em Bancroft, em 1906 e o vírus da dengue foi isolado em 1943. Nesse mesmo ano os sorotipos 1 e 2 foram isolados em camundongos e posteriormente, em 1950, os sorotipos 3 e 4 foram também isolados (Barreto and Teixeira 2008; Santos et al., 1964)

Após a segunda guerra mundial, o grande movimento das tropas e a maior circulação de pessoas de um modo geral propiciou uma maior disseminação dos diferentes sorotipos favorecendo o aparecimento de infecções mais graves (Gubler 1998; Howe 1977). Em 1953 nas Filipinas, e, em 1958, em Bangkok ocorreram os primeiros surtos de dengue hemorrágica. A partir de então casos de febre hemorrágica passaram a ser frequentes no sudeste asiático e

nas décadas de 80 e 90 a doença se expandiu para regiões como Índia e leste da China aumentando consideravelmente o número de epidemias e a circulação de diferentes sorotipos do vírus da dengue resultando na maior frequência de casos graves da doença (revisado por Martinez-Torres 1990).

Casos de dengue já haviam sido relatados nas Américas ainda no século XIX, até as primeiras décadas do século XX. A partir de então, observou-se uma redução do número de casos da doença devido a medidas de controle contra o *Aedes aegypti*. No entanto, em 1963 os sorotipos DENV1 e DENV2 reemergiram em alguns países da América, mas foi a partir da década de 80 que se observou um crescente número de casos da doença (Barreto and Teixeira 2008; Who 2009).

Ainda nas Américas, o primeiro caso de dengue hemorrágica foi documentado em Porto Rico em 1975, e em 1981 ocorreu uma grande epidemia em Cuba com muitos casos de dengue hemorrágica e muitas mortes (Rigau-Pérez 2016). A maior concentração de casos de dengue na América do Sul está na região que compreende a Argentina, Brasil, Paraguai, Uruguai e Chile. No entanto, quase a totalidade dos casos é registrada no Brasil (Who 2009).

No Brasil, embora existam relatos de epidemias entre os anos de 1845 e 1853 nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro, as primeiras citações científicas referentes a casos de dengue datam de 1916 e 1923 nas cidades de São Paulo e Niterói, respectivamente (Meira, 1916; Pedro, 1923). Devido a medidas de controle do *Aedes aegypti* com a intenção de erradicar a febre amarela urbana no Brasil a dengue se manteve ausente até 1981 com a reintrodução dos sorotipos DENV-1 e DENV-4, em Boa Vista (RO). Porém, essa epidemia não se expandiu para outras regiões ficando restrita ao estado de Roraima (Barreto and Teixeira 2008; Rita Maria Ribeiro Nogueira et al. 2005). Em 1986, o sorotipo DENV-1 foi reintroduzido no Rio de Janeiro provocando uma epidemia de febre da dengue clássica. A partir desse momento a dengue se tornou um problema de saúde pública no Brasil se disseminando rapidamente para vários outros estados. Em 1990, houve reintrodução do

DENV-2 e os anos subsequentes foram marcados por epidemias de dengue clássica causadas pelos sorotipos 1 e 2 até a reintrodução do DENV-3 em 2000. (Barreto and Teixeira 2008; Rita Maria Ribeiro Nogueira et al. 2005).

Em 2002, o país foi atingido por uma das maiores epidemias, causada pelo DENV-3. Este sorotipo se tornou predominante até 2006, momento em que DENV- 2 passou a ser o responsável pelo maior número de casos, causando entre 2007 e 2008 uma epidemia com perfil diferente das anteriores, com o predomínio de casos graves de dengue principalmente entre crianças e adolescentes (Fares et al. 2015; Montoya et al. 2012).

Em 2010, o sorotipo 4 do vírus da dengue (DENV4) reemergiu no estado de Roraima, sendo confirmados pouco menos de 20 casos de dengue por este sorotipo. No mesmo ano, o vírus se espalhou para outros estados do norte e nordeste, chegando em 2011 aos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (Rita Maria R Nogueira et al. 2001; Temporão et al. 2011).

2- CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA DENGUE

A dengue é uma doença infecciosa com espectro clínico muito amplo. Após a infecção alguns indivíduos permanecem assintomáticos. No entanto, a maioria desenvolve uma infecção febril aguda com sintomas típicos da dengue, sendo que uma minoria pode desenvolver formas muito graves da infecção que, se não tratada correta e rapidamente, pode levar o paciente a morte. Por ser uma doença com evolução clínica e desfecho imprevisível não é possível definir logo no início da infecção se o paciente poderá evoluir para a forma mais grave.

Segundo a antiga classificação, que ainda é amplamente utilizada, a infecção por dengue pode ser assintomática podendo levar a uma Febre indiferenciada (FD) ou ser caracterizada pela Febre hemorrágica de Dengue (FHD) podendo esta última ser subdividida nos graus I, II, III e IV. O grau I é caracterizado por teste de torniquete positivo, grau II por

sangramento espontâneo, e os graus III e IV caracterizados pela síndrome do choque da dengue (SCD) (Who 2009).

Devido à grande dificuldade para aplicar a classificação “FD/FHD/SCD” e consequentemente um adequado manejo e tratamento dos pacientes, fez com que a OMS criasse uma nova classificação para os casos de dengue de acordo com os níveis de gravidade da doença. Por exemplo, casos de dengue com comprometimentos de órgãos como coração (miocardite), sistema nervoso central (encefalite) e fígado (hepatites) ficavam fora dos critérios para dengue grave de acordo com a classificação de 1997. Além disso, um estudo da OMS, DENCO (Dengue Control) concluiu que 18 -40% dos pacientes não se encaixavam adequadamente nesses critérios e 15% dos casos de choque não se enquadravam nos critérios de DHF/SCD (Martínez Torres, 2008)

De acordo com a atual classificação, os pacientes foram divididos em dois grandes grupos: dengue não grave e dengue grave. Sendo o primeiro grupo (dengue não grave) ainda subdividido em dengue com ou sem sinais de alerta e onde ambos os grupos podem evoluir para a forma grave (Figura 1)

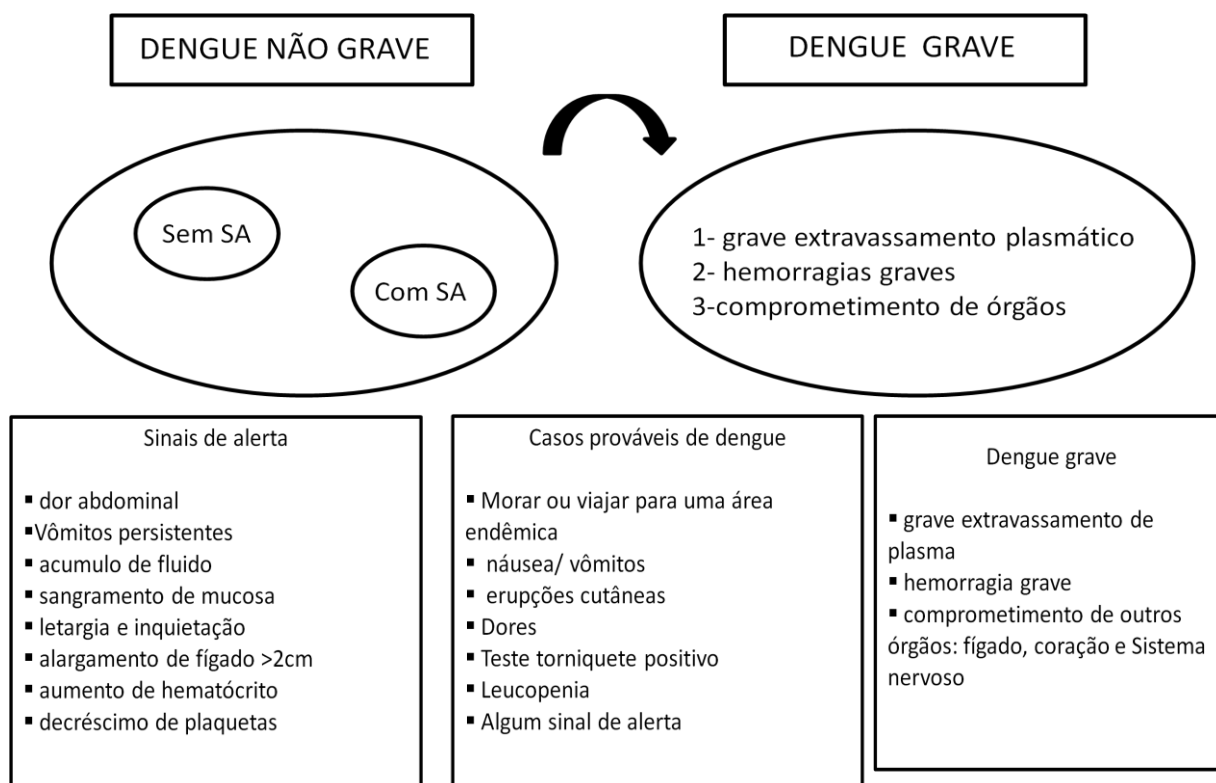


Figura 1-Classificação da dengue com base nos critérios da OMS (2009)

Depois da infecção, o vírus pode permanecer incubado no hospedeiro humano em média de 4 a 7 dias. Após o período de incubação, a doença tem início e passa por três etapas: fase febril, fase crítica e fase de recuperação (Figura 2).

A fase febril possui variável duração e está associada à presença do vírus no sangue (viremia). Esta fase pode durar de 2 a 7 dias e geralmente é acompanhada por outros sintomas típicos como vômitos, náuseas, dores no corpo e na cabeça assim como eritemas cutâneos. Interessantemente, a fase febril é indistinguível entre pacientes com a forma grave e não grave, por isso, é necessária grande atenção aos sinais de alerta que podem caracterizar a transição do paciente para a fase crítica.

Após a fase febril o paciente passa por um período de defervescência onde pode progredir para a cura ou entrar na fase crítica. Nesse caso, as dores abdominais e os vômitos tornam-se mais frequentes podendo-se constatar derrame pleural e ascítico que anunciam a iminência do choque que, por sua vez, é até cinco vezes mais frequente na etapa crítica do que na etapa febril. Ainda durante a etapa crítica também pode ocorrer hepatomegalia, acompanhada pelo aumento de hematócrito e decaimento de plaquetas. Depois, o paciente entra na fase de recuperação, onde o acompanhamento médico também é importante. Nessa fase ocorre eliminação de todo o líquido extravasado e estabilização de todas as funções vitais.

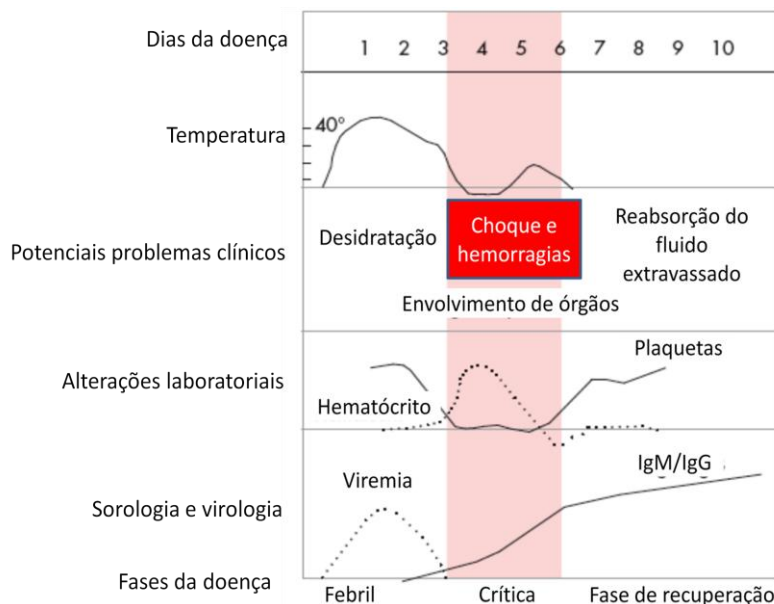


Figura 2- Fases clínicas da dengue

A fase febril apresenta variável duração e está associada a viremia. É nesse período que o paciente apresenta os sintomas típicos da doença e onde pode ser observada a manifestação de algum sinal de alerta. Após a fase febril, o paciente entra num período de defervescência podendo prosseguir para a cura ou entrar na fase crítica, onde se observa aumento do hematócrito e decaimento de plaquetas podendo ocorrer o choque. Após a fase crítica segue-se a fase de recuperação onde ocorre reabsorção fluídica e estabilização do hematócrito e número de plaquetas (adaptado de WHO/TDR 2009).

3- TRANSMISSÃO E EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE

O vírus da dengue é transmitido aos humanos através de mosquitos do gênero *Aedes* principalmente o *Aedes aegypti*. No entanto, outras espécies de mosquitos do mesmo gênero também podem transmitir a doença, como o *Aedes albopictus*. Somente primatas podem ser infectados naturalmente por *Aedes albopictus*, sendo que as linhagens que infectam primatas humanos e não humanos são geneticamente distintas (Rothman 2011; E. Wang et al. 2000).

O *Aedes Aegypti* geralmente se aloja no interior das residências picando preferencialmente durante o dia, com picos de maior atividade entre 2 e 3 horas da madrugada e durante a tarde, antes do anoitecer. Por ser um mosquito bastante ativo, a fêmea do *Aedes Aegypti* interrompe facilmente sua alimentação e, assim, várias pessoas podem se picadas em um curto período de tempo antes da postura dos ovos, que é feita em recipientes contendo água limpa e parada ao redor das residências. Devido a esse comportamento, é bem comum que em uma mesma residência todas as pessoas tenham sido infectadas pelo mesmo mosquito (Gubler 1998; Martínez Torres, 2008).

O mosquito se torna infectado ao alimentar-se de sangue humano durante o período da viremia. No trato intestinal do mosquito o vírus passa por um período de incubação extrínseco que dura cerca de 10-14 dias chegando até a glândula salivar, onde poderá ser transmitido novamente aos humanos juntamente com a picada do vetor (Guzman and Vazquez 2010).

Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, obtidos no período de 2015 e 2016, houve um aumento do número de casos de dengue quando comparado ao ano de 2014 (Figura 3).

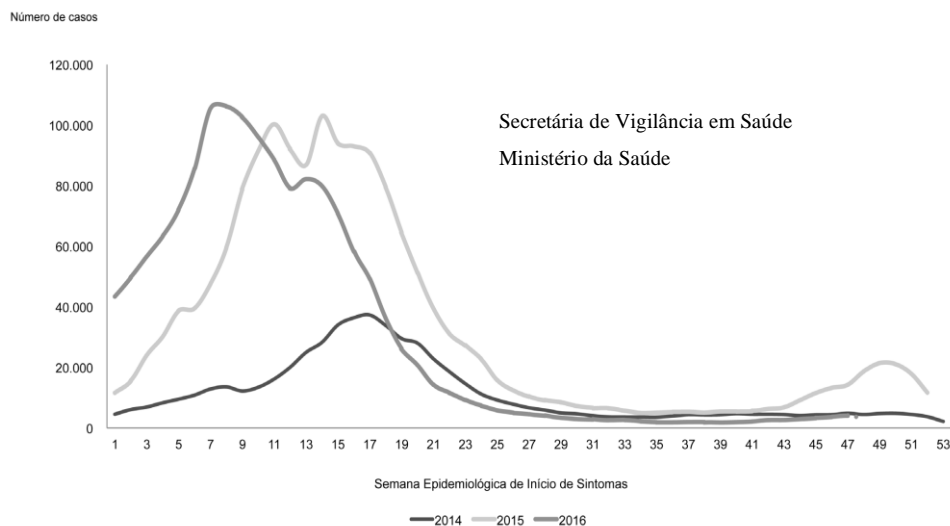
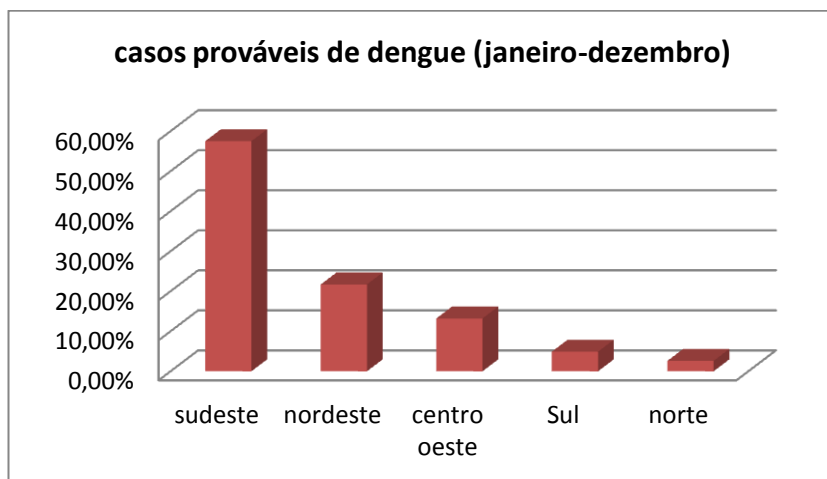


Figura 3-Casos prováveis e taxa de incidência para dengue nos anos de 2014, 2015 e 2016.

Somente no ano de 2016, entre janeiro e dezembro, foram registrados 1.487.924 casos prováveis de dengue. A região sudeste foi responsável pelo maior número de casos, seguida pela região nordeste (Figura 4)



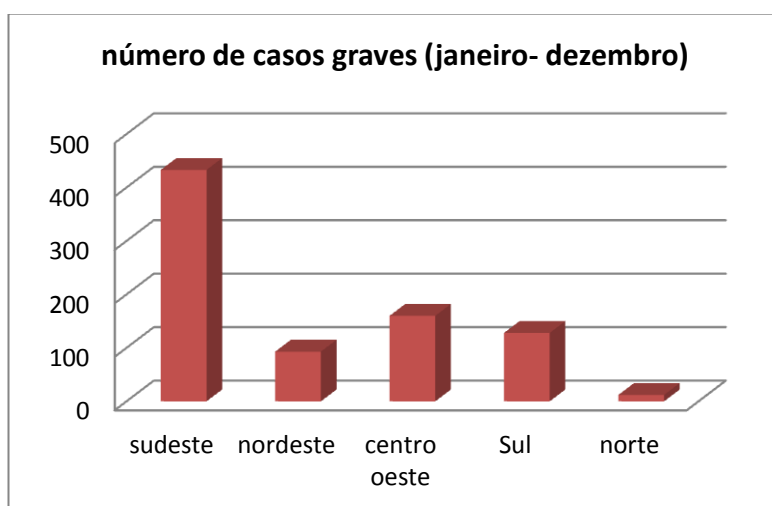
Fonte: Secretária de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde

Figura 4 - Casos prováveis de dengue nas diferentes regiões do Brasil.

Em relação aos casos graves, foram confirmados 826 casos de dengue grave e 8.116 casos com sinais de alarme. A região sudeste registrou o maior número de casos graves de dengue, 433 (Figura 5). Além disso, foram confirmados 609 óbitos por dengue, além desses

outros 621 óbitos ainda estão em investigação, podendo ou não ser descartados (Secretaria de vigilância em saúde. Ministério da Saúde).

Em relação ao sorotipo viral, em 2016, das 9.513 amostras processadas por isolamento, 89,7% foram referentes ao DENV1; 3,5% ao DENV4; 2% ao DENV2 e 0,9% ao DENV3 (Secretaria de vigilância em saúde. Ministério da Saúde).



Fonte: Secretária de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde

Figura 5- Número de casos graves de dengue nas diferentes regiões do Brasil

4- DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PREVENÇÃO

O diagnóstico de dengue pode ser feito por isolamento viral, detecção direta de antígenos virais circulantes (NS1), detecção do RNA viral ou a partir da detecção de imunoglobulinas G (IgG) ou M (IgM) específicas para o vírus da dengue a partir de testes como ELISA. Os métodos de detecção de anticorpos específicos para o dengue apesar de serem amplamente utilizados em todo o mundo apresentam uma problemática, pois os níveis de imunoglobulinas não são detectados na fase aguda da doença. Além disso, anticorpos contra dengue podem reagir de forma cruzada com outros flavivírus (Scott B. Halstead 2007; Martínez Torres, 2008).

Uma boa alternativa seria o uso de RT-PCR, que além de ser uma nova ferramenta para diagnóstico de várias doenças, é amplamente indicada para diagnóstico durante a fase aguda da dengue, além de permitir a identificação e quantificação dos diferentes sorotipos virais em uma única reação de PCR em tempo real (Kong et al. 2006).

Em relação ao tratamento, não existe terapia exclusiva para dengue, como drogas antivirais. No entanto, o acompanhamento médico é importante para detecção de sintomas que possam facilitar a avaliação do prognóstico do paciente. Após o diagnóstico da doença, esta deve ser notificada e dependendo da manifestação clínica o paciente pode recuperar-se em casa. Eventualmente, pode ser necessária a hospitalização do paciente devido à presença de sinais de alerta que indicariam a possibilidade de agravamento. Nesses casos, uma precoce reidratação intravenosa pode resultar na recuperação do paciente. Em casos mais graves de extravasamento plasmático (choque e derrames), graves hemorragias ou comprometimento de outros órgãos é necessário tratamento de emergência (Who 2009).

Em relação a prevenção, nos últimos anos houve um grande avanço no desenvolvimento de uma vacina tetravalente eficiente. As principais abordagens dessas vacinas envolvem o vírus atenuado, vírus quimérico atenuado, vírus inativado e vacina de DNA (Screaton et al. 2015). Porém, no início de 2016 a vacina tetravalente de única dose produzida pelo Instituto Butantan São Paulo – Brasil em colaboração com o *National Institute health* (NIH) nos Estados Unidos foi aprovada e entrou na última fase, que consiste em testá-la em um grupo de voluntários (Ministério da Saúde, 2016).

5- O VÍRUS, INFECÇÃO E INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO HUMANO

O vírus da dengue pertence ao gênero Flavivírus, família *Flaviviridae* e, conforme descrito anteriormente, compreende quatro sorotipos relacionados genética e antígenicamente: DENV-1,-2, -3 e 4. Tais sorotipos exibem cerca de 65-70% de sequências homólogas e

causam manifestações clínicas semelhantes. A infecção com um determinado sorotipo confere proteção duradoura contra este e imunidade temporária e parcial contra os outros sorotipos (Green and Rothman 2006).

Diferenças entre os sorotipos do vírus da dengue e até mesmo diferenças entre cepas de um mesmo sorotipo podem ser responsáveis pelas diferentes manifestações da doença. Vários genótipos e linhagens têm sido identificados para cada sorotipo, mostrando a grande diversidade genética de cada um deles. No Brasil, a variação da virulência dentro de um mesmo sorotipo tem sido alvo de investigação e controvérsia, entretanto todos os sorotipos podem causar formas graves da doença no Brasil incluindo casos de óbito (Heringer et al. 2015).

No Brasil, o genótipo asiático do DENV-2 foi associado a casos graves de dengue comparado a outros genótipos para esse mesmo sorotipo principalmente na epidemia de 2008, quando houve a circulação de uma nova linhagem desse genótipo, a linhagem II. Epidemias anteriores e menos graves também causadas pelo DENV-2, porém pela linhagem I do genótipo asiático (Conrado et al. 2015; Faria et al. 2013; Fried et al. 2010; Watts et al. 1999).

Contrariamente às associações encontradas entre genótipos de um mesmo sorotipo e o desenvolvimento de formas graves de dengue, Fried e cols. (2010) não encontraram associações significativas entre os quatro sorotipos e os índices de FHD na população Asiática. No entanto quando somente os casos de infecção secundária foram analisados foi encontrado um aumento significativo de DENV2 e DENV3 comparado com o sorotipo DENV4 em casos de FHD (Fried et al. 2010).

Em relação à estrutura da partícula viral, esta mede aproximadamente 40 a 50nm de diâmetro e possui um envelope glicoproteico. Todos os flavivirus possuem grupos de epítomos em comum em seus envelopes o que resulta em alta reatividade cruzada em testes sorológicos. Seu material genético é constituído por uma fita simples de RNA positiva com aproximadamente 11kb de comprimento que possui uma fase aberta de leitura (ORF - open

reading frame) que codifica três proteínas estruturais: a proteína do capsídeo (C) e as glicoproteínas precursora de membrana (prM) e do envelope (E); além de sete proteínas não estruturais essenciais para o processo de replicação viral: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. O RNA é viral é empacotado pelo capsídeo que possui formato icosaédrico e o nucleocapsídeo é envolto por uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro formada pelas proteínas E e M (Mukhopadhyay, Kuhn, & Rossmann 2005).

Após a entrada do vírus no corpo humano pela picada do mosquito as primeiras células infectadas são as células de Langerhans, um subtipo de célula dendrítica imatura presente na epiderme (Wu et al. 2000). Além de monócitos, macrófagos (Bobek et al. 2010) que também são células importantes na infecção por dengue, outras células, como as endoteliais, hepatócitos, fibroblastos e linfócitos também podem ser importantes alvos para o vírus da dengue (Avirutnan et al. 2016; Jessie et al. 2004; Y. Lin et al. 2002).

Após interagir com o receptor, o vírus é internalizado em compartimentos endossomais. O pH ácido no interior do endossomo promove mudanças conformacionais na proteína E. Esta sofre uma trimerização irreversível que expõe seu peptídeo de fusão, permitindo a fusão do envelope com a membrana endossomal e liberação do genoma no citoplasma da célula infectada. Este é traduzido em uma única poliproteína, processada por proteases virais e do hospedeiro, formando o complexo de replicação viral na membrana do retículo endoplasmático (RE). Os genomas recém-sintetizados são empacotados pelas proteínas estruturais formando o nucleocapsídeo que é envolto pelo envelope lipídico contendo glicoproteínas de membrana, formando assim as partículas virais. As partículas virais imaturas são transportadas através da rede trans-Golgi, sofrendo glicosilações e clivagens por proteases do hospedeiro. Ao término da via de secreção, as partículas são, então, secretadas como maduras por exocitose. Adicionalmente algumas proteínas NS1 virais recém-sintetizadas e partículas virais imaturas podem escapar ou serem secretadas pela membrana da célula infectada (Mukhopadhyay, Kuhn, & Rossmann 2005; Rothman 2011).

Ainda não se sabe ao certo todos os receptores envolvidos na entrada do vírus nas células alvo. Porém o receptor CD209 ou *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin* (DCSIGN) é um dos principais receptores envolvidos na entrada do vírus em células dendríticas e macrófagos, uma das mais permissivas a infecção por dengue (Tassaneeritthep et al. 2003). O sistema imune é altamente conservado evolutivamente e capaz de reconhecer estruturas comuns a diversos patógenos. Estruturas virais são prontamente reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro. Tal reconhecimento leva a produção de Interferon tipo I e citocinas inflamatórias. Os principais receptores que reconhecem estruturas virais são os do tipo Toll (TLR, do inglês *toll like receptor*) e RIG-1 (do inglês, *retinoic acid-inducible gene1*) e ambos reconhecem componentes comuns como lipoproteínas, ou outras estruturas, no caso dos vírus os ácidos nucleicos (Kawai & Akira 2007). Entretanto, receptores extracelulares, Lectinas tipo C, receptores TREM (do inglês, *triggering receptors expressed on myeloid cells*) também são capazes de se ligar a patógenos e ativar a expressão de genes da resposta imune (Robinson et al. 2006).

CLEC5A (C-type lectin domain family 5 member A) é um receptor de lectina tipo C com importante participação na imunopatogênese da dengue. Embora não esteja relacionado à entrada do vírus na célula, participa de vias de ativação de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-6 e IL-8 (Chen et al. 2008). Também conhecido como MDL-1, CLEC5A é um receptor expresso em monócitos, macrófagos e neutrófilos e possui um domínio extracelular com uma lectina C e um domínio N terminal citoplasmático composto por apenas quatro aminoácidos. CLEC5A interage com o imunoreceptor citoplasmático DAP-12, e essa interação se dá através do resíduo de lisina na região transmembrana de CLEC5A com o resíduo de aspartato na proteína DAP-12. Após ativação de CLEC5A por um ligante, este sofre uma mudança conformacional, ocorrendo fosforilação de DAP-12 por quinases Src e interação com Syk disparando toda uma via de sinalização (Cheung et al. 2011; Watson et al. 2011).

Embora não se saiba exatamente o principal ligante de CLEC5A, experimentos *in vitro* mostraram que a glicoproteína E do envelope estaria envolvida na ligação do vírus a esse receptor e que manoses e mananas funcionam como inibidores a ligação do dengue. O bloqueio de CLEC5A também foi capaz de inibir a produção de outros mediadores, como MIP1 α , IP-10, IL6 e IL8 e adicionalmente foi visto que camundongos infectados e tratados com anticorpos anti CLEC5A tiveram redução de danos em órgãos como fígado, rins, intestinos e baço além da redução da taxa de mortalidade (Chen et al. 2008).

O receptor TREM-1, assim como CLEC5A é também expresso em células mielóides e tem sido associado à produção de citocinas pró inflamatórias durante a infecção por dengue. TREM-1 é considerado um importante regulador da resposta imune (Bouchon et al. 2001; Ruiz-Pacheco et al. 2014). Dentre os receptores *Toll* destacam-se os TLR-4 e TLR-2 que detectam proteínas virais extracelulares, enquanto TLR-7 e TLR-8 funcionam como sensores intracelulares de RNA viral fita simples e TLR-3 que reconhece intermediários da replicação viral intracelulares, como RNAs dupla fita (Kawai & Akira 2007).

Um estudo *in vitro* mostrou que células de carcinoma de pulmão infectadas com dengue e silenciadas para os genes *RIG-1*, *MDA-5* e *TLR-3* tornam-se altamente suscetíveis ao vírus e que TLR-3 atua na produção de IFN tipo I em vias independentes de RIG-1 e MDA-5 (Nasirudeen et al. 2011). Interessantemente, foi visto que os complexos DENV-anticorpos quando se ligam a receptores Fc γ regulam negativamente a expressão de receptores Toll somente em casos graves de dengue (Modhiran, Kalayanarooj, & Ubol 2010). Outro trabalho mais recente mostrou que TLR2 e TLR6 também participam da imunopatogênese durante a infecção por dengue. Foi visto que a proteína viral NS1 é capaz de ativar esses receptores e influenciar a produção das citocinas IL-6 e TNF em PBMCs (J. Chen, Ng, & Chu 2015).

6- RESPOSTA IMUNE ASSOCIADA À PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE

O limiar entre a resposta imune protetora e a resposta que leva a inflamação exacerbada na dengue é muito sutil. A patogênese da dengue é determinada pela interação de fatores ambientais, biológicos e genéticos tanto virais como do hospedeiro. Como discutido anteriormente, alguns sorotipos e genótipos virais são associados a casos graves de dengue, como o genótipo asiático do sorotipo DENV-2 que é associado à gravidade durante infecções secundárias (Bernardo et al. 2008; Ocazionez 2007) quando comparado ao genótipo americano desse mesmo sorotipo. Altos níveis de viremia também já foram associados à gravidade. De acordo com esta hipótese alguns sorotipos seriam capazes de replicar com maior eficiência amplificando a resposta imune do hospedeiro (Leitmeyer et al. 1999; David W Vaughn et al. 2000).

Dentre os principais fatores do hospedeiro associados à patogênese estão as características genéticas e *status* imunológico, como históricos de infecção por dengue. A resposta imunológica desencadeada pelo indivíduo infectado é muito complexa uma vez que pode ser protetora ou patogênica resultando numa desregulada produção de citocinas que podem causar alterações fisiológicas, como o aumento da permeabilidade vascular que é observado nos casos mais graves de dengue (Mongkolsapaya et al. 2003; Rothman 2011).

Estudos clássicos sobre a imunopatogênese na dengue apoiam a correlação entre gravidade e infecção secundária por outro sorotipo. Tal teoria é chamada de *Original Antigenic sin* (Scott B Halstead 1979; Rothman 2011). Segundo essa teoria, durante uma infecção secundária ocorre predominância de uma resposta cruzada de células de T e B de memória geradas durante uma infecção primária por um primeiro sorotipo, que seria o “antígeno original” (Zompi & Harris 2013). Essas células de memória respondem mais rapidamente e com menor avidéz ao novo sorotipo infectante do que as células *naive*.

A facilitação dependente de anticorpos, que é uma das teorias mais aceitas para explicar a gravidade da dengue (do inglês *Antibody dependent enhancement* , ADE) ocorre quando em casos de baixa concentração de anticorpos específicos ou em condições de baixa avides, ao invés de ocorrer a neutralização do vírus ou da partícula viral, ocorre aumento da internalização de complexos vírus-anticorpos não neutralizantes em células que possuem receptores Fc γ , como monócitos e macrófagos resultando no aumento da replicação viral que pode ser compatível com o aumento de viremia observado nos casos graves de dengue (Duyen et al. 2011; Tricou et al. 2011; D W Vaughn et al. 2000). Esse processo pode também ser acompanhado por modificações na regulação de vias produtoras de mediadores pró e anti-inflamatórios (Chareonsirisuthigul, Kalayanarooj, & Ubol 2007; Mahalingam and Lidbury 2002).

Da mesma forma, células T CD4+ e T CD8+ de memória possuem reatividade cruzada e quando ativadas durante uma infecção secundária por um sorotipo diferente podem participar da imunopatogênese, exacerbando os danos teciduais através da lise celular e produção de citocinas e quimiocinas (Bukowski et al. 1989; Gagnon, Ennis, and Rothman 1999; I. Kurane, Meager, & Ennis 1989). Como revisado por Rothman (2011) em condições de alta avides, observa-se elevada produção de IFN γ , TNF e CCL4, além de alta capacidade de lise das células infectadas. Em condições de baixa avides, onde os epítomos funcionam como agonistas parciais, observa-se altos níveis de CCL4 e baixos níveis de IFN γ e TNF, além de baixa capacidade de lise celular (Rothman 2011)

Apesar de as principais teorias para a gravidade da dengue estarem relacionadas a uma resposta imune inespecífica e desregulada, mediada tanto por linfócitos B quanto T, a maioria das pessoas infectadas com um sorotipo heterólogo do vírus da dengue são capazes de responder a infecção com a proliferação de células T de memória de reatividade cruzada e aumento da produção de anticorpos e a grande maioria não desenvolve a forma grave da doença. Além disso, existem casos de dengue grave em infecções primárias (Balmaseda et al.

2006; Scott B Halstead et al. 2002; Hung et al. 2004; C.-C. Lin et al. 2010). Portanto, embora os dados sugiram que a teoria da infecção secundária seja interessante, ela explica apenas parcialmente o fenômeno da exacerbação inflamatória.

7- *MARCADORES DE GRAVIDADE*

Entre os marcadores fisiológicos associados à gravidade estão aqueles relacionados à ativação endotelial como angioproteínas, desintegrinas, metaloproteinases, trombosmodulinas, E-selectinas, molécula de adesão intracelular (ICAM-1) e molécula de adesão vascular (VCAM-1), além de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF). Dentre os marcadores bioquímicos podemos citar níveis de proteína ligadora de LPS (LBP), CD14 solúvel, Aspartato transaminase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT) e óxido nítrico. Todos esses marcadores são encontrados em níveis diferenciados de acordo com a forma da doença (John, Lin, & Perng 2015).

A expressão de vários genes é regulada positivamente em pacientes com FHD. Um estudo realizado por Ubol e colaboradores (2008) em uma coorte de crianças tailandesas encontrou aumento na expressão de genes envolvidos na ativação de células B e T, produção de citocinas, ativação de complemento e apoptose de células T, entre eles CCL4, CCL5, granzima (GZMA), proteína 1 transmembrana induzida por IFN (IFITM1), proteína 2 transmembrana induzida por IFN (IFTIM2), IL1 β , transcrito 4 de célula NK (NK4), proteassomo (PSME1) em casos de FHD comparado a casos de FD (Ubol et al. 2008).

Consistente com esses resultados, Nascimento et al (2009) também encontrou genes relacionados a apoptose, entre eles, PDCD4, PACAP e proteína D52 com níveis de expressão elevados em PBMCs de pacientes com FHD (Nascimento et al. 2009). Adicionalmente Simmons et al (2007) realizou um estudo a fim de encontrar uma assinatura molecular para casos graves de dengue e mais uma vez foi observado uma regulação positiva de genes

envolvidos em vias apoptóticas em pacientes com síndrome do Choque da dengue. Além disso, nesse mesmo trabalho, genes estimulados por IFN foram negativamente regulados nos casos mais graves de dengue (Simmons et al. 2007).

Uma ampla gama de mediadores é encontrada em níveis elevados no soro de pacientes com dengue grave comparado a indivíduos com dengue branda, entre eles, IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, TNF, MIF, CCL2, CCL4, CCL5, CD69, MIP-1 β , IFN γ , IL-4, GM-CSF, IL13, IL17, IL18, IP-10 (Bozza et al. 2008; Braga et al. 2001; Cui et al. 2016; Ferreira et al. 2015; Mustafa et al. 2001; Singla et al. 2016). O perfil de citocinas parece ser diferenciado entre uma resposta de células T específicas ou de reatividade cruzada (Dong et al. 2007; Mongkolsapaya et al. 2006; Rothman 2011). Apesar de ser observado um aumento tanto de citocinas pró- e anti-inflamatórias nas formas graves de dengue, o momento em que essas citocinas são produzidas parece ser um importante fator.

Uma ativação inicial de IFN γ parece estar associada à gravidade na dengue (Bozza et al. 2008; D. H. Libraty et al. 2002). Essa citocina é um importante mediador com importantes efeitos antivirais participando da ativação de macrófagos. Ao contrário dos IFN α/β que são mais importantes para controlar a infecção em estágios iniciais (Shresta et al. 2004) o IFN γ parece ser importante em todos os estágios da infecção. No entanto, seus efeitos durante a infecção por dengue ainda são muito controversos. Alguns trabalhos mostram que ele pode aumentar a infecção dos macrófagos induzindo a expressão de receptores Fc que, por sua vez, aumenta a captação de complexos vírus-anticorpos (Diamond et al. 2000; B. Y. I. Kurane, Meager, & Ennis 1989; D. Libraty et al. 2001). Por outro lado, alguns trabalhos associam IFN γ a proteção à dengue (Cui et al. 2016; Gunther et al. 2011).

Em relação ao TNF, esta citocina pode contribuir para uma eliminação precoce do Dengue vírus, mas por outro lado, pode estar entre os principais responsáveis pelo agravamento da infecção sendo uma das primeiras citocinas detectadas no soro de pacientes (E L Azeredo et al. 2001; Singla et al. 2016). Altas concentrações de TNF produzem

trombose sanguínea e reduzem a pressão arterial por meio de uma combinação de contratilidade reduzida e vasodilatação. Todas as manifestações clínicas e patológicas do choque séptico são causadas por níveis elevados de TNF. Além disso, o TNF é capaz de induzir as células vasculares a produzirem outros mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-6, IL-8 e PAF, bem como a produção de substâncias vasodilatadoras como a prostaglandina I₂ e óxido nítrico (Tracey & Cerami, 1992). TNF, ainda é capaz de induzir a produção de outras citocinas que quando secretados em conjunto, podem ter efeitos sinérgicos. Por exemplo, TNF, IFN γ e IL-1 juntas podem ter um grande efeito sobre a permeabilidade vascular, comparado com a ação de cada uma individualmente (Burke-Gaffney & Keenan, 1993).

Citocinas anti-inflamatórias aparecem em níveis mais elevados durante um estágio mais tardio da infecção, tendo um papel controlador de citocinas pró-inflamatórias. Entre essas citocinas, a IL-10 parece ter uma importante participação nos casos graves de dengue, uma vez que seus níveis estão elevados no soro de pacientes que desenvolvem essa forma da doença (R.-F. Chen et al. 2007; Ferreira et al. 2015; Hung et al. 2004; Pérez et al. 2004). Assim como no caso do IFN γ , o papel da IL-10 na gravidade à dengue ainda é incerto. A IL-10 é produzida principalmente por monócitos e linfócitos T. Entre as suas funções estão a indução da diferenciação das células B e secreção de anticorpos, inibição da expressão de MHC classe II, além de funcionar como um potente inibidor de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Altos níveis de IL-10 foram associados a uma linfopenia transitória e ao aumento de trombocitopenia (Elzinandes L Azeredo et al. 2001; D. H. Libraty et al. 2002). Tal correlação já foi observada para pacientes com outras doenças inflamatórias que foram tratados com IL-10 (Sosman et al. 2000).

A infecção que ocorre devido à facilitação dependente de anticorpos (ADE) parece estar acompanhada por uma alta produção de citocinas anti-inflamatórias, entre elas a IL-10 (Chareonsirisuthigul, Kalayanarooj, and Ubol 2007; Mahalingam and Lidbury 2002). Por outro lado, Sierra e colaboradores (2010) observaram em estudos *ex vivo* que a re-infecção

por um sorotipo heterólogo induz uma resposta pró-inflamatória com altos níveis de IFN γ e TNF assim como uma fraca indução de citocinas anti-inflamatórias como TGF- β 1 e IL-10 enquanto uma reinfecção por um sorotipo homólogo apresentou um padrão predominante de citocinas anti-inflamatórias (B. Sierra et al. 2010).

Outro importante marcador de gravidade à dengue, o fator inibidor de migração de macrófagos (MIF), é um mediador que foi inicialmente descrito como um fator produzido por células T após estimulação a fim de inibir a migração de macrófagos. Hoje, sabe-se que MIF é constitutivamente expresso em vários tipos de celulares. MIF parece contribuir para o extravasamento plasmático de forma direta ou indireta. Indiretamente através da indução da liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-1 β e de moléculas de adesão ou diretamente através da sinalização de vias que interferem na estabilidade das junções das células endoteliais (Assunção-Miranda et al. 2010; Chuang et al. 2011).

8- CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DO PACIENTE ASSOCIADAS À GRAVIDADE NA DENGUE

A importância da participação genética do hospedeiro tem sido investigada em doenças infecciosas causadas por diversos patógenos, incluindo a Malária, Hanseníase e tuberculose (Azad, Sadee, and Schlesinger 2012; Cardoso et al. 2011; de Mendonça, Goncalves, and Barral-Netto 2012). De forma semelhante, uma série de estudos tem mostrado que variações genéticas do hospedeiro possuem extrema importância na evolução clínica da dengue, assim como outras infecções virais (Coffey et al. 2009; Fang et al. 2012).

Como revisado por Sierra e colaboradores (2006) e observado por Halstead e colaboradores (2001), FHD/SCD é ausente entre indivíduos de origem Africana. Um estudo realizado com uma amostra da população de Cuba durante a grave epidemia de 1981 mostrou que 86% dos casos de FHD ocorreram em brancos e apenas 7% em negros, sendo os 7%

restantes em mulato. Mesmo essas observações sendo feitas em relação à etnia, podem funcionar como um indicativo de descendência africana. Resultados similares foram obtidos em estudos de epidemias subsequentes em 1997 e 2001 (S. B. Halstead et al. 2001; Sierra et al. 2006).

Interessantemente, foi visto que linfócitos T CD4+ de reatividade cruzada para outro sorotipo são mais reativos em brancos do que em negros e conseqüentemente produzem mais citocinas (Guzma 2007; S. B. Halstead et al. 2001; Sierra et al. 2006). Outros dois estudos encontraram ancestralidade africana associada a dengue grave em populações da Colômbia e Brasil (Blanton et al. 2008; Chacón-duque et al. 2014).

Estudos de epidemiologia genética do tipo caso-controle com abordagem de genes candidatos tem mostrado dezenas de polimorfismos genéticos de base única (SNPs, do inglês, *single nucleotide polymorphisms*) e polimorfismos em *locus* HLA associados com gravidade a dengue. Os principais estudos de associação em dengue assim como a população de estudo são mostrados na tabela 1.

O primeiro estudo de associação em todo o genoma, GWAS (do inglês, *genome wide association study*) realizado em uma população Vietnamita encontrou SNPs associados a forma grave da dengue em genes como *MICB* e *PLCE1* (Khor et al. 2012). Posteriormente essas dados de associação foram confirmados em uma segunda população de origem tailandesa (Dang et al. 2014).

O gene *PLCE1* codifica uma fosfolipase C (Zhang et al. 2013) e havia sido anteriormente associado a câncer, mas não a doenças infecciosas. Os genes *MICA* e *MICB*, relacionados ao MHC classe 1, são ligantes do receptor NKG2D presente em células NK e T (Lazear et al. 2013). Polimorfismos no gene *MIC* também foram associados com desfecho da dengue em uma população cubana (García et al. 2011).

Curiosamente, SNPs previamente associados com dengue grave nas dezenas de estudos caso-controle publicados não foram associados a dengue nesse GWAS. Alguns desses

SNPs já foram associados com gravidade ou proteção a dengue em mais de uma população ao redor do mundo. Como exemplo pode ser citado o SNP da posição -336 no gene que codifica DC-SIGN (Alagarasu et al. 2013; Sakuntabhai et al. 2005; L. Wang et al. 2011; Xavier-Carvalho et al. 2013). Apesar do grande número de trabalhos publicados mostrando associações de polimorfismos genéticos com a forma da dengue e outras doenças, estes carecem de replicações e validações em diferentes populações. Outro ponto extremamente importante é a escassez de estudos sobre a funcionalidade de um polimorfismo genético que tenha sido previamente associado com a forma grave/branda da dengue ou outras doenças de um modo geral.

Tabela 1- Estudos de associação do tipo caso controle para dengue.

GENE	POPULAÇÃO	REFERÊNCIA
<i>MBL2</i>	Brasileira	(Acioli-Santos et al. 2008; Figueiredo et al. 2016)
<i>TLR4</i>	Indiana, Indonésia	(Djamiatun et al. 2011; Sharma et al. 2016)
<i>IFNγ</i>	Brasileira	(Feitosa et al. 2016)
<i>IL1β</i>	Brasileira, Tailandesa	(Cansanção et al. 2016; Sa-ngasang et al. 2014)
<i>BAK1</i>	Tailandesa	(Dang et al. 2016)
<i>TLR3/ TIRAP</i>	Indiana	(Alagarasu et al. 2015)
<i>α triptase</i>	Vietnamita	(Vasquez Velasquez et al. 2015)
<i>FCγRIIa</i>	Paquistanesa, Mexicana	(Mohsin et al. 2015; Noecker et al. 2014)
<i>DCSIGN</i>	Brasileira, Chinesa, Tailandesa, Cubana	(Alagarasu et al. 2013; Dang et al. 2016; Garcia et al. 2012; Silva et al. 2010; Oliveira et al. 2014; Sakuntabhai et al. 2005; Xavier-Carvalho et al. 2013; Wang et al. 2011)
<i>IL1RA</i>	Tailandesa	(Sa-ngasang et al. 2014)
<i>KIR</i>	Brasileira	(Beltrame et al. 2013)
<i>Fator de complemento CFH</i>	Brasileira	(Pastor et al. 2013)

<i>OASs</i>	Indiana	(Alagarasu et al. 2013; Thamizhmani and Vijayachari 2014)
<i>CLEC5A</i>	Brasileira	(Xavier-Carvalho et al. 2013)
<i>TNFα</i>	Mexicana, Brasileira, Indiana, Tailandesa	(Fernández-Mestre et al. 2004; Feitosa et al. 2016; Garcia-Trejo et al. 2011; Vejbaesya et al. 2009) (Alagarasu et al. 2013)
<i>HLA</i>	Malaia, chinesa e Indiana	(Alagarasu et al. 2013; Appanna et al. 2010; Falcón-Lezama et al. 2009; Vejbaesya et al. 2009)
<i>JAK1</i>	Brasileira	(Silva et al. 2010)
<i>TAP 1 e 2</i>	Indiana	(Soundravally and Hoti 2008)
<i>VDR e FCγ</i>	Vietnamita	(Loke et al. 2002)

Dados recuperados do Pubmed/NCBI

II- JUSTIFICATIVA

O Brasil é atualmente o país com maior número de casos de dengue notificados à OMS, sendo responsável pela quase totalidade de casos na América. Desde 2015 o quadro se agravou com a emergência de outras arboviroses similares, como a zika e chikungunya, dificultando ainda mais o manejo correto dos pacientes que podem vir a desenvolver dengue grave. Mesmo com um significativo progresso no desenvolvimento de uma vacina eficiente, não estão claros ainda os fatores que podem levar o paciente a evoluir para casos graves de dengue.

Além disso, a dengue é uma doença multifatorial, onde principalmente fatores genéticos virais e do hospedeiro humano contribuem para a patogênese. Observa-se entre os diferentes estudos envolvendo pacientes, grande controvérsia entre níveis de mediadores e outros componentes da resposta imune mesmo quando outras variáveis como idade, sorotipo viral, forma da doença entre outros, são equivalentes. Tais diferenças podem ser resultado da variação genotípica interindividual.

Nós estudamos aqui, a variação genética interindividual e sua contribuição na gravidade a dengue através de estudos de epidemiologia genética, esta tem por objetivo determinar se existe um componente genético para uma certa doença observada na população. Estudos caso controle com genes candidatos são uma das abordagens para esse tipo de estudo. Nesse caso, o gene (mais especificamente o alelo) é o fator de exposição e a doença ou suas diferentes formas clínicas, o desfecho. Os resultados de associação obtidos no nosso primeiro estudo caso controle em pacientes com dengue do Rio de Janeiro nos guiaram a realização da validação deste achado em uma segunda população bem como através de estudos funcionais *in vitro* e *in vivo*, como descrito a seguir nos objetivos.

III- OBJETIVOS

1- OBJETIVO GERAL

Avaliar o valor prognóstico de marcadores genéticos e moleculares na infecção por dengue e outras infecções febris.

2- OBJETIVOS ESPECIFICOS

➤ Estudo epidemiológico genético

- 1- Realizar um estudo caso controle genético com abordagem de genes candidatos em pacientes com dengue.
- 2- Replicar a associação dos SNP rs1285933 no gene *CLEC5A* e rs4804803 no gene *DC-SIGN* em uma segunda população independente.
- 3- Investigar a associação do *DC-SIGN* com o desfecho de dengue grave através de meta análise e análises da estrutura haplotípica da região.

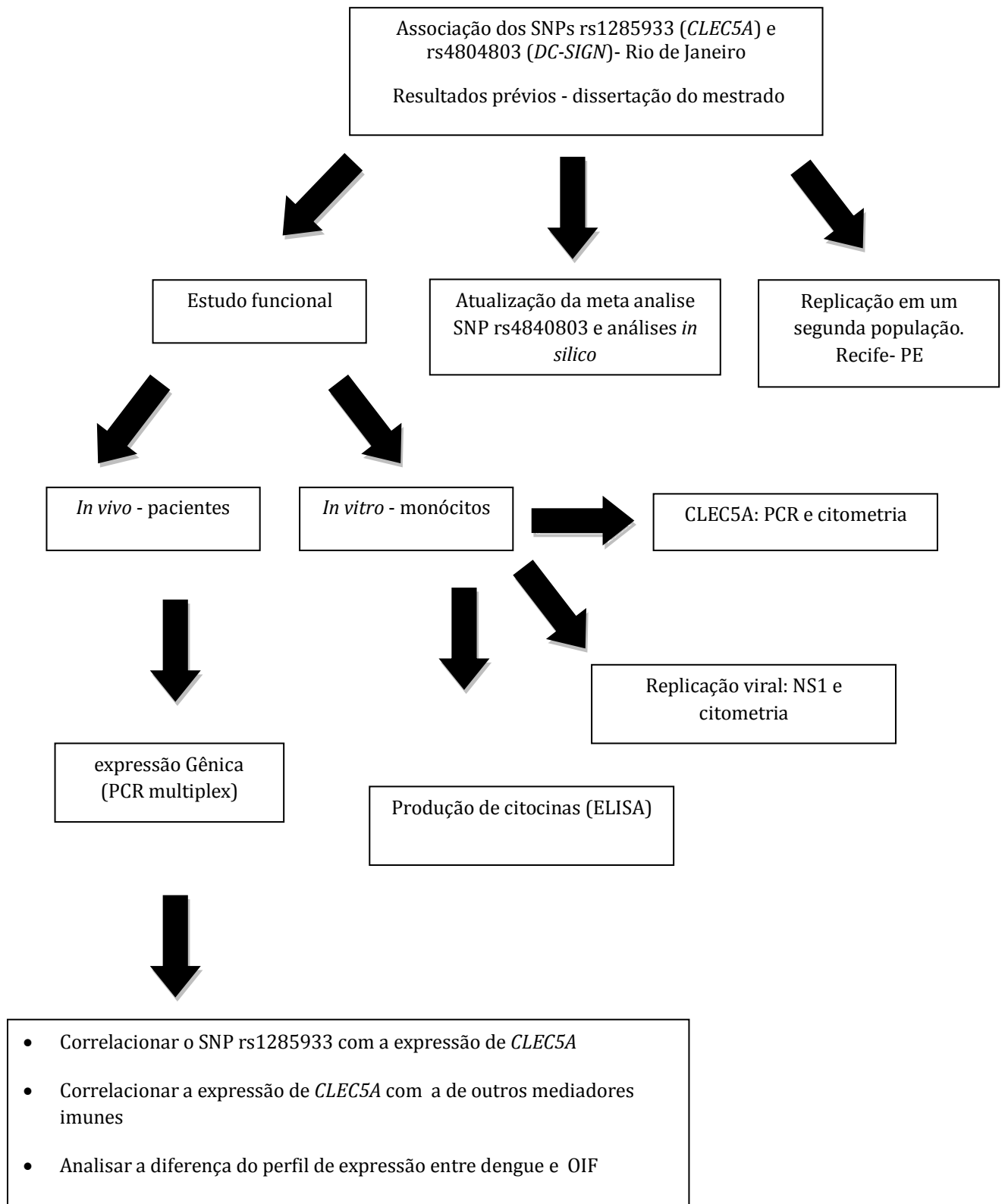
➤ Estudo funcional *in vitro*

1. Avaliar a expressão e produção de *CLEC5A* em monócitos de doadores voluntários correlacionando com os diferentes genótipos do SNP rs1285933, com a produção de TNF e com a carga viral.

➤ Estudo funcional envolvendo pacientes com dengue e outras infecções febris (OIF)

1. Analisar os perfis de expressão gênica em dengue e outras infecções febris.

IV- DESENHO DE ESTUDO



CAPÍTULO 2

ESTUDO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA EM GENES CANDIDATOS DA RESPOSTA IMUNE E GRAVIDADE À DENGUE.

Uma vez que os casos mais graves de dengue são acompanhados de uma intensa liberação de mediadores imunes, *cytokine storm*, a presença de polimorfismos em tais genes pode ser responsável por diferenças na produção desses mediadores, explicando em parte a variação da resposta imune entre indivíduos e assim a associação genética com o desfecho da dengue. Recentemente tem sido crescente o número de publicações mostrando polimorfismos de base única, SNPs, associados com gravidade ou proteção a dengue grave em diferentes populações ao redor do mundo.

No artigo apresentado em seguida, publicado no periódico *Infection Genetics and Evolution* foi realizada uma seleção de genes candidatos com relevante participação na infecção por dengue. Em seguida, foram selecionados SNPs já estudados para outras doenças infecciosas ou mesmo para dengue, como no caso do -308 no gene *TNF*, -819 no gene da *IL10* e -336 no gene *CD209*, que codifica o receptor DC-SIGN. Foram selecionados ainda SNPs no gene do receptor *CLEC5A*.

Tais SNPs em genes candidatos foram avaliados em um estudo caso-controle para o desfecho de dengue grave em uma amostra de pacientes do Rio de Janeiro. A metodologia completa e resultados estão mostrados no artigo a seguir.



Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: A case–control, functional and meta-analysis study



Caroline Xavier-Carvalho^a, Gerusa Gibson^b, Patrícia Brasil^c, Ralph X. Ferreira^d,
Reinaldo de Souza Santos^b, Oswaldo Gonçalves Cruz^e, Solange Artimos de Oliveira^d,
Marília de Sá Carvalho^e, Antonio G. Pacheco^e, Claire F. Kubelka^{f,*}, Milton O. Moraes^{a,*},¹

^a Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21040-360 Rio de Janeiro, Brazil

^b Departamento de Endemias Samuel Pessoa, Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

^c Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

^d Departamento de Medicina Clínica, Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Hospital Universitário Antonio Pedro, UFF, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

^e Programa de Computação Científica (PROCC) – Prédio da Antiga Residência Oficial FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

^f Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 April 2013

Received in revised form 13 August 2013

Accepted 21 August 2013

Available online 7 September 2013

Keywords:

CLEC5A

DC-SIGN

TNF

Cytokines

Dengue

DHF

ABSTRACT

Dengue is an arthropod-borne emerging viral disease with high morbidity and mortality risk in tropical countries like Brazil. Clinical manifestations are vast, ranging from asymptomatic to most severe forms of dengue such as shock. Previous data have shown that host genetics play a role in disease susceptibility and severity. Herein, we have tested the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) at *TNF*, *IL10*, *MIF*, *DCSIGN*, *CLEC5A*, *NOD2*, *CCR5* and *MRC1* as candidate genes using a matched case–control study design including 88 severe children cases of dengue patients and 335 healthy unrelated subjects that was also separated in IgG⁺ and IgG⁻ controls. We demonstrated that the TT genotype of *CLEC5A* SNP (rs1285933 C>T) is associated with dengue severity (OR = 2.25; *p* = 0.03) and that GG genotype of –336G>A *DCSIGN* (*CD209*) SNP is associated with protection to severe dengue (OR = 0.12; *p* = 0.04). Both comparisons were borderline significant when cases were compared with IgG⁺ controls subgroup. Nevertheless, genotype–phenotype correlation was also assessed using serum levels of TNF from infected patients at the onset of dengue fever, and CT/TT carriers in *CLEC5A* secreted higher levels of TNF than CC individuals in 5–7 days of infection. No significant difference was observed in TNF levels between genotypes GG versus AG/AA at *DCSIGN* promoter. Next, we performed a meta-analysis retrieving results from the literature for –336G>A *DCSIGN* and –308G>A *TNF* SNPs demonstrating that the consensus estimates of these SNPs indicated no association with dengue severity (when compared to Dengue fever) in the overall analysis. But, a subgroup analysis in the –336G>A *DCSIGN*, the G allele was associated with severe dengue susceptibility in Asians (OR_{allele} = 2.77; *p* = 0.0001; OR_{carriers} = 2.99; *p* = 0.0001) and protection in Brazilians (OR_{allele} = 0.66; *p* = 0.013). In summary, our results suggest that genetic variations at *CLEC5A* increase the risk and regulate TNF secretion in dengue severity among Brazilians. Also, combined data of the literature suggest population-specific effect of the –336 *DCSIGN* SNP more prominent in Asians and in a different direction than Brazilians.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During the last decades dengue became the most important arthropod-borne emerging viral disease with high morbidity and

mortality risk and is considered a neglected disease by the World Health Organization (WHO/TDR, 2009). It is caused by the Dengue Virus (DENV), which has four circulating serotypes, DENV-1 to DENV-4 (Guzman et al., 2010; Wilder-Smith et al., 2010). In Brazil, after the introduction of DENV-3 in 2002, the disease has been presenting increasing numbers of reported cases and deaths. It recently became alarming when DENV-2 re-emerged in Rio de Janeiro during 2008 (Rodriguez-Barraquer et al., 2011; Teixeira et al., 2009) and, more recently, by the DENV-4 introduction in 2010 raising serious concerns about the increase of severe cases of the disease in the next few years (Nogueira and Eppinghaus, 2011; Temporao et al., 2011).

* Corresponding authors. Address: Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, CEP 21040-360, Brazil (C.F. Kubelka), Leprosy Laboratory – FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, CEP 21040-360, Brazil. Tel.: +21 25621556 (M.O. Moraes).

E-mail addresses: claire@ioc.fiocruz.br (C.F. Kubelka), mmoraes@fiocruz.br (M.O. Moraes).

¹ These authors share senior authorship in this work.

DENV infection in humans presents with a wide clinical spectrum ranging from an asymptomatic, acute self-limiting febrile illness to a more severe form, when patients may develop shock due to increased vascular permeability (Guzman et al., 2010; WHO/TDR, 2009; Wilder-Smith et al., 2010). Immune mediators, such as TNF, IL-10, MIF (Assuncao-Miranda et al., 2010; Kurane, 2007; Perez et al., 2004) and others, have an important role in the pathogenesis of dengue. More recently, it has been observed that pattern recognition receptors (PRRs) also participate during infection, increasing the viral internalization or stimulating the production of cytokines, including Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN) (Hottz et al., 2013; Navarro-Sanchez et al., 2003) and C-type lectin superfamily member 5 – *CLEC5A* (Chen et al., 2008).

Pathogenesis of dengue has been attributed to many factors over the years, such as sequential infections by a distinct serotypes (Dejnirattisai et al., 2010; Halstead, 1988, 1983; Sierra et al., 2010), genetic and antigenic variations among viral strains (Fried et al., 2010; Rico-Hesse, 2003) and host genetic variations (Blanton et al., 2008; de la et al., 2006, 2007; Halstead et al., 2001). In fact, some of the host polymorphisms in candidate genes have been found as responsible for different outcomes such as dengue *per se* or dengue severity (Alagarasu et al., 2013a,b Appanna et al., 2010; Falcon-Lezama et al., 2009; Fernandez-Mestre et al., 2004; Garcia et al., 2011; Garcia-Trejo et al., 2011; Loke et al., 2002; Perez et al., 2010; Sakuntabhai et al., 2005; Silva et al., 2010; Stephens et al., 2002; Wang et al., 2011). Also, a genome-wide association study (GWAS) pinpointed association between previously unsuspected genes with severe dengue (Khor et al., 2011).

Here, a case-control comparing severe dengue cases with matched neighbors was conducted in Rio de Janeiro, Brazil. We selected for this study important SNPs at candidate genes in the immune response, some of them being associated with severe dengue or other infectious diseases. These SNPs may be involved in increased expression of these molecules or by regulation of other mediators. Those include rs1800629 (–308G>A) in *TNF* (Fernandez-Mestre et al., 2004; Perez et al., 2010), rs1800871 (–819C>T) in *IL10* (Perez et al., 2010), rs4804803 (–336G>A) in *DC-SIGN* (Alagarasu et al., 2013a; Sakuntabhai et al., 2005; Wang et al., 2011), rs755622 (–173G>C) in *MIF* (Assuncao-Miranda et al., 2010; Torres et al., 2009) rs333 in *CCR5* (Kindberg et al., 2008), rs1926736 in *MRC1* (Alter et al., 2010), rs2066843, rs751271 in *NOD2* (Bourhis and Werts, 2007). Additionally, we performed a search of tag SNPs in Hapmap and selected three SNPs: rs1285933, rs13237944 and rs1285935 in *CLEC5A*.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design of case-control study

Child patients admitted in four pediatric intensive care units (PICUs) – IFF/FIOCRUZ; Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, IPPMG/UFRJ; Hospital Municipal Jesus; and Pronto-baby, Hospital da Criança – between 2007 and 2008, aged up to 18 years, were recruited. Definition of a dengue was established based on clinical evidence associated with geographical and temporal incidence of the disease as described by Brazilian Ministry of Health and WHO (WHO/TDR, 2009). After reviewing medical records of admitted patients, all exhibited symptoms consistent with shock syndrome: slow capillary filling, cold clammy skin, filiform or absent pulse in the presence of either hypotension for age (systolic pressure < 80 mm of Hg for those <5 years old and <90 mm of Hg for those ≥ 5 years old) or narrow pulse pressure ≤ 20 mm of Hg, besides other typical symptoms of dengue such as fever, hemorrhagic manifestations, hemoconcentration, constant vomits,

persistent abdominal pain, hypotension, pleural or pericardial effusion or ascites and high levels of AST and ALT.

The serology could not be performed in all suspected cases at the onset of the disease. Forty-nine (56%) of the patients were tested and confirmed serologically using IgM specific ELISA. Moreover, all patients were IgG⁺ when blood was collected during recruitment in 2010 (2 years later of infection). We excluded from the study patients with hematological or neoplastic conditions, transplanted patients, patients with autoimmune diseases and those who were HIV positive.

A control group was selected among cases' household members (son in law, brother in law among others, always excluding relatives and siblings) and neighbors matched by age (up to 3 years older or younger than the cases). For each case, at least four controls were sampled. To exclude siblings and other relatives, a questionnaire was applied to all participants in order to guarantee that all samples recruited either in cases or controls were independent from each other. Episodes of previous mild dengue were not considered when selecting the controls, although individuals with history of severe dengue were excluded from the study, after which, 88 cases and 335 controls remained in the study. The rate of seropositivity for dengue IgG among controls was 60%, while 5% of the individuals remained undetermined.

2.2. Functional study – cytokines measurement in sera

Thirty-eight patients admitted in a PICU (Hospital Municipal Jesus) located in Rio de Janeiro, Brazil with dengue confirmed by serological tests (IgM⁺) were used for cytokines detection. They had their blood collected in the critical phase at 5–7 days of infection and none of them exhibited fever.

Clinical manifestations for these patients ranged from dengue fever without warning signs (WS), to patients with WS and severe dengue including shock. Severe dengue was considered if the patient previously presented fever of 2–7 days plus any of the following features: evidence of plasma leakage, such as high or progressively rising hematocrit; pleural effusions or ascites; circulatory compromise or shock (tachycardia, cold and clammy extremities, capillary refill time greater than three seconds, weak or undetectable pulse, narrow pulse pressure or, in late shock, unrecordable blood pressure). Hemorrhagic manifestations and other considered severe criteria were eventually observed, but were not relevant for the patient classification (WHO/TDR, 2009).

After blood collection, the serum was stored at –70 °C until use. TNF, IL-10, IL-13, and IFN γ were quantified by a multiplex microbead biometric immunofluorescent assay according to the manufacturer's instructions (Milliplex, Millipore) and analyzed by a multiplex array reader (Bio-Plex Workstation & Bio-Plex Manager Software from Bio-Rad Laboratories).

2.3. Ethics statement

This study was approved by research ethics committee (CAAE3723.0.000.009–08 Instituto de Pesquisas Clinicas Evandro Chagas/FIOCRUZ) and informed consent was obtained in two copies from the parents of all subjects enrolled in the study. A signed copy saved with the clinical researcher and the other with the family.

2.4. DNA extraction

Whole blood was collected from each individual in tubes containing EDTA. Genomic DNA extraction was performed from whole blood cells by the salting out method. The DNA was resuspended in TE (5 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA). After extraction, DNA was

quantified in a Nanodrop ND 1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies).

2.5. Genotyping

The following polymorphisms were genotyped in cases and controls: rs1800629 in *TNF*, rs1800871 in *IL10*, rs755622 in *MIF*, rs1926736 in *MRC1*, rs4804803 (–336) in *DCSIGN*, rs333 in *CCR5* ($\Delta 32$), rs2066843 and rs751251 in *NOD2*; for the gene *CLEC5A*, three SNPs were genotyped: rs13237944, located in intron 4 (+7569C > A), rs1285933 in 3' near gene (C > T) and rs1285935 (C_8876417_10) in 3' UTR (+18845C > T). All SNPs were genotyped (except for $\Delta 32$) using allelic discrimination method for real-time TaqMan assays (Applied Biosystems) in the ABI Prism 7000 Sequence Detection System or Step One Plus Real time PCR System. About 50 ng of DNA was used in the genotyping reaction. For $\Delta 32$ polymorphism in *CCR5*, genotypes were determined by the length of the amplified fragment. We used the following primers 5'GGT CCT CAT ACA CCT GC 3' (sense) and 5'AGG ATT CCC GAG TAG CAG ATG 3' (antisense) in the following cycling conditions: 95 °C for 3 min; 95 °C for 20 s; 54 °C for 20 s and 72 °C for 30 s followed by 35 cycles, and, finally, 72 °C for 3 min for final extension. Reactions were performed in thermal cycler (PT100, MJ Research) and PCR products were submitted to 2.0% agarose gel electrophoresis in TBE Buffer and DNA was visualized after SYBR® safe gel (Invitrogen) staining in UV transillumination.

2.6. Meta-analysis

Studies of association for SNP rs4804803 (–336/*DCSIGN*) and rs1800629 SNP (–308 *TNF*) in dengue severity were searched in Pubmed, Cochrane Library, Embase, Scopus and ISI Web of Knowledge and combined, eventually, with our data to generate –336 A/G *DCSIGN* and –308 A/*GTNF* meta-analysis. The keywords: “–308 *TNF*”, “–336 *DC-SIGN*”, “polymorphisms”, “dengue” and “SNPs” were used to perform the search. Also a search in the reference lists of included papers was performed.

Studies with sufficient genetic data to infer genotypes and obtain OR values were included.

2.7. Statistical analysis

2.7.1. Case–control study

Statistical analyses were performed using R version 2.11.1 (*R-Development-Core-Team, 2008*). Genetics and haplo.stats R package was used as previously described (*Cardoso et al., 2011b; Pereira et al., 2009*). Briefly, genotype frequencies were tested for Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) using a Chi-square test. The genotypic, allelic and carriers frequencies were calculated and compared in cases and controls by conditional logistic regression. Next, we compared the frequencies between cases versus IgG⁺ or IgG[–], separately. The values of linkage disequilibrium to SNPs studied in *CLEC5A* and *NOD2* were estimated by *D'* and *R*² and the haplotype frequencies were compared between cases and controls by logistic regression.

Sample size calculations were based on a logistic regression model. Considering a 95% confidence level, 80% power, a 1:4 case/control ratio and proportion of 40% minor allele frequency among controls, an odds ratio (OR) of 2 would be detectable with a sample of 82 cases and 328 controls.

2.7.2. Functional study

Differences in median levels of cytokines between groups were compared by Mann–Whitney test using GraphPad Prism version 4.

2.7.3. Meta analysis

For the meta-analysis, methods were described elsewhere (*Cardoso et al., 2011b; Pacheco et al., 2008*). Briefly, for each study we obtained the frequencies of genotypes, alleles and carriers. Comparisons were made with respect to the minor allele frequency. The modified Egger's test for funnel plot symmetry was used to test publication bias and heterogeneity across studies was assessed through Cochran's *Q* and *I*² statistic. Pooled OR was obtained by using Mantel–Haenszel method in the fixed-effect model and by using Der Simonian and Laird method in the random effects model. All analyses were carried in R with the packages meta and metafor. However, due to the small number of studies involved, we showed only the random effect. Concerning the selection of the patients and controls groups selection, after a careful analysis of healthy controls from published studies information retrieved concerning dengue previous infections was not available for most of the “controls” (except ours). In order to have a more homogeneous analysis we decided to test severe dengue (or DHF) versus DF (our IgG⁺ controls were considered as DF) in this meta-analysis.

3. Results

3.1. Case–control analysis show rs1285933 SNP in *CLEC5A* and –336 SNP in *DC-SIGN* associated with dengue susceptibility and protection, respectively

Among the severe dengue cases studied, 45 were female, with mean age 9.8 ± 3.9 years old and 43 were males 10.2 ± 3.62 years old. Among controls 183 were males, mean age 10.3 ± 3.6 years old and 152 are females, mean age 9.7 ± 3.3 years old.

In all SNPs tested, genotype frequencies were found in HWE. When the allele, genotype and carrier frequencies were compared between cases and controls, a significant risk association was found for the genotype TT of SNP rs1285933, located at *CLEC5A* (OR = 2.25; *p* = 0.03) and the genotype GG of SNP –336 *DCSIGN* was associated with protection in our population (OR = 0.12; *p* = 0.04) (*Table 1*).

It was not observed any differences in the frequencies between cases and controls at: –308 in *TNF*, –819 in *IL10*, –173 in *MIF*, $\Delta 32$ in *CCR5*, rs1926736 in *MRC1*, rs2066843, rs751271 in *NOD2* and rs13237944 and rs1285933 in *CLEC5A* SNPs (*Table 1*).

Next, controls were stratified according to history of exposure to dengue as evaluated by IgG positivity. We compared allelic, genotype and carrier frequencies for all SNPs between severe cases versus controls IgG⁺ or IgG[–] separately. However, it was observed a borderline significant differences in frequencies to TT genotype/SNP rs1285933 between cases and controls IgG⁺ (OR = 2.03; *p* = 0.12). Also, –336 promoter SNP in *DCSIGN* showed borderline association (OR = 0.14; *p* = 0.06 – *Table 1*). Importantly, OR values in both analysis were only slightly modified.

3.2. Haplotype analysis for SNPs in *CLEC5A* and *NOD2*

The linkage disequilibrium (LD) values were obtained for each pair of SNPs studied in *CLEC5A* (rs13237944, rs1285933, and rs1285935) and *NOD2* (rs2066843 and rs751271) using *D'* and *r*² parameters. No LD was detected in any comparison. LD analyses among SNPs in either *CLEC5A* or *NOD2* SNPs resulted in very low *r*² values (data not shown). Thus, we combined SNPs in the same loci to arrange haplotypes in *CLEC5A* and *NOD2*.

The C/C haplotype in *CLEC5A* (rs13237944, rs1285933, and rs1285935) was associated with protection (OR = 0.54; *p* = 0.03) to severe dengue. No association was found with haplotypes in *NOD2* (*Table 2*). Again, the OR between severe cases versus controls

Table 1
Genotypes, allele and carrier frequency distribution at SNPs studied.

SNP	Genotype/allele	N ^a (frequencies)		CLR		CLR controls IgG ⁺	CLR controls IgG ⁻
		Cases	Controls	OR (IC 95%)	p values	OR (p value)	OR (p value)
CLEC5A (rs1285933)	CC	12 (0.14)	76 (0.23)	Baseline		Baseline	
	CT	46 (0.53)	175 (0.53)	1.74 (0.85–3.55)	0.12	1.60 (0.25)	1.73 (0.28)
	TT	28 (0.33)	81 (0.24)	2.25 (1.07–4.87)	0.03*	2.03 (0.12)	3.07 (0.03*)
	Allele T	102 (0.59)	339 (0.51)	1.23 (0.85–1.80)	0.27	1.18 (0.43)	1.38 (0.20)
	Allele C	70 (0.41)	327 (0.49)	Baseline		Baseline	
	Carriers T	74 (0.86)	256 (0.77)	1.90 (0.97–3.76)	0.06**	1.69 (0.19)	2.23 (0.09**)
rs13237944 (CLEC5A)	CC	56 (0.67)	209 (0.63)	Baseline		Baseline	
	CA	25 (0.30)	109 (0.33)	0.83 (0.48–1.45)	0.52	0.94 (0.83)	0.58 (0.16)
	AA	2 (0.02)	13 (0.04)	0.53 (0.11–2.50)	0.43	1.11 (0.90)	0.54 (0.46)
	Allele C	137 (0.83)	527 (0.80)	Baseline		Baseline	
	Allele A	29 (0.17)	135 (0.21)	0.87 (0.54–1.42)	0.60	0.98 (0.93)	0.74(0.34)
	Carriers A	27 (0.32)	122 (0.37)	0.80 (0.47–1.37)	0.42	0.95(0.86)	0.58(0.13)
rs1285935 (CLEC5A)	CC	64 (0.74)	251 (0.76)	Baseline		Baseline	
	CT	21 (0.24)	75 (0.23)	1.06 (0.61–1.84)	0.81	1.13 (0.70)	–
	TT	2 (0.02)	6 (0.02)	1.25 (0.25–6.26)	0.78	0.77 (0.75)	–
	Allele C	149 (0.86)	577 (0.87)	Baseline		Baseline	
	Allele T	25 (0.14)	87 (0.13)	1.06 (0.63–1.78)	0.81	1.05 (0.86)	1.16 (0.68)
	Carriers T	23 (0.26)	81 (0.24)	1.08 (0.64–1.83)	0.74	1.11(0.74)	1.08 (0.83)
rs4804803 (DCSIGN –336)	AA	51 (0.60)	172 (0.54)	Baseline		Baseline	
	GA	33 (0.39)	122 (0.38)	0.90 (0.55–1.47)	0.68	0.96 (0.88)	0.96 (0.91)
	GG	1 (0.01)	28 (0.09)	0.12 (0.01–0.9)	0.04*	0.14 (0.06)	0.22 (0.18)
	Allele A	135 (0.8)	466 (0.72)	Baseline		Baseline	
	Allele G	35 (0.21)	178 (0.28)	0.81(0.53–1.26)	0.35	0.78 (0.46)	0.90 (0.75)
	Carriers G	34 (0.40)	150 (0.47)	0.76(0.47–1.22)	0.25	0.82 (0.46)	0.86 (0.66)
rs1800629 (TNF-308)	GG	64 (0.78)	271 (0.80)	Baseline		Baseline	
	GA	16 (0.20)	66 (0.19)	1.04 (0.55–1.98)	0.89	0.90 (0.76)	–
	AA	2 (0.02)	6 (0.02)	2.55 (0.42–15.46)	0.31	1.70 (0.57)	–
	Allele A	20 (0.12)	73 (0.11)	1.09 (0.61–1.96)	0.76	0.98 (0.95)	1.34 (0.43)
	Allele G	144 (0.88)	585 (0.89)	Baseline		Baseline	
	Carriers A	18 (0.22)	72 (0.21)	1.12(0.60–2.08)	0.72	0.93 (0.84)	1.57 (0.32)
rs755622 (MIF-173)	GG	43 (0.50)	168 (0.51)	Baseline		Baseline	
	CG	34 (0.40)	134 (0.40)	1.01 (0.61–1.67)	0.96	0.88 (0.68)	1.25 (0.52)
	CC	9 (0.10)	30 (0.09)	1.12 (0.49–2.54)	0.79	1.14 (0.77)	0.70 (0.62)
	Allele G	120 (0.70)	470 (0.71)	Baseline		Baseline	
	Allele C	52 (0.30)	194 (0.29)	1.02 (0.68–1.54)	0.92	0.93 (0.81)	1.20 (0.59)
	Carriers C	43 (0.50)	164 (0.50)	1.03 (0.63–1.66)	0.90	0.93 (0.81)	1.2 (0.59)
rs1800871 (IL10–819)	TT	11 (0.13)	44 (0.14)	0.79 (0.37–1.64)	0.51	0.84 (0.68)	0.94 (0.90)
	CT	33 (0.38)	149 (0.46)	0.69 (0.40–1.17)	0.16	0.66 (0.17)	0.77 (0.46)
	CC	42 (0.49)	132 (0.40)	Baseline		Baseline	
	Allele T	55 (0.32)	237 (0.37)	0.85 (0.57–1.27)	0.43	0.86 (0.52)	0.92 (0.74)
	Allele C	117 (0.68)	413 (0.64)	Baseline		Baseline	
	Carriers T	44 (0.51)	193 (0.60)	0.70 (0.43–1.16)	0.17	0.70 (0.22)	0.80 (0.52)
rs333 (Δ32 CCR5)	DD	82 (0.94)	313 (0.96)	Baseline		Baseline	
	Dd	5 (0.03)	13 (0.04)	1.44 (0.46–4.07)	0.62	1.54 (0.49)	1.41 (0.68)
	Allele D	169 (0.97)	639 (0.98)	Baseline		Baseline	
	Allele d	5 (0.03)	13 (0.02)	1.24 (0.40–3.85)	0.70	1.24 (0.72)	1.35 (0.72)
	Carriers d	5 (0.06)	13 (0.04)	1.32 (0.43–4.07)	0.53	1.39 (0.59)	1.41 (0.68)
	rs1926736 (MRC1)	GG	48 (0.56)	182 (0.56)	Baseline		Baseline
GA		32 (0.37)	119 (0.37)	1.0 (0.61–1.66)	0.99	0.89 (0.69)	1.16 (0.66)
AA		6 (0.07)	26 (0.08)	0.83 (0.33–2.14)	0.70	0.56 (0.33)	0.80 (0.71)
Allele G		128 (0.74)	483 (0.74)	Baseline		Baseline	
Allele A		44 (0.26)	171 (0.26)	0.97 (0.63–1.48)	0.90	0.86 (0.55)	1.03 (0.92)
Carriers A		38 (0.44)	145 (0.45)	0.97 (0.60–1.56)	0.91	0.83 (0.51)	1.09 (0.79)
rs2066843 (NOD2)	CC	57 (0.65)	231 (0.69)	Baseline		Baseline	
	TC	26 (0.30)	90 (0.27)	1.21 (0.71–2.06)	0.48	1.37 (0.30)	1.08 (0.82)
	TT	5 (0.06)	13 (0.04)	1.39 (0.47–4.13)	0.55	2.14 (0.23)	1.62 (0.52)
	Allele T	36 (0.2)	116 (0.17)	1.16 (0.73–1.85)	0.52	1.33 (0.27)	1.12 (0.71)
	Allele C	140 (0.8)	552 (0.83)	Baseline		Baseline	
	Carriers T	31 (0.36)	103 (0.30)	1.23 (0.74–2.05)	0.41	1.47 (0.18)	1.14 (0.71)
rs751271 (NOD2)	GG	35 (0.40)	112 (0.34)	Baseline		Baseline	
	TG	43 (0.49)	163 (0.49)	0.83 (0.50–1.38)	0.48	0.67 (0.17)	0.69 (0.29)
	TT	10 (0.11)	59 (0.18)	0.55 (0.25–1.19)	0.13	0.45 (0.07**)	0.64 (0.37)
	Allele T	63 (0.36)	281 (0.42)	0.83 (0.57–1.22)	0.36	0.78 (0.24)	0.83 (0.47)
	Allele G	113 (0.64)	387 (0.58)	Baseline		Baseline	
	Carriers G	78 (0.89)	275 (0.82)	1.61 (0.8–3.29)	0.18	1.72 (0.17)	1.25 (0.62)

^a Total number of genotyped samples for each SNP in may vary due to genotype miscalling. Major allele was used as baseline, except rs1285933. Conditional logistic regression (CLR) odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI) and p-values (*p < 0.05, **p < 0.01). Conditional logistic regression (CLR) to severe cases versus controls IgG⁺ or controls IgG⁻. Some cells were left blank (–) since genotypes were missing distorting calculations.

Table 2
Haplotype analysis for the SNPs studied in *CLEC5A* and *NOD2* genes.

rs13237944/rs1285933/rs1285935	Cases	Controls	OR (IC 95%)	p value	OR (p value) Severe versus controls IgG ⁺	OR (p value) Severe versus controls IgG ⁻
<i>CLEC5A</i>						
A/C/C	0.16	0.19	0.71 (0.44–1.17)	0.18	0.82 (0.47)	0.55 (0.04**)
C/C/C	0.10	0.17	0.54 (0.30–0.97)	0.03*	0.57 (0.07**)	0.45 (0.02**)
C/C/T	0.14	0.13	0.97 (0.58–1.61)	0.90	0.91 (0.74)	0.1 (0.1)
C/T/C	0.59	0.50	Baseline			
rs2066843/rs751271	Cases	Controls	OR (IC 95%)	p value	OR (p value) Severe versus controls IgG ⁺	OR (p value) Severe versus controls IgG ⁻
<i>NOD2</i>						
C/G	0.44	0.41			Baseline	
C/T	0.36	0.41	0.80 (0.55–1.16)	0.25	0.76 (0.20)	0.81(0.35)
T/G	0.20	0.17	1.14 (0.73–1.77)	0.56	1.38 (0.20)	0.94 (0.83)

The SNPs in *CLEC5A* and *NOD2* showed very low values to D' and r^2 parameters indicating absence of LD. Major haplotype was used as baseline and haplotypes with frequencies lower than 0.05 were excluded from the analysis. OR, odds ratio with CI – 95% confidence interval.* $p < 0.05$.** $p < 0.01$.

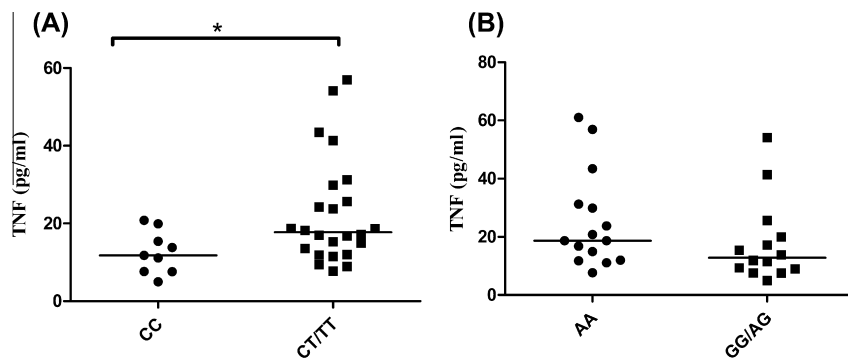


Fig. 1. TNF levels by SNP rs1285933 in *CLEC5A* (a) and rs4804803 in *DCSIGN* (b). TNF was quantified between 5 and 7 days of infection in patients with dengue confirmed by serological tests (IgM⁺). Differences in median between groups were compared using Mann–Whitney test. *Significant results considering $p < 0.05$.

IgG⁺ for haplotype C/C/C in *CLEC5A* was borderline, but in the same direction with similar magnitude (OR = 0.57; $p = 0.07$, Table 2).

3.3. Functional analysis shows that TNF levels are altered in patients' sera by *CLEC5A*rs1285933, but not –336 *DCSIGN* Snp

Since, we did find *CLEC5A* and *DCSIGN* SNPs associated with severe dengue, we moved on trying to investigate the impact of these genetic polymorphisms in the circulating TNF, IL-10, IL-13 and IFN γ levels. Sera from children during the critical phase of the disease were separated and patients were stratified according to their genotypes at rs1285933 SNP in *CLEC5A* or –336 SNP in *DCSIGN*. Among 38 patients enrolled in the functional study, 11 were classified as mild cases, mean age 7.2 ± 2.8 (7 females and 4 males) and 27 as severe cases, mean age 9.8 ± 2.7 (17 females and 10 males).

When TNF levels from the 5th to 7th day after disease onset (time of defervescence or critical phase) were compared between different genotypes by SNP rs1285933 in *CLEC5A* and –336 SNP in *DCSIGN*, we found that carriers of the T allele (CT/TT) showed significantly higher levels this cytokine compared with carriers of CC genotype (Fig. 1a). No significant differences in TNF levels were observed between carriers of the G allele (AG/GG) versus AA genotype to –336 SNP at *DCSIGN* (Fig. 1b).

No differences were observed in IL-10, IL-13 and IFN γ levels when patients were stratified according to the genotypes of rs1285933 at *CLEC5A* or rs4040803 at *DCSIGN* (data not shown). Also, TNF –308G>A or IL10–819C>T SNPs do not regulate TNF or IL-10 levels in this sample (data not shown).

3.4. Meta-analysis of –336 *DCSIGN*

After search in databanks, four papers were retrieved testing the –336G>A *DCSIGN* SNP association with dengue severity (Alagarasu et al. 2013a; Sakuntabhai et al., 2005; Silva et al., 2010; Wang et al., 2011). Since one of those papers (Silva et al., 2010) had insufficient data, genotype frequencies had to be estimated from allelic frequencies. We obtained for analysis a pool of 750 DHF cases (including our severe cases) and 836 DF cases (including our IgG⁺ controls, Supplementary Table 1). All genotype frequencies were in HWE and no evidence of publication bias was detected (data not shown). We adopted the random effects model because Cochran's Q statistic is underpowered when there are few studies are analyzed (Kavvoura and Ioannidis, 2008; Pereira et al., 2009).

When we performed meta-analysis testing severe dengue (or DHF) versus DF (our IgG⁺ controls were considered as DF) the pooled OR were not significant (OR_{allele} = 1.78; $p = 0.10$; OR_{genotype} = 0.71; $p = 0.65$; OR_{carrier} = 1.91; $p = 0.08$ – Fig. 2 and Supplementary Table 2). Next, we performed a new meta-analysis by geographic region (Asian or Brazilian population, separately) and we observed pooled OR values to allele and carriers associated with severe dengue when, only the frequencies from Asian population were grouped (OR_{allele} = 2.77; $p = 0.0001$; OR_{carriers} = 2.99; $p = 0.0001$ – Fig. 3 and Supplementary Table 3). On the other hand, when we grouped only Brazilian population the pooled OR to allele and carrier were associated with protection (OR_{allele} = 0.66; $p = 0.013$; OR_{carriers} = 0.68; $p = 0.06$ – data not shown).

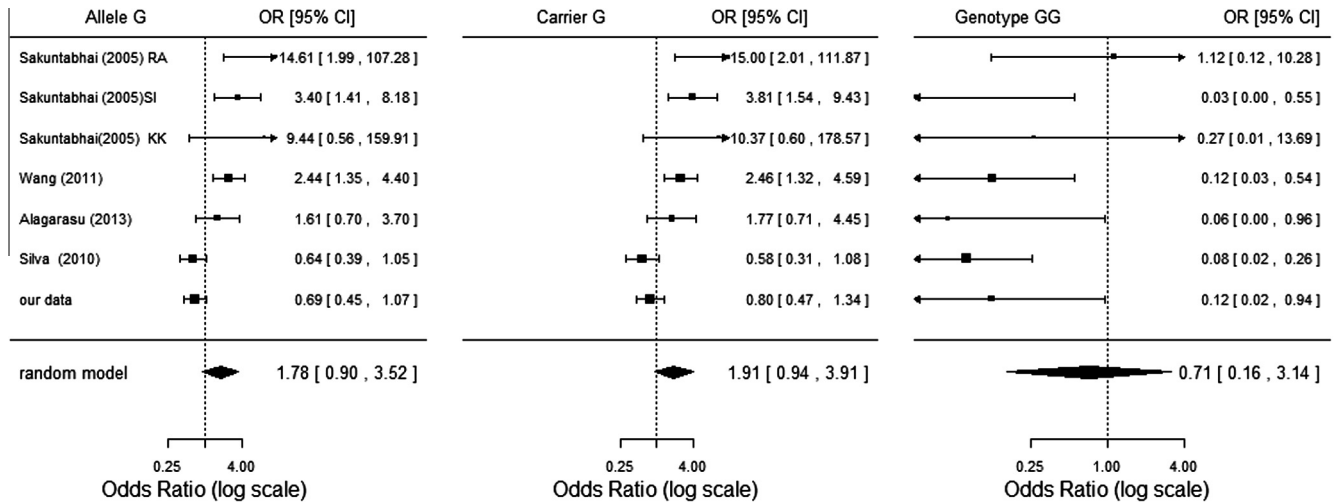


Fig. 2. Meta-analysis for $-336G>A$ DCSIGN SNP. Pooled OR (95% CI) was obtained by using Der Simonian and Laird method in the random effects model. Seven-hundred and fifty DHF cases (including our severe cases) and 836 DF cases (including our IgG⁺ controls). Two studies were automatically excluded to genotype analysis due to absence of GG individuals in both groups.

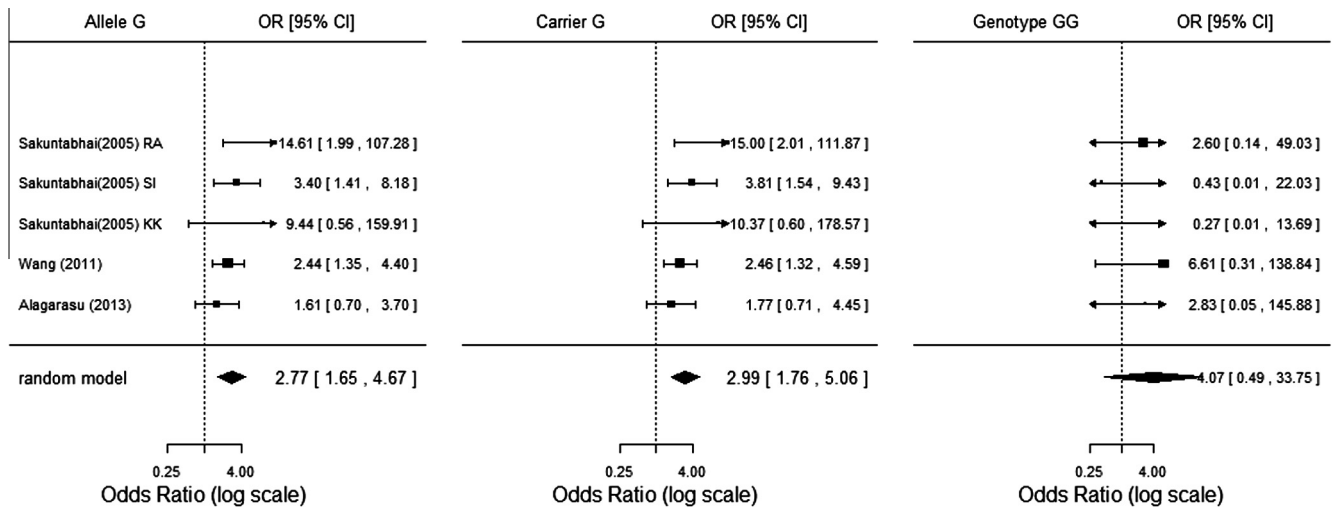


Fig. 3. Meta-analysis for $-336G>A$ DCSIGN SNP for the subgroup of Asians. Pooled OR (95% CI) was obtained by using Der Simonian and Laird method in the random effects model. Six-hundred and sixteen DHF cases (including our severe cases) and 409 DF cases (including our IgG⁺ controls). Three studies were automatically excluded to genotype analysis due to absence of GG individuals in both groups.

3.5. Meta analysis of -308 TNF

Four papers testing the $-308G>A$ TNF SNP in association with dengue severity were selected (Alagarasu et al., 2013c; Fernandez-Mestre et al., 2004; Garcia-Trejo et al., 2011; Perez et al., 2010). One was excluded for not having a DHF group (Perez et al., 2010). Overall, we obtained a pool of 193 DHF cases (including our severe cases), 422 DF cases (including our IgG⁺ controls – Supplementary Table 4) for the analysis. All genotype frequencies were in HWE and no evidence of publication bias was detected (data not shown).

The pooled OR values were not significant in comparisons between DF (including our controls IgG⁺) versus severe cases (our DHF) ($OR_{\text{allele A}} = 1.34$ $p = 0.23$; $OR_{\text{carrier}} = 1.49$ $p = 0.21$; $OR_{\text{Genotype AA}} = 1.16$ $p = 0.71$ – Supplementary Fig. 1).

4. Discussion

In this work, we support the hypothesis that the genetic make-up of individuals plays an important role in the development of

severe forms of dengue. We performed a case-control study, in which cases comprised children admitted in pediatric intensive care units during the 2008 epidemic and controls were chosen among individuals living in the neighborhood or households of the cases, excluding relatives. We found the TT genotype of rs1285933 SNP in *CLEC5A* gene associated with risk of severe dengue. Then, controls were stratified according dengue-specific IgG status and we assumed that IgG⁺ controls resulted from a case of mild (or classic) dengue fever, since we they were not admitted to a hospital. When patients were compared to IgG⁻ controls the results showed TT also associated with dengue risk and remained statistically significant, although a borderline p -value was found when IgG⁺ controls were used. Results were confirmed using the arranged SNPs in haplotypes. The C/C/C (rs13237944/rs1285933/rs1285935) haplotype was also associated with protection to severe dengue corroborating the result found to genotype analysis. Note that results are in opposite directions due to differences in the baseline for comparison. In the genotypic analysis we used CC as the baseline, while in the haplotypic analysis we used the C/I/C. Again stratification of the group for haplotype analysis,

using IgG status repeated the results observed for genotypes. In fact, we observed borderline *p*-values when severe cases versus IgG⁺ controls were compared. This result is probably due to a reduction of sample size, once the OR values had just a slight alteration. As described in methods, we would need a control group of 328 individuals to detect OR at least equal to 2 with 80% power according sample size calculations. So, we understand that this result is still preliminary and replication in novel populations is necessary to confirm the implication of the locus, although our combined IgG⁺ and IgG⁻ control group demonstrated an very important finding. Indeed, a confirmatory functional finding indicates that CT/TT in the rs1285933 was associated with higher levels of TNF. Thus, our data point to a new marker, the rs1285933 allele, as a severity marker for dengue with a functional role as measured by TNF.

The SNPrs1285933 (C/T) is located in a region that can regulate gene expression. Therefore, the allelic variant of this SNP could influence the *CLEC5A* expression and consequently the interaction of this receptor with DENV. As a matter of fact, *CLEC5A* (C-type lectin domain family 5 member A) also known as MDL-1 (myeloid DAP-12-associating lectin 1) is an important receptor involved in the pathogenesis of dengue. This receptor is expressed exclusively in monocytes and macrophages and is associated with the activation and differentiation of myeloid cells, although its ligands and biological functions remain to be determined (Bakker et al., 1999; Cheung et al., 2011).

The progression of the systemic inflammatory response syndrome to dengue shock is poorly understood. TNF has been implicated as critical mediator in this process (Bethell et al., 1998; Braga et al., 2001) and, interestingly, activation of MDL-1 (*CLEC5A*) by DENV resulted in septic shock in a mouse model that is mediated by TNF and nitric oxide (Cheung et al., 2011). Additionally, recent papers have shown that the *CLEC5A* gene expression can be used to differentiate DF patients from DHF (Gomes et al., 2010) as well as blocking of DENV/MDL-1 interaction can act as an antiviral therapy (Noble et al., 2010).

Studies conducted *in vitro* have shown that *CLEC5A* knockdown suppressed the release of TNF, IL-6, IL-8, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and interferon-inducible protein (IP)-10 by DV-infected macrophages and susceptible infected mice treated with *CLEC5A*-reactive antibodies lowered TNF and IP-10 serum levels in addition to the reduction of mortality and vascular leakage (Chen et al., 2008). Although, we can only speculate how *CLEC5A* rs1285933 T carriers are producing more TNF, it is likely that this variation is regulating MDL-1 (*CLEC5A* product) levels in the cell surface and, consequently, TNF production.

We also found GG genotype of the rs4804803 SNP in *DCSIGN* gene associated with protection against severe dengue. DC-SIGN is crucial to infection of dendritic cells by the four dengue virus serotypes (Navarro-Sanchez et al., 2003; Tassaneetrithep et al., 2003) and this promoter (-336 G/A) SNP has been described as a functional variation that regulates levels of DC-SIGN, since the G allele is associated with the presence of binding sites for transcriptional factors (Liu et al., 2003; Sakuntabhai et al., 2005).

The SNP -336 in *DCSIGN* has been previously associated with DHF risk in other populations (Sakuntabhai et al., 2005; Wang et al., 2011). In Thai cohort studied by Sakuntabhai et al. AG/GG genotypes was associated with protection when patients with DF were compared versus control group and associated with risk when DHF patients were compared versus DF. Here, we obtained a consensus estimate from the published studies, and we chose to perform the meta-analysis, between severe cases (or DHF) versus DF cases (in our data IgG⁺ controls with no history of severe dengue were used here as DF). The pooled OR including all studies showed no association between -336 SNP and severe dengue. However, when the meta-analysis was performed including only

Asian subpopulation, the results show an association of G allele with severity. Curiously, when Brazilian subgroup, the allele G was associated with protection, indicating that population-specific selective pressures in different geographic regions mainly exerted by pathogens are molding human genetic makeup and it has an important impact on specific routes to respond to dengue.

Furthermore, frequency of the G allele varied a lot among studies. In the control population, the Taiwanese showed 4% (Wang et al., 2011), while among Thais the frequency was 10% (Sakuntabhai et al., 2005). Brazilians exhibited 28–38% according to data obtained by us, in Rio de Janeiro, and others in Salvador, respectively (Silva et al., 2010).

Additionally, our meta-analysis also helped to diminish the ambiguity in TNF locus. The -308G>A SNP in the TNF promoter, has been systematically studied in different diseases and it seems that may impact outcome of intracellular pathogens (Cardoso et al., 2011a; de Jesus Fernandes Covas et al., 2013). But, meta-analysis showed that TNF -308 SNP not associated with dengue after combination of several publications.

We realize that it is quite difficult to perform meta-analysis if studies are not compatible (disease classifications, or age differences, for example), but we also understand the need to combine these studies to improve the discussion towards an integrated view to classify patients and analyze the genetic influence on dengue severity.

Here, we suggest that *CLEC5A* SNP control the intensity of immune inflammatory responses regulating unbalanced high TNF levels, reinforcing the importance of host genetics in dengue fever. Regarding the SNP rs4804803 in *DCSIGN* our meta-analysis suggests that there is association between this SNP and severe dengue in Asian population, although separately studies are indicating a role of the SNP in dengue fever, which will require further investigation.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: M.O.M., M.S.C., R.S.S., O.G.C., A.G.P., C.F.K. Performed the experiments: C.X.C., G.G., R.X.F., P.B., S.O.A. Analyzed the data: C.X.C., M.O.M., O.G.C., A.G.F., C.F.K. Contributed reagents/materials/analysis tools: P.B., C.F.K., M.O.M. Wrote the paper: C.X.C., C.K.F., M.S.C., A.G.F., M.O.M.

Acknowledgments

We are grateful to Cynthia Chester Cardoso, Lucia Elena Alvarado Arnez for technical support and critical reading of the paper and Mariana Gandini for TNF measurements. This work was supported by Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (internal funds), FIOCRUZ/PAPES V (from portuguese, Fundação Oswaldo Cruz/Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde; FAPERJ (from portuguese: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro); and CNPq (from portuguese, Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico). M.O.M. is CNPq and FAPERJ (JCNE) fellowship researcher.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.017>.

References

Alagarasu, K., Damle, I.M., Bachal, R.V., Mulay, A.P., Shah, P.S., Dayaraj, C., 2013a. Association of promoter region polymorphisms of CD209 gene with clinical

- outcomes of dengue virus infection in Western India. *Infect. Genet. Evol.* 17, 239–242.
- Alagarasu, K., Honap, T., Damle, I.M., Mulay, A.P., Shah, P.S., Cecilia, D., 2013b. Polymorphisms in the oligoadenylate synthetase gene cluster and its association with clinical outcomes of dengue virus infection. *Infect. Genet. Evol.* 14, 390–395.
- Alagarasu, K., Mulay, A.P., Singh, R., Gavade, V.B., Shah, P.S., Cecilia, D., 2013c. Association of HLA-DRB1 and TNF genotypes with dengue hemorrhagic fever. *Hum. Immunol.* 74, 610–617.
- Alter, A., de Leseleuc, L., Van Thuc, N., Thai, V.H., Huong, N.T., Ba, N.N., Cardoso, C.C., Grant, A.V., Abel, L., Moraes, M.O., Alcasi, A., Schurr, E., 2010. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum. Genet.* 127, 337–348.
- Appanna, R., Ponnampalavanar, S., Lum Chai See, L., Sekaran, S.D., 2010. Susceptible and protective HLA class I alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population. *PLoS One* 5, 218–228.
- Assuncao-Miranda, I., Amaral, F.A., Bozza, F.A., Fagundes, C.T., Sousa, L.P., Souza, D.G., Pacheco, P., Barbosa-Lima, G., Gomes, R.N., Bozza, P.T., Da Poian, A.T., Teixeira, M.M., Bozza, M.T., 2010. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J.* 24, 218–228.
- Bakker, A.B., Baker, E., Sutherland, G.R., Phillips, J.H., Lanier, L.L., 1999. Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9792–9796.
- Bethell, D.B., Flobbe, K., Cao, X.T., Day, N.P., Pham, T.P., Buurman, W.A., Cardoso, M.J., White, N.J., Kwiatkowski, D., 1998. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 177, 778–782.
- Blanton, R.E., Silva, L.K., Morato, V.G., Parrado, A.R., Dias, J.P., Melo, P.R., Reis, E.A., Goddard, K.A., Nunes, M.R., Rodrigues, S.G., Vasconcelos, P.F., Castro, J.M., Reis, M.G., Barreto, M.L., Teixeira, M.G., 2008. Genetic ancestry and income are associated with dengue hemorrhagic fever in a highly admixed population. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 762–765.
- Bourhis, L.L., Werts, C., 2007. Role of Nods in bacterial infection. *Microbes Infect.* 9, 629–636.
- Braga, E.L., Moura, P., Pinto, L.M., Ignacio, S.R., Oliveira, M.J., Cordeiro, M.T., Kubelka, C.F., 2001. Detection of circulant tumor necrosis factor- α , soluble tumor necrosis factor p75 and interferon- γ in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 229–232.
- Cardoso, C.C., Pereira, A.C., de Sales Marques, C., Moraes, M.O., 2011a. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol.* 6, 533–549.
- Cardoso, C.C., Pereira, A.C., Brito-de-Souza, V.N., Duraes, S.M., Ribeiro-Alves, M., Nery, J.A., Francio, A.S., Vanderborght, P.R., Parelli, F.P., Alter, A., Salgado, J.L., Sampaio, E.P., Santos, A.R., Oliveira, M.L., Sarno, E.N., Schurr, E., Mira, M.T., Pacheco, A.G., Moraes, M.O., 2011b. TNF $-308G>A$ single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J. Infect. Dis.* 204, 1256–1263.
- Chen, S.T., Lin, Y.L., Huang, M.T., Wu, M.F., Cheng, S.C., Lei, H.Y., Lee, C.K., Chiou, T.W., Wong, C.H., Hsieh, S.L., 2008. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* 453, 672–676.
- Cheung, R., Shen, F., Phillips, J.H., McGeachy, M.J., Cua, D.J., Heyworth, P.G., Pierce, R.H., 2011. Activation of MDL-1 (CLEC5A) on immature myeloid cells triggers lethal shock in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 4446–4461.
- de Jesus.Fernandes Covas, C., Cardoso, C.C., Gomes-Silva, A., Santos Oliveira, J.R., Da-Cruz, A.M., Moraes, M.O., 2013. Candidate gene case-control and functional study shows macrophage inhibitory factor (MIF) polymorphism is associated with cutaneous leishmaniasis. *Cytokine* 61, 168–172.
- de la, C.S.B., Garcia, G., Perez, A.B., Morier, L., Alvarez, M., Kouri, G., Guzman, M.G., 2006. Ethnicity and difference in dengue virus-specific memory T cell responses in Cuban individuals. *Viral. Immunol.* 19, 662–668.
- de la, C.S.B., Kouri, G., Guzman, M.G., 2007. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch. Virol.* 152, 533–542.
- Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsririsakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitkul, W., Puttikhant, C., Edwards, C., Duangchinda, T., Supasa, S., Chawansuntati, K., Malasit, P., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., 2010. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 328, 745–748.
- Falcon-Lezama, J.A., Ramos, C., Zuniga, J., Juarez-Palma, L., Rangel-Flores, H., Garcia-Trejo, A.R., Acunha-Alonso, V., Granados, J., Vargas-Alarcon, G., 2009. HLA class I and II polymorphisms in Mexican Mestizo patients with dengue fever. *Acta Trop.* 112, 193–197.
- Fernandez-Mestre, M.T., Gendzekhadze, K., Rivas-Vetencourt, P., Layrisse, Z., 2004. TNF- α -308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens* 64, 469–472.
- Fried, J.R., Gibbons, R.V., Kalayanarooj, S., Thomas, S.J., Srikiatkachorn, A., Yoon, I.K., Jarman, R.G., Green, S., Rothman, A.L., Cummings, D.A., 2010. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e617.
- Garcia, G., del Puerto, F., Perez, A.B., Sierra, B., Aguirre, E., Kikuchi, M., Sanchez, L., Hirayama, K., Guzman, M.G., 2011. Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection. *Hum. Immunol.* 72, 904–907.
- Garcia-Trejo, A.R., Falcon-Lezama, J.A., Juarez-Palma, L., Granados, J., Zuniga-Ramos, J., Rangel, H., Barquera, R., Vargas-Alarcon, G., Ramos, C., 2011. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with dengue fever. *Acta Trop.* 120, 67–71.
- Gomes, A.L., Wee, L.J., Khan, A.M., Gil, L.H., Marques Jr., E.T., Calzavara-Silva, C.E., Tan, T.W., 2010. Classification of dengue fever patients based on gene expression data using support vector machines. *PLoS One* 5, e11267.
- Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H.S., Martinez, E., Nathan, M.B., Pelegrino, J.L., Simmons, C., Yoksan, S., Peeling, R.W., 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, S7–16.
- Halstead, S.B., 1988. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239, 476–481.
- Halstead, S.B., Rojanasuphot, S., Sangkawibha, N., 1983. Original antigenic sin in dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 154–156.
- Halstead, S.B., Streit, T.G., Lafontant, J.G., Putvatana, R., Russell, K., Sun, W., Kanasa-Thanan, N., Hayes, C.G., Watts, D.M., 2001. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 180–183.
- Hottz, E.D., Oliveira, M.F., Nunes, P.C., Nogueira, R.M., Valls-de-Souza, R., Da Poian, A.T., Weyrich, A.S., Zimmerman, G.A., Bozza, P.T., Bozza, F.A., 2013. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J. Thromb. Haemost.* 11, 951–962.
- Kavvoura, F.K., Ioannidis, J.P., 2008. Methods for meta-analysis in genetic association studies: a review of their potential and pitfalls. *Hum. Genet.* 123, 1–14.
- Kindberg, E., Mickiené, A., Ax, C., Åkerlind, B., Vene, S., Lindquist, L., Lundkvist, Å., Svensson, L., 2008. A deletion in the chemokine receptor 5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis. *Acta Trop.* 197, 266–269.
- Khor, C.C., Chau, T.N., Pang, J., Davila, S., Long, H.T., Ong, R.T., Dunstan, S.J., Wills, B., Farrar, J., Van Tram, T., Gan, T.T., Binh, N.T., Tri le, T., Lien le, B., Tuan, N.M., Tham, N.T., Lanh, M.N., Nguyet, N.M., Hieu, N.T., Van, N.V.C.N., Thuy, T.T., Tan, D.E., Sakuntabhai, A., Teo, Y.Y., Hibberd, M.L., Simmons, C.P., 2011. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for dengue shock syndrome at MICB and PLCE1. *Nat. Genet.* 43, 1139–1141.
- Kurane, I., 2007. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 329–340.
- Liu, H., Yu, W., Liou, L.Y., Rice, A.P., 2003. Isolation and characterization of the human DC-SIGN and DC-SIGNR promoters. *Acta Trop.* 313, 149–159.
- Loke, H., Bethell, D., Phuong, C.X., Day, N., White, N., Farrar, J., Hill, A., 2002. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and Fc gamma receptor Ila genes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67, 102–106.
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Despres, P., 2003. 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.* 4, 723–728.
- Noble, C.G., Chen, Y.L., Dong, H., Gu, F., Lim, S.P., Schul, W., Wang, Q.Y., Shi, P.Y., 2010. Strategies for development of Dengue virus inhibitors. *Antiviral Res.* 85, 450–462.
- Nogueira, R.M., Eppinghaus, A.L., 2011. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 255–256.
- Pacheco, A.G., Cardoso, C.C., Moraes, M.O., 2008. IFNG +874T/A, IL10 $-1082G/A$ and TNF $-308G/A$ polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum. Genet.* 123, 477–484.
- Pereira, A.C., Brito-de-Souza, V.N., Cardoso, C.C., Dias-Baptista, I.M., Parelli, F.P., Venturini, J., Villani-Moreno, F.R., Pacheco, A.G., Moraes, M.O., 2009. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for $-819C/T$ in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 10, 174–180.
- Perez, A.B., Garcia, G., Sierra, B., Alvarez, M., Vazquez, S., Cabrera, M.V., Rodriguez, R., Rosario, D., Martinez, E., Denny, T., Guzman, M.G., 2004. IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *J. Med. Virol.* 73, 230–234.
- Perez, A.B., Sierra, B., Garcia, G., Aguirre, E., Babel, N., Alvarez, M., Sanchez, L., Valdes, L., Volk, H.D., Guzman, M.G., 2010. Tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum. Immunol.* 71, 1135–1140.
- R-Development-Core-Team, 2008. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0.
- Rico-Hesse, R., 2003. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv. Virus Res.* 59, 315–341.
- Rodriguez-Barraquer, I., Cordeiro, M.T., Braga, C., de Souza, W.V., Marques, E.T., Cummings, D.A., 2011. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e935.
- Sakuntabhai, A., Turbpaiboon, C., Casademont, I., Chuansumrit, A., Lowhnoo, T., Kajaste-Rudnitski, A., Kalayanarooj, S.M., Tangnararatthakit, K., Tangthawornchaikul, N., Vasanawathana, S., Chaiyaratana, W., Yenchitsomanus, P.T., Suriyaphol, P., Avirutnan, P., Chokephaibulkit, K., Matsuda, F., Yoksan, S., Jacob, Y., Lathrop, G.M., Malasit, P., Despres, P., Julier, C., 2005. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat. Genet.* 37, 507–513.
- Sierra, B., Perez, A.B., Vogt, K., Garcia, G., Schmolke, K., Aguirre, E., Alvarez, M., Volk, H.D., Guzman, M.G., 2010. MCP-1 and MIP-1 α expression in a model resembling early immune response to dengue. *Cytokine* 52, 175–183.

- Silva, L.K., Blanton, R.E., Parrado, A.R., Melo, P.S., Morato, V.G., Reis, E.A.G., Dias, J.P., Castro, J.M., Vasconcelos, P.F.C., Goddard, K.A.B., Barreto, M.L., Reis, M.G., Teixeira, M.G., 2010. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. *Eur. J. Hum. Gen.* 18, 1221–1227.
- Stephens, H.A., Klaythong, R., Sirikong, M., Vaughn, D.W., Green, S., Kalayanarooj, S., Endy, T.P., Libraty, D.H., Nisalak, A., Innis, B.L., Rothman, A.L., Ennis, F.A., Chandanayingyong, D., 2002. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens* 60, 309–318.
- Tassaneetrithep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D.L., Steinman, R.M., Schlesinger, S., Marovich, M.A., 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 823–829.
- Teixeira, M.G., Costa, M.D.N., Barreto, F., Barreto, M.L., 2009. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cadernos De Saude Publica* 25, S7–S18.
- Temporao, J.G., Penna, G.O., Carmo, E.H., Coelho, G.E., do Socorro Silva Azevedo, R., Teixeira Nunes, M.R., da Costa Vasconcelos, P.F., 2011. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 938–940.
- Torres, O.A., Calzada, J.E., Beraun, Y., Morillo, C.A., Gonzalez, C.I., Gonzalez, A., Martin, J., 2009. Association of the macrophage migration inhibitory factor –173G/C polymorphism with Chagas disease. *Hum. Immunol.* 70, 543–546.
- Wang, L., Chen, R.F., Liu, J.W., Lee, I.K., Lee, C.P., Kuo, H.C., Huang, S.K., Yang, K.D., 2011. DC-SIGN (CD209) Promoter –336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e934.
- WHO/TDR, 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control – New edition. World Health Organization (WHO) and the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). <http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf>. (downloaded in 26.12.2011).
- Wilder-Smith, A., Ooi, E.E., Vasudevan, S.G., Gubler, D.J., 2010. Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. *Curr Infect Dis Rep* 12, 157–164.

CAPÍTULO 3

CASO CONTROLE GENÉTICO E ESTUDO FUNCIONAL DO SNP RS1285933 NO GENE *CLEC5A* NA INFECÇÃO POR DENGUE

Recentemente muitos trabalhos do tipo caso controle têm avaliado a associação entre SNPs localizados em genes mediadores da resposta imune com o desfecho da dengue. Entretanto, na maioria das vezes esses resultados não são replicados em diferentes populações. Estudos do tipo caso-controle genético são muito suscetíveis a erros e associações espúrias. Logo, para que uma associação encontrada seja de fato validada, torna-se necessário a replicação em diferentes populações.

A participação do receptor *CLEC5A* na imunopatogênese da dengue foi descrita tanto na introdução assim como no artigo apresentado no capítulo anterior. Dando continuidade aos nossos estudos, conduzimos um novo estudo de associação em uma segunda população independente proveniente da cidade de Recife- PE com o objetivo de replicar os achados referentes à associação do SNP rs1285933 à gravidade na dengue. Devido à replicação da associação nós damos continuidade a nossa investigação realizando um estudo funcional para um melhor entendimento do receptor *CLEC5A* e do SNP rs1285933 durante a infecção por dengue. Foram utilizados modelos de infecção *in vitro*, bem como amostras de pacientes com dengue.

Toda a metodologia, resultados e discussão deste estudo está apresentada no artigo em seguida, que foi submetido para publicação para o periódico *Human Immunology*.

1 **GENETIC CASE-CONTROL AND FUNCTIONAL STUDY OF**
2 **rs1285933 CLEC5A SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN**
3 **DENGUE**

4 **Caroline Xavier-Carvalho^{a,b}, Renata Duarte da Silva Cezar^c, Naishe Matos Freire^d,**
5 **Carla Mola, Victor Fiesta^b Thiago Gomes de Toledo-Pinto^a, Luciana Gomes Fialho**
6 **Torres^b, Rodrigo Feliciano do Carmo^e, Luydson Richardson Silva Vasconcelos^{d,f}, Marli**
7 **Tenório Cordeiro^g, Paulo Baptista^d, Elzinandes leal de Azeredo^b, Rivaldo Venâncio da**
8 **Cunhaⁱ, Luiz José de Souza^j, Antonio Guilherme Pacheco^h, Claire Fernandes**
9 **Kubelka^b, Patrícia Moura^{c,f}, Milton Ozorio Moraes^a**

11 **Affiliations:**

12 a-Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro,
13 RJ, Brazil

14 b-Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

15 c-Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

16 d-Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

17 e-Colegiado de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil

18 f-Laboratório de Doenças Transmissíveis, Departamento de Parasitologia, FIOCRUZ, Recife, PE, Brasil

19 g-LAVITE, CPqAM, FIOCRUZ, Recife, PE, Brasil

20 h- Programa de Computação Científica (PROCC) – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

21 i-Departamento de Clínica Médica, FM, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS,
22 Brazil

23 j-Centro de Referência em Dengue e Faculdade de Medicina, Campos de Goytacazes, RJ, Brazil

24 Corresponding author at Oswaldo Cruz Institute - FIOCRUZ Av. Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro-
25 Brasil, 21040-900. E mail adress: milton.moraes@fiocruz.br (Milton Moraes)

26 **Abstract**

27 Outbreaks of Zika, Dengue and Chikungunya viruses especially in the Americas poses as a
28 global threat due to their rapid spread and difficulties to control the vector. Extreme
29 phenotypes are often observed such as asymptomatic to severe clinical manifestations that
30 are well studied in dengue. Host variations have also been shown as an important contributor
31 to the disease outcome where many case-control studies associated single nucleotide
32 polymorphism (SNPs) with severe dengue. Here, we found TC genotype and carrier T for
33 SNP rs1285933 in C-type lectin superfamily member 5 (CLEC5A) gene associated with
34 severe dengue, in a Northern Brazilian population (OR=2.13; p value=0.03; OR =2.64; p
35 value=0.01, respectively). We also tested the functional effect of the CLEC5A
36 demonstrating that the protein is upregulated on the surface of human monocytes after an *in*
37 *vitro* Dengue virus infection. CLEC5A was correlated with viral load inside the monocytes
38 (Spearman test r=0.55; p=0.008) and TNF production on culture supernatants (Spearman test
39

42 $r = 0.72$; $p = 0.03$). Analysis of mRNA in blood samples from DENV4 infected patients
43 exhibiting mild symptoms showed that CLEC5A mRNA expression is correlated with TNF
44 (Spearman=0.65; $p = 0.0001$) and other immune mediators. Monocytes from rs1285933
45 TT/TC individuals showed a lower CLEC5A expression than CC. However, in these cells,
46 CLEC5A was not correlated with TNF production. In summary, we confirm that CLEC5A is
47 genetically associated with dengue severity outcome, playing a central role during immune
48 response triggered during Dengue Virus infection and rs1285933 is a relevant SNP being
49 able to regulate signaling pathways after interaction between dengue virus and CLEC5A
50 receptor.

51

52 **Keywords**

53 Dengue

54 CLEC5A

55 Dengue Polymorphisms

56 Severe dengue

57 SNPs

58 CLEC5A SNPs

59

60 **1- Introduction**

61 The emergence of arboviruses such as Zika and Chikungunya along with high prevalence
62 dengue viruses (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) simultaneously circulating in
63 tropical and subtropical countries especially in Brazil demands better understanding
64 mechanisms where co-infection or subsequent infections may lead to severe disease [1,2].
65 Dengue alone is estimated to have about three times higher case numbers than registered [3].
66 Occurrence of severe cases is believed to be more frequent in sequential infections by a
67 distinct serotype, however some severe cases also occur in primary infections [4–7]. In fact,
68 along the past ten years, studies have shown that host variations also has an essential
69 influence in dengue outcome. Genetic epidemiological studies found SNPs associated with
70 dengue outcome although most of them were not replicated independently. Nevertheless,
71 genes associated with innate immunity such as oligoadenylate synthetases (OASs), mannose
72 binding lectin (MBL2), MICB, PLCE1 were detected either in Genome-wide association
73 studies (GWAS) or case-control designs [8–13].

74 C-type lectin superfamily member 5 (CLEC5A) also known MDL-1 (myeloid DAP-
75 12 associating lectin 1) is a protein belonging to C-type lectin superfamily being expressed
76 exclusively in myeloid cells [14]. CLEC5A does not seem responsible for virus entry in

77 target cells, but has a crucial involvement in inflammatory pathways through association and
78 consequently phosphorylation of the adaptor protein DNAX activating protein of 12kDa
79 (DAP12) [14–16]. DAP12 is a type I transmembrane adapter protein containing an
80 immunoreceptor tyrosine-based activating motifs (ITAMs). The agonist binds to the receptor
81 associated with DAP12, inducing phosphorylation of tyrosine residues in Src kinases
82 presented in ITAM that recruits tyrosine kinases (SIK) and finally leading to a cellular
83 signaling cascade [17,18]. ITAMs can recruit tyrosine kinases or tyrosine phosphatases
84 [19,20]. During the canonical DAP12 signaling [15,18] the induction of cytokines and
85 chemokines, as TNF, IL-1, IL-6, IL-8, MIP1 α (21), RANTES and IP10 occurs [16,22].

86 Activation of CLEC5A by Dengue virus (DENV) results in septic shock mediated by
87 TNF and nitric oxide, in mouse model [23,24]. Additionally, monoclonal antibodies against
88 CLEC5A can inhibit plasma leakage, hemorrhagic episodes and reduce mortality (16).
89 Indeed, our previous findings studying patients from Rio de Janeiro showed that near-gene
90 rs1285933 SNP in CLEC5A was associated with risk for severity in dengue fever and also
91 associated with higher level of TNF in the serum of patients [10].

92 Here, we aimed to replicate our previous genetic results for rs1285933 SNP in a second
93 Brazilian population and investigate the functional effect for CLEC5A performing *in vitro*
94 experiments and analyzing blood samples from dengue patients.

95

96 **2- Material e Methods**

97 **2.1- Dengue patients, Association study**

98 A total of 213 individuals from 1 to 18 years old (97 females, 8.3 ± 4 mean years old;
99 116 males 9 ± 4.7 years old) were included in this study. All individuals were hospitalized at
100 the Oswaldo Cruz University Hospital – University of Pernambuco (HUOC-PE) from
101 January 2010 to December 2011. All patients were positive for dengue through ELISA IgM,
102 IgG, NS1 or Dengue PCR. Tests were performed in the laboratory of Virology and
103 Experimental Therapy (LAVITE) of the Research Institute Aggeu Magalhães, Oswaldo
104 Cruz Foundation, Recife.

105 Patients were followed up every day during hospitalization and parameters such as
106 rash, days of fever, abdominal pain, bleedings, plasma leakage, pleural and cavity effusion,
107 hemoconcentration, hypotension, platelets and leucocytes levels were evaluated. We
108 considered as mild, when patients exhibited no or only one of the following warning signs:

109 hypotension, mucosal bleeding, abdominal pain, persistent vomiting and lows levels of
110 platelets and no plasma/cavitory, leakage/effusion or hemoconcentration. On the other hand,
111 patients were considered as severe cases when hypotension and hemoconcentration or
112 effusions together with severe bleeding episodes were presented. This study was approved
113 by Ethical Committee in Research of UPE under the protocol n. CEP/UPE 186/08.

114

115 **2.2- DNA extraction and Genotyping**

116 DNA extraction was performed using the Wizard genomic DNA Purification Kit
117 (Promega, Madison, WI) following the protocol as described by the manufacturer and the
118 polymorphism rs1285933 (CLEC5A) were genotyped by allelic discrimination – Real Time
119 PCR using TaqMan system (Invitrogen/ ThermoFisher).

120

121 **2.3- Dengue virus and titration**

122 For Dengue virus propagation and titration, methods were described elsewhere [25].
123 Briefly, DENV serotype 2, strain Thailand 16681 [26] were propagated in *Aedes albopictus*
124 cell line (C6/36 cells) during 7 days in Dulbecco's modified Eagle medium
125 (Gibco/Thermofisher, CA, USA) at 28°C. After this period, supernatants were collected,
126 centrifuged at 1.000g, 4°C for 10 minutes, and then aliquoted and stored at -70°C.
127 Alternatively, the supernatants were ultracentrifuged at 100.000g for 1h concentrating 20
128 times. Then, supernatants were filtered, aliquoted and stored at -70°C. Titration was
129 performed also in C6/36 using standard TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) [27]

130

131 **2.4- Cell culture and viral infection**

132 Blood from 24 health volunteers (19 female, 34±7 and 5 males, 32±5.4) were
133 collected in EDTA tubes (BD Bioscience, San Jose, CA). Peripheral blood mononuclear
134 cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient (Ficoll-Paque Premium GE
135 Healthcare Bioscience). Monocytes were purified using Dynabeads untouched human
136 monocytes kit (Invitrogen/ThermoFisher) according to the manufacturer and cultivated in
137 RPMI-1640 (Invitrogen/ ThermoFisher, MD,USA) containing 10% serum fetal bovine (SFB,
138 Hyclone) and 1% penicillin-streptomycin (GIBCO) at 37°C, 5% CO₂. Cells were adsorbed

139 with the virus during 90 minutes in medium SFB-free. Then, medium was replaced and cells
140 were maintained for 24 or 48h at 37°C, 5% CO₂.

141

142 **2.5- Flow Cytometry assays**

143 For extracellular labelling, cells were washed with 1% bovine serum albumin (BSA)
144 and 0.1% of sodium azide in PBS buffer. Then, cells were incubated for 30 min with
145 unspecific blocking buffer (1% BSA, 5% autologous plasma, 0.1% sodium azide). Then,
146 cells were incubated for 30 min with mouse anti-human/MDL-1 CLEC5A-PE (R&D
147 Systems, Minneapolis, MN, USA), anti CD14 PerCP (BD Bioscience) or IgG2b isotype
148 (R&D Systems) and fixed with wash buffer containing 2% paraformaldehyde (SIGMA).

149 For intracellular labelling, cells were fixed with 2% paraformaldehyde and
150 permeabilized with washing buffer containing 0.15% of saponin. Cells were incubated for
151 60 min at 4°C with anti-DENV complex (Millipore, Billerica, MA, USA) and 30 min with
152 IgG anti mouse Alexa Fluor 488 ((Molecular Probes/Life Technologies). Cells were
153 acquired by Accuri C6 cytometer (BD Bioscience). Analysis were performed in FLOWJO
154 software (Treestar, Ashland, OR, USA).

155

156 **2.6- TNF and NS1 viral quantification by ELISA**

157 TNF and non-structural viral protein (NS1) were quantified in cell culture
158 supernatants using TNF ELISA kit (Peprotech, San Francisco, CA. USA) and NS1 Dengue
159 ELISA kit (Panbio/Australia), respectively, according the manufacturer instructions.

160

161 **2.7- Whole blood patient samples**

162 Samples from 47 dengue adult patients were collected during 2013 epidemic in the
163 states of Rio de Janeiro (RJ) and Mato Grosso do Sul (MS), Brazil. Samples were collected
164 in Paxgene tubes (Preanalytix/ QIAGEN) and storage at -70°C. It was considered dengue if
165 the sample was positive for at least of the following tests: IgM antibody-capture (MAC)-
166 ELISA and IgG-ELISA [28], PCR [29] and NS1 Ag Strip (Biorad Laboratories, Marnes-La-
167 Coquette, France). The clinical characteristics for these patients are well described here [30].

168

169 **2.8- RNA extraction and cDNA synthesis**

170 For *in vitro* assays, total RNA was extracted by Trizol (Invitrogen/ Life
171 Technologies, CA, EUA) methods. RNA integrity was analyzed by 1.2% gel agarose
172 electrophoresis. RNA from Blood sample patients collected in paxgenes tubes were
173 performed using Blood RNA kit (PreAnalytiX, QIAGEN/BD) according to the manufacturer
174 instructions. Subsequently, RNA integrity was analyzed by capillary electrophoresis using
175 Agilent 2100 Bionalyzer and kit Agilent Total RNA according to the manufacturer
176 instructions (Agilent). After, RNA from pax genes or *in vitro* assays were quantified in
177 Qubit Fluorimetric Quantitation (Thermo Fisher) using Qubit RNA HS assay kit according
178 manufacturer instructions. A total of 500 ng of total RNA extracted for *in vitro* assays was
179 reverse transcribed in complementary DNA (cDNA) using Oligo-dT (Invitrogen/ Thermo
180 Fisher) and Super Script III Reverse transcriptase (Invitrogen/ ThermoFisher) while same
181 amount of total RNA from paxgenes tubes was reverse transcribed using Super Script Vilo
182 cDNA synthesis Kit (Thermo Fisher scientific).

183

184 **2.9- Quantitative and multiplex real time PCR**

185 PCR was performed using SyBr green in StepOne plus (ThermoFisher) with standard
186 cycling conditions. cDNA from blood sample patients were amplified by multiplex real time
187 PCR using Evagreen (Applied Biosystem/ ThermoFisher) in Fluidigm Biomark microfluidic
188 system, according to the manufacturer. Methodology is fully described elsewhere [31]. In all
189 analyses, Ribosomal L13 protein (RPL13) gene was used as the housekeeping gene and
190 data were analyzed by $2^{-\Delta Ct}$

191

192 **2.10- Statistical analysis**

193 Non-parametric and paired Wilcoxon t test or Friedman test were applied when
194 adequate. Correlations were performed using Spearman r test. All analyses were conducted
195 in Prism software 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

196 Frequencies between mild and severe patients were compared by logistic regression
197 adjusted for sex and age, Hardy Weinberg Equilibrium (EHW) were tested by Chi square
198 test. Analysis were performed using genetic R package version 2.11.1[32].

199 **3- Results**

200 **3.1- SNP analysis**

201 Firstly, we confirmed that rs1285933 SNP was not deviating from Hardy Weinberg
202 Equilibrium (HWE) (data not shown). We found the heterozygous genotype CT (OR =2.64;
203 p value=0.01) and T carriers (CT+TT) (OR=2.13; p value=0.03) were associated with
204 severity in dengue patients (Table 1).

205

206 **3.2- CLEC5A protein expression in DENV-infected monocytes**

207 Since we found CLEC5A associated with severe dengue in a second and independent
208 population of Brazilian children, we decided to describe CLEC5A expression during dengue
209 infection to explore the functional effect of rs1285933 SNP.

210 Monocytes purified from adult healthy volunteers' blood were infected with dengue
211 virus (serotype 2, strain 16681) for 24 or 48 h. By flow cytometry analysis, after doublets
212 exclusion, monocytes were selected on the morphological area (Fig S1). We can observe
213 that CLEC5A labelling was detected homogeneously 24h and 48h after DENV infection
214 (Fig. 1A). We observed an increase in CLEC5A protein detection when CLEC5A was
215 detected in cell surface comparing 24h infected cells with uninfected cells (NI) (Fig. 1B).
216 Additionally, levels of CLEC5A mRNA were also higher in DENV-infected monocytes for
217 24h (Fig. S2). In the same way, DENV intracellular labelling were correlated with CLEC5A
218 detection at 24h of infection (Fig. 1C).

219

220 **3.3- CC Genotype of rs1285933 SNP showed a higher CLEC5A expression**

221

222 The CC individuals showed a higher CLEC5A production than carriers T (CT/TT)
223 after 24h of DENV infection in monocytes, represented by higher intensity in detection
224 (MIF) or higher frequencies in CLEC5A positive cells (Fig. 2A). This effect was not
225 observed after 48h of infection (data not shown). We could not detect any differences
226 between DENV loads when we compared CC vs CT/TT genotypes. Quantification of non-
227 structural protein (NS1) in cell culture supernatants according to genotypes after 24h (Fig
228 2B) or 48h was not different either (data not shown). CLEC5A mRNA was also quantified
229 by real-time PCR in total blood of DENV4-infected patients exhibiting mild dengue. In this

230 group, CC individuals showed a borderline ($p=0.08$) increase in CLEC5A expression
231 compared with T-carriers individuals (Fig 2C).

232

233 **3.4- TNF expression and protein secretion is positively correlated with** 234 **CLEC5A, but not associated with rs1285933 SNP**

235

236 After 48h of DENV infection in monocytes, TNF levels detected in supernatants
237 were correlated with CLEC5A protein (Spearman=0.72; $p=0.03$) on monocyte surface
238 analyzed by flow cytometry (Figure 3A). No correlation was found between CLEC5A and
239 TNF production for 24h of infection (data not shown), although RNA levels for TNF and
240 CLEC5A were correlated for 24h of dengue infection in monocytes (Spearman test $r = 0.78$;
241 $p = 0.03$, Fig. S3).

242 In addition, in the whole blood cells from dengue patients, mRNA expression for
243 CLEC5A and TNF were positively correlated (Fig. 3B) along with pro- or anti-inflammatory
244 and antiviral cytokines such as IL1 β , IL18, IDO, NLRP3, TGF β , IL10, IL15 and IFN β (Fig.
245 S4). Nevertheless, no differences were observed in TNF secretion from monocytes in *in*
246 *vitro* assays or TNF mRNA levels in total blood patients according to rs1285933 SNP (Fig
247 3C and 3D)

248

249

250

251

4- Discussion

252 Here, we show that CLEC5A, a C-type lectin surface molecule is upregulated in
253 DENV-infected human circulating monocytes and it is correlated with the TNF production,
254 besides correlated with many others mediators in blood cells from dengue patients. CLEC5A
255 has been reported as central receptor either in dengue or other flavivirus infections
256 [10,16,21,33] and the association of rs1285933 SNP with dengue severity reinforce our
257 previous results where TT genotyped was found associated with severe dengue and carrier T
258 showed a borderline association in an independent Brazilian population also enrolling
259 children [10]. Here, we compared mild *versus* severe patients (case-case study). The use of
260 mild cases as controls is a common strategy in association studies for complex diseases [34].
261 Besides, we are looking for association with severity instead dengue *per se* and our previous
262 case-control performed in Southern of Brazil (Rio de Janeiro) is composed only of patients
263 with severe dengue [10]. The replication in association studies is important to avoid spurious

264 association, thus, we consider that we replicated rs1285933 SNP results in two independent
265 populations.

266 Brazilians showed a high admixture according to EPIGEN database, that was a
267 project designed to better understand the genetic variability of Brazilians from different parts
268 of the country (Salvador, Bambuí and Pelotas) [35]. Searching EPIGEN showed that the C
269 allele frequencies at the southern populations from Bambuí and Pelotas were 52%, and 46%,
270 respectively, that was very similar to Europeans retrieved from 1000 genomes (47%). On the
271 other hand, the C allele frequency in Salvador (Northeast of Brazil) was 34% that was
272 similar to the frequency observed in Africans recovered from 1000 genomes (39%). Recife
273 is located also in Northeast of Brazil, but shows a lower frequency of African ancestry as
274 compared to Salvador [36]. The frequency of the C allele was 47%, while our previous
275 study from Rio de Janeiro (Southern of Brazil) the frequency for C allele was 49%, which
276 was very similar to what we observe in Europeans. Therefore, the frequency of the
277 rs1285933 SNP in different Brazilians populations is regular with the data obtained here
278 reinforcing that genetic replication is consistent.

279 Previous studies have already demonstrated an up regulation for CLEC5A after
280 dengue infection [16,37] and rs1285933 SNP has been reported as a quantitative trait loci
281 (eQTL) for CLEC5A [38]. Our results suggest the rs1285933 SNP may be an eQTL for
282 dengue-stimulated monocytes. Indeed, CT/TT genotypes that are associated with severity
283 risk were also associated with lower levels of CLEC5A and there might be alternative
284 explanations for this result. It has been suggested that DAP12 can present inhibitory or
285 stimulatory activities depending on the avidity binding between receptor associated with
286 DAP12 (CLEC5A, in this case) and its ligand [17]. It is likely that during high avidity
287 ligation, DAP12 is fully activated and can synergize with other pathways, such as TLR, for
288 example. In contrast, during partial DAP12 activation the signaling directs an inhibitory
289 pathway [17]. It has been demonstrated a weak binding between Dengue virus and CLEC5A
290 [39,40]. Thus, we can hypothesize that when CLEC5A is less expressed (CT/TT), and
291 partial DAP12 activation is at work, severe dengue is observed once these individuals are
292 not able to develop an efficient immune response. On the other hand, CC genotype would be
293 associated with protection to severe dengue activating a better response through full DAP12
294 signaling and possible synergy with other antiviral pathways, such as TLRs.

295 Other hypothesis is that other SNPs can be contributing for the observed functional
296 effects. A recent study shows the synergistic effect between DC-SIGN and mannose

297 receptor (MR) with CLEC5A-DAP12 signaling [40], highlight, that unknown mechanisms
298 are involved in DAP12 signaling after DENV binding. DC-SIGN and MR are crucial
299 receptors for dengue infection in monocytes and dendritic cells, while SNPs in these genes
300 could also influence the DENV binding avidity and consequently DAP12 signaling.

301 We failed to confirm that rs1285933 is associated with TNF levels *in vitro* or *in vivo*.
302 We showed previously that sera TNF levels are higher among rs1285933 T-carriers [10]. It
303 is likely that our previous data could be a result of TNF secretion by different cellular
304 sources when quantified in sera [10]. Here, we used only supernatants from purified
305 monocytes or in total blood (for mRNA detection) of dengue patients, which might explain
306 the discrepancy since limited sources for TNF release were used. It is important to highlight
307 that cases-only genetic epidemiological study showed here was performed in children and *in*
308 *vitro* functional experiments in adults. Moreover, patients enrolled for the *in vivo* functional
309 analysis presented mild dengue fever caused by DENV4, and these differences could affect
310 results.

311 In summary, the results showed here highlight the important role of CLEC5A in
312 dengue immunopathogenesis and the participation of rs1285933 SNP in signaling pathways
313 after CLEC5A- DAP12 activation, it can be extended for others febrile infections causing by
314 other arboviruses that have immunopathogenesis poorly understood, such as Zika,
315 Chikungunya, West Nile and Japanese encephalitis.

316

317 **Conflict of interest**

318 No conflict of interest exist

319

320 **Funding**

321 The authors wish to thank the Founding Agency for Science of Pernambuco (FACEPE).
322 Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ) and Oswaldo Cruz Institute
323 (IOC) - Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ)

324

325 **Acknowledgments**

326 We are grateful to Leonardo Ribeiro for critical reading of the paper and to Fernanda Kehdy,
327 Eduardo Tarazona-Santos, Bernardo L. Horta, Alexandre C. Pereira, Mauricio L. Barreto,
328 M. Fernanda Lima-Costa for availability of EPIGEN data.

329

330

331 **Figure Legends**

332 Figure 1 - CLEC5A detection in DENV-infected monocytes. Dengue virus serotype 2 (16681 strain) was used
333 to infect monocytes for 24 or 48h using a 5:1 MOI. NI, 24h uninfected cultures. Cells were labeled with anti-
334 human CLEC5A-PE, isotype IgG2b, Anti-CD14 PerCP, or antibody anti Dengue Complex (DENV 1-4)
335 followed by anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 and analyzed by flow cytometry. (A) Median for CLEC5A
336 expression among nine individuals was compared among NI, 24 and 48h conditions, using Friedman test. (B).
337 Median of CLEC5A expression (NI and 24 hr) were compared among monocytes from thirteen individuals
338 using Wilcoxon t test. *p value < 0.05. (C) DENV-labeled monocytes were positively correlated with CLEC5A
339 expression.

340

341 Figure 2: CLEC5A expression and viral load according to rs1285933 SNP. A) CLEC5A protein was compared
342 in CC versus CT/TT genotypes by t test; *p value < 0.05. B) Dengue virus was labeled using flow cytometry
343 intracellular labeling or by NS1 ELISA detection in supernatants. No difference was observed according
344 genotype. C) CC patients showed an increased borderline expression (p=0.08) in RNA levels compared with T
345 carriers.

346

347 Figure 3: TNF levels, CLEC5A expression and SNP rs1285933. TNF was quantified by ELISA in supernatants
348 of DENV-infected monocytes for 24 or 48h (A). CLEC5A protein quantified by cytometry and there was a
349 positive correlation (Spearman test) with TNF levels 48h after infection, quantified by ELISA (A). TNF levels
350 did not differ according genotypes in *in vitro* infections either protein detection by ELISA (C) or mRNA
351 detection in whole blood from patient samples (D).

352

353 **Tables**

354 Table 1: Genotype, allelic and carrier frequencies for rs1285933 SNP in CLEC5A

SNP	Genotype/ allele	N (%)		OR (p-value)	p value (IC)
		Mild	Severe		
rs1285933		62 (0.29)	151 (0.71)		
	CLEC5A				
	CC	19 (0.31)	27 (0.18)	reference	reference
	TC	23 (0.37)	83 (0.55)	2.69 (1.20-5.36)	0.01*
	TT	20 (0.32)	41 (0.27)	1.51 (0.65-3.19)	0.36
	C allele	61 (0.49)	137 (0.45)	reference	reference
	T allele	63 (0.51)	165 (0.55)	1.11 (0.67-1.83)	0.68
	T carrier	43 (0.69)	124 (0.82)	2.14 (1.07-4.28)	0.03*

355 Total number of genotyped samples for rs1285933 SNP in CLEC5A gene. Odds ratio (OR) with 95%
356 confidence interval (CI) and adjusted for sex and age. *p value<0.05

357

358 **Supplementary figure 1:** Morphological and fluorescent representative plot. Monocytes
359 purified from adult healthy volunteers' blood were infected with DENV (serotype 2, strain

360 16681) for 24 or 48 h. After doublets exclusion, monocytes were selected on the
361 morphological area. CLEC DV: CLEC5A on monocytes DENV-infected; CLEC SI:
362 CLEC5A on monocytes uninfected; IST DV: isotype on monocyte DENV infected; IST SI:
363 Isotype on monocytes uninfected.

364

365 **Supplementary figure 2:** Levels of CLEC5A mRNA ($2^{-\Delta Ct}$) in uninfected (NI) and DENV-
366 infected monocytes (DV) for 24h. Groups were tested by Friedman test, $*p<0.05$. RNA
367 integrity was analyzed by 1.2% agarose electrophoresis. A representative agarose gel is
368 shown.

369

370 **Supplementary figure 3:** Correlations between mRNA levels for TNF and CLEC5A after
371 24h of dengue infection. Spearman r test was used.

372

373 **Supplementary figure 4:** CLEC5A RNA levels were correlated with pro-inflammatory
374 mediators, such as IL1 β , IL18, IDO, NLRP3, TGF β , IL10, IL15 and IFN β . Spearman r test
375 was used, RNA integrity was analyzed by capillary electrophoresis and a representative plot
376 is shown.

377

378 5- REFERENCES

379

380 [1] D. Musso, V.M. Cao-Lormeau, D.J. Gubler, Zika virus: following the path of dengue
381 and chikungunya?, *Lancet*. 386 (2016) 243–244. doi:10.1016/S0140-6736(15)61273-
382 9.

383 [2] Who, Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control, Spec.
384 Program. Res. Train. Trop. Dis. (2009) 147. doi:WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1.

385 [3] S. Bhatt, P.W. Gething, O.J. Brady, J.P. Messina, A.W. Farlow, C.L. Moyes, J.M.
386 Drake, J.S. Brownstein, A.G. Hoen, O. Sankoh, M.F. Myers, D.B. George, T.
387 Jaenisch, G.R.W. Wint, C.P. Simmons, T.W. Scott, J.J. Farrar, S.I. Hay, The global
388 distribution and burden of dengue., *Nature*. 496 (2013) 504–7.
389 doi:10.1038/nature12060.

390 [4] A. Balmaseda, S.N. Hammond, L. Pérez, Y. Tellez, S.I. Saborío, J.C. Mercado, R.
391 Cuadra, J. Rocha, M.A. Pérez, S. Silva, C. Rocha, E. Harris, Serotype-specific
392 differences in clinical manifestations of dengue, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74 (2006)
393 449–456. doi:74/3/449 [pii].

394 [5] S.B. Halstead, N.T. Lan, T.T. Myint, T.N.N. Shwe, A. Nisalak, S. Kalyanarooj, S.
395 Nimmannitya, S. Soegijanto, D.W. Vaughn, T.P. Endy, Dengue Hemorrhagic Fever

- 396 in Infants: Research Opportunities Ignored, *Emerg. Infect. Dis.* 8 (2002) 1474–1479.
397 doi:10.3201/eid0812.020170.
- 398 [6] C.C. Lin, Y.H. Huang, P.Y. Shu, H.S. Wu, Y.S. Lin, T.M. Yeh, H.S. Liu, C.C. Liu,
399 H.Y. Lei, Characteristic of dengue disease in Taiwan: 2002-2007, *Am. J. Trop. Med.*
400 *Hyg.* 82 (2010) 731–739. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0549.
- 401 [7] N.T. Hung, H.-Y. Lei, N.T. Lan, Y.-S. Lin, K.-J. Huang, L.B. Lien, C.-F. Lin, T.-M.
402 Yeh, D.Q. Ha, V.T.Q. Huong, L.-C. Chen, J.-H. Huang, L.T. My, C.-C. Liu, S.B.
403 Halstead, Dengue Hemorrhagic Fever in Infants: A Study of Clinical and Cytokine
404 Profiles, *J. Infect. Dis.* . 189 (2004) 221–232. doi:10.1086/380762.
- 405 [8] X. Fang, Z. Hu, W. Shang, J. Zhu, C. Xu, X. Rao, Genetic polymorphisms of
406 molecules involved in host immune response to dengue virus infection, *FEMS*
407 *Immunol. Med. Microbiol.* 66 (2012) 134–146. doi:10.1111/j.1574-
408 695X.2012.00995.x.
- 409 [9] H.A.F. Stephens, HLA and Other Gene Associations with Dengue Disease Severity
410 BT - Dengue Virus, in: L.A. Rothman (Ed.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin,
411 Heidelberg, 2010: pp. 99–114. doi:10.1007/978-3-642-02215-9_8.
- 412 [10] C. Xavier-Carvalho, G. Gibson, P. Brasil, R.X. Ferreira, R. De Souza Santos, O.
413 Gonçalves Cruz, S.A. De Oliveira, M. De Sá Carvalho, A.G. Pacheco, C.F. Kubelka,
414 M.O. Moraes, Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue
415 severity in children: A case-control, functional and meta-analysis study, *Infect. Genet.*
416 *Evol.* 20 (2013) 197–205. doi:10.1016/j.meegid.2013.08.017.
- 417 [11] R. Thamizhmani, P. Vijayachari, Brief communication Association of dengue virus
418 infection susceptibility with polymorphisms of 2 -5 -oligoadenylate synthetase genes :
419 a case – control study, *Brazilian J. Infect. Dis.* 8 (2014) 4–6.
420 doi:10.1016/j.bjid.2014.03.004.
- 421 [12] G.G. Figueiredo, R.D. Cezar, N.M. Freire, V.G. Teixeira, P. Baptista, M. Cordeiro,
422 R.F. Carmo, L.R.S. Vasconcelos, P. Moura, Mannose-binding lectin gene (MBL2)
423 polymorphisms related to the mannose-binding lectin low levels are associated to
424 dengue disease severity, *Hum. Immunol.* 77 (2016) 571–575.
425 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2016.05.006.
- 426 [13] C.C. Khor, T.N.B. Chau, J. Pang, S. Davila, H.T. Long, R.T.H. Ong, S.J. Dunstan, B.
427 Wills, J. Farrar, T. Van Tram, T.T. Gan, N.T.N. Binh, L.T. Tri, L.B. Lien, N.M.

- 428 Tuan, N.T.H. Tham, M.N. Lanh, N.M. Nguyet, N.T. Hieu, N. Van N Vinh Chau, T.T.
429 Thuy, D.E.K. Tan, A. Sakuntabhai, Y.-Y. Teo, M.L. Hibberd, C.P. Simmons, T.
430 Nguyen, B. Chau, J. Pang, S. Davila, H.T. Long, R.T.H. Ong, S.J. Dunstan, B. Wills,
431 J. Farrar, T. Van Tram, T.T. Gan, Genome-wide association study identifies
432 susceptibility loci for dengue shock syndrome at MICB and PLCE1, *Nat. Genet.* 43
433 (2011) 1139–1141. doi:10.1038/ng.960.
- 434 [14] A. a. Watson, A.A. Lebedev, B.A. Hall, A.E. Fenton-May, A.A. Vagin, W.
435 Dejnirattisai, J. Felce, J. Mongkolsapaya, A.S. Palma, Y. Liu, T. Feizi, G.R. Screaton,
436 G.N. Murshudov, C. a. O’Callaghan, Structural flexibility of the macrophage dengue
437 virus receptor CLEC5A: Implications for ligand binding and signaling, *J. Biol. Chem.*
438 286 (2011) 24208–24218. doi:10.1074/jbc.M111.226142.
- 439 [15] a B. Bakker, E. Baker, G.R. Sutherland, J.H. Phillips, L.L. Lanier, Myeloid DAP12-
440 associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of
441 myeloid cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 9792–9796.
442 doi:10.1073/pnas.96.17.9792.
- 443 [16] S.-T. Chen, Y.-L. Lin, M.-T. Huang, M.-F. Wu, S.-C. Cheng, H.-Y. Lei, C.-K. Lee,
444 T.-W. Chiou, C.-H. Wong, S.-L. Hsieh, CLEC5A is critical for dengue-virus-induced
445 lethal disease., *Nature.* 453 (2008) 672–676. doi:10.1038/nature07013.
- 446 [17] I.R. Turnbull, M. Colonna, Activating and inhibitory functions of DAP12, 7 (2007)
447 155–161.
- 448 [18] A. Paradowska-Gorycka, M. Jurkowska, Structure, expression pattern and biological
449 activity of molecular complex TREM-2/DAP12, *Hum. Immunol.* 74 (2013) 730–737.
450 doi:10.1016/j.humimm.2013.02.003.
- 451 [19] E. Vivier, J.A. Nunès, F. Vély, Natural Killer Cell Signaling Pathways, *Science* (80-
452). 306 (2004) 1517–1519.
453 <http://science.sciencemag.org/content/306/5701/1517.abstract>.
- 454 [20] B. Pasquier, P. Launay, Y. Kanamaru, I.C. Moura, S. Pfirsch, C. Ruffié, D. Hénin, M.
455 Benhamou, M. Pretolani, U. Blank, R.C. Monteiro, Identification of Fc α RI as an
456 inhibitory receptor that controls inflammation: Dual role of Fc γ ITAM, *Immunity.*
457 22 (2005) 31–42. doi:10.1016/j.immuni.2004.11.017.
- 458 [21] M. Wu, S. Chen, A. Yang, W. Lin, Y. Lin, N. Chen, I. Tsai, L. Li, CLEC5A is critical
459 for dengue virus – induced inflammasome activation in human macrophages, 121

- 460 (2013) 95–106. doi:10.1182/blood-2012-05-430090.The.
- 461 [22] B. Joyce-Shaikh, M.E. Bigler, C.-C. Chao, E.E. Murphy, W.M. Blumenschein, I.E.
462 Adamopoulos, P.G. Heyworth, S. Antonenko, E.P. Bowman, T.K. McClanahan, J.H.
463 Phillips, D.J. Cua, Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 regulates synovial
464 inflammation and bone erosion associated with autoimmune arthritis., *J. Exp. Med.*
465 207 (2010) 579–589. doi:10.1084/jem.20090516.
- 466 [23] R. Cheung, F. Shen, J.H. Phillips, M.J. McGeachy, D.J. Cua, P.G. Heyworth, R.H.
467 Pierce, Activation of MDL-1 (CLEC5A) on immature myeloid cells triggers lethal
468 shock in mice, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 4446–4461. doi:10.1172/JCI57682.
- 469 [24] P.A. Ward, Do MDL-1+ cells play a broad role in acute inflammation?, *J. Clin.*
470 *Invest.* 121 (2011) 4234–4237. doi:10.1172/JCI60122.
- 471 [25] M. Gandini, C. Gras, E.L. Azeredo, L.M.D.O. Pinto, N. Smith, P. Despres, R.V. da
472 Cunha, L.J. de Souza, C.F. Kubelka, J.P. Herbeuval, Dengue Virus Activates
473 Membrane TRAIL Relocalization and IFN- α Production by Human Plasmacytoid
474 Dendritic Cells In Vitro and In Vivo, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013).
475 doi:10.1371/journal.pntd.0002257.
- 476 [26] S.B. Halstead, N.J. Marchette, Biologic properties of dengue viruses following serial
477 passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii., *Am. J.*
478 *Trop. Med. Hyg.* 69 (2003) 5–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14740949>
479 (accessed September 9, 2015).
- 480 [27] H. Reed, L.J.; Muench, A simple method of estimating fifty percent endpoints, *Am. J.*
481 *Hyg.* 27 (1938) 493–497.
- 482 [28] S. Inoue, M.T.G. Alonzo, Y. Kurosawa, C.A. Mapua, J.D. Reyes, E.M. Dimaano,
483 M.T.P. Alera, M. Saito, K. Oishi, F. Hasebe, R.R. Matias, F.F. Natividad, K. Morita,
484 Evaluation of a Dengue IgG Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and a
485 Japanese Encephalitis IgG Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for
486 Diagnosis of Secondary Dengue Virus Infection, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 10
487 (2009) 143–150. doi:10.1089/vbz.2008.0153.
- 488 [29] G. Chang, A.V. Vorndamt, Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from
489 Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, 30
490 (1992) 545–551.

- 491 [30] F.B. Faria, N. R., Solorzano, V. E., Nogueira, R. M., Chouin-Carneiro, T., Nunes, P.
492 C., Simoes, J. B., de Bruycker Nogueira, F., Lima Mda, R., de Oliveira Pinto, L. M.,
493 Kubelka, C. F., da Cunha, R. V., de Azeredo, E. L. & dos Santos, NDengue
494 epidemics in two distinct periods reveal distinct epidemiological, laboratorial and
495 clinical aspects in a same scenario: analysis of the 2010 and 2013 epidemics in Mato
496 Grosso do Sul, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 110 (2016) 228–36.
- 497 [31] L.T.A. Guerreiro, A.B. Robottom-Ferreira, M. Ribeiro-Alves, T.G. Toledo-Pinto, T.
498 Rosa Brito, P.S. Rosa, F.G. Sandoval, M.R. Jardim, S.G. Antunes, E.J. Shannon, E.N.
499 Sarno, M.C.V. Pessolani, D.L. Williams, M.O. Moraes, Gene Expression Profiling
500 Specifies Chemokine, Mitochondrial and Lipid Metabolism Signatures in Leprosy,
501 *PLoS One.* 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0064748.
- 502 [32] R.A.L. and E. for S. Development - Core Team, C.R.F. for S. Computing, A
503 Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical
504 Computing, (2008).
- 505 [33] S.T. Chen, R.S. Liu, M.F. Wu, Y.L. Lin, S.Y. Chen, D.T.W. Tan, T.Y. Chou, I.S.
506 Tsai, L. Li, S.L. Hsieh, CLEC5A regulates Japanese encephalitis virus-induced
507 neuroinflammation and lethality, *PLoS Pathog.* 8 (2012).
508 doi:10.1371/journal.ppat.1002655.
- 509 [34] A.G. Pacheco, M.O. Moraes, Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-
510 control studies, *27* (2009) 173–186. doi:10.3233/DMA-2009-0654.
- 511 [35] F.S.G. Kehdy, M.H. Gouveia, M. Machado, W.C.S. Magalhães, A.R. Horimoto,
512 Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of
513 deleterious mutations, *112* (2015) 8696–8701. doi:10.1073/pnas.1504447112.
- 514 [36] A.V.C. Coelho, R.R. Moura, C.A.J. Cavalcanti, R.L. Guimarães, A rapid screening of
515 ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco ,
516 *Brazil*, *14* (2015) 2876–2884.
- 517 [37] Y. Cheng, Y. Lin, C. Chen, T. Tsai, C. Tsai, Y. Wu, Y. Ou, Y. Chu, J. Wang, C. Yu,
518 C. Lin, Activation of Nrf2 by the dengue virus causes an increase in CLEC5A , which
519 enhances TNF- α production by mononuclear phagocytes, *Nat. Publ. Gr.* (2016) 1–15.
520 doi:10.1038/srep32000.
- 521 [38] T. Zeller, P. Wild, S. Szymczak, M. Rotival, A. Schillert, R. Castagne, S. Maouche,
522 M. Germain, K. Lackner, H. Rossmann, M. Eleftheriadis, C.R. Sinning, R.B.

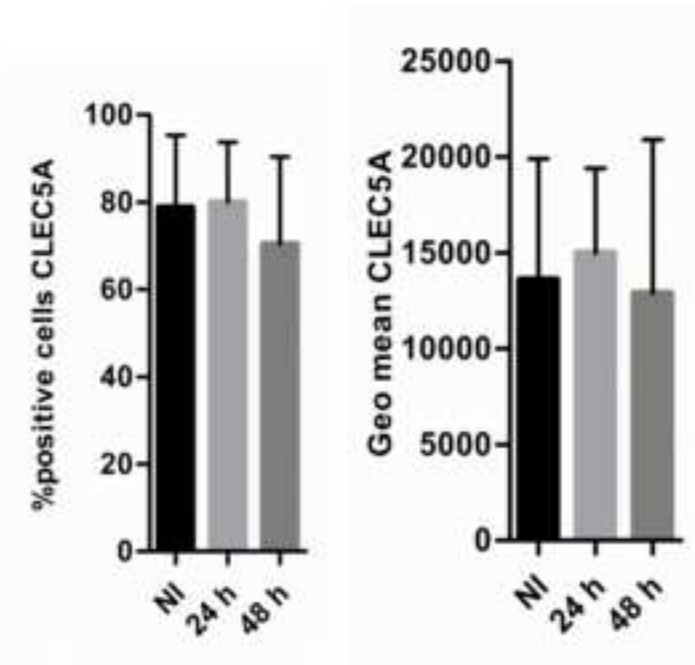
523 Schnabe, E. Lubos, D. Mennerich, W. Rust, C. Perret, C. Proust, V. Nicaud, J.
524 Loscalzo, N. H??bner, D. Tregouet, T. M??nze, A. Ziegler, L. Tired, S. Blankenberg,
525 F. Cambien, Genetics and beyond - the transcriptome of human monocytes and
526 disease susceptibility, PLoS One. 5 (2010). doi:10.1371/journal.pone.0010693.

527 [39] Y.T. Tung, M.F. Wu, G.J. Wang, S.L. Hsieh, Nanostructured electrochemical
528 biosensor for th0065 detection of the weak binding between the dengue virus and the
529 CLEC5A receptor, Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 10 (2014) 1335–1341.
530 doi:10.1016/j.nano.2014.03.009.

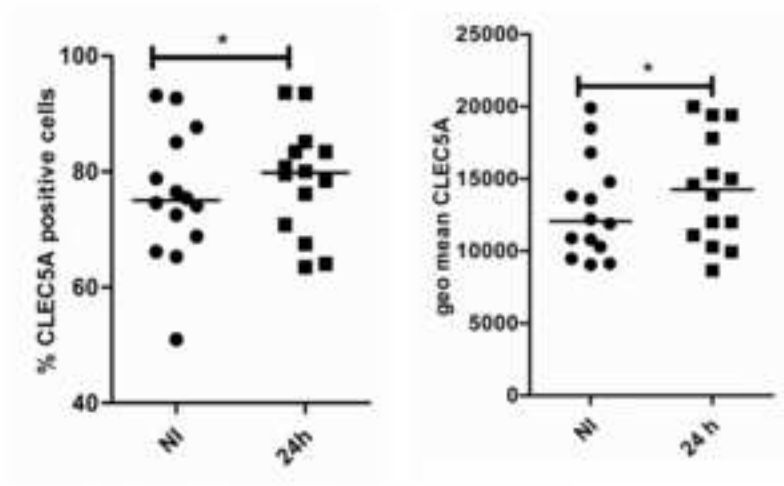
531 [40] M. Hetero-complex, Y. Lo, G. Liou, J. Lyu, M. Hsiao, T. Hsu, Dengue Virus
532 Infection Is through a Cooperative Interaction between a Mannose Receptor and
533 CLEC5A on Macrophage as a, (2016) 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0166474.

534
535
536
537

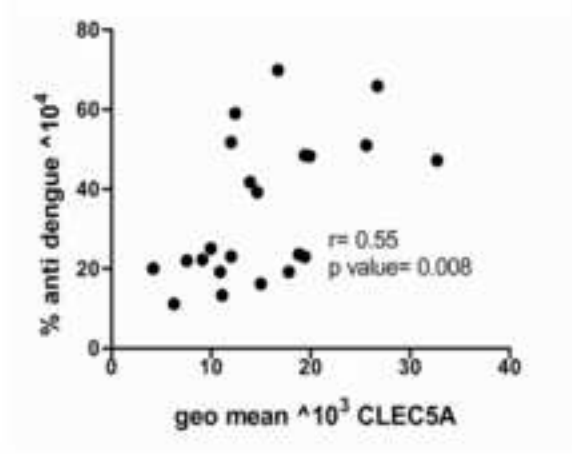
A

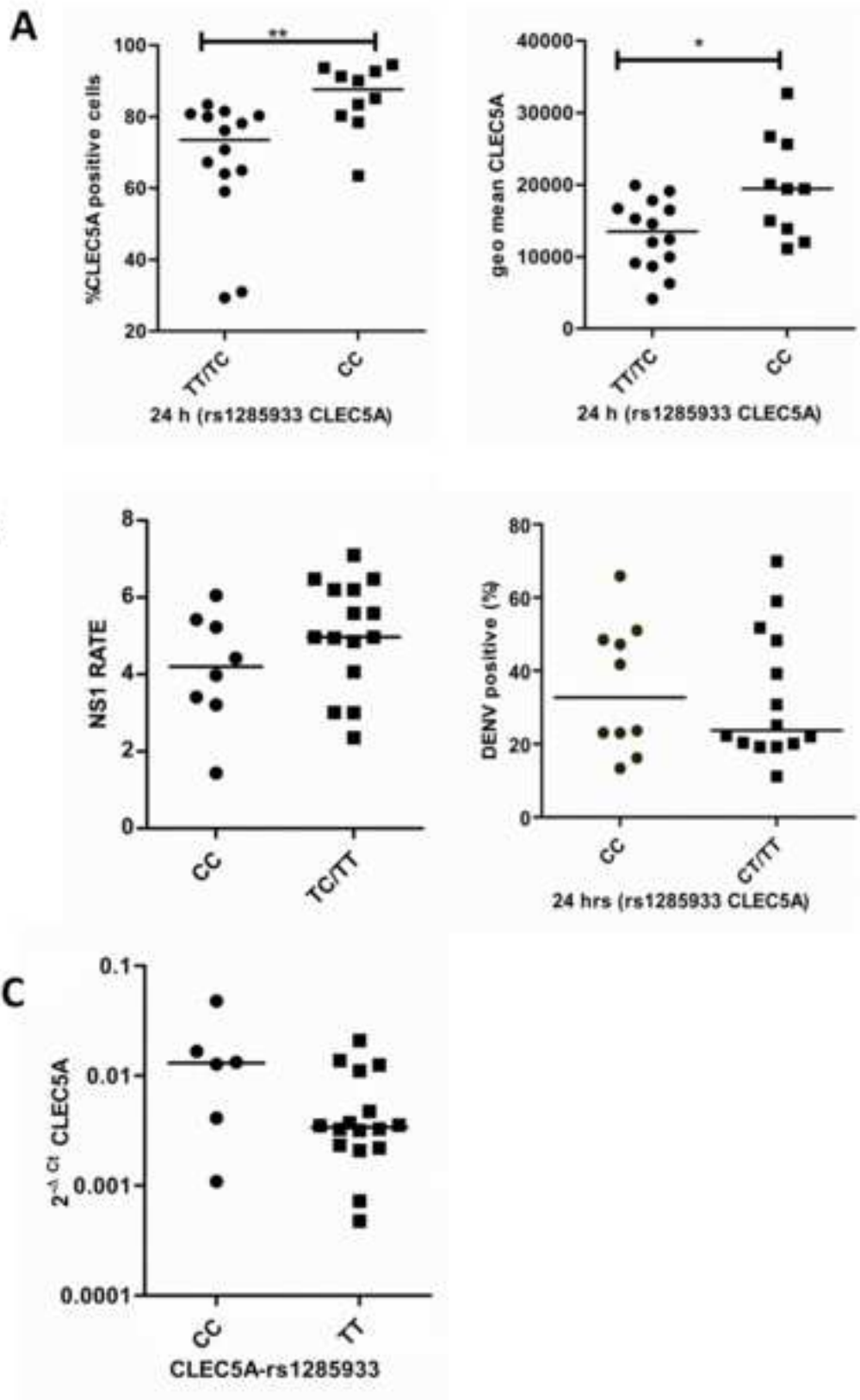


B



C

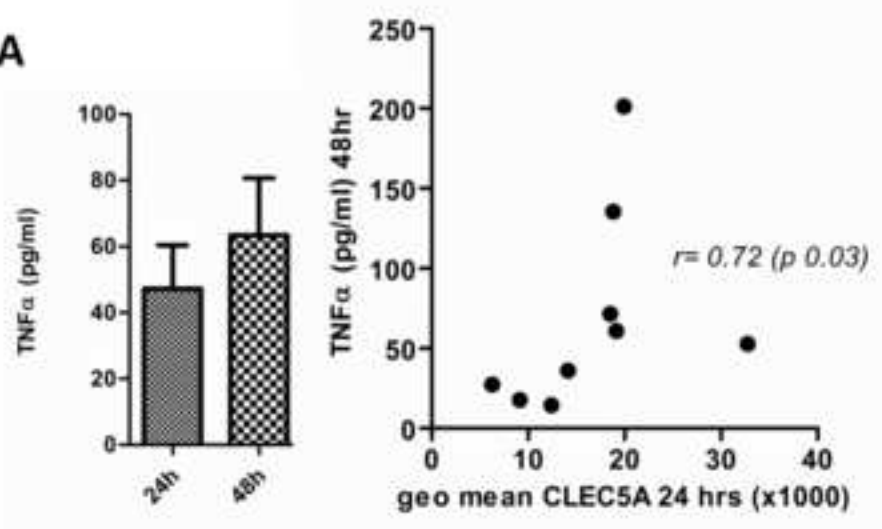




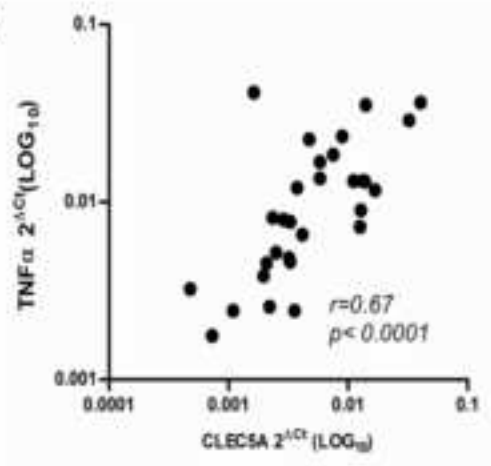
Figure(s) 3

[Click here to download high resolution image](#)

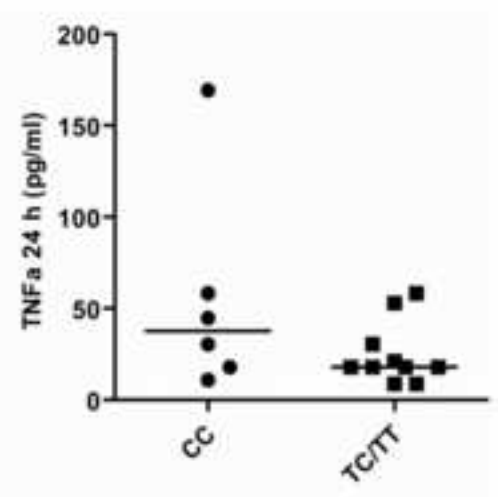
A



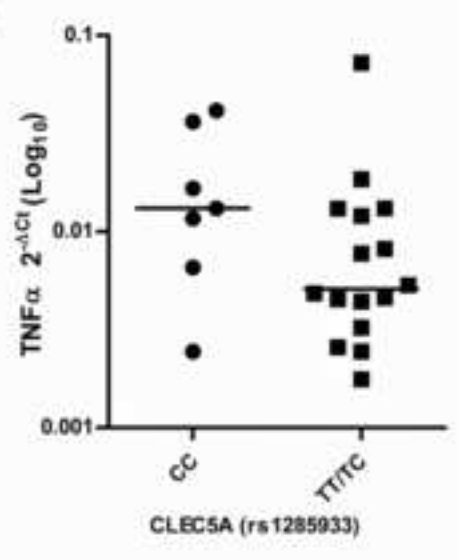
B

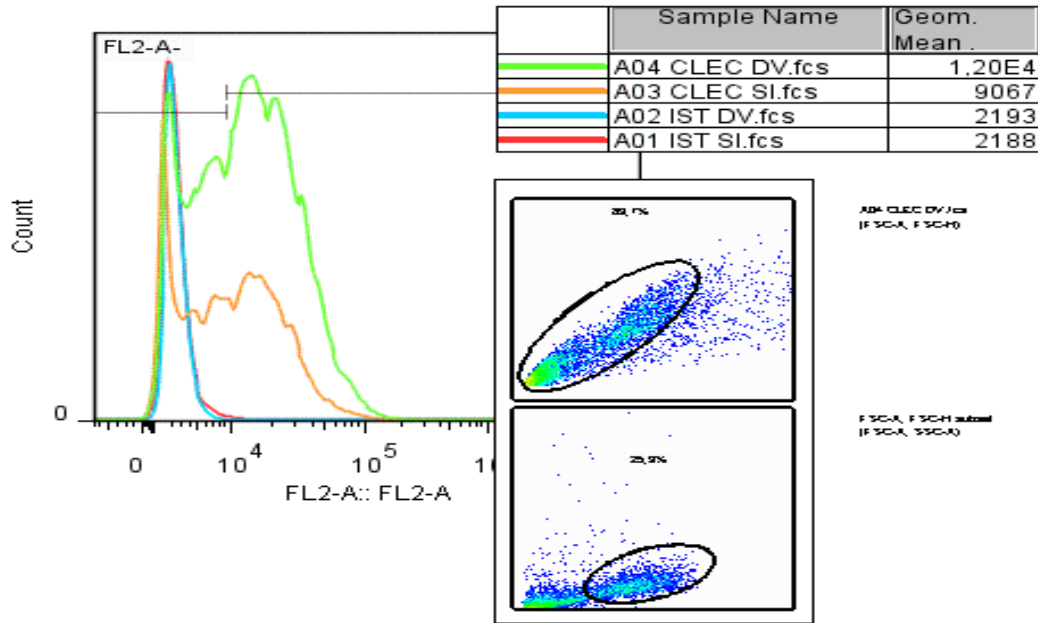


C

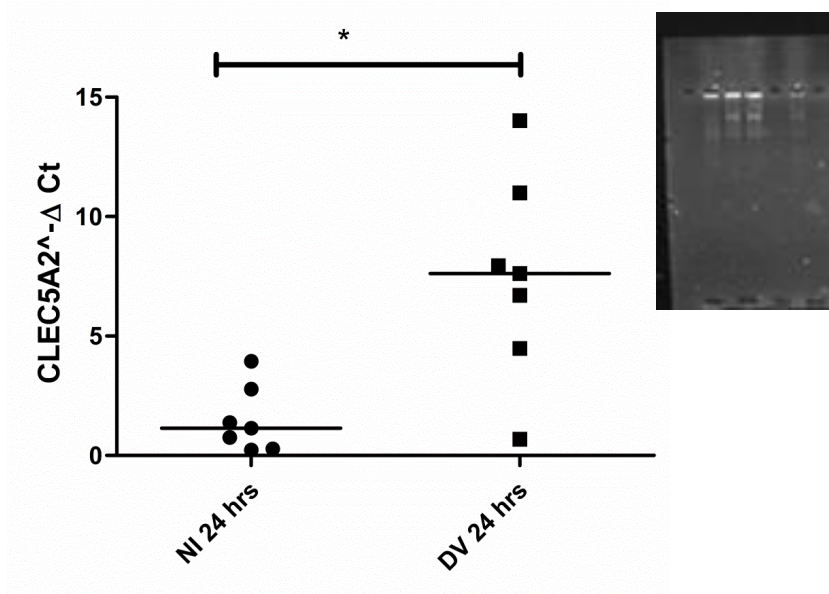


D

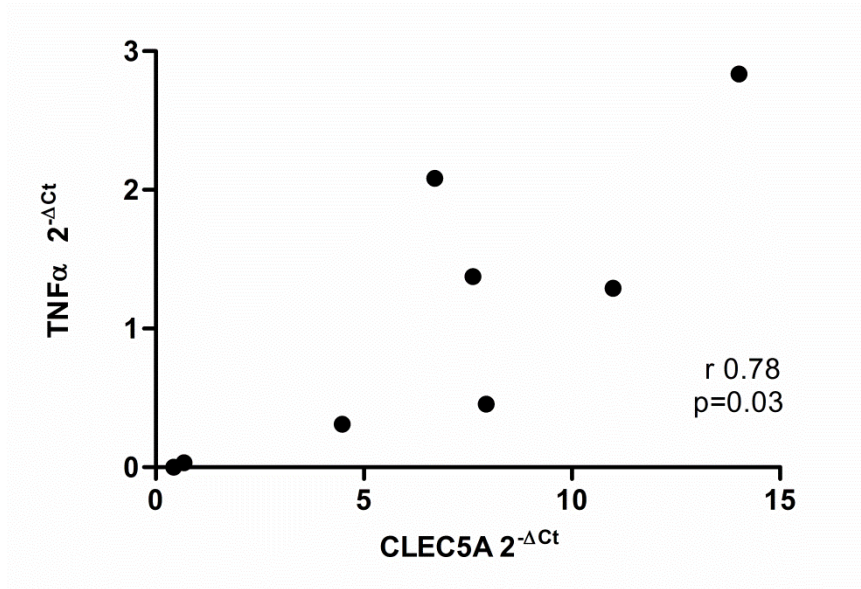




Supplementary figure 1: Morphological and fluorescent representative plot. Monocytes purified from adult healthy volunteers' blood were infected or not with Dengue Virus (serotype 2, strain 16681) for 24 or 48 h. After doublets exclusion, monocytes were selected on the morphological area. CLEC DV: CLEC5A on monocytes DENV infected; CLEC SI: CLEC5A on monocytes uninfected; IST DV: isotype on monocyte DENV infected; IST SI: Isotype on monocytes uninfected.

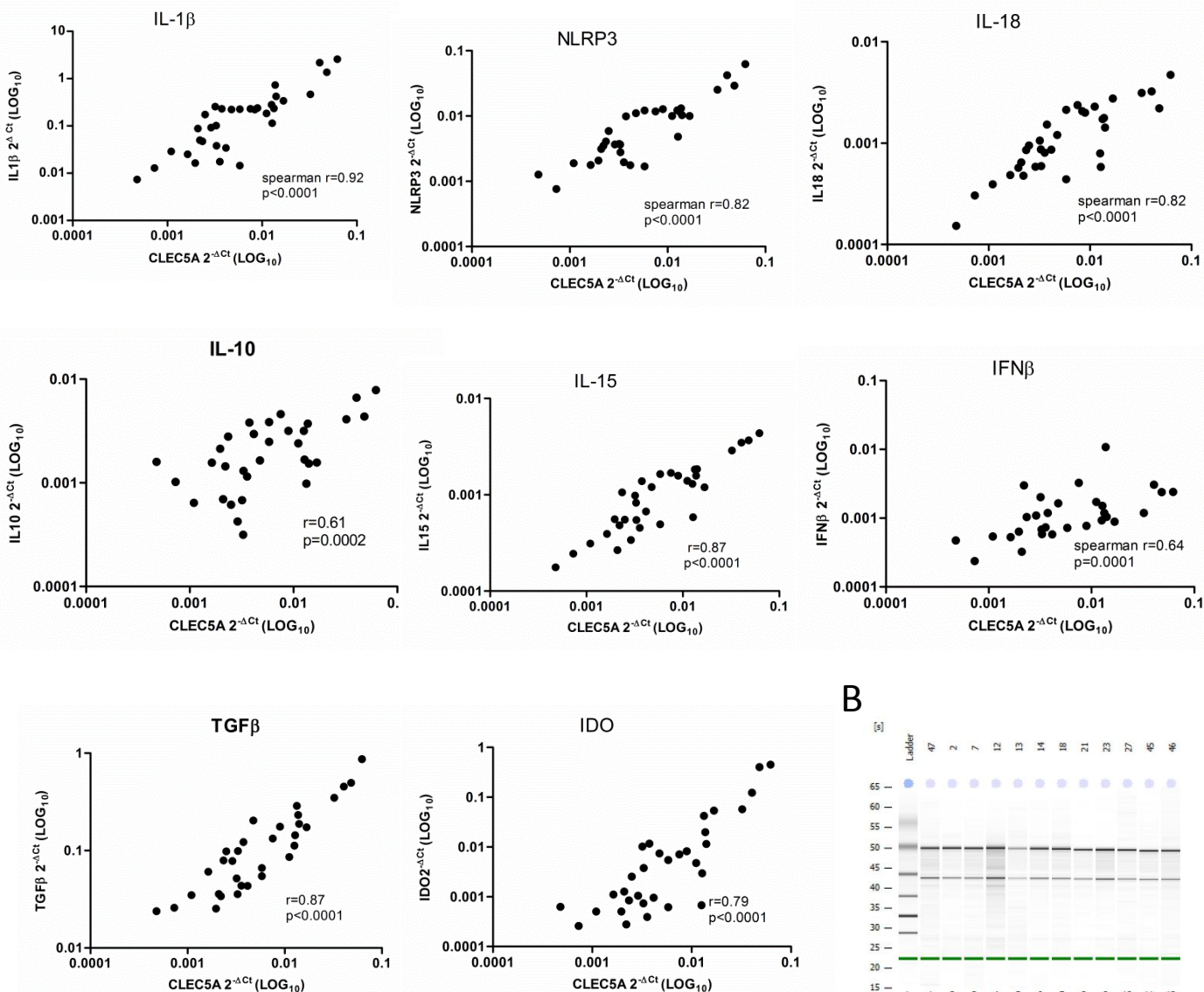


Supplementary figure 2: levels of CLEC5A mRNA ($2^{-\Delta Ct}$) in uninfected (NI) and DENV-infected monocytes (DV) for 24h. Groups were tested by Friedman test, $*p < 0.05$. RNA integrity was analyzed by 1.2% agarose electrophoresis, we can see a representative gel.

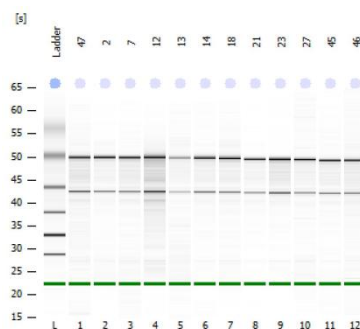


Supplementary figure 3: Correlations between mRNA levels for TNF and CLEC5A after 24h of dengue infection. Were used Spearman r test.

A



B



Supplementary figure 4: CLEC5A RNA levels were correlated with pro-inflammatory mediators, such as IL1 β , IL18, IDO, NLRP3, TGF β , IL10, IL15 and IFN β . Were used Spearman r test, RNA integrity was analyzed by capillary electrophoresis, we can see a representative plot

CAPÍTULO 4

-336 SNP NO GENE DCSIGN E SUA ASSOCIAÇÃO COM O DESFECHO DA DENGUE

Como visto no artigo anexado ao capítulo 2, nós encontramos o genótipo GG para o SNP rs4804803/-336 (G/A) no gene DCSIGN associado à proteção a casos graves de dengue em uma população da cidade do Rio de Janeiro. Embora existam descrições de um efeito funcional para esse polimorfismo, os resultados de associação em diferentes populações são ainda controversos. Contraditoriamente ao nosso primeiro resultado, o genótipo GG tem sido associado ao risco de desenvolvimento de dengue grave em várias populações, principalmente asiáticas.

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de replicar o achado genético para o SNP -336 em uma segunda amostra da população brasileira. Para este fim, utilizamos a mesma amostra descrita no capítulo 3, oriunda da cidade de Recife. Entretanto, os resultados obtidos acompanharam a tendência da literatura, com a associação do genótipo GG ao risco de dengue grave. Por essa razão, a fim de melhor compreender a associação deste marcador ao desfecho de dengue grave, a etapa seguinte foi a atualização da meta-análise previamente apresentada no capítulo 2.

As estimativas de associação obtidas na meta-análise não mostraram associação com o desfecho da dengue. Entretanto, a OR consenso incluindo somente estudos em asiáticos mostrou uma associação entre o SNP-336 e o risco à dengue grave, conforme esperado. Nós, então realizamos análises *in silico* para conhecer melhor a estrutura gênica do DCSIGN e buscar diferenças de frequências alélicas e haplotípicas em populações ancestrais com diferentes etnias que pudessem justificar os diferentes padrões de associação observados nos

estudos de associação para o SNP -336. O manuscrito a seguir apresenta esses resultados e encontra-se em processo de submissão no periódico *Meta Gene*.

1 **SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS AT CD209 GENE IN ASSOCIATION**
2 **WITH DENGUE SEVERITY OUTCOME**

3 **Caroline Xavier Carvalho^a, Fernanda de Souza Gomes Kehdy^{a,b}, Renata Duarte da Silva**
4 **Cezar^d, Naishe Matos Freire^e, Carla Mola, Victor Fiesta, Rodrigo Feliciano do Carmo^f,**
5 **Luydson Richardson Silva Vasconcelos^{e,g}, Marli Tenório Cordeiro^h, Paulo Baptista^e,**
6 **Claire Fernandes Kubelka^b, Patrícia Moura^{d,g}, Antonio Guilherme Pacheco^c, Milton**
7 **Ozório Moraes^a**

8 a- Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ, Brazil.

9 b-Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

10 c- Programa de Computação Científica (PROCC) – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

11 d- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

12 e-Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

13 f- Colegiado de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE,
14 Brasil

15 g- Laboratório de Doenças Transmissíveis, Departamento de Parasitologia, FIOCRUZ, Recife, PE, Brasil

16 h- LAVITE, CPqAM, FIOCRUZ, Recife, PE, Brasil

17 .

18 Corresponding author: milton.moraes@fiocruz.br

19 **ABSTRACT**

20 Host genetic variations are contributing to susceptibility and severity of infectious
21 diseases. In dengue fever, -336G>A (rs4804803) single nucleotide polymorphisms in
22 DC-SIGN gene have been systematically studied in Brazilian and Asian populations,
23 but results are controversial. Here, we genotyped a novel Northeastern Brazilian
24 population and found an association between -336 SNP and severe dengue (N=208;
25 OR_{AGgenotype}=2.01; p-value=0.04; OR_{Gcarrier}=1.92; p=0.04). After, we updated our
26 previous published meta-analysis including the results showed here and other 2 novel
27 studies searched in databases. Consensus OR was not associated with dengue outcome,
28 however pooled data including only Asian studies showed an association with risk to
29 severe disease (N= 1940 OR_{Gallele}=2.33 p-value-0.02). The controversial results among
30 association studies for -336 SNP indicate a possible intrinsic difference among
31 populations studied, which led us to analyze the genomic structure of the region
32 encompassing DC-SIGN gene to better understand this discrepancy among association
33 studies enrolling Asians and Brazilians from different regions. Principal component
34 analysis (PCA) was used to retrieve the most important SNPs that could discriminate
35 ancestral populations or indicate functional role. The depicted 461 SNPs from the
36 Public Database 1000 Genomes Project were searched using database integration tool
37 MASSA (Multi-Agent System for SNP Annotation) to identify the ones located in
38 coding or regulatory regions. Nine SNPs were chosen for further analysis using linkage
39 disequilibrium to compare parental populations and LD blocks, indicating that
40 rs4804803 (-336) is a singleton; this SNP and three others were used to arrange
41 haplotypes. We observed that SNPs rs4804800, rs4804801, rs41335247 and rs4804803
42 generated haplotypes with high frequency, which vary between Africans and
43 Europeans/Asians. G/T/T/G haplotype is more frequent in Africans and absent in other
44 parent populations, while the G/A/C/G haplotype is more frequent in Europeans. The
45 organization of the haplotypes carrying -336G could explain the opposite association

46 with risk and protection to severe dengue. The frequency variation in parent population
47 and the admixture patterns in Brazilians can lead to differences observed in population-
48 based designs indicating that haplotype analysis can help to reduce the ambiguity in
49 association studies.

50 **Keywords**

51 Severe dengue
52 dengue
53 DCSIGN
54 polymorphisms
55 meta analysis
56 case control
57

58 **1- INTRODUCTION**

59 In addition to other arboviruses such as Zika and Chikungunya, dengue poses a
60 great concern in public health in Brazil and other subtropical countries around the
61 world. Dengue is a multifactorial disease that may be presented as mild or severe forms
62 (Guzman et al., 2010; Kantor, 2016; Who, 2009). Dengue infection may be caused by
63 four DENV serotypes (DENV1, 2, 3 and 4), and the most accepted hypothesis to
64 explain disease severity is associated to secondary infection with a different serotype.
65 Host genetic factors, especially those related to immune response, also play a central
66 role in dengue outcome (Coffey et al., 2009; Fang et al., 2012; Guzma, 2007).

67 Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule 3 grabbing non-integrin
68 (DC-SIGN, encoded by *CD209* gene) is an important receptor in dengue
69 immunopathogenesis, being crucial for dengue infection in dendritic cells (Navarro-
70 Sanchez et al., 2003; Tassaneetrithep et al., 2003). The -336 G>A (rs4804803) SNP is
71 located in the promoter of *CD209* gene and has been studied in either population-based
72 case-control or functional studies in dengue. However, results regarding the association
73 between this SNP and dengue outcome in different populations are still controversial,
74 and the frequency of the -336G allele varies across Asians, Africans, and Europeans.
75 Noteworthy, we have previously demonstrated that the presence of the G allele was
76 associated with protection against severe forms of the disease among Brazilians, while
77 the same allele was associated with risk among Asians (Xavier-Carvalho et al., 2013).
78 Here, we performed a novel association study in a second Brazilian population, from the
79 city of Recife. We found an association in the opposite direction when compared with
80 our previous results performed in the city of Rio de Janeiro. Therefore, we have updated

81 our previous meta-analysis and performed *in silico* analysis of *CD209* gene structure
82 using ancestral populations in order to understand the discrepancies among association
83 studies for -336 SNP and dengue outcome.

84

85 **2- METHODS**

86 **2.1- Dengue patients**

87 A total of 225 young patients was enrolled in this study (102 females, 8.4 ± 3.9
88 mean years old; 123 males 10 ± 4.6 years old). From these, 66 were clinically classified
89 with mild and 156 with severe disease. All individuals were hospitalized at the Oswaldo
90 Cruz University Hospital – University of Pernambuco (HUOC-PE) from January 2010
91 to December 2011. All patients were positive for dengue through ELISA IgM, IgG,
92 NS1 or Dengue PCR. The tests were performed in the laboratory of Virology and
93 Experimental Therapy (LAVITE) of the Research Institute Aggeu Magalhães.

94 Patients were continuously monitored during hospitalization and parameters
95 such as, rash, days of fever, abdominal pain, bleedings, plasma leakage, pleural and
96 cavity effusion, haemoconcentration, hypotension, platelets and leucocyte levels were
97 evaluated. We considered as mild, patients presenting up to one of the warning signs as
98 follows: hypotension, mucosal bleeding, abdominal pain, persistent vomiting and low
99 number of platelets and absence of plasma/cavitary, leakage/effusion or
100 hemoconcentration. On the other hand, patients were considered as severe cases when
101 hypotension and hemoconcentration or leakage/effusions were detected together with
102 severe bleeding episodes. This study was approved by Ethical Committee in Research
103 of UPE under the protocol n. CEP/UPE 186/08.

104

105 **2.2- DNA extraction and Genotyping**

106 DNA samples were extracted from whole blood samples using the Wizard
107 genomic DNA Purification Kit) Promega, Madison, WI) according to manufacturer's
108 protocol. The rs4804803 SNP was genotyped using a TaqMan[®] assay designed for real-
109 time PCR allelic discrimination. Reactions were performed using TaqMan[®] Genotyping
110 Mastermix according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher).

111 2.3. Literature search

112 In order to update our previous meta-analysis (Xavier-Carvalho et al., 2013), we have
113 searched for papers describing the association between the -336 G>A SNP and dengue.
114 Terms such as “DC-SIGN”, “polymorphisms”, “CD209”, “SNP”, “-336”, “rs4804803”
115 “dengue”, “DF”, “dengue hemorrhagic fever”, “DHF”, “severe dengue” among others
116 were used to retrieve papers in the following databases: Pubmed, Cochrane library,
117 Embase, Scopus and ISI web knowledge. The search was performed until November
118 2016. All selected papers were carefully read and the references were also checked for
119 studies conducted on genetic association of CD209 polymorphisms and dengue
120 outcomes. Concerning the selection of the patients and controls, we observed that
121 healthy controls were poorly described in most of the published studies and no
122 information is available concerning dengue previous infections. But, our IgG+ controls
123 in the Xavier-Carvalho paper (2013) were considered as DF, which consists the same
124 approach, we performed in our previous meta-analysis and evaluated severe dengue (or
125 DHF) versus DF in the meta-analysis.

126 **2.4- Statistical analyses**

127 Statistical analyses were performed using R version 3.2.2 (R Development Core- Team,
128 2008). Briefly, frequencies of each genotype, allelic and minor allele carriers were
129 calculated and compared between cases and controls by logistic regression adjusted for
130 sex. Meta-analyses were performed using meta- and metafor packages. Comparisons
131 were performed to determine the effects of each genotype, minor allele and minor allele
132 carriers using the most frequent genotype/allele as reference. A modified Egger’s test
133 for funnel plot symmetry was used to test publication bias and heterogeneity across
134 studies was assessed through Cochran’s Q and I^2 statistics. Pooled ORs were obtained
135 by Mantel-Haenszel method in the fixed effect model and Der Simonian and Laird
136 method in the random effects model (Kavvoura and Ioannidis, 2008).

137 **2.4- CD209 genomic region analysis: SNPs selection and haplotype construction**

138 We have searched for SNPs at *CD209* region (chr19:7,804,881-7,812,464 -
139 GRCh37/hg19) from Africans (ENS, GWD, LWK, MSL and YRI), Europeans (CEU,
140 FIN, GBR, IBS and TSI) and Chinese (CHB, CHS and CDX) populations from 1000
141 Genomes Project phase 3 (Consortium, 2012). Principal Components Analysis (PCA)
142 were performed using EIGENSOFT 4.2 (Price et al., 2006) to identify the main clusters.
143 SNPs were sorted by decreasing values of “SNP weight” for the principal components 1

144 and 2 (PC1 and PC2) and annotated using the database integration tool MASSA (Multi-
145 Agent System for SNP Annotation). MASSA (Soares-Souza, 2014) combines
146 information from 11 databases: dbSNP (SNP repository), UCSC (genomics), Gene
147 Ontology (ontologies), PharmGKB (pharmacogenetics), OMIM (phenotypes),
148 Reactome (metabolic pathways), HGNC (gene names repository), NHGRI GWAS
149 Catalog, PolyPhen2, Provean and SIFT (functional impact of nucleotide substitutions),
150 generating a total of 66 attributes. We have used the remote simple mode of MASSA,
151 which returns 16 basic attributes from the dbSNP database. According to the functional
152 category identified by MASSA and the “SNP weight” for PC1 and PC2 (called top
153 SNPs), SNPs were selected for haplotype construction. The allele frequencies of all
154 selected SNPs were calculated for Africans, Europeans and Chinese from 1000
155 Genomes Project using PLINK (Purcell et al., 2007). Haplotypes inferences,
156 frequencies and linkage disequilibrium (LD) analysis for all studied populations were
157 performed using HAPLOVIEW (Barrett et al., 2005).

158 **3- RESULTS**

159 We genotyped a total of 225 patients for rs4804803, for which frequencies were
160 in Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) (data not shown). We found AG genotype and
161 G carrier associated with severe dengue (OR =2.01; p-value=0.04 and OR=1.92, p-
162 value=0.04, respectively) (Table 1).

163 Since our previous meta-analysis, we found three new studies testing
164 rs4804803/-336 SNP at *CD209* gene and dengue outcome. One study was excluded due
165 insufficient data (Noecker et al., 2014). Then, eight studies were selected, where four of
166 them were conducted in Asian (two Thai, one Chinese, and one Indian). The Thai study
167 included 3 distinct populations. Other four studies were developed in Brazilian
168 populations including our new population tested here. A pool of 1503 severe dengue (or
169 DHF) and 1406 mild cases (or DF) was gathered (Table S1). The meta-analysis was
170 performed using severe disease as outcome. For this purpose, we have compared cases
171 classified as mild or dengue fever with cases classified as severe or dengue hemorrhagic
172 fever. Healthy controls were not included. In spite of the -336G allele frequency in all
173 studies were in HWE, results of the Egger’s test showed funnel plot asymmetry,
174 suggesting a possibility of biased publication (Tables S2, S3 and S4). Also, considering
175 the small number of studies and the heterogeneity among them, only random effects
176 model was applied.

177 Pooled OR values obtained from random effects model have suggested an
178 association between the presence of G allele and increased risk of severe dengue
179 ($OR_{G\text{allele}} = 1.36$; $p = 0.13$; $OR_{GG\text{genotype}} = 0.58$; $p = 0.19$; $OR_{G\text{carrier}} = 1.51$; $p = 0.06$
180 (Figure 1 and Table S2).

181 In order to investigate the heterogeneity across studies, we have performed
182 subgroup analysis according to geographic region. No association was observed when
183 analysis were performed including only studies from Brazilian population ($OR_{G\text{allele}} =$
184 0.90 ; $p = 0.62$; $OR_{GG\text{genotype}} = 1.00$; $p = 0.98$; $OR_{G\text{carrier}} = 0.45$; $p = 0.13$ - Figure 2A and
185 Table S3). But, as expected, results confirmed association between G allele carriage and
186 risk of severe disease when analysis were performed including only studies from Asian
187 population ($OR_{G\text{allele}} = 2.33$; $p = 0.02$; $OR_{GG\text{genotype}} = 1.20$; $p = 0.84$; $OR_{G\text{carrier}} = 2.50$; p
188 $= 0.02$ - Fig 2B and S4 table).

189 Due to the controversial results about association studies for -336 SNP among
190 Brazilians and the results of association with severe dengue only in meta-analysis
191 grouping four Asian studies, we have decided to use the 1000 Genomes Project data to
192 evaluate, using principal component analysis (PCA), the most informative SNPs to
193 discriminate ancestral populations. Results returned a total of 421 SNPs in *CD209*
194 genomic region either using PC1 or PC2 that stratified Africans versus Europeans,
195 Native Americans and Asians (Figure 3). The rank output of 421 SNPs obtained in the
196 PCA were scrutinized using MASSA to define polymorphisms according to their
197 frequency, location (for example, coding regions), and effect of variation in the coding
198 region (for example, deleterious). Nine SNPs were defined to calculate linkage
199 disequilibrium and estimate haplotypes in the regions encompassing the -336G>A SNP
200 (Figure 4). We detected that Africans as expected, exhibited higher diversity with 2
201 bins that could be tagged by rs4804800 and rs41335247 SNPs and 2 singletons
202 rs4804801 and rs4804803 SNPs. Among Europeans, there were only 1 bin and 2
203 singletons (rs48048001 and rs4804803) and among Asians (Chinese) exhibited the
204 lowest diversity showing one bin and one singleton, rs4804803 (Figure 4).

205 A combination of 4 SNPs spanning this region, including 2 tags, rs4804800,
206 rs41335247, and 2 singletons, rs4804801 and rs4804803 formed haplotypes where the
207 major one (A/A/C/A) in Europeans (74%), Chinese (55%), Indian (62%) and Japanese
208 (68%) bearing rs4804803 A allele are less prevalent in Africans with only 13% (Table
209 2). Major haplotypes carrying -336G alleles in Africans have low frequencies among
210 Europeans and Chinese and few haplotypes are present in Africans alone (Table 1).

211 In fact, haplotypes rs4804800, rs1334257, rs4804801 and rs4804803 indicate
212 that G/T/T/G has a frequency around 9% in Africans and is not presented in
213 Europeans/Chinese/Indians. Also, the haplotype combining G/A/C/G shows up in
214 around 8% of Europeans but it is not observed in Africans. Unfortunately, this
215 haplotype is not observed among Asians searched in the 1000 Genomes databank.
216 However, the combination of these four SNPs and the imbalance of the haplotype
217 frequencies in populations with different background could be responsible for
218 differences observed among Asian and Brazilian associations for -336G allele and
219 dengue severity.

220

221 4- DISCUSSION

222

223 Here, we screened *CD209* genomic region to better understand association with
224 dengue severity. There are several difficulties for association studies in dengue and
225 classification is the most difficult one that creates heterogeneity concerning the clinical
226 classification of the patients among different studies and difficulties towards replication
227 and validation of the results. Nevertheless, replication of the genetic epidemiological
228 studies and meta-analysis are necessary to find a consensus estimates and most of the
229 time help to diminish ambiguity described in the literature. We confirmed that -336G
230 allele was associated with risk in subgroup analysis in Asians. Moreover, analysis of the
231 same allele in Brazilians showed association in the other direction (towards resistance
232 $OR < 1$), although meta-analysis was not statistically significant ($OR_{G_{carrier}} = 0.45$; $p =$
233 0.13) to confirm our previous results (Xavier-Carvalho et al 2013). But, the results from
234 Asians should be consider with great care since Egger's test showed funnel plot
235 asymmetry that suggests a bias in the published papers.

236 In this regard, the association in -336G allele in opposite directions in Brazilians
237 and Asians (Xavier-Carvalho et al 2013) interested us to follow a different strategy to
238 understand this discrepancy. A combined approach using principal component analysis
239 and MASSA narrowed down for nine informative SNPs and haplotype arrangements in
240 *CD209* locus suggest that G/T/T/G, which is more frequent in Africans could be
241 associated with protection, while G/A/C/G haplotype would be associated with risk to
242 dengue severity. It is well known that Brazilians exhibit high genetic diversity and
243 great admixture can be observed. It has been described that Bahia (Kehdy et al., 2015),
244 but also Rio have a higher percentage of African ancestry (Saloum de Neves Manta et

245 al., 2013) than other regions of the country, while African ancestry have been reported
246 to be more resistant to severe dengue (Blanton et al., 2008; Halstead et al., 2001).

247 Studies conducted among Brazilians from Bahia (Silva et al., 2010) and Rio
248 (Xavier-Carvalho et al., 2013), which present higher African ancestry are pointing the
249 results towards protection. On the other hand, the populations from Recife (this study)
250 and study number 4 (Oliveira et al., 2014) from Belém, north of the country, are known
251 to have higher European and Native American ancestries (Coelho et al., 2015; Saloum
252 de Neves Manta et al., 2013).

253 *CD209* haplotypes containing rs4804800 SNP were also associated with
254 Kawasaki disease in Asians and possibly this SNP can also have a participation in
255 genetic patterns in autoimmune and infectious diseases (Kuo et al., 2014). Expression
256 levels of DC-SIGN can be impacted by -336G>A and the presence of the G allele is
257 suggested to have an important regulation step during dengue infection but other SNPs
258 in the same haplotype can also contribute to observed phenotype. Our data suggest that
259 the genomic arrangement of *CD209* region could at least in part explain the association
260 in opposite directions. Thus, it is very important to search for LD bins and form
261 haplotypes with in different parent populations in order to explain the arrangements and
262 confounding associations in distinct populations to organize expandable risk alleles
263 (such as in HLA) for dengue severity.

264

265 **5- CONCLUSION**

266

267 We can conclude through the OR consensus obtained in meta analysis that
268 SNP -336 in *CD209* is associated with severe dengue in Asians and the results are
269 controversial among Brazilians probably due to high admixture observed among
270 individuals from different regions from the country. We cannot exclude that some of the
271 misleading associations are due to differences in clinical classification. Nevertheless,
272 haplotype analysis indicate important SNPs in *CD209* locus to be tested in association
273 studies.

274

275 **Conflict of interest**

276 No conflict of interest exists

277 **Funding**

278 The authors wish to thank the Founding Agency for Science of Pernambuco (FACEPE).
 279 Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ) and Oswaldo Cruz
 280 Institute (IOC) - Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ)
 281

282 Acknowledgments

283 We are grateful to Cynthia C Cardoso for the careful reading of the paper.

284 Figure legends

285 Figure 1. Forest plot for 336G>A DCSIGN SNP meta-analysis. Pooled OR (95% CI)
 286 was obtained by using Der Simonian and Laird method in the random effects model.

287 Figure 2. Forest plot for 336G>A DCSIGN SNP meta-analysis including only Brazilian
 288 studies (A) or only Asian studies (B). Pooled OR (95% CI) was obtained by using Der
 289 Simonian and Laird method in the random effects model.
 290

291 Figure 3: Principal Component Analysis (PCA) using 461 SNPs from DCSIGN
 292 genomic region and 1.655 individuals from Africans, Europeans Native Americans and
 293 Asian populations from 1000 Genomes Project.
 294

295 Figure 4: Linkage disequilibrium for nine SNPs selected through PCA in Africans,
 296 Europeans and Asians. SNPs 1- rs11465425, 2- rs4804800, 3- rs11465423, 4-
 297 rs72448637, 5- rs4804801, 6- rs17159887, 7- rs41335247, 8-rs11465366, 9-4804803
 298

299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306

306 Tables

307 Table 1: Genotype, allelic and minor allele carrier frequencies for rs4804803 SNP.

SNP	Genotype/allele	N (frequency)		OR (95% CI)*	P value*
		Mild	Severe		
<i>CD209</i> rs4804803		62 (93.9%)	146 (93.6%)		
	AA	40 (0.65)	70 (0.48)	Reference	
	AG	18 (0.29)	65 (0.45)	2.01 (1.04-3.85)	0.04
	GG	4 (0.06)	11 (0.08)	1.60 (0.47-5.44)	0.49
	Allele A	98 (0.79)	205 (0.70)	Reference	
	Allele G	26 (0.21)	87 (0.30)	1.46 (0.83-2.58)	0.20
	Carrier G	22 (0.35)	76 (0.52)	1.92 (0.65-3.42)	0.04

308 Total number of genotyped samples for each SNP may vary due to genotype miscalling. OR= Odds
 309 ratio.*Results adjusted for sex.

310

311

312 Table 2: Frequencies of *CD209* haplotypes in 1000 Genomes populations.

				Africans	Europeans	Chinese	Japanese	Indians
rs4804800	rs4804801	rs41335247	rs4804803					
A	T	C	A	0,232	0.002	0.055	0.050	0.064
G	T	C	A	0.184	0.003	0.289	0.211	0.087
A	T	C	G	0.159	0.056	0.051	0.023	0.073
A	A	C	G	0.131	0.080	0.005	0.006	0.079
A	A	C	A	0.129	0.737	0.554	0.685	0.619
G	T	T	G	0.097	0.000	0.000	0.000	0.000
A	A	T	G	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000
G	T	C	G	0.018	0.000	0.017	0.010	0,000
G	A	C	G	0.017	0.079	0.003	0.000	0.013
A	T	T	G	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000
G	A	C	A	0.005	0.042	0.024	0.015	0.061
G	A	T	G	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000
A	A	T	A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002

313 Haplotype frequencies were estimated using HAPLOVIEW.

314

315

316

317 **6- REFERENCES**

318

319 Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and
320 haplotype maps. *Bioinforma.* 21, 263–265. doi:10.1093/bioinformatics/bth457321 Blanton, R.E., Silva, L.K., Morato, V.G., Parrado, A.R., Nunes, R.T., Dias, J.P., Melo, P.R.S., Reis,
322 E.A.G., Goddard, K. a B., Rodrigues, S.G., Vasconcelos, P.F.C., Castro, J.M., Reis, M.G.,
323 Nunes, M.R.T., Rodrigues, S.G., Vasconcelos, P.F.C., Castro, J.M., Reis, M.G., Barreto, M.L.,
324 Teixeira, M.G., 2008. Genetic ancestry and income are associated with dengue
325 hemorrhagic fever in a highly admixed population. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 762–765.
326 doi:10.1038/ejhg.2008.4327 Coelho, A.V.C., Moura, R.R., Cavalcanti, C.A.J., Guimarães, R.L., 2015. A rapid screening of
328 ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco ,
329 Brazil 14, 2876–2884.330 Coffey, L.L., Mertens, E., Brehin, A.C., Fernandez-Garcia, M.D., Amara, A., Després, P.,
331 Sakuntabhai, A., 2009. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility.
332 *Microbes Infect.* 11, 143–156. doi:10.1016/j.micinf.2008.12.006

333 Consortium, T. 1000 G.P., 2012. An integrated map of genetic variation from 1,092 human

- 334 genomes. *Nature* 491, 56–65. doi:10.1038/nature11632
- 335 Dang, T.N., Naka, I., Sa-NGasang, A., Anantapreecha, S., Wichukchinda, N., Sawanpanyalert, P.,
336 Patarapotikul, J., Tsuchiya, N., Ohashi, J., 2016. Association of BAK1 single nucleotide
337 polymorphism with a risk for dengue hemorrhagic fever. *BMC Med. Genet.* 17, 43.
338 doi:10.1186/s12881-016-0305-3
- 339 Fang, X., Hu, Z., Shang, W., Zhu, J., Xu, C., Rao, X., 2012. Genetic polymorphisms of molecules
340 involved in host immune response to dengue virus infection. *FEMS Immunol. Med.*
341 *Microbiol.* 66, 134–146. doi:10.1111/j.1574-695X.2012.00995.x
- 342 Guzman, M.G., 2007. Race : a risk factor for dengue hemorrhagic fever 533–542.
343 doi:10.1007/s00705-006-0869-x
- 344 Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., Hunsperger, E.,
345 Kroeger, A., Margolis, H.S., Martínez, E., Nathan, M.B., Pelegrino, J.L., Simmons, C.,
346 Yoksan, S., Peeling, R.W., 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.*
347 8, S7–S16. doi:10.1038/nrmicro2460
- 348 Halstead, S.B., Streit, T.G., Lafontant, J.G.U.Y., Putvatana, R., Russell, K., Sun, W., Kanesa-
349 thanan, N., Hayes, C.G., Watts, D.M., 2001. Haiti: Absence of dengue hemorrhagic fever
350 despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 180–183.
- 351 Kantor, I.N., 2016. [Dengue, Zika and Chikungunya]. *Medicina (B. Aires)*. 1–5.
- 352 Kavvoura, F.K., Ioannidis, J.P.A., 2008. Methods for meta-analysis in genetic association
353 studies: a review of their potential and pitfalls. *Hum. Genet.* 123, 1–14.
354 doi:10.1007/s00439-007-0445-9
- 355 Kehdy, F.S.G., Gouveia, M.H., Machado, M., Magalhães, W.C.S., Horimoto, A.R., 2015. Origin
356 and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious
357 mutations 112, 8696–8701. doi:10.1073/pnas.1504447112
- 358 Kuo, H., Huang, Y., Chien, S., Yu, H., Hsieh, K., 2014. Genetic Variants of CD209 Associated with
359 Kawasaki Disease Susceptibility 9. doi:10.1371/journal.pone.0105236
- 360 Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.-L.,
361 Arenzana-Seisdedos, F., Desprès, P., 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-
362 integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-
363 cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 4, 723–728. doi:10.1038/sj.embor.embor866
- 364 Noecker, C.A., Amaya-Larios, I.Y., Galeana-Hernández, M., Ramos-Castañeda, J., Martínez-
365 Vega, R.A., 2014. Contrasting associations of polymorphisms in FcγRIIIa and DC-SIGN
366 with the clinical presentation of dengue infection in a Mexican population. *Acta Trop.*
367 138, 15–22. doi:10.1016/j.actatropica.2014.05.021
- 368 Oliveira, L.F. De, Lima, C.P.S. De, Azevedo, R.D.S.S., Mendonça, D.S.F. De, Rodrigues, S.G.,
369 Carvalho, V.L., Pinto, E.V., Maia, A.L., Maia, M.H.T., Vasconcelos, J.M., Silva, A.L.S. Da,
370 Nunes, M.R.T., Sena, L., Vasconcelos, P.F., Santos, E.J.M. Dos, 2014. Polymorphism of DC-
371 SIGN (CD209) promoter in association with clinical symptoms of dengue fever. *Viral*
372 *Immunol.* 27, 245–9. doi:10.1089/vim.2013.0119
- 373 Price, A.L., Patterson, N.J., Plenge, R.M., Weinblatt, M.E., Shadick, N.A., Reich, D., 2006.
374 Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association
375 studies. *Nat Genet* 38, 904–909.

376 Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar,
377 P., de Bakker, P.I.W., Daly, M.J., Sham, P.C., 2007. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome
378 Association and Population-Based Linkage Analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559–575.

379 Saloum de Neves Manta, F., Pereira, R., Vianna, R., Rodolfo Beuttenmüller de Araújo, A., Leite
380 Góes Gitaí, D., Aparecida da Silva, D., de Vargas Wolfgramm, E., da Mota Pontes, I., Ivan
381 Aguiar, J., Ozório Moraes, M., Fagundes de Carvalho, E., Gusmão, L., 2013. Revisiting the
382 Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. *PLoS One* 8, 1–11.
383 doi:10.1371/journal.pone.0075145

384 Silva, L.K., Blanton, R.E., Parrado, A.R., Melo, P.S., Morato, V.G., Reis, E.A.G., Dias, J.P., Castro,
385 J.M., Vasconcelos, P.F.C., Goddard, K.A.B., Barreto, L., Reis, M.G., Glo, M., 2010. Dengue
386 hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1 1221–1227.
387 doi:10.1038/ejhg.2010.98

388 Soares-Souza, G., 2014. abordagens para integração de banco de dados e desenvolvimento de
389 ferramentas bioinformáticas para estudos de genética de populações. Universidade
390 Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

391 Tassaneetrithep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W.,
392 Eller, M. a, Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D.L., Steinman, R.M., Schlesinger,
393 S., Marovich, M. a, 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human
394 dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 823–829. doi:10.1084/jem.20021840

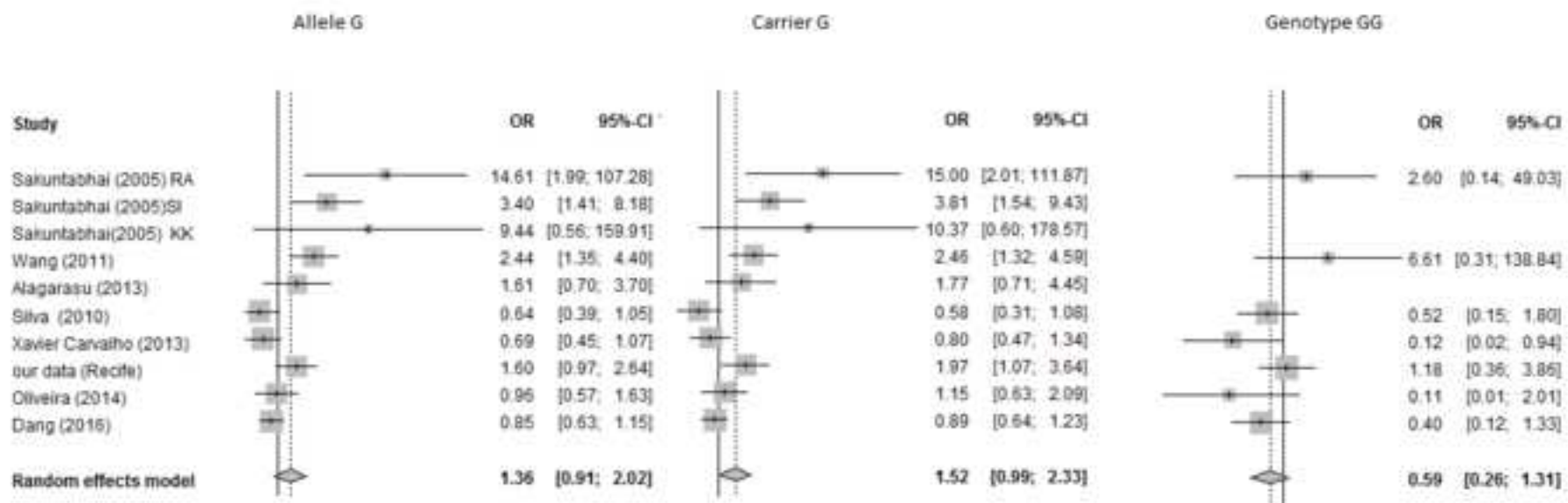
395 Who, 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. Spec.
396 Program. Res. Train. Trop. Dis. 147. doi:WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1

397 Xavier-Carvalho, C., Gibson, G., Brasil, P., Ferreira, R.X., De Souza Santos, R., Gonçalves Cruz,
398 O., De Oliveira, S.A., De Sá Carvalho, M., Pacheco, A.G., Kubelka, C.F., Moraes, M.O.,
399 2013. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in
400 children: A case-control, functional and meta-analysis study. *Infect. Genet. Evol.* 20, 197–
401 205. doi:10.1016/j.meegid.2013.08.017

402

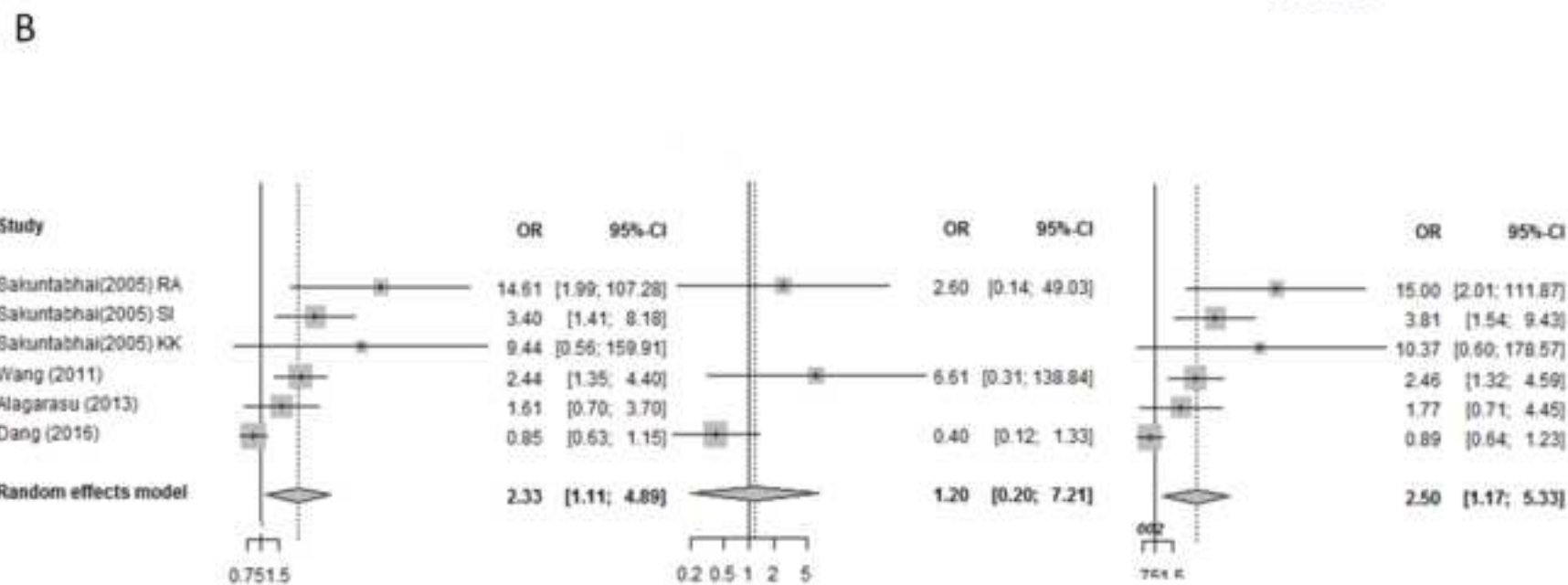
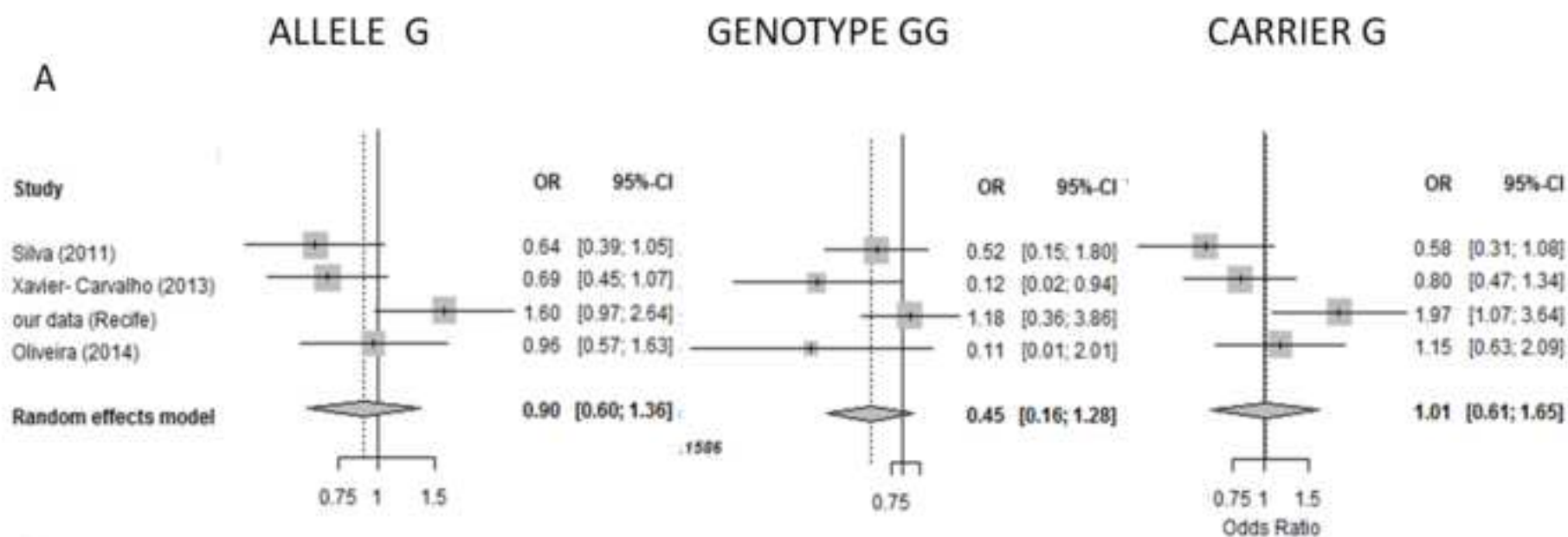
Figure(s)

[Click here to download high resolution image](#)



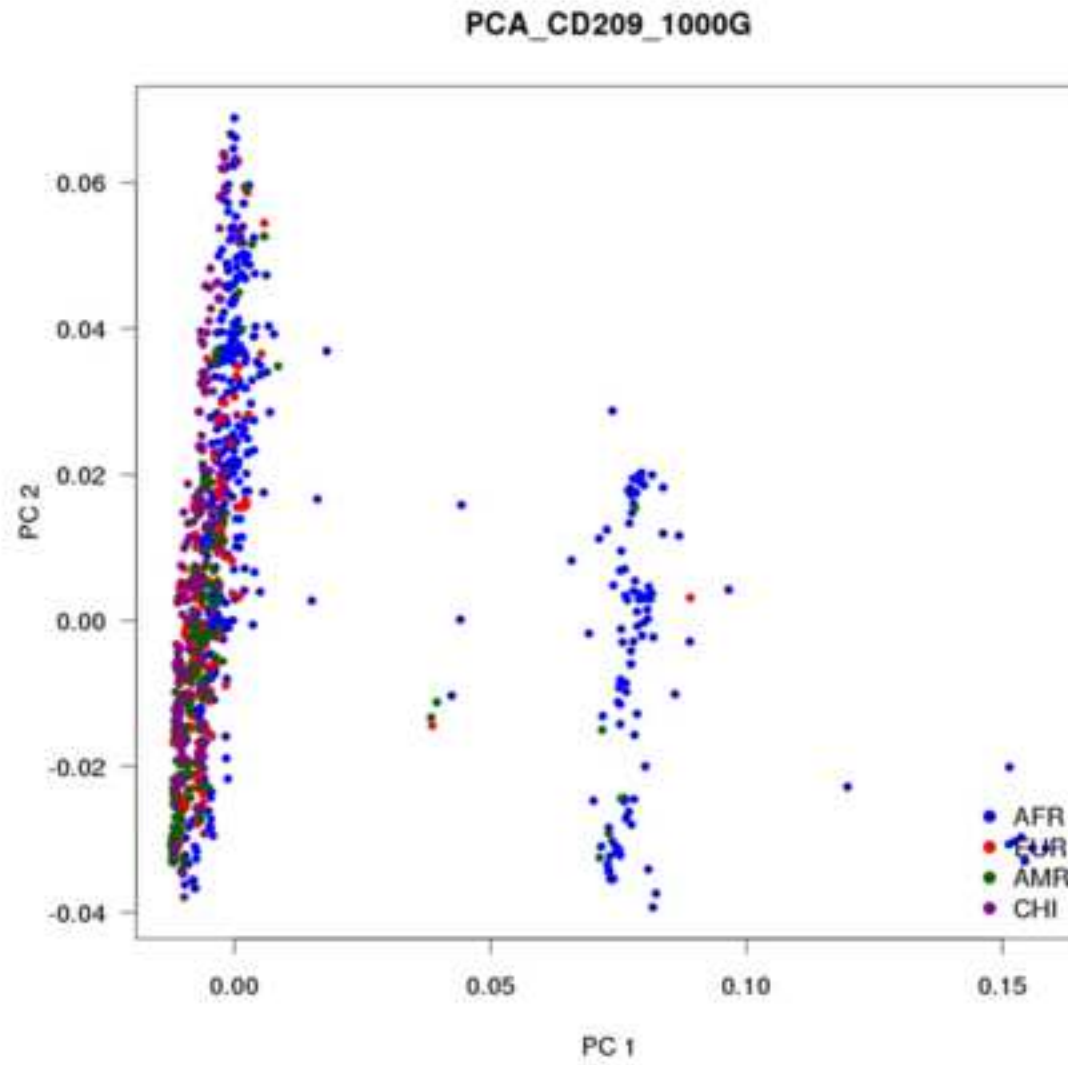
Figure(s)

[Click here to download high resolution image](#)

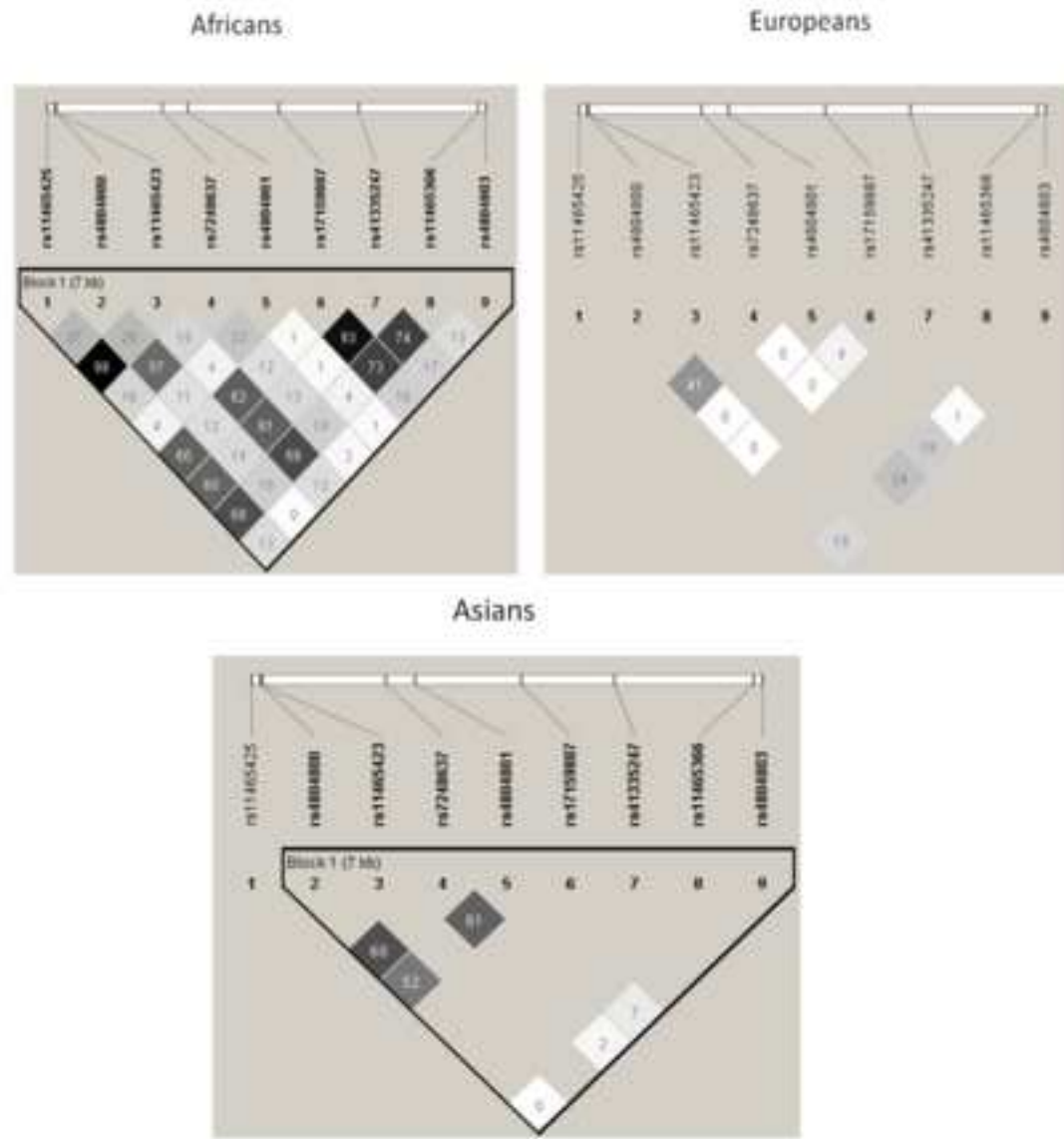


Figure(s)

[Click here to download high resolution image](#)



Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)



Supplementary Table 1- Allele, genotype and carriers numbers (frequencies) of SNP -336 DC-SIGN in selected papers for meta-analysis.

	-336 DC-SIGN	Sakuntabhai et al. (2005) Coorte RA	Sakuntabhai et al. (2005) Coorte SI	Sakuntabhai et al. (2005) Coorte KK	Wang et al. (2011)	Alagaraasu et al. (2013)	Silva et al.* (2010)	Xavier- Carvalho	Oliveira (2014)	Dang (2016)	Our data- Recife 92016)
	GG	4 (0.02)	0 (0)	0 (0)	2 (0.01)	0 (0)	3 (0.06)	1(0.01)	0 (0)	4 (0.0078)	11 (0.07)
Severe cases	GA	38 (0.21)	43 (0.26)	16 (0.15)	29 (0.22)	10 (0.34)	18 (0.37)	33 (0.39)	33 (0.33)	92(0.18)	65(0.44)
	AA	140 (0.77)	124 (0.74)	87 (0.84)	104 (0.77)	19 (0.65)	28(0.57)	51 (0.60)	67 (0.67)	411(0.81)	70(0.48)
	Total	182	167	103	135	29	49	85	100	507	146
	Allele A	318 (0.87)	291 (0.87)	190 (0.92)	238 (0.88)	48 (0.83)	74 (0.75)	135 (0.79)	167 (0.835)	914 (0.999)	205 (0.706)
	Allele G	46 (0.13)	43 (0.13)	16 (0.08)	33 (0.12)	10 (0.17)	24 (0.25)	35 (0.21)	33 (0.165)	100	87 (0.294)
	Carrier G	42 (0.23)	43 (0.26)	16 (0.15)	31(0.23)	10		34 (0.40)	33(0.33)	96 (0.19)	76(0.52)
mild cases	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	26 (0.11)	17 (0.09)	4(0.04)	8(0.02)	4(0.064)
	GA	1 (0.02)	6 (0.08)	0 (0)	19 (0.11)	19 (0.23)	106 (0.45)	71 (0.37)	26(0.26)	77(0.19)	18(0.29)
	AA	50 (0.91)	66 (0.92)	27 (1)	157 (0.89)	64 (0.77)	102 (0.43)	105 (0.54)	70(0.70)	323 (0.80)	40(0.64)
	Total	51	72	27	176	83	234	193	100	408	62
	Allele A	101 (0.99)	138 (0.96)	54 (1)	333 (0.94)	147 (0.88)	310 (0.66)	275 (0.73)	166 (0.83)	723 (0.89)	98 (0.79)
	Allele G	1 (0.01)	6 (0.04)	0 (0)	19 (0.05)	19 (0.12)	158 (0.34)	105 (0.28)	34 (0.17)	93 (0.11)	27 (0.21)

Carrier G	1	6	0	19	19	88	30(0.30)	85 (0.21)	22 (0.35)
-----------	---	---	---	----	----	----	----------	-----------	-----------

Supplementary table 2: Meta analysis for -336SNP including all studies

	Meta-analysis/ randomeffect					Heterogeinety		
	Severe cases or DHF	Mild cases or DF	OR	95% CI	p value	Q (p value)	I ²	Funnel plot
Allele G	427	461	1.78	[0.9;3.52]	0.1	32.74 (< 0.0001)	76.1%	t=2.99,p=0.02
Genotype GG	25	59	0.71	[0.16;3.14]	0.65	30 (0.0002)	32.1%	t=0.16,p=0.87
Carriers G	402	402	1.91	[0.93;3.90]	0.07	28.71(< 0.0001)	73.9%	t=2.78,p=0.03

Meta-analysis for -336 SNP in *DCSIGN*. Allelic, genotype and carriers frequencies were compared between severe cases (or DHF) versus DF. We showed only the random effect. Values OR (95% CI). Heterogeneity was quantified by Cochran's Q and I² statistic.

Supplementary table 3: Meta analysis for -336SNP including only studies from Brazil

	Meta-analysis/ randomeffect					Heterogeinety		
	Severe cases or DHF	Mild cases or DF	OR	95% CI	p value	Q (p value)	I ²	Funnel plot
Allele G	179	323	0.90	[0.60;1.35]	0.62	8.38 (0.04)	64.2%	t=-0.7,p=0.56
Genotype GG	15	51	1	[0.61;1.65]	0.98	8.64 (0.03)	65.3%	t=-2.45,p=0.14
Carriers G	131	272	0.45	[0.15;1.28]	0.13	5.19 (0.16)	42.2%	t=0.39,p=0.73

Meta-analysis for -336 SNP in *DCSIGN*. Allelic, genotype and carriers frequencies were compared between severe cases (or DHF) versus DF only in Brazilian studies. We showed only the random effect. Values OR (95% CI). Heterogeneity was quantified by Cochran's Q and I² statistic.

Supplementary table 4- Meta-analysis for SNP -336DCSIGN SNP- Asian populations

	Meta-analysis/ randomeffect					Heterogeinety		Funnel plot
	Severe cases or DHF	Mild casos or DF	OR	95% CI	p value	Q (p value)	I ²	
Allele G	248	158	2.33	[1.11;4.88]	0.02	25.6 (0.0001)	80.5%	t=3.62,p=0.02
Genotype GG	10	8	1.20	[0.20; 7.20]	0.84	3.79 (0.15)	78.9%	t=5.12,p=0.12
Carriers G	238	130	2.49	[1.17;5.33]	0.02	23.71 (0.0002)	47.2%	t=3.73,p=0.02

Meta-analysis for -336 SNP in *DCSIGN*. Allelic, genotype and carriers frequencies were compared between severe cases (or DHF) versus DF only in Asian studies. We showed only the random effect. Values OR (95% CI). Heterogeneity was quantified by Cochran's Q and I² statistic.

Errata

Na seção resultados, linha 184. Onde lê-se: $OR_{GG_{genotype}} = 1.00$; $p = 0.98$; $OR_{G_{carrier}} = 0.45$; $p = 0.13$. Corrigi-se para $OR_{GG_{genotype}} = 0.45$; $p = 0.13$; $OR_{G_{carrier}} = 1.01$; $p = 0.98$.

A tabela suplementar 2 substitui-se por esta:

	Meta-analysis/ randomeffect					Heterogeinety		
	Severe cases or DHF	Mild cases or DF	OR	95% CI	p value	Q (p value)	I ²	Funnel plot
Allele G	427	461	1.36	[0.91;2.02]	0.1	37.60 (< 0.0001)	76.1%	t=2.99,p=0.02
Genotype GG	25	59	0.59	[0.26;1.30]	0.19	8.84 (0.18)	32.1%	t=0.16,p=0.87
Carriers G	402	402	1.52	[0.98;2.32]	0.06	34.53(< 0.0001)	73.9%	t=2.78,p=0.03

CAPÍTULO 5

ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM DENGUE E OUTRAS INFECÇÕES FEBRIS

Nesse capítulo serão apresentados resultados, de expressão gênica em amostras de sangue total de pacientes com dengue e outras infecções febris similares. Esse tipo de estudo se torna interessante para indicar potenciais genes que juntamente com a confirmação através de outros estudos funcionais mais específicos possam funcionar como biomarcadores para dengue ou para uma forma específica da doença além de poder identificar vias metabólicas com importante participação no curso da infecção.

A partir de 2015 o Brasil passou a enfrentar dois novos problemas de saúde pública com a emergência das novas arboviroses, zika e chikungunya, ampliando problemas na rede de saúde pública que já enfrenta dificuldades com as epidemias de dengue. A circulação simultânea dessas arboviroses que possuem sintomas muito similares aumentou a dificuldade do correto diagnóstico e conseqüentemente o tratamento e acompanhamento adequado para cada uma destas, a fim de evitar o desenvolvimento de formas mais graves, como no caso da dengue. Além disso, muito pouco se sabe a respeito da imunopatogênese de tais doenças.

Como será descrito a seguir na metodologia, as amostras utilizadas nesse estudo foram coletadas na epidemia de dengue 2013 nas cidades de Campos/RJ e Campo Grande/MS. Adicionalmente, algumas amostras foram coletadas na cidade do Rio de Janeiro, no Instituto Nacional de Infectologia/ FIOCRUZ, entre final de 2015 e início de 2016, período onde houve crescente número de infecções pelo vírus da Zika, e também coincidiu com a identificação, mesmo que em menor número, de casos da febre

chikungunya. Todas as amostras foram testadas para dengue, zika ou chikungunya. Se positivas para dengue foram classificadas em com e sem sinais de alarme e quando negativa para todos os testes foram classificadas como outras infecções febris. Foram testados genes de vias do sistema imune, como antivirais, pró e anti-inflamatórias. A metodologia empregada e os resultados obtidos estão apresentados a seguir.

I- METODOLOGIA

1- AMOSTRAS UTILIZADAS

Durante a epidemia de 2013, amostras de sangue total de 48 pacientes com suspeita de dengue, durante a fase aguda, foram coletadas nas cidades de Campos dos Goytacazes- Rio de Janeiro (Centro de Referência da Dengue- CRD) e no estado de Mato Grosso do Sul (Hospital Universitário Esterina Corsini/Universidade Federal do Mato Grosso do Sul). As amostras foram coletadas em tubos paxgene (Preanalytix/ QIAGEN) e estocadas a -70° C até o momento da extração. A classificação clínica foi realizada de acordo com critérios da OMS 2009 (WHO 2009) em casos com ou sem sinais de alarme. Nenhum paciente foi classificado como grave. Posteriormente foram consideradas como dengue, amostras positivas para um dos seguintes testes: IgM ou IgG, PCR (Chang & Vorndamt 1992) ou NS1 (Biorad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France).

Adicionalmente 10 amostras foram coletadas também na fase aguda, no Instituto Nacional de Infectologia (INI), FIOCRUZ – Rio de Janeiro entre os meses de dezembro de 2015 e março de 2016, durante a epidemia de zika. Estas amostras foram testadas por PCR em tempo real para zika, chikungunya ou dengue (Santiago et al. 2013; Lanciotti et al. 2008; Pongsiri et al. 2012).

2- GENES SELECIONADOS

Foram selecionados 93 genes envolvidos em vias do sistema imune. Adicionalmente foram utilizados três genes constitutivos. Os genes selecionados estão mostrados na tabela em anexo (anexo 1), as sequências dos oligonucleotídeos estão disponíveis caso necessário.

3- EXTRAÇÃO DE RNA

RNA foi extraído de tubos de pax genes (PreAnalytiX, Quiagen/BD) de acordo com instruções do fabricante. O sangue foi centrifugado a 5000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e a ele foram adicionados 4mL de água RNase free cedida pelo kit. Em seguida, o sedimento foi homogeneizado em vórtex e centrifugado a 5000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e ao sedimento foram adicionados 350µL de tampão BM1. A solução foi transferida para um tubo de 1,5mL e acrescentados 300 µL de BM2 e 40 µL de proteinase K. As amostras foram então incubadas a 55°C durante 10 minutos sob agitação. A amostra foi adicionada a coluna pax genes Shredder spin columns, cedida pelo kit e posteriormente centrifugado 20000 x g por 3 minutos. A esse sobrenadante coletado foram adicionados 700µL de isopropanol. Esta solução foi adicionada a uma nova coluna de membrana de sílica, também fornecida pelo kit (Pax genes Spin columns) e centrifugada a 20000xg por 1 minuto. Após, a membrana foi lavada com 350µL de tampão BM3 e centrifugado novamente a 20000g por 1 minuto.

Posteriormente, a membrana foi lavada por duas vezes com tampão BM4 e centrifugados a 20.000xg por 2 minutos. A coluna foi então transferida para um tubo novo e centrifugado novamente a 20000xg por 1 minuto. A coluna foi transferida novamente para um novo tubo e foram adicionados 80µL de tampão de eluição BR5 seguido de centrifugação 20.000xg por 1 minuto. O RNA foi desnaturado por 5 minutos e armazenados a -80°C.

4- QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

O rendimento da extração de RNA foi aferido em NanoDrop 1000 (ThermoFisher). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese capilar usando Agilent 2100 Bionalyzer e *kit Agilent Total RNA* de acordo com instruções do fabricante (Agilent). Nesta técnica, o RNA

previamente marcado com um corante, é submetido à eletroforese capilar sendo a intensidade da fluorescência captada em um ponto fixo. A execução da técnica consistiu em preparar o chip para receber as amostras, acrescentando a matriz de separação e um reagente condicionante. Posteriormente, foi acrescentado o RNA total em cada poço do chip. Ao RNA foi acrescentado o reagente *marker*. A estimativa de tamanho do RNA foi obtida por comparação com o *Ladder* presente no *chip*.

Posteriormente, o RNA foi reversamente transcrito em cDNA usando Super Script Vilo cDNA (ThermoFisher scientific) de acordo com instruções do fabricante. Em poucas palavras, 250ng de RNA foram reversamente transcritos utilizados com 2 µl de Super Script Vilo. A reação ocorreu a 42°C, 1h seguidos de 5 minutos a 85°C. Ao final da reação as amostras foram diluídas para um volume final de 50 µl (100 ng/ µl)

5- PCR MULTIPLEX

Primeiramente o cDNA foi pré amplificado em placas de 96 poços contendo um mix de 96 pares de oligonucleotídeos (anexo 1) na concentração de 20µM diluídos a 5Mm Tris; 0.1mM EDTA em um volume final de 500 µL. Para cada poço, foi adicionado 1,25 µl of cDNA (5ng/µl) 2,5 µl of Taq pre Amp Master Mix 2X (Applied Biosystem/ ThermoFisher) e 1,25 µl do mix de oligonucleotídeos. A reação foi realizada em termociclador usando a seguinte condição de ciclagem: desnaturação a 95°C - 15 s seguidos de 14 ciclos de anelamento e extensão a 60°C - 4 minutos. Após a pré amplificação, foram adicionados 20 µl de tampão TE em cada amostra.

O PCR multiplex foi realizado em sistema Biomark de microfluídica (Fluidigm) de acordo com as instruções do fabricante. Às amostras (cDNAs) foi adicionado um mix contendo TaqMan gene expression Master Mix (Applied Biosystem/ ThermoFisher), Eva green (Applied Biosystem/ ThermoFisher) e TE 1X. Aos oligonucleotídeos foi adicionado reagente assay load e TE (1X). Reação foi realizada usando condições padrões de ciclagem.

6- ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Primeiramente dentre as amostras amplificadas, aquelas cuja curva de dissociação apresentou mais de um pico foram excluídas da análise. O gene da proteína ribossomal L13 (RPL13) foi usado como constitutivo. Os dados foram analisados pela metodologia $2^{-\Delta Ct}$. Os gráficos e testes estatísticos foram realizados em software Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A diferença entre os grupos foi avaliada usando teste Kruskal Wallis e pós-teste Dunn comparando todos os subgrupos.

II- RESULTADOS

1- CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Dentre as 48 amostras coletadas na epidemia de 2013, 32 tiveram diagnóstico confirmado para dengue, 5 tiveram diagnóstico indeterminado e 11 foram negativas para todos os testes (NS1, IgG e IgM e PCR). Amostras positivas foram classificadas em dengue com ou sem sinais de alarme (DVCA e DVSA, respectivamente) de acordo com critérios da OMS 2009 (Who 2009); Amostras negativas foram agrupadas como outras infecções febris (OIF) – Tabela 3

Dentre as amostras coletadas em 2016, todas foram testadas por PCR em tempo real para zika, dengue e chikungunya. Três desses pacientes tiveram diagnóstico de chikungunya confirmado por PCR. Estes pacientes apresentaram sintomas clínicos como: Febre, mialgia, artralgia, cefaléia, vômitos, náuseas e dor retroorbital. As demais amostras foram negativas para zika, chikungunya ou dengue. Estes pacientes apresentaram sintomas como: Febre, calafrios, lombalgia, manchas pelo corpo, exantemas difusos, hiperemia conjuntiva, prurido, dor nas articulações, diarreia, mialgia, cefaléia, dor retroorbital, dor abdominal, edema nas

articulações. Alguns desses casos tiveram diagnóstico clínico sugestivo de Zika, chikungunya ou mesmo dengue mas não foram confirmados laboratorialmente.

Adicionalmente, amostras negativas para dengue coletadas em 2013 foram também testadas para zika e chikungunya e todas foram negativas.

Tabela 2- Caracterização dos pacientes

	Pacientes 2013¹	Pacientes 2016²
	Sexo (idade média)	Sexo (idade média)
Dengue com sinais de alarme (DCA)	3 M (40±9) 9 F (36,9±16,4)	-
Dengue sem sinais de alarme (DSA)	6 M (28,5±11,5) 14 F (33,4±13,5)	-
Outras infecções febris (OIF)³	9 M (22,3 ±10,9) 6 F (46,2 ±12,6)	5 F (32 ±4) 2 M (36,5 ±9,2)
Zika	-	-
Chikungunya	-	3 F (51 ±19,8)
Total	47	10

1- Amostras coletadas nas cidades de Campos dos Goytacazes- Rio de Janeiro (Centro de Referência da Dengue- CRD) e no Estado de Mato Grosso do Sul (Hospital Universitário Esterina Corsini/Universidade Federal do Mato grosso do Sul). 2- Instituto Nacional de Infectologia/ FIOCRUZ. F: feminino, M: masculino. Todos possuem confirmação por diagnóstico clínico

2- ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM PACIENTES COM DENGUE, CHIKUNGUNYA E OUTRAS INFECÇÕES FEBRIS.

Foram analisados, a princípio 69 genes após exclusão daqueles que não tiveram amplificação com boa qualidade ou daqueles onde o número de amostras por grupo de comparação se tornou muito reduzido. O gene *RPL13* foi utilizado como normalizador. Foram comparados os grupos DVCA, DCSA, OIF 2013, CHIK e OIF2016. Pacientes DVCA e OIF, ambos os grupos coletados na epidemia de 2013, tiveram expressão diferenciada para os seguintes genes: *ALOX5AP*, *IL12*, *IL23A* e *SOD2* (Figura 6). *ALOX5AP*, *IL23A* e *SOD2*

apresentaram-se mais expressos em OIF, enquanto *IL12* apresentou-se mais expresso em pacientes DVCA.

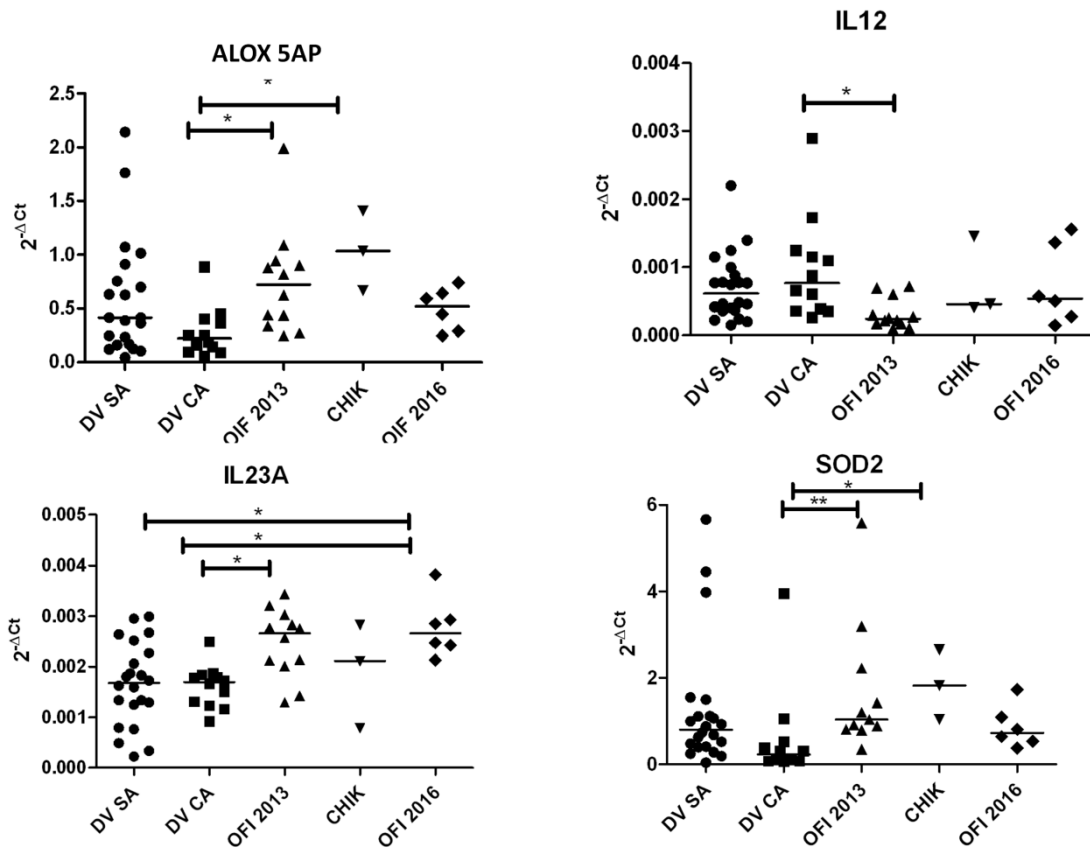


Figura 5- genes diferencialmente expressos entre os grupos dengue com sinais de alerta (DVCA) e outras infecções febris (OIF) 2013.

Os genes *BCL2* e *IL23A* tiveram maior expressão em pacientes OIF 2016 comparados a DVCA (Figura 7).

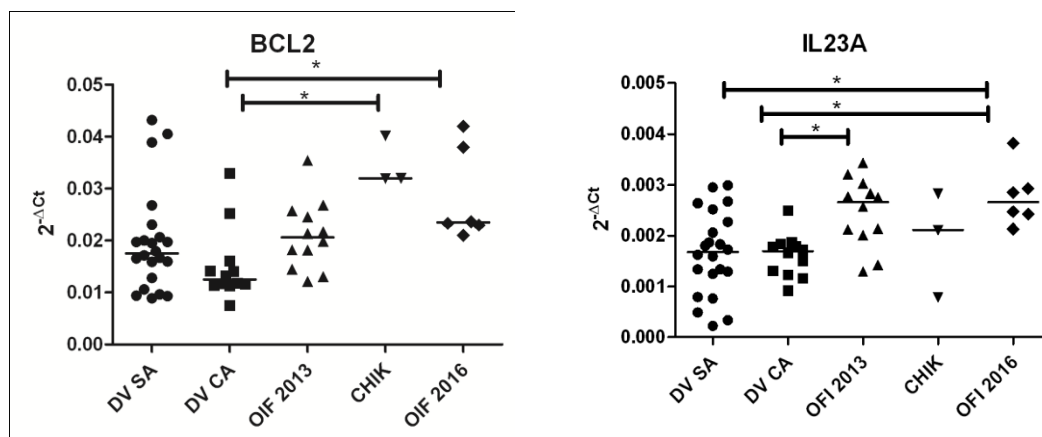
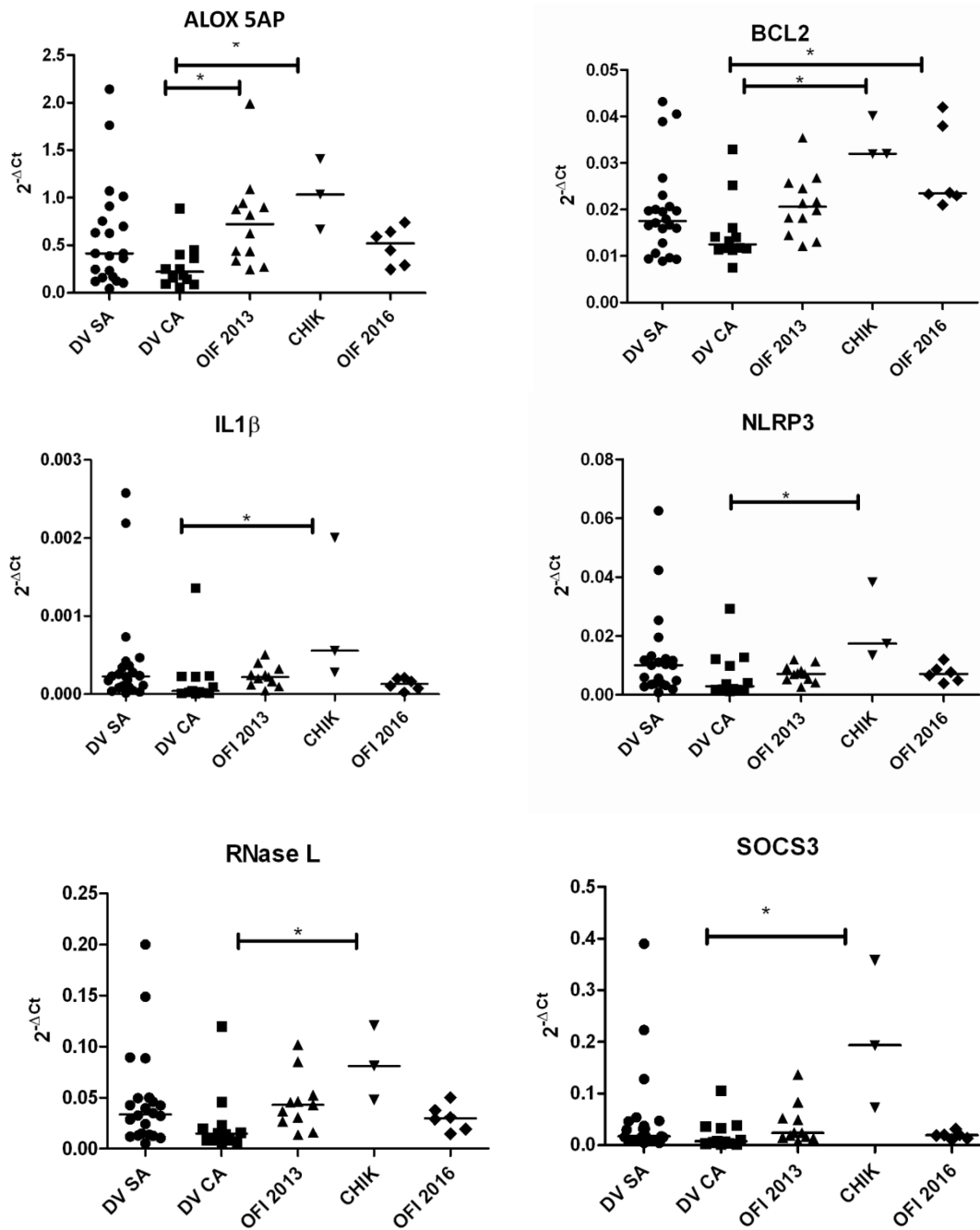


Figura 6- genes diferencialmente expressos entre os grupos dengue com sinais de alerta (DVCA) e outras infecções febris (OIF) 2016.

Pacientes com chikungunya apresentaram expressão aumentada e estatisticamente significativa quando comparado a DVCA para os seguintes genes: *ALOX5AP*, *BCL2*, *IL1 β* , *NLRP3*, *RNaseL*, *SOCS3*, *SOD2*, *TLR2* e *TLR8* (Figura 8). E ainda, pacientes com chikungunya apresentaram expressão aumentada do gene *ASMT* comparado ao grupo OIF 2016 (Figura 8).



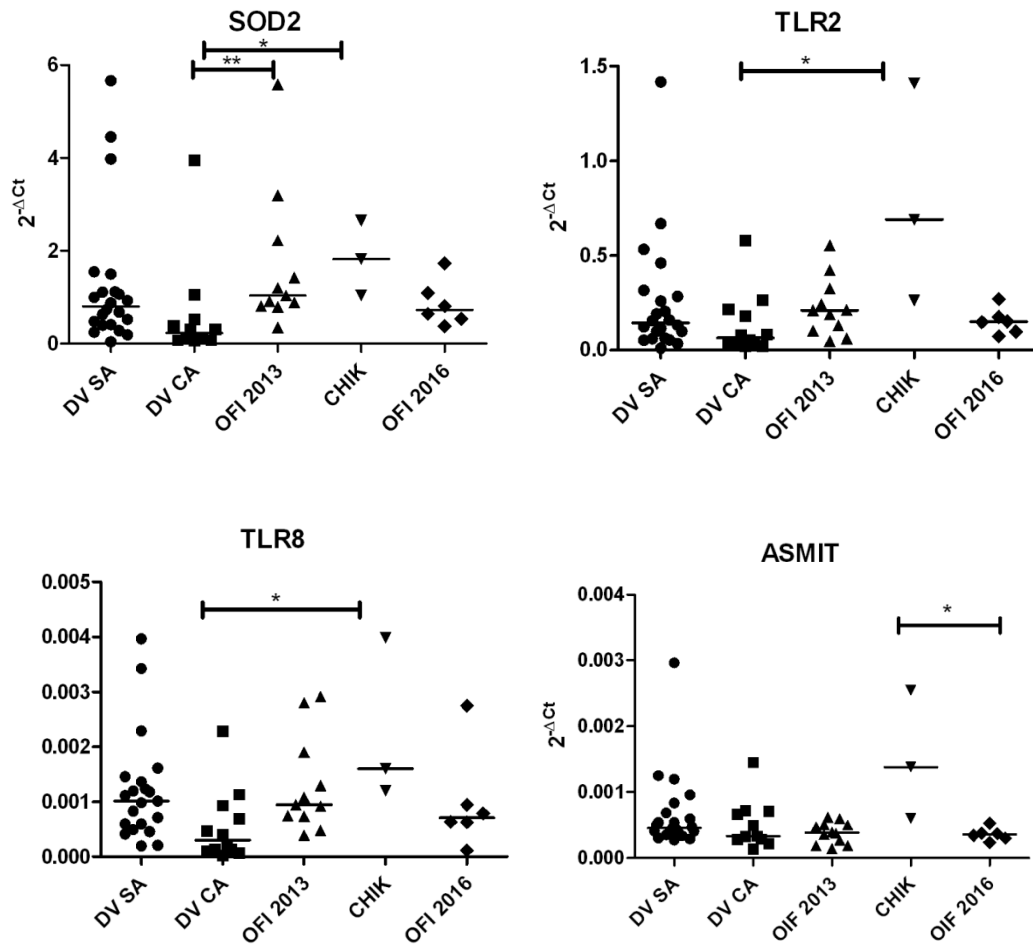
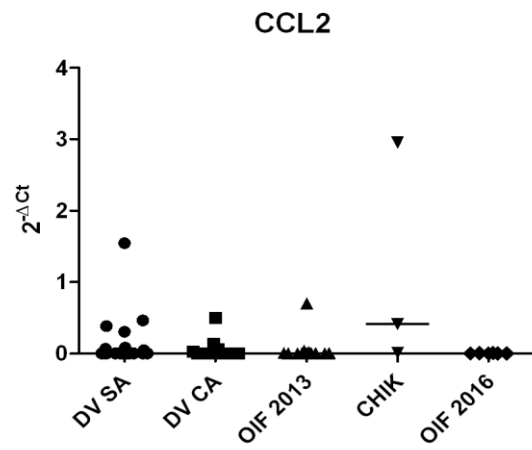
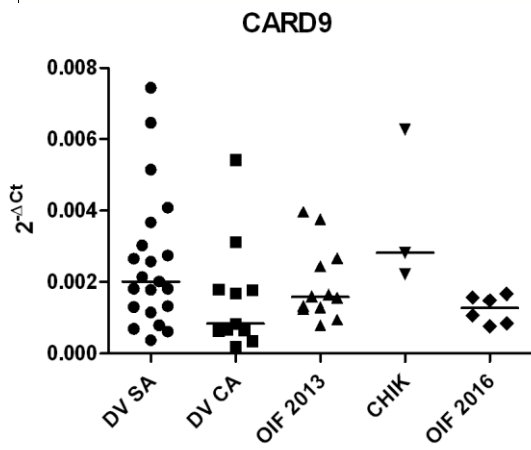
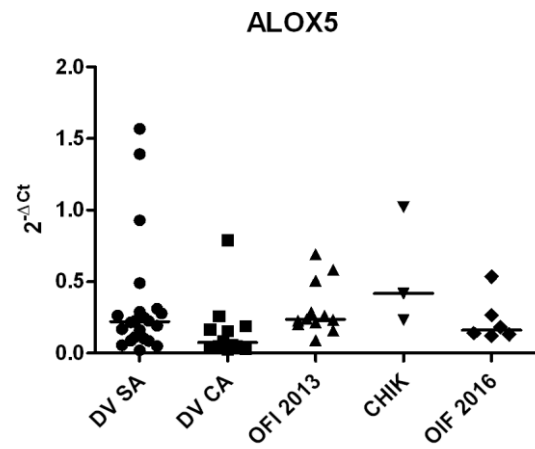
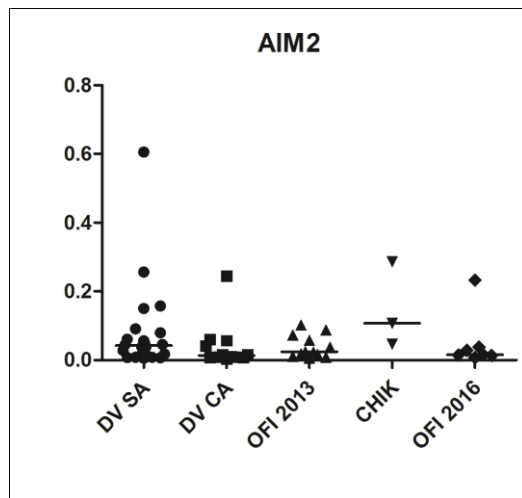
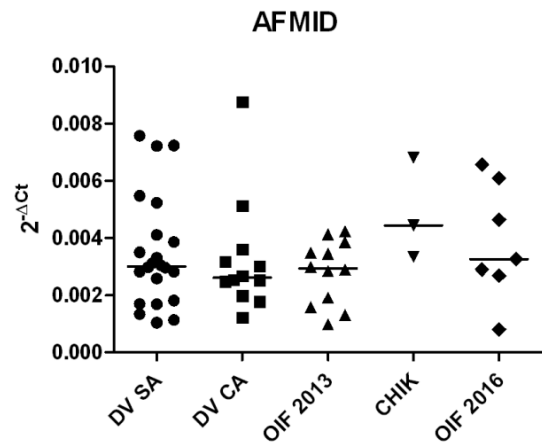
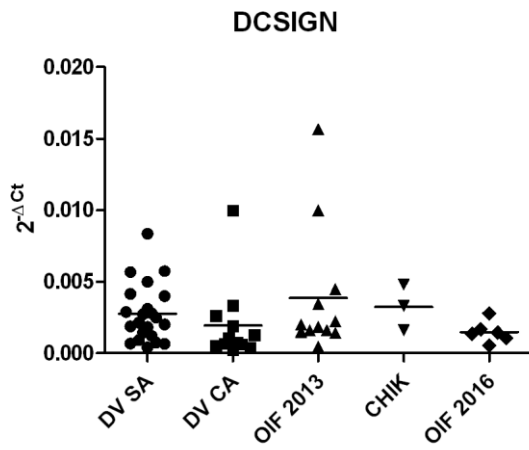
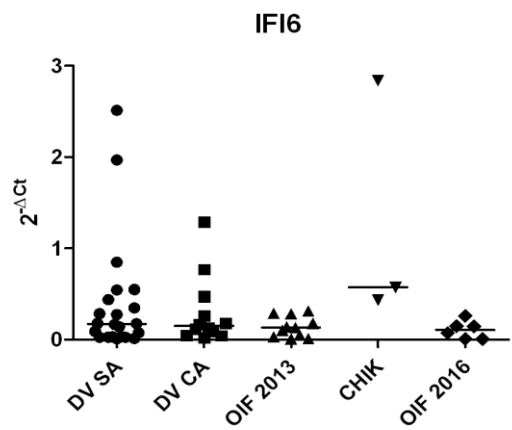
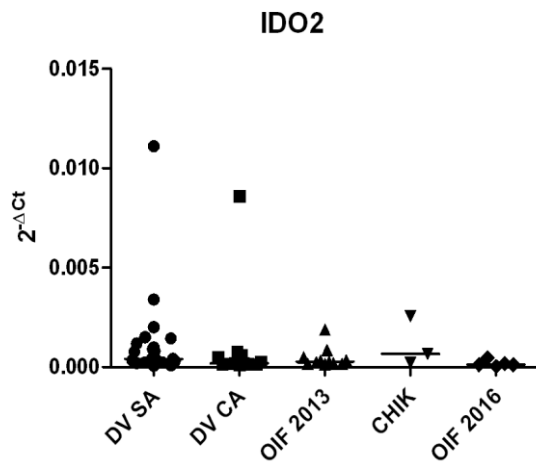
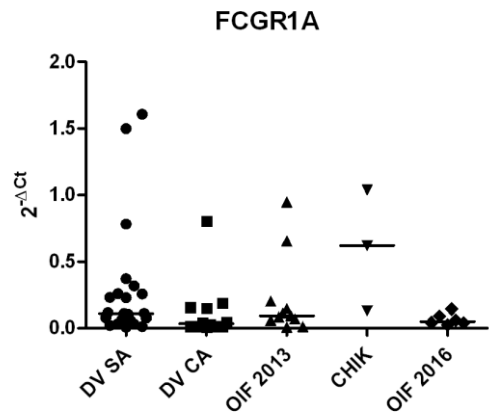
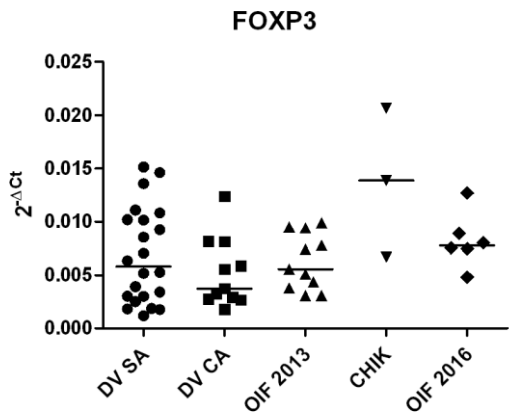
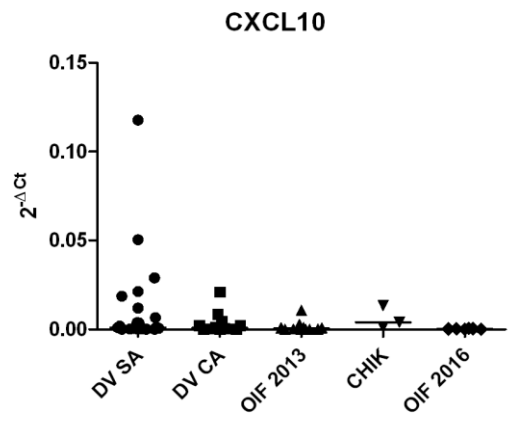
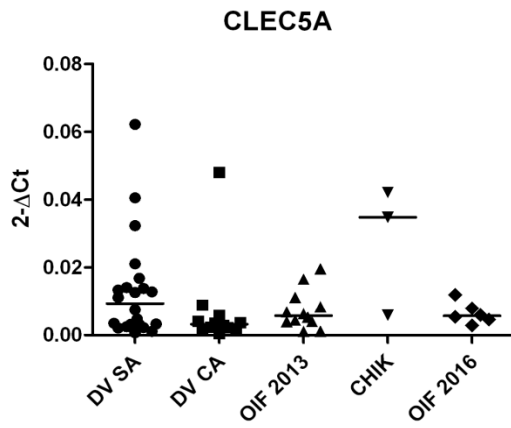
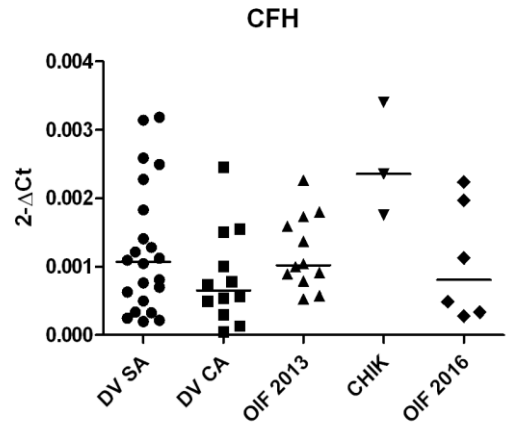
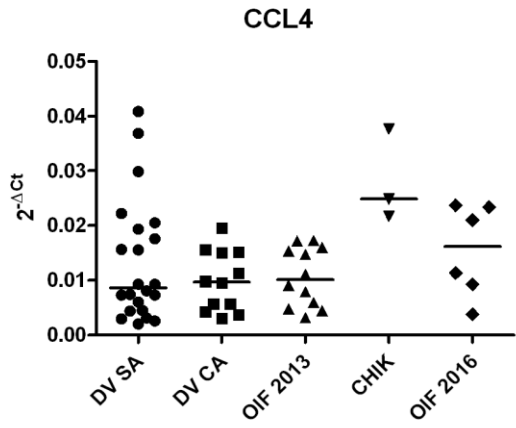
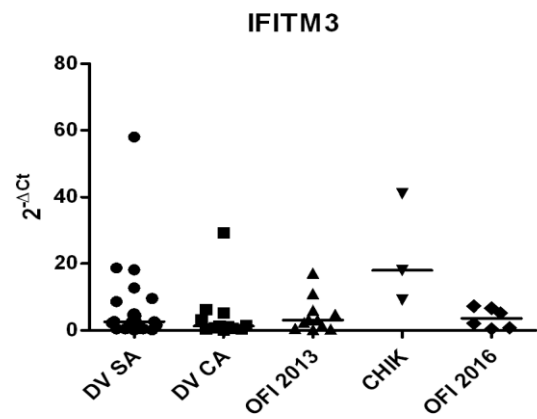
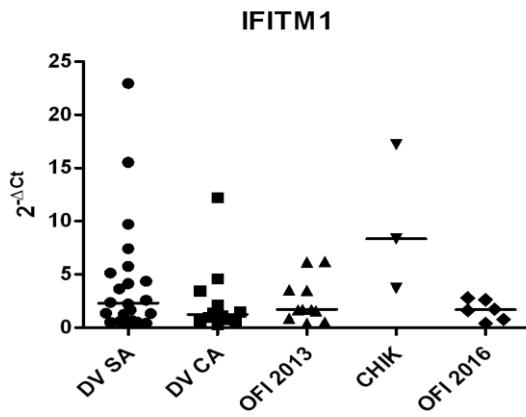
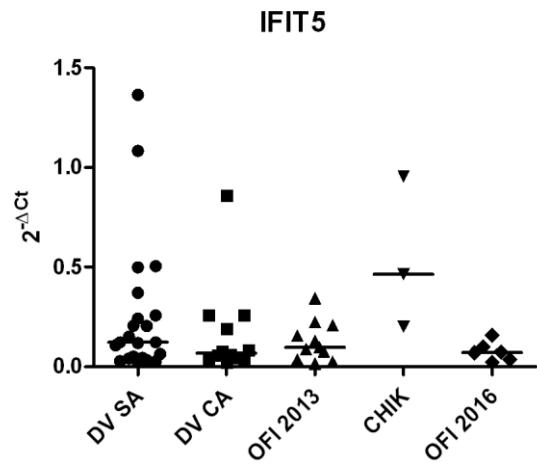
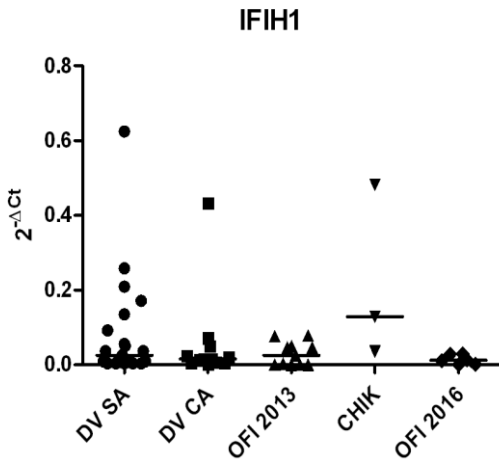
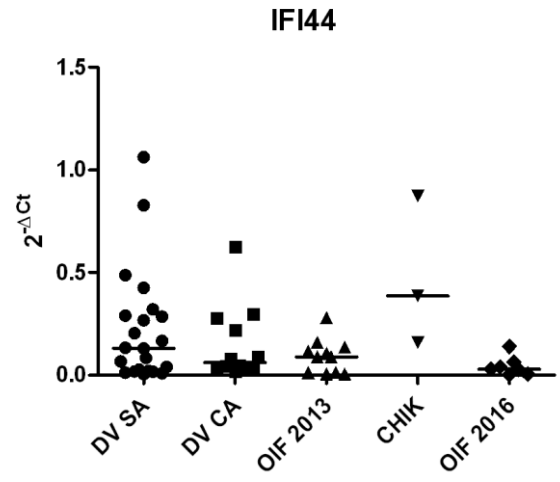
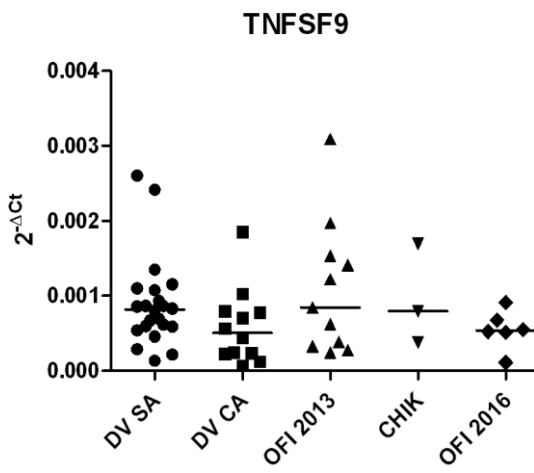


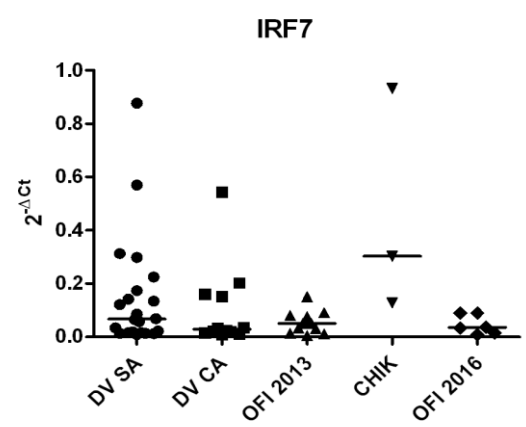
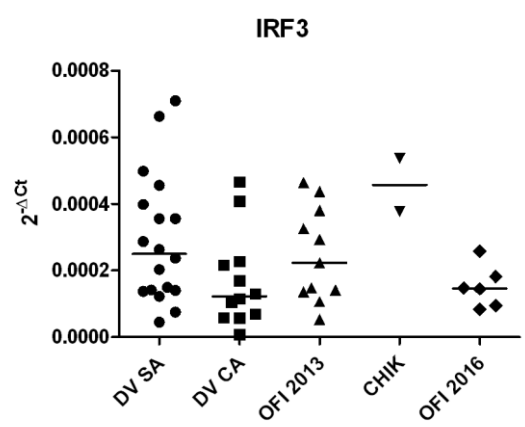
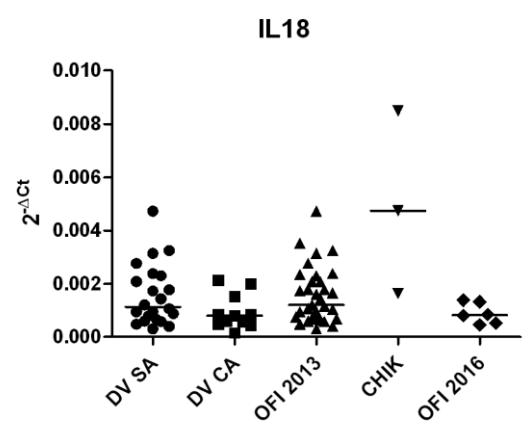
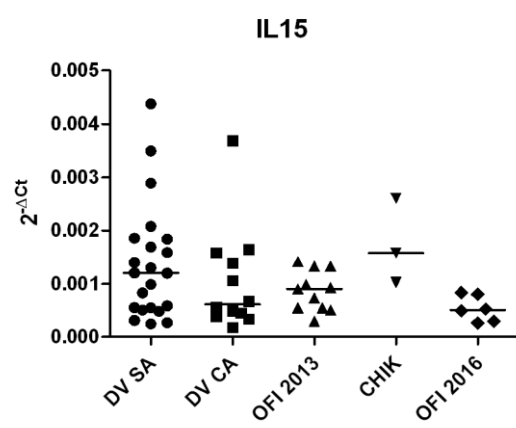
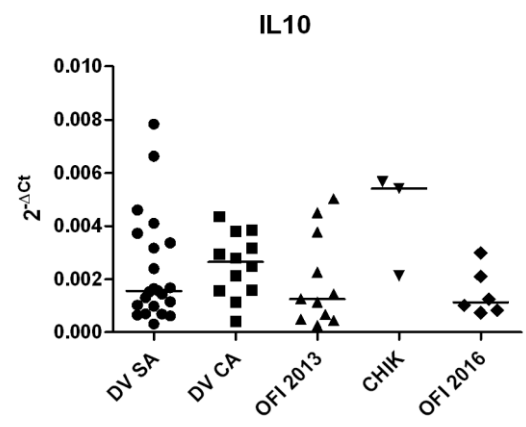
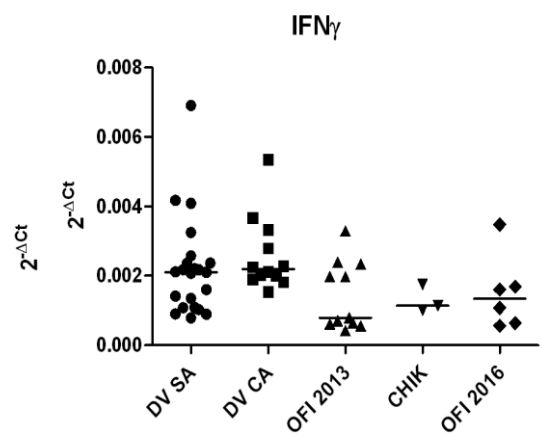
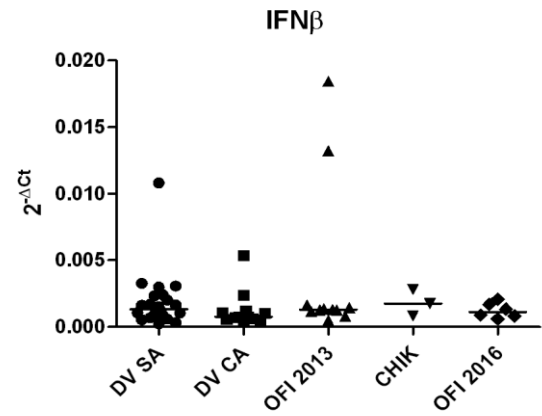
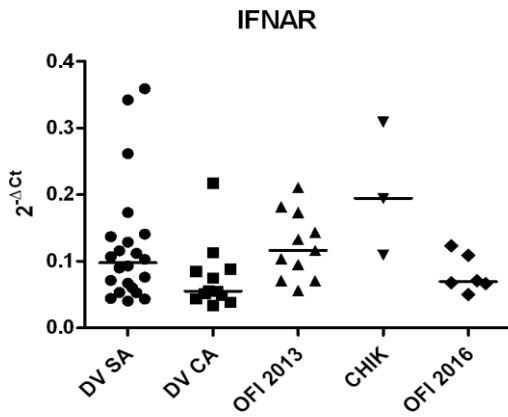
Figura 7- genes diferencialmente expressos entre os grupos chikungunya (CHIK), dengue com sinais de alerta (DVCA) e OIF 2016.

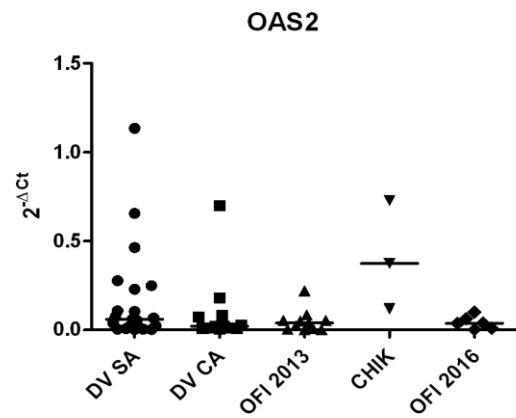
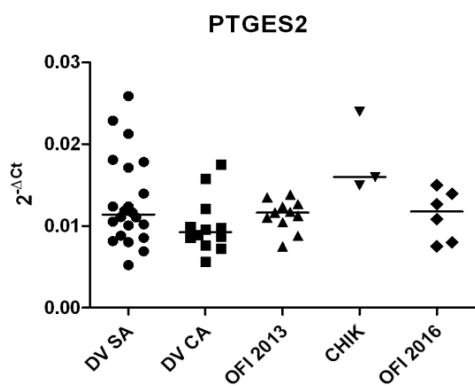
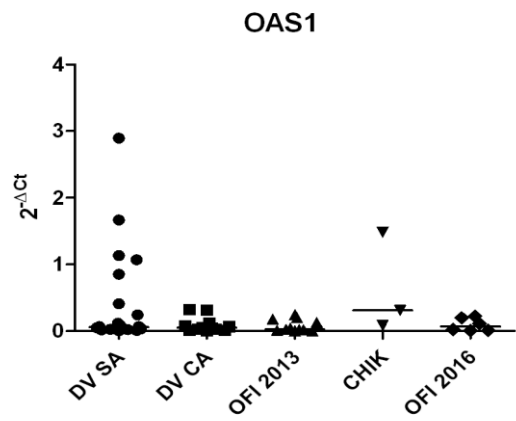
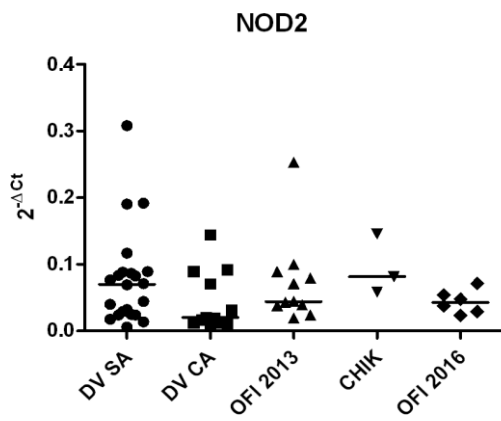
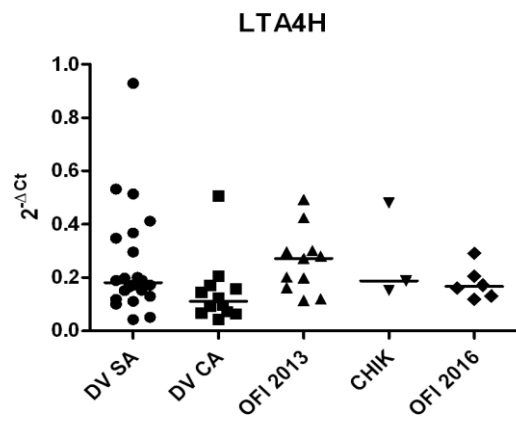
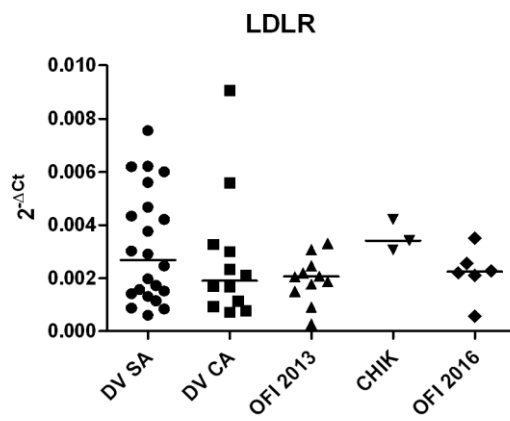
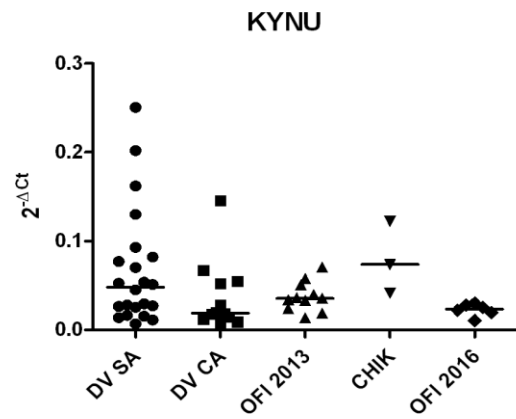
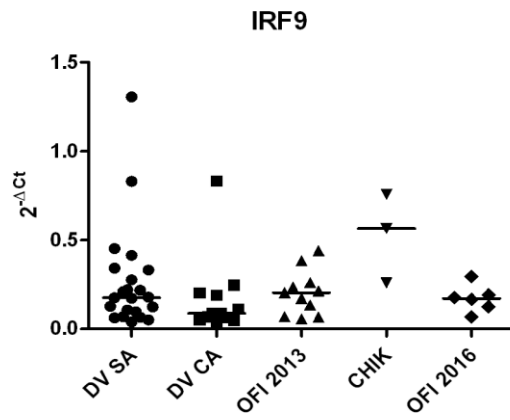
Os genes *DCSIGN*, *AFMID*, *AIM2*, *ALOX5*, *CARD9*, *CCL2*, *CCL4*, *CFH*, *CLEC5A*, *CXCL10*, *FOXP3*, *FCGR1A*, *IDO2*, *IFI6*, *TNFSF9*, *IFI44*, *IFIH1*, *IFIT5*, *IFITM1*, *IFITM3*, *IFNAR*, *IFN β* , *IFN γ* , *IL6*, *IL7*, *IL10*, *IL15*, *IL18*, *IRF3*, *IRF7*, *IFI35*, *TNF*, *TNFSF15*, *EGF*, *TLR3*, *TLR6*, *TLR7*, *TLR9*, *STING*, *TBK1*, *TGF β* , *TLR1*, *PPAR γ* , *PTGES2*, *RIG1*, *RIPK2*, *OASL*, *PARK*, *OAS2*, *OAS3*, *NOD2*, *OAS1*, *IRF9*, *KYNU*, *LDLR*, *LTA4H* não apresentaram diferença estatística entre os grupos (Figura 9).

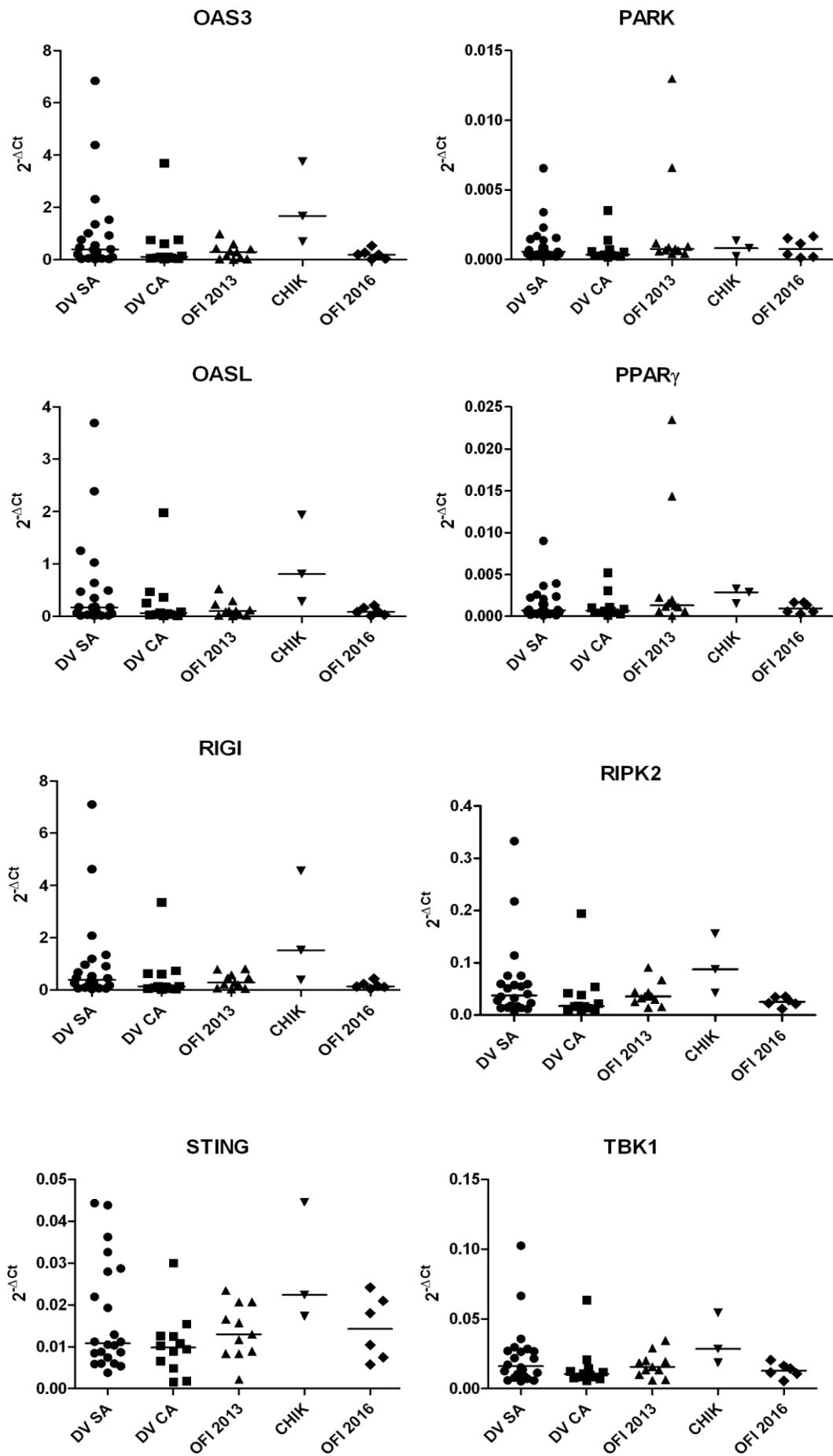


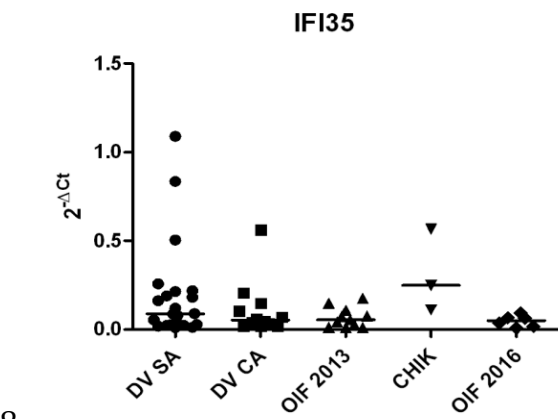
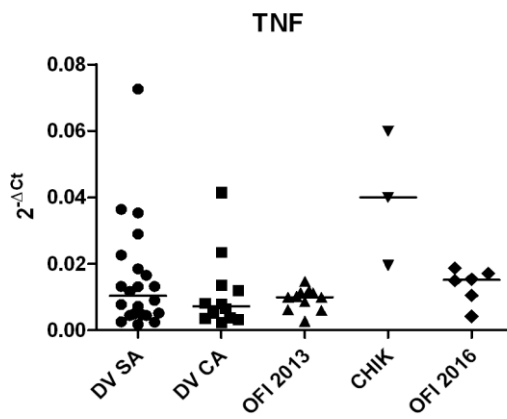
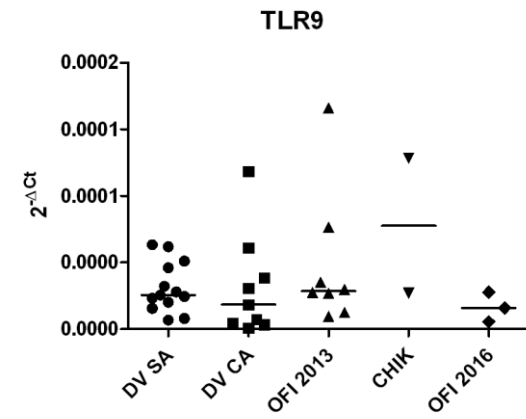
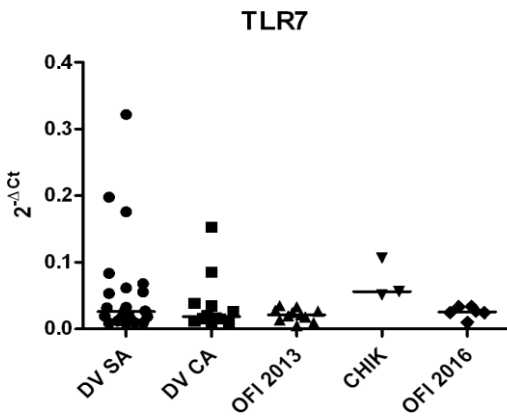
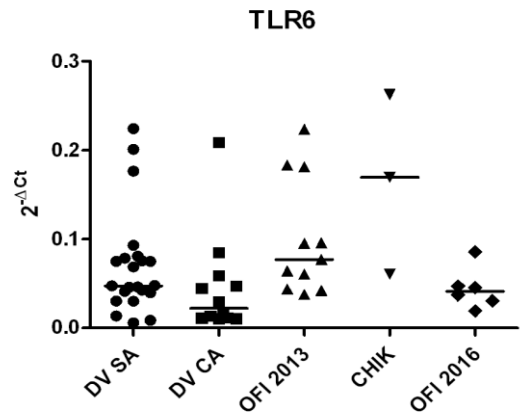
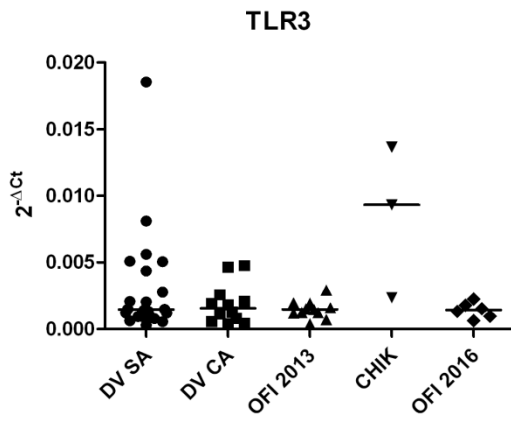
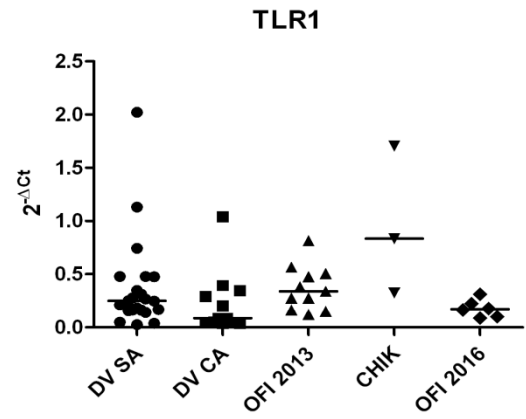
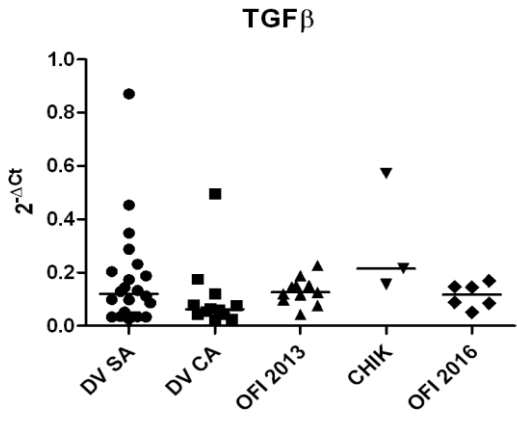












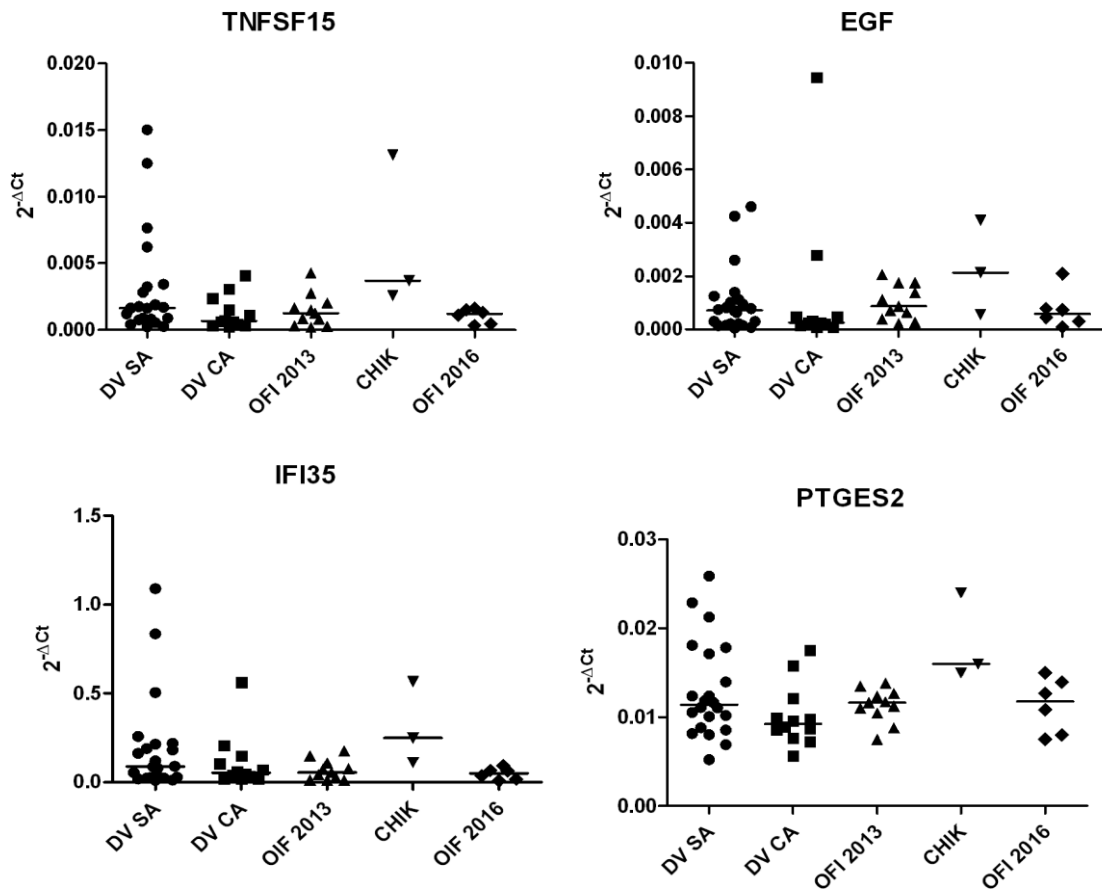


Figura 8 – Genes não diferencialmente expressos entre os grupos dengue Chikungunya e outras OIF

CAPÍTULO 6

I- DISCUSSÃO

Nas últimas décadas tem sido crescente o número de evidências mostrando como o perfil genético dos indivíduos infectados com DENV pode influenciar na gravidade da doença. A dengue é uma doença multifatorial onde as diferenças entre as cepas infectantes e o modelo de infecção secundária por um segundo sorotipo apresentam-se como as hipóteses mais aceitas para explicar a evolução para formas graves. Entretanto, a ocorrência dos casos graves, principalmente aqueles ocorridos durante uma infecção primária, não são facilmente explicados, necessitando de hipóteses mais complexas. Neste contexto, vários estudos epidemiológicos demonstram o alto índice de ocorrência de dengue grave ou FHD durante infecções primárias tanto em adultos quanto em crianças (Balmaseda et al. 2006; Hung et al. 2004; Halstead et al. 2002; Lin et al. 2010; Soo et al. 2016; Khurram et al. 2014).

Nos capítulos 2, 3 e 4, apresentamos os resultados que mostram o modelo da participação das características genéticas dos pacientes no desfecho da dengue. Fortes indícios mostram que a ancestralidade africana estaria relacionada à proteção a ocorrência de casos mais graves de dengue (Scott B. Halstead et al. 2001; Sierra et al. 2006). Da mesma forma muitos trabalhos têm mostrado SNPs associados a um determinado desfecho da dengue, como apresentado na introdução. Como foi visto nos capítulos 2 e 3 foram apresentados estudos epidemiológicos e genéticos realizados em duas populações independentes. A primeira população de casos foi composta por 88 crianças e adolescentes internadas em unidades de tratamento intensivo de centros de referência para tratamento de dengue, na cidade do Rio de Janeiro, durante a epidemia que assolou vários estados brasileiros durante o verão de 2007/2008, cujo sorotipo predominante foi o DENV-2. Como controles, foram recrutados para cada caso em média quatro indivíduos, todos com idade próxima entre si, variando até 3

anos para mais ou para menos. Todos os 335 controles foram selecionados na vizinhança dos casos, sendo assim, possuem grandes chances de terem sido infectados pelo mesmo sorotipo de DENV na mesma época em que os casos.

Nessa população do Rio de Janeiro, nós avaliamos o estudo de associação entre vários SNPs em genes de resposta imune e gravidade a dengue, um estudo de detecção de TNF em soro de pacientes, além de meta-análises para o SNP -308 (rs1800629) no gene TNF e outra para o SNP -336 (rs4804803) no gene DC-SIGN. Dentre os SNPs testados no caso-controle, aqueles que mostraram associações foram o SNP rs1285933 no gene CLEC5A e o SNP rs4804803 no gene DC-SIGN, sendo o primeiro SNP associado ao risco e o segundo SNP associado à proteção à dengue grave.

Com esses resultados na população do Rio de Janeiro, resolvemos fazer a replicação genética do achado de associação dos SNPs rs1285933 e rs4804803 em uma segunda população também formada por crianças e adolescentes recrutada na cidade de Recife – Pernambuco. Esta foi composta por 156 pacientes internados. Nós classificamos os pacientes em dois grupos: (1) Brandos, incluindo aqueles sem ou com apenas um sinal de alerta (hipotensão, sangramento de mucosas, plaquetopenia, dor abdominal, vômitos persistentes); (2) Graves: pacientes que apresentaram plaquetopenia e extravasamento (hipotensão e hemoconcentração ou derrame), além de sangramentos graves.

Nesta população, ambos os SNPs (rs1285933 e rs4804803) foram associados à gravidade a dengue. Portanto, inicialmente para o SNP de *CLEC5A* confirmamos o achado do Rio de Janeiro a despeito de usar uma população onde o desenho é do tipo “casos apenas” (do inglês *cases-only* ou case-case), onde o grupo controle é composto por pacientes com a forma branda da doença. A utilização de casos brandos como controles é uma estratégia comum em estudos de associação para doenças complexas. Por exemplo, estima-se que por sorologia IgG, 80-90% de adultos em áreas endêmicas, como as periferias de centros urbanos no Brasil,

são positivos. Ainda, reforça-se a lógica da genética do hospedeiro como fator relevante para o desencadeamento da doença, já que uma parcela grande de indivíduos expostos se apresenta assintomática, sugerindo uma resistência biológica/genética para a doença e outros apresentam formas graves indicando forte suscetibilidade. Portanto, desenhos de casos com um grupo de pacientes brandos como controles é uma alternativa legítima para estudos de associação baseados em população (Pacheco & Moraes 2009; Quirico-Santos et al. 2006).

A classificação adotada para os pacientes do estudo de Recife foi uma tentativa de tornar o estudo comparativamente mais próximo do realizado no Rio de Janeiro, especialmente nos critérios de gravidade, pois esse foi composto por pacientes com dengue e comparado com controles saudáveis. Todos os controles relataram nunca terem sido internados em unidades de tratamento intensivo (UTIs) por suspeita de dengue durante ou anteriormente ao período da epidemia em que os casos foram coletados, 2007/2008. Posteriormente, cerca de metade dos indivíduos apresentaram-se como IgG⁺ na análise sorológica de dengue (capítulo 2). Dessa forma, análises adicionais foram realizadas onde os casos foram comparados aos grupos controles IgG⁺ e IgG⁻, separadamente. A partir dessas análises observamos uma perda de poder devido a diminuição do tamanho amostral o que pode ter resultado, para o SNP rs1285933, na perda da significância estatística para o grupo de comparação casos *versus* controles IgG⁺, entretanto o valor de OR sofreu pouca alteração. Mesmo assim quando o grupo casos *versus* controles IgG⁻ foi comparado, o valor de OR manteve-se estatisticamente significativo, sugerindo que de fato existe uma associação entre o SNP estudado e dengue independente da forma da doença.

O grupo de controles de Recife (capítulo 3) tem tamanho amostral reduzido, e há uma flutuação que pode ser observada na frequência de heterozigotos de CLEC5A. Mesmo assim, os dados de carreador de T replicam o achado do primeiro estudo de associação nas crianças do Rio de Janeiro. Embora a flutuação de heterozigotos possa ser uma fragilidade, a

frequência alélica se mantém parecida com o que é observado em Brasileiros de outras regiões do país. Em uma análise interessante, SNPs incluindo o rs1285933 no *CLEC5A* foram recuperados no estudo do EPIGEN (Kehdy et al. 2015). Esse estudo pioneiro fez genotipagens em larga escala para aprofundar a caracterização da diversidade genética entre Brasileiros. Os dados indicaram que as populações de Bambuí e Pelotas apresentam frequências semelhantes ao observado em Europeus com dados recuperados do projeto “1000 genomas” (alelo C - 52%, 46% e 47% respectivamente). Enquanto que a frequência em Salvador resgatada do EPIGEN de 34% é semelhante a frequência obtida em Africanos a partir do projeto “1000 genomas”, que é igual a 39%. Para esse SNP a frequência no grupo usado como controle foi de 49% no capítulo 2 (Rio) e capítulo 3 (Recife) semelhante ao observado em europeus. Os dados apontaram também frequência de 47% em Recifenses embora nesse caso apenas pacientes contribuíram para a estimativa que pode até contar com um viés, mas a alteração não deve ser muito importante na população geral. Portanto, as frequências em ambos os estudos são comparáveis porque os pacientes foram classificados de maneira similar quanto à gravidade e as populações das duas cidades são comparáveis quanto a frequências do alelo menos frequente. Infelizmente, ainda não foi possível um ajuste das análises, tanto na população do Rio quanto Recife para ancestralidade genética, que devido à alta miscigenação encontrada entre brasileiros se torna muito útil em estudos de associação genética.

Em seguida, nosso objetivo foi testar a expressão de *CLEC5A* assim como a influência do SNP rs1285933 na sua expressão. Para isso, foram usados monócitos de doadores voluntários com diferentes genótipos para o referido SNP. Como esperado, a infecção por dengue foi capaz de induzir uma regulação positiva de *CLEC5A* em monócitos após 24 horas de infecção (tanto por expressão de mRNA quanto por produção de proteína). Além disso, a expressão de *CLEC5A* mostrou-se correlacionada à produção de TNF nos sobrenadantes de culturas após 48 horas de infecção. Uma regulação positiva de *CLEC5A*, com consequente produção de TNF em macrófagos ou monócitos infectados por dengue já foi demonstrado

previamente por Chen et al. 2008 (Chen et al. 2008) e o mesmo grupo mais recentemente corroborou esses dados concomitante ao nosso estudo (Cheng et al. 2016).

Posteriormente, nós estratificamos os resultados de acordo com os genótipos do SNP rs1285933. Doadores com o genótipo CC mostraram uma maior expressão da proteína *CLEC5A* na superfície dos monócitos infectados com DENV durante 24 horas. Dessa forma, ao mesmo tempo que o genótipo TT ou carreadores de T (CT/TT) estão associados com gravidade a dengue, indivíduos com tais genótipos apresentam um decréscimo na produção de *CLEC5A* na superfície dos monócitos comparado a indivíduos CC. Como discutido no manuscrito do capítulo 3, nós não encontramos diferença significativa na produção de TNF entre os diferentes genótipos quando foram usados monócitos isolados. Um estudo prévio encontrou o SNP rs1285933 como sendo um eQTL (expression quantitative trait loci) para *CLEC5A*, após estimulação de monócitos com LPS (Zeller et al. 2010). O eQTL é um SNP capaz de regular a expressão de um determinado gene. Nossos resultados indicam que esse SNP também pode regular a expressão de *CLEC5A* em monócitos estimulados por dengue nas condições que usamos. Mas, ao mesmo tempo, a ausência de confirmação do resultado da associação de rs1285933 e TNF em monócitos foi surpreendente, uma vez que níveis mais altos de TNF no soro estavam associados ao genótipo TT que explicava, pelo menos em parte, o risco encontrado na parte genética do estudo (como demonstrado no capítulo 2). Na verdade, os resultados sugerem de fato que *CLEC5A* é um receptor central na ativação celular que culmina com a produção de citocinas e que o rs1285933 tem papel regulatório, mas curiosamente a estratificação de acordo com o genótipo não confirmou a associação do rs1285933 com os níveis de TNF em cultura de monócitos. Pode ser que tipo celular utilizado tenha influenciado esse resultado. Macrófagos inflamatórios podem produzir uma maior quantidade de TNF após a interação *CLEC5A*-DENV, tornando mais fácil a observação de uma diferença nos níveis dessa citocina entre os diferentes genótipos do SNP estudado. Os altos níveis de TNF encontrado no plasma também podem ser resultado da interação de

diferentes vias celulares ou mesmo de vias ainda pouco estudadas, como por exemplo, a produção de mediadores inflamatórios por plaquetas, que mesmo sendo anucleadas expressam fatores de transcrição como NF- κ B além de mediadores pro inflamatórios como IL1 β e o inflamossomo NLRP3 (Hottz et al. 2015; Rivadeneyra et al. 2016).

CLEC5A ou MDL-1 expressa uma proteína, uma lectina tipo C, presente em células mielóides (Bakker et al. 1999) e está associada à DAP-12, que é a uma molécula adaptadora, transmembrana que contém motivos de ativação baseado em tirosina (ITAMs). As vias de sinalização de DAP-12 são bem conhecidas em células natural killer (NK), porém esses modelos podem ser estendidos para monócitos e macrófagos. Quando um agonista se liga ao receptor associado à DAP-12, neste caso, o CLEC5A, Src quinases fosforilam resíduos de tirosina presentes nos ITAMs recrutando Syk e ou ZAP70 quinases levando a ativação de toda uma cascata de sinalização celular que finalmente culmina com a ativação e translocação de NF- κ B e consequente expressão de genes ou mediadores pro inflamatórios (Turnbull & Colonna 2007; Paradowska-Gorycka & Jurkowska 2013).

Estudos têm sugerido que DAP-12 pode apresentar atividade estimuladora ou inibitória, e alguns modelos têm sido propostos para explicar uma função inibitória da ativação celular. Um destas propostas seria de que este fator pode ser dependente da avidéz de ligação entre o receptor associado à DAP-12 e seu agonista (Turnbull & Colonna 2007). Quando esta ligação é de alta avidéz, DAP12 apresenta uma completa e robusta ativação caso contrário DAP12 pode ser parcialmente ativado apresentando função inibitória, como revisado por Turnbull & Colonna (2007). Este mesmo modelo já foi demonstrado para o receptor CD89 e TCR, que também são receptores que ativam moléculas adaptadoras contendo ITAMs (Pasquier et al. 2005; Stefanova et al. 2003). Nesses casos, a ligação de baixa avidéz entre o agonista e o receptor associado à DAP-12 resulta em uma incompleta fosforilação dos resíduos de tirosina nos motivos ITAMs com recrutamento preferencial de tirosinas fosfatases

1 (SHP1) ao invés de tirosina quinases que possuem função de ativação, o que culmina com a atenuação da ativação celular. Por outro lado, quando ocorre uma ligação de alta avidéz entre agonista e receptor associado à DAP-12 ocorre uma completa fosforilação dos motivos de ITAMs e recrutamento de SYK quinases, MAPK e NF-κB e assim agindo sinergicamente com outras vias, como a de TLR (Turnbull & Colonna 2007).

Como foi demonstrado previamente que uma fraca ligação entre CLEC5A e o vírus da dengue (Tung et al. 2014; Lo et al. 2016) é observada, nós sugerimos que em condições de baixa expressão deste receptor, e conseqüentemente uma pequena interação com DENV, onde já existe uma fraca ligação entre ambos, resulta em uma incompleta ativação de DAP-12 e conseqüentemente uma ineficiente resposta imune. Por outro lado, quando CLEC5A é mais expresso, ou seja, em células de indivíduos com genótipo CC, ocorreria uma maior ativação de DAP12 com eficiente resposta imune devido a alta transcrição de mediadores imunológicos e antivirais. Embora a gravidade da dengue esteja relacionada à exacerbada resposta celular com intensa produção de mediadores inflamatórios, o modelo proposto ressalta a importância da homeostase celular durante a infecção (Fig 10).

Adicionalmente, um recente estudo encontrou que DENV se liga aos receptores de manose (RM) e DC-SIGN com uma avidéz cerca de mil vezes maior que ao CLEC5A, e que a interação desses receptores localizados proximalmente atuam de forma sinérgica na sinalização DAP12-CLEC5A. Nesse mesmo trabalho, foi visto que um aumento da ligação do DENV a CLEC5A resulta em uma maior fosforilação de DAP12 (Lo et al. 2016). Dessa forma, polimorfismos nos genes dos receptores DC-SIGN e MR que influenciam o nível de expressão dessas proteínas na superfície celular também poderiam interferir na sinalização DAP12-CLEC5A.

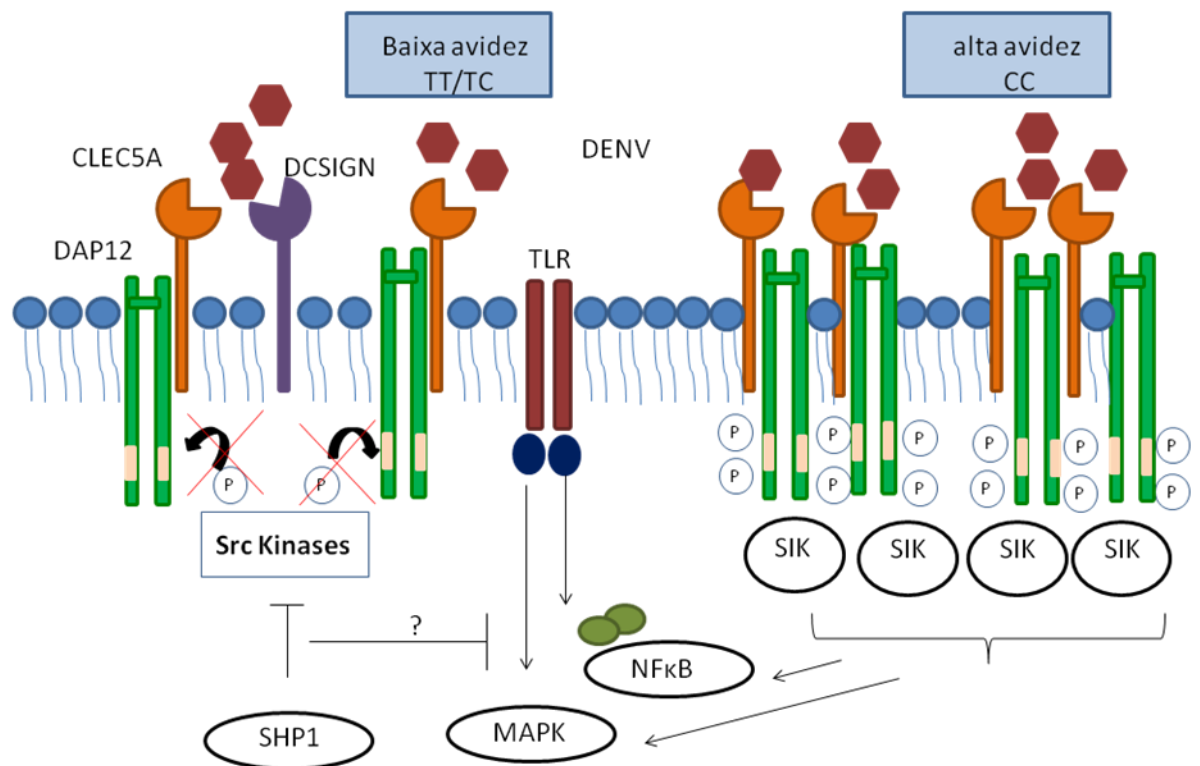


Figura 9 Modelo proposto para cascata de sinalização após ativação de DAP12.

Uma inibição de DAP-12 pode ser resultado da interação de baixa afinidade da ligação entre CLEC5A e DENV, levando a uma falha no agrupamento dos receptores e à incompleta fosforilação de DAP-12, ocorrendo uma falha no recrutamento de tirosina kinases (SYK) e subsequentes sinais de ativação. A ativação parcial de DAP-12 pode resultar em preferencial ativação de SHP1, que pode levar a inativação de TLR por um mecanismo ainda desconhecido. Tal cenário poderia ser observado em indivíduos TC/TT para o SNP rs1285933 que expressariam menos CLEC5A na superfície celular, segundo este modelo. A formação de complexos multivalentes formados por DENV e CLEC5A, que seria observado em células de indivíduos CC para o SNP rs1285933, onde ocorre maior expressão do receptor, culmina com a fosforilação dos motivos ITAMs de DAP12 recrutando SYKs sinergizando com TLR, MAPK e NFκB resultando na ativação da resposta imune. Ainda no esquema podemos notar uma interação entre DC-SIGN e CLEC5A durante a ligação com DENV (Adaptado Turnbull & Colonna, 2007).

Entretanto, esta é apenas uma hipótese, uma vez que todas as vias imunes resultantes da ativação de DAP12 após a interação de CLEC5A e DENV ainda não são totalmente conhecidas. De fato, nossos resultados em sangue de pacientes com dengue branda e infectados com DENV4, indicam que a expressão de CLEC5A foi correlacionada não somente com genes de mediadores pró inflamatórios mas também mediadores anti inflamatórios e mesmo antivirais. Dentre eles estão IL1β, NLRP3, IDO, IL-15, IL-10, IL18, IFNβ e TGFβ. Embora algumas dessas correlações possam ser indiretas, esse resultado reforça a hipótese de que outras vias de sinalização podem ser reguladas após a interação de

CLEC5A com DENV. Esses dados estão em parte de acordo com o que já foi demonstrado na literatura para experimentos *in vitro* ou com camundongos. Wu et al. 2013 mostraram que o bloqueio de CLEC5A inibe o inflamassomo NLRP3 e conseqüentemente a produção de IL1 β e IL18 (Wu et al. 2013). Chen et al. 2008 mostrou que o silenciamento de CLEC5A inibe a produção de mediadores como TNF, IL-8, proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 α) e proteína induzível por interferon (IP-10) (Chen et al. 2008).

CD209 também conhecido como DCSIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) é um receptor dependente de cálcio que possui três domínios: região N terminal localizada no citoplasma, região transmembrana e região C terminal (extracelular) altamente conservada que possui uma lectina que interage com a glicoproteína E do envelope do vírus da dengue. Acredita-se que esse seja o principal receptor de entrada para o vírus da dengue em células dendríticas e monócitos/macrófagos (Navarro-Sanchez et al. 2003; Tassaneetrithep et al. 2003). O SNP rs4804803 localizado na região promotora do gene, na posição -336, é resultante da troca de uma guanina (G) por uma adenina (A), está inserido no principal sítio de início de transcrição do DC-SIGN (Liu et al. 2003). Este SNP tem sido muito estudado em trabalhos epidemiológicos sobre dengue envolvendo asiáticos e brasileiros. Entretanto, os resultados de associação têm se mostrado bastante controversos. Alguns estudos têm encontrado carreadores de G (GG/AG) para o SNP rs4804803 associado ao risco de dengue grave ou FHD (Wang et al. 2011; Sakuntabhai et al. 2005) enquanto outros não encontraram associação alguma com o desfecho da doença (Oliveira, Lima, et al. 2014; Silva, Blanton, Parrado, Melo, Morato, et al. 2010; Dang et al. 2016).

Da mesma forma, estudos funcionais para o SNP na posição -336 também mostram resultados contraditórios, pois experimentos realizados por Sakuntabhai et al (2005) mostraram que este SNP afeta o sítio de ligação à Sp1, estando a variante alélica G

relacionada a uma maior ligação a esse fator de transcrição e à uma menor atividade promotora quando comparada a variante alélica A (Sakuntabhai et al. 2005). Wang et al. (2011) demonstrou que células de indivíduos AG expressavam mais DC-SIGN na superfície celular e produziam mais de TNF e IP-10 quando comparado a células de indivíduos AA. Entretanto, a replicação viral foi significativamente mais baixa em carreadores AG do que em indivíduos AA (Wang et al. 2011). Contrariamente a esse resultado, estudos feitos por Lozach et al. (2005) encontraram uma correlação positiva entre os níveis de expressão de DC-SIGN na superfície celular e a replicação viral (Lozach et al. 2005). Portanto, os dados são ainda controversos e mais informações são necessárias para o entendimento das relações genótipo-fenótipo.

No estudo caso controle realizado no Rio de Janeiro, nós encontramos o genótipo GG do SNP associado à proteção a dengue grave, enquanto no segundo estudo, envolvendo pacientes da cidade de Recife, nós encontramos esse SNP associado ao risco. Devido aos resultados opostos, nós realizamos duas meta-análises a fim de tentar diminuir a ambiguidade da literatura e encontrar estimativas consenso. Para realização da meta-análise, as comparações foram realizadas entre pacientes graves ou com FHD *versus* pacientes brandos ou com FD (a classificação original de cada estudo, uma vez que alguns utilizaram a classificação WHO1997 e outros a WHO2009).

A primeira meta análise, realizada em 2013 que recuperou 4 estudos e mais a população do Rio que estava sendo estudada (capítulo 2) e a segunda meta-análise que está presente no capítulo 3 envolvendo um total de 6 estudos (Alagarasu et al. 2013; Dang et al. 2016; Sakuntabhai et al. 2005; Silva, Blanton, Parrado, Melo, Vanessa, et al. 2010; Wang et al. 2011; Oliveira, Carvalho, et al. 2014), além da população de Recife genotipada mais recentemente. Em ambas as meta-análises a OR consenso gerada não apresentou suporte estatístico. porém para a análise de carreador mostrou um p-valor borderline com OR em

direção ao risco. Quando a meta análise foi realizada separadamente agrupando populações Brasileiras e Asiáticas, os valores de OR consenso indicaram associações opostas para o genótipo GG ou carreador G. Em Asiáticos as análises indicaram OR de risco tanto em 2013 e 2016 com um total de 3 e 4 estudos, respectivamente. Em Brasileiros, estimativas consenso indicaram OR de proteção em 2013, mas o dado de Recife tornou o resultado *borderline* em 2016.

Devido ao padrão de associação genética observado entre as populações (Brasileiros e Asiáticos) estudadas na nossa meta análise, nós buscamos analisar *in silico* a estrutura gênica do gene que codifica o DC-SIGN. A partir de SNPs selecionados no projeto 1000 genomas para populações ancestrais Europeias, Chinesas e Africanas foram realizadas análises de componente principal (PCA) onde podemos observar uma estratificação dos SNPs entre essas populações, especialmente para Europeus e Africanos. Adicionalmente, nós observamos que haplótipos contendo o alelo G para o SNP rs4804803 são bastante variáveis entre as populações analisadas (Africanos, Europeus, Chineses, Japoneses e Indianos). De fato, observamos que há dois haplótipos majoritários um deles quase que exclusivo em Africanos (G/T/T/G) e o outro em Europeus (G/A/C/G).

A partir dessas observações, nós imaginamos que outros SNPs, além do -336, poderiam também estar associados ao desfecho da dengue e por isso análises haplotípicas se tornam importantes nesse tipo de estudo. Entretanto, infelizmente não existem dados na literatura de estudos de associação em dengue envolvendo os SNPs analisados *in silico* e usados aqui para a formação dos haplótipos. Um padrão, onde outras variantes genéticas menos estudadas podem ter uma relevante participação em estudos de associação assim como na regulação da expressão do gene já foi demonstrado para outras doenças, e ajudou a explicar as discrepâncias observadas entre diferentes estudos de associação, como foi visto no caso de variantes no gene G6PD, em estudos de associação em malária (Shah et al. 2014).

Embora não tenhamos dados sobre ancestralidade em nossos estudos de associação genética, sabe-se que a população brasileira é altamente miscigenada e que o estado do Rio de Janeiro possui ancestralidade africana maior comparada com os outros estados brasileiros. Da mesma forma, sabe-se que populações de Recife, na região nordeste foram formadas por indivíduos com ancestralidade Européia mais prevalente (Saloum de Neves Manta et al. 2013; Coelho et al. 2015). Sendo assim, haplótipos formados pelo alelo G do SNP -336 juntamente com outras variantes que são mais frequentes em populações de origem africana (Figura 11) podem estar associados à proteção, como foi observado no caso controle do Rio de Janeiro. De fato, estudos genéticos têm mostrado uma relação entre ancestralidade africana e proteção à dengue grave (S. B. Halstead et al. 2001; Blanton et al. 2008). Baseado nessas hipóteses, uma medida para esclarecer nossos dados seria a caracterização ancestral dos indivíduos utilizados nos estudos caso controle assim como a genotipagem dos SNPs analisados *in silico* para possível análise haplotípica. Esses estudos serão realizados no futuro.

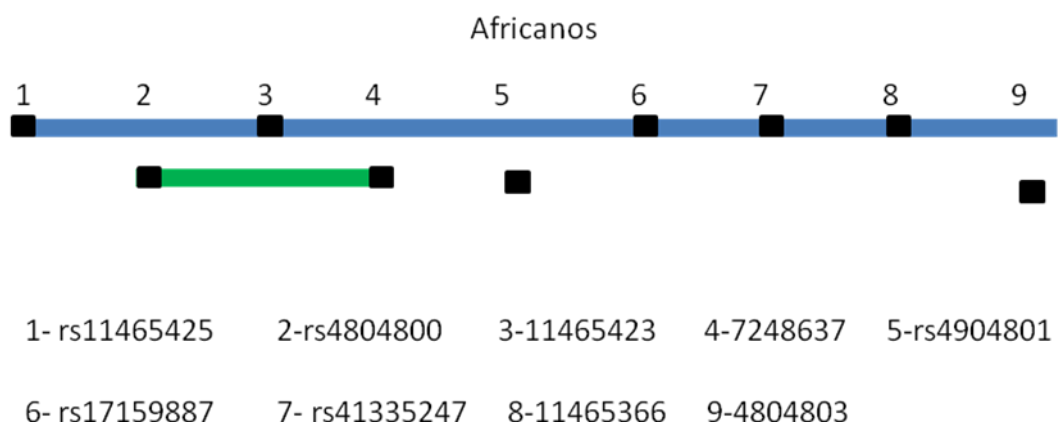


Figura 10 Possíveis bins para SNPs no gene DC-SIGN em africanos

Figura esquemática mostrando os nove SNPs selecionados a partir da análise de PCA para Africanos. Cada cor significa um *bin* e pontos soltos são SNPs *singletons* (Que não estão em desequilíbrio de ligação com nenhum outro).

No capítulo 5, exploramos outro aspecto da gravidade a dengue. Foram testadas amostras de sangue total de pacientes na tentativa de observar assinaturas moleculares da doença visando biomarcadores precoces de gravidade com o objetivo de encontrar a partir do

transcrito, genes que pudessem funcionar como um marcador de predição da doença ou mesmo de diagnóstico podendo contribuir para o tratamento da doença (Riedmaier & Pfaffl 2013). Esse tipo de abordagem de análise de transcritos gênicos em sangue total de pacientes tem sido utilizado para várias doenças infecciosas, como por exemplo, tuberculose, malária, influenza A (de Araujo et al. 2016; Tran et al. 2016; Hoang et al. 2014), além de dengue como será discutido adiante.

Genes envolvidos no metabolismo, apoptose, resposta imune inata e genes estimulados por IFN, são as principais classes gênicas diferencialmente expressas observadas em estudos prévios de expressão gênica envolvendo pacientes com febre da dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue (Nascimento et al. 2009; Simmons et al. 2007; Loke et al. 2010; Ubol et al. 2008). Ubol et al. 2008 encontrou em um estudo do tipo transcriptoma, oito genes envolvidos na via de IFN regulados positivamente em pacientes com FD comparado a pacientes com FHD. Entre eles, *IFI27*, *IFI44*, *Mx1*, *CXCL10*, *GBP1*, *IFIH1*, *IFIT1* e *ISG15*. Enquanto isso, genes envolvidos na produção de citocinas, ativação de complemento e apoptose de células T foram regulados positivamente em pacientes com FHD (Ubol et al. 2008). Da mesma forma, no estudo realizado por Nascimento e colaboradores foi visto que pacientes que evoluíram para FHD apresentaram nos primeiros estágios da infecção baixos níveis de expressão de genes envolvidos na resposta imune inata (Nascimento et al. 2009).

No presente trabalho, nós realizamos uma análise de expressão gênica de RNAs mensageiros em pequena escala. Quando da coleta, o desfecho clínico (presença ou ausência de dengue grave) ainda não era conhecido. A totalidade dos casos foi infectada por DENV4 e não houve casos graves nessa população. Entretanto, foi possível explorar os resultados de expressão gênica em pacientes com dengue e outras infecções febris (OIF). Dentre as amostras, 47 foram coletadas durante a epidemia de dengue de 2013 nas cidades de Campos-RJ e Campo Grande-MS. No momento da coleta (fase aguda) todos os pacientes procuraram atendimento com sintomas de dengue e assim foram diagnosticados clinicamente.

Posteriormente, apenas 32 tiveram diagnóstico laboratorial de dengue confirmado e todos foram infectados com DENV4. Esses pacientes com diagnóstico confirmado foram classificados em “com” ou “sem sinais de alarme”. As amostras negativas para dengue foram posteriormente também testadas para Zika e Chikungunya e foram negativas sendo classificadas como OIF 2013. Adicionalmente, durante os meses de dezembro de 2015 e fevereiro de 2016 foram coletadas 10 amostras de pacientes que buscaram atendimento no INI/ FIOCRUZ. Todos os pacientes no momento da coleta, também na fase aguda, apresentavam sintomas característicos de infecções virais como dengue, zika ou chikungunya. Posteriormente, todos foram testados para estas três doenças e somente três foram positivos para chikungunya. Dessa forma, todas as amostras restantes, foram também classificadas como OIF 2016.

Os genes escolhidos para serem analisados estão envolvidos com a resposta pró inflamatória, e imune antiviral (via de IFN tipo I) incluindo diversas citocinas e receptores. O grupo de pacientes dengue com sinais de alerta apresentou maior expressão dos genes *ALOX5AP*, *IL12*, *IL23A* e *SOD2* comparado aos pacientes com OIF também de 2013 e dos genes *BCL2* e *IL23A* comparado aos pacientes com OIF de 2016. Embora os grupos de pacientes com Dengue com e sem sinais de alerta apresentassem diferença na expressão quando comparados individualmente, no pós-teste utilizado em nossas análises (comparando todos os grupos) essas diferenças não foram significativas. Além disso, o grupo de pacientes com sinais de alerta se mostrou mais homogêneo, e parecem ser mais representativos da doença do que aqueles sem sinais de alerta.

Podemos observar também que os grupos OIF 2013 e 2016 foram bastante similares entre si e curiosamente esses pacientes apresentaram sintomas clínicos e epidemiológicos das viroses aqui citadas no momento da coleta. Uma das hipóteses é que talvez a carga viral nesses pacientes estivesse muito baixa e por isso não tenha sido detectada, ou o período de

coleta não foi o mais adequado para a detecção, embora a técnica de PCR em tempo real a partir de sangue total tenha se mostrado bastante sensível para detecção de ZIKV e DENV (Lustig et al. 2016).

Pacientes que tiveram diagnóstico de chikungunya confirmado apresentaram expressão aumentada em relação a pacientes com dengue com sinais de alerta para os genes *ALOX5AP*, *SOD2*, *BCL2*, *RNaseL*, *SOCS3*, *TLR2* e *TLR8* e expressão aumentada para o gene *ASMT* comparado a pacientes com outras infecções febris de 2016. Parte desses genes está envolvida direta ou indiretamente em processos apoptóticos (Jan et al. 2000; Loke et al. 2013; Gross 2016; Gusho et al. 2016) e muitos também foram diferencialmente expressos para dengue. Apoptose é um marcador de gravidade para a dengue (John et al. 2015), além disso, indução da morte celular por vírus em células do sistema nervoso pode estar relacionada à ocorrência de distúrbios no sistema nervoso, como tem sido observado recentemente para Zika e mesmo para modelos *in vitro* de infecção por dengue (Jan et al. 2000; Cugola et al. 2016). Altos níveis de *ALOX5AP* observados em pacientes com Chikungunya e mesmo dengue podem estar relacionados aos sintomas de artralguas observados para estas doenças, uma vez que este gene codifica uma proteína que participa da síntese de leucotrienos, que por sua vez está envolvido em processos inflamatórios como artrite. Na tabela 3, a principal função de cada gene aqui citado foi brevemente descrita.

Até o momento não existem trabalhos de expressão gênica envolvendo pacientes com chikungunya ou comparando com outras infecções virais. Experimentos utilizando modelos de infecção por CHIKV em camundongos encontraram uma regulação positiva de genes que participam da resposta antiviral (Priya et al. 2014). Um outro estudo de expressão gênica também em camundongos infectados com CHIKV encontrou um perfil de expressão similar ao encontrado em um modelo artrite reumatóide induzida (Nakaya et al. 2012).

Nossos resultados são exploratórios e mesmo o número de pacientes com Chikungunya sendo muito pequeno foi possível observarmos algumas diferenças significativas para este grupo. Genes como *ALOX5AP*, *SOD2*, *IL23* e *BCL2* se destacaram como marcadores de gravidade e sugerem um papel importante dessas vias na imunopatogênese diferencial das arboviroses. Estes podem servir futuramente como ponto de partida para uma investigação mais aprofundada em outros pacientes e mesmo serem testados funcionalmente em modelos de infecção por dengue e chikungunya.

Tabela 3 Genes diferencialmente expressos entre os grupos analisados. As informações foram coletadas no banco de dados Gene do NCBI

Gene	GENE/NCBI
ALOX5AP	é um gene que codifica a proteína 5 lipoxigenase que é requerida para a síntese de leucotrienos que tem sido implicados em vários tipos de resposta inflamatória, incluindo asma, artrite e psoríase.
SOD2	É membro da família superóxido dismutase. Tem importante participação na regulação de vias apoptóticas e de morte celular; Esse gene tem sido associadas com cardiomiopatia idiopática (ICD), envelhecimento prematuro, doença de neurônio motor e câncer
BCL2	é um regulador apoptótico, que codifica uma proteína mitocondrial que bloqueia a apoptose
RNaseL	É uma endoribunuclease que participa da resposta antiviral de interferon. Ativação da RNaseL está relacionada a apoptose, autofagia e inflamação.

TLR2 e 8	são receptores tipo toll com fundamental modelo no reconhecimento de patógenos e ativação da resposta imune. TLR2 é membranar possui envolvimento na ativação de apoptose em resposta a lipoproteínas de bactérias enquanto TLR8 é intracelular e está envolvido no reconhecimento de RNA viral fita simples.
NLRP3	é um dos inflamossomos mais bem caracterizados e ativado por vários vírus, possui papel relevante em infecções virais dentre outros fatores pela ativação das citocinas IL1 β e IL18
IL1 β	Membro da família interleucina 1. É produzida por macrófagos ativados como uma proproteína que é proteoliticamente em uma forma ativa. IL1 β é um importante ativador da resposta inflamatório e esta envolvido em processos de proliferação celular, diferenciação e apoptose
SOCS3	SOCS3, também conhecido como supressor de sinalização de citocinas, pertence a família <i>STAT induced STAT inhibitor</i> (SSI). A expressão de SOCS3 é induzida por várias citocinas, dentre elas IL6, IL10 e IFN γ , a proteína codificada por SOCS3 pode inibir a atividade de Jak2 kinase.
IL12 e IL23A	são citocinas que estimulam o fator transcricional STAT4 além de estimular a produção de IFN γ . Enquanto IL12 age principalmente em células naive CD4+, IL23A é uma citocina que age principalmente em células T CD4+ de memória.
ASMT	Acetilserotonina O-metiltransferase. Esse gene pertence a superfamília de metiltransferase. Codifica uma enzima que catalisa a reação final

II- CONCLUSÕES

- 1- SNP rs1285933 no gene *CLEC5A* foi associado a gravidade a dengue em duas populações distintas do Brasil. E a expressão e produção de *CLEC5A*, regulada positivamente após a infecção por dengue em monócitos, confirma participação central na gravidade a dengue. Neste contexto os carreadores de T (TT/CT) do SNP rs1285933 produzem mais *CLEC5A* na superfície de monócitos que CC no nosso modelo.
- 2- A produção de *CLEC5A* está correlacionada a produção de TNF em ensaios *in vitro* de infecção e a expressão de *CLEC5A* está correlacionada a expressão de TNF e outros mediadores pró e anti inflamatórios e também a mediadores antivirais em amostras de sangue total de pacientes infectados com DENV4.
- 3- O SNP -336 no gene que codifica o receptor DCSIGN foi associado a proteção no caso controle do RJ e a risco de gravidade no estudo de Recife e na meta-análise em Asiáticos.
- 4- Pacientes de dengue com sinais de alerta apresentaram um perfil de expressão diferenciado em relação a outras infecções febris. A expressão de *ALOX5A*, *SOD2*, *IL23* e *BCL2* se destacam como genes potencialmente marcadores de gravidade e sugerem um papel importante dessas vias na imunopatogênese diferencial das arboviroses.

III- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acioli-Santos, Bartolomeu et al. 2008. “MBL2 Gene Polymorphisms Protect against Development of Thrombocytopenia Associated with Severe Dengue Phenotype.” *Human Immunology* 69(2): 122–28.
- Alagarasu, K. et al., 2013. Association of promoter region polymorphisms of CD209 gene with clinical outcomes of dengue virus infection in Western India. *Infection, Genetics and Evolution*, 17, pp.239–242. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.024>.
- Alagarasu, K. et al. 2013. “Infection , Genetics and Evolution Polymorphisms in the Oligoadenylate Synthetase Gene Cluster and Its Association with Clinical Outcomes of Dengue Virus Infection.” *INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION* (January). <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.12.021>.
- Alagarasu, K. et al. 2013. “Association of HLA-DRB1 and TNF Genotypes with Dengue Hemorrhagic Fever.” *Human Immunology* 74(5): 610–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2013.01.027>.
- Alagarasu, K. et al., 2015. Association of combinations of interleukin-10 and pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms with dengue hemorrhagic fever. *Cytokine*, 74(1), pp.130–136. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.03.021>.
- Alagarasu, K. et al., 2015. Association of FCGR2A p . R131H and CCL2 c . -2518 A > G gene variants with thrombocytopenia in patients with dengue virus infection. *Human Immunology*, 76(11), pp.819–822.
- Alagarasu, K. et al., 2012. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with clinical outcomes of dengue virus infection. *Human Immunology*, 73(11), pp.1194–1199. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2012.08.007>.
- de Araujo, L.S. et al., 2016. Transcriptomic Biomarkers for Tuberculosis: Evaluation of DOCK9, EPHA4, and NPC2 mRNA Expression in Peripheral Blood . *Frontiers in Microbiology* , 7, p.1586. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01586>.
- Azad, Abul K, Wolfgang Sadee, and Larry S Schlesinger. 2012. “Innate Immune Gene Polymorphisms in Tuberculosis” ed. H L Andrews-Polymenis. *Infection and Immunity* 80(10): 3343–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3457569/>.
- Azeredo, E L et al. 2001. “Characterisation of Lymphocyte Response and Cytokine Patterns in Patients with Dengue Fever.” *Immunobiology* 204(4): 494–507. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11776403>.
- Assunção-Miranda, Iranaia et al. 2010. “Contribution of Macrophage Migration Inhibitory Factor to the Pathogenesis of Dengue Virus Infection.” *The FASEB Journal* 24 (1): 218–28. <http://www.fasebj.org/content/24/1/218.abstract>.

- Bakker, a B. et al., 1999. Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), pp.9792–9796.
- Balmaseda, A. et al., 2006. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(3), pp.449–456.
- Barreto, Maurício L, and Maria Glória Teixeira. 2008a. “Dengue No Brasil: Situação Epidemiológica E Contribuições Para Uma Agenda de Pesquisa .” *Estudos Avançados* 22 : 53–72.
- Beltrame, L.M. et al., 2013. Influence of KIR genes and their HLA ligands in susceptibility to dengue in a population from southern Brazil. *Tissue Antigens*, 82(6), pp.397–404. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/tan.12256>.
- Bernardo, Lidice et al. 2008. “Primary and Secondary Infections of Macaca Fascicularis Monkeys with Asian and American Genotypes of Dengue Virus 2 □.” 15(3): 439–46.
- Blanton, R.E. et al., 2008. Genetic ancestry and income are associated with dengue hemorrhagic fever in a highly admixed population. *European journal of human genetics : EJHG*, 16, pp.762–765.
- Bokisch, V.A. et al., 1973. The Potential Pathogenic Role of Complement in Dengue Hemorrhagic Shock Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 289(19), pp.996–1000. Available at: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM197311082891902>.
- Bouchon, a, F Facchetti, M a Weigand, and M Colonna. 2001. “TREM-1 Amplifies Inflammation and Is a Crucial Mediator of Septic Shock.” *Nature* 410(6832): 1103–7.
- Bozza, Fernando a et al. 2008. “Multiplex Cytokine Profile from Dengue Patients: MIP-1beta and IFN-Gamma as Predictive Factors for Severity.” *BMC infectious diseases* 8: 86.
- Braga, E L et al. 2001. “Detection of Circulant Tumor Necrosis Factor-Alpha, Soluble Tumor Necrosis Factor p75 and Interferon-Gamma in Brazilian Patients with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever.” *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96(February): 229–32.
- Bukowski, J F et al. 1989. “Dengue Virus-Specific Cross-Reactive CD8+ Human Cytotoxic T Lymphocytes.” *Journal of virology* 63(12): 5086–91.
- Burke-Gaffney, A., and Keenan, A.K. (1993). Modulation of human endothelial cell permeability by combinations of the cytokines interleukin-1 alpha/beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunopharmacology* 25, 1-9.
- Cansanção, I.F. et al., 2016. Association of genetic polymorphisms of IL1β -511 C>T, IL1RN VNTR 86 bp, IL6 -174 G>C, IL10 -819 C>T and TNFα -308 G>A, involved in symptomatic patients with dengue in Brazil. *Inflammation Research*, 65(11), pp.925–932. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00011-016-0975-5>.
- Cardoso, Cynthia Chester, Ana Carla Pereira, Carolinne de Sales Marques, and Milton Ozório Moraes. 2011. “Leprosy Susceptibility: Genetic Variations Regulate Innate and Adaptive Immunity, and Disease Outcome.” *Future Microbiology* 6(5): 533–49. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.11.39>.

- Chacón-duque, Juan Camilo et al. 2014. "Infection , Genetics and Evolution African Genetic Ancestry Is Associated with a Protective Effect on Dengue Severity in Colombian Populations." 27: 89–95.
- Chandak, N. et al., 2009. Neurological complications of Chikungunya virus infection. *Neurology India*, 57(2), pp.177–180. Available at: <http://www.neurologyindia.com/article.asp?issn=0028-3886>.
- Chang, G. & Vorndamt, A.V., 1992. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. , 30(3), pp.545–551.
- Chareonsirisuthigul, Takol, Siripen Kalayanarooj, and Sukathida Ubol. 2007. "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* 88(Pt 2): 365–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251552> (July 28, 2011).
- Chen, Rong-Fu et al. 2007. "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* 101 (11): 1106–13. <http://trstmh.oxfordjournals.org/content/101/11/1106.abstract>.
- Chen, S.-T. et al., 2008. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature*, 453(7195), pp.672–676.
- Chen, Jincheng, Mary Mah-Lee Ng, and Justin Jang Hann Chu. 2015. "Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection." *PLoS pathogens* 11(7): e1005053. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4520596&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cheng, Y. et al., 2016. Activation of Nrf2 by the dengue virus causes an increase in CLEC5A , which enhances TNF- α production by mononuclear phagocytes. *Nature Publishing Group*, (August), pp.1–15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep32000>.
- Cheung, Ricky et al. 2011. "Activation of MDL-1 (CLEC5A) on Immature Myeloid Cells Triggers Lethal Shock in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 121(11): 4446–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3204838/>.
- Chuang, Yung-Chun et al. 2011. "Macrophage Migration Inhibitory Factor Induced by Dengue Virus Infection Increases Vascular Permeability." *Cytokine* 54(2): 222–31. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466611000263>.
- Chuansumrit, A. et al., 2013. Tumour necrosis factor gene polymorphism in dengue infection: association with risk of bleeding. *Paediatrics and international child health*, 33, pp.97–101. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23925283>.
- Coelho, A.V.C. et al., 2015. A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco , Brazil. , 14(1), pp.2876–2884.
- Coffey, Lark L. et al. 2009. "Human Genetic Determinants of Dengue Virus Susceptibility." *Microbes and Infection* 11: 143–56.

- Conrado, Priscila et al. 2015. “Dengue Severity Associated With Age and a New Lineage of Dengue Virus-Type 2 During an Outbreak in Rio De Janeiro , Brazil.” (December).
- Cugola, F.R. et al., 2016. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534(7606), pp.267–271. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4902174/>.
- Cui, Liang et al. 2016. “Serum Metabolomics Reveals Serotonin as a Unique Predictor of Severe Dengue in the 2 Early Phase of Dengue Fever.” *PLoS neglected tropical diseases*: 1–19.
- Dang, Tran Ngoc et al. 2014. “A Replication Study Confirms the Association of GWAS-Identified SNPs at MICB and PLCE1 in Thai Patients with Dengue Shock Syndrome.” *PLoS ONE* 15(1): 1–5.
- Dang, T.N. et al., 2016. Association of BAK1 single nucleotide polymorphism with a risk for dengue hemorrhagic fever. *BMC Medical Genetics*, 17, p.43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4940700/>.
- Diamond, M S et al. 2000. “Modulation of Dengue Virus Infection in Human Cells by Alpha, Beta, and Gamma Interferons.” *Journal of virology* 74(11): 4957–66. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=110847&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dejnirattisai, Wanwisa et al. 2013. “Europe PMC Funders Group Enhancing Cross-Reactive Anti-prM Dominates the Human Antibody Response in Dengue Infection.” *PLoS ONE* 8(12): 1–12.
- Dong, Tao et al. 2007. “High pro-Inflammatory Cytokine Secretion and Loss of High Avidity Cross-Reactive Cytotoxic T-Cells during the Course of Secondary Dengue Virus Infection.” *PLoS ONE* 2(12): 1–12.
- Duyen, Huynh T L et al. 2011. “Kinetics of Plasma Viremia and Soluble Nonstructural Protein 1 Concentrations in Dengue: Differential Effects according to Serotype and Immune Status.” *Journal of Infectious Diseases* 203(9): 1292–1300.
- Falcón-Lezama, J.A. et al., 2009. HLA class I and II polymorphisms in Mexican Mestizo patients with dengue fever. *Acta Tropica*, 112(2), pp.193–197.
- Fang, Xin et al. 2012. “Genetic Polymorphisms of Molecules Involved in Host Immune Response to Dengue Virus Infection.” *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 66(2): 134–46. <http://femsim.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2012.00995.x>.
- Fares, Rafaelle C G, Katia P R Souza, Germán Añez, and Maria Rios. 2015. “Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil.” 2015.
- Faria, Nieli Rodrigues Da Costa et al. 2013. “Twenty Years of DENV-2 Activity in Brazil: Molecular Characterization and Phylogeny of Strains Isolated from 1990 to 2010.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(3).
- Feitosa, R.N.M. et al., 2016. Gene Polymorphisms and Serum Levels of Pro- and Anti-Inflammatory Markers in Dengue Viral Infections. *Viral Immunology*, 29(7), pp.379–388. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/vim.2016.0026>.

- Fernández-Mestre, M.T. et al., 2004. TNF- α -308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens*, 64(4), pp.469–472.
- Fernando, A.N. et al., 2015. Polymorphisms of Transporter Associated with Antigen Presentation, Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 and their Implications for Protection and Susceptibility to Severe Forms of Dengue Fever in Patients in Sri Lanka. *Journal of Global Infectious Diseases*, 7(4), pp.157–164. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4693307/>.
- Ferreira, Ralph Antonio Xavier et al. 2015. “Circulating Cytokines and Chemokines Associated with Plasma Leakage and Hepatic Dysfunction in Brazilian Children with Dengue Fever.” *Acta tropica* 149: 138–47. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X15001205>.
- Figueiredo, G.G. et al., 2016. Mannose-binding lectin gene (MBL2) polymorphisms related to the mannose-binding lectin low levels are associated to dengue disease severity. *Human Immunology*, 77(7), pp.571–575.
- Fried, Jessica R. et al. 2010. “Serotype-Specific Differences in the Risk of Dengue Hemorrhagic Fever: An Analysis of Data Collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(3): 1–6.
- García-Trejo, Alma Rosa et al. 2011. “Tumor Necrosis Factor Alpha Promoter Polymorphisms in Mexican Patients with Dengue Fever.” *Acta Tropica* 120(1-2): 67–71.
- García, Gissel et al. 2011. “Association of MICA and MICB Alleles with Symptomatic Dengue Infection.” 72: 904–7.
- García Gissel et al. 2012. “Polimorfismo Del Receptor Fc γ RIIa Y Su Posible Relacion Con Las Manifestaciones Clínicas Del Dengue.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 30(10): 621–23.
- Gagnon, S.J., Ennis, F. a & Rothman, a L., 1999. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *Journal of virology*, 73(5), pp.3623–3629.
- Green, S. et al., 1999. Early Immune Activation in Acute Dengue Illness Is Related to Development of Plasma Leakage and Disease Severity. *Journal of Infectious Diseases* , 179(4), pp.755–762. Available at: <http://jid.oxfordjournals.org/content/179/4/755.abstract>.
- Green, Sharone, and Alan Rothman. 2006. “Immunopathological Mechanisms in Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.” *Current Opinion in Infectious Diseases* 19(5). http://journals.lww.com/co-infectiousdiseases/Fulltext/2006/10000/Immunopathological_mechanisms_in_dengue_and_dengue.6.aspx.
- Gross, A., 2016. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(8), pp.1243–1246. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272816300196>.
- Gubler, Duane J. 1998. “Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.” *Clinical Microbiology Reviews* 11(3): 480–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88892/>.

- Gunther, V. J. et al. 2011. "A Human Challenge Model for Dengue Infection Reveals a Possible Protective Role for Sustained Interferon Gamma Levels during the Acute Phase of Illness." *Vaccine* 29(22): 3895–3904.
- Gusho, E., Baskar, D. & Banerjee, S., 2016. New advances in our understanding of the "unique" RNase L in host pathogen interaction and immune signaling. *Cytokine*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466616304562>.
- Guzma, M G. 2007. "Race : A Risk Factor for Dengue Hemorrhagic Fever." : 533–42.
- Guzman, Maria G, and Susana Vazquez. 2010a. "The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection." *Viruses* 2(12): 2649–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185591/>.
- Halstead, S.B. et al., 2002. Dengue Hemorrhagic Fever in Infants: Research Opportunities Ignored. *Emerging Infectious Diseases*, 8(12), pp.1474–1479. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2738509/>.
- Halstead, S.B. et al., 2001. Haiti: Absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(June 1996), pp.180–183.
- Halstead, Scott B. 2007. "Dengue." *Lancet* 370: 1644–52.
- Halstead, S.B., 1979. In Vivo Enhancement of Dengue Virus Infection in Rhesus Monkeys by Passively Transferred Antibody. *Journal of Infectious Diseases* , 140(4), pp.527–533. Available at: <http://jid.oxfordjournals.org/content/140/4/527.abstract>.
- Heringer, Manoela et al. 2015. "Impact of the Emergence and Re-Emergence of Different Dengue Viruses ' Serotypes in Rio de Janeiro , Brazil , 2010 to 2012." (January): 268–74
- Hoang, L.T. et al., 2014. Patient-Based Transcriptome-Wide Analysis Identify Interferon and Ubiquitination Pathways as Potential Predictors of Influenza A Disease Severity. *PLOS ONE*, 9(11), p.e111640. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0111640>.
- Hottz, E.D. et al., 2015. Inflammasome in Platelets : Allying Coagulation and Inflammation in Infectious and Sterile Diseases ? , 2015, pp.12–15.
- Howe, George Melvyn. 1977. *A World Geography of Human Diseases*. Academic Press Inc.(London) Ltd., 24-28 Oval Road, London NW1 7DX.
- Hung, N.T. et al., 2004. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *The Journal of infectious diseases*, 189(1), pp.221–232. Available at: <http://jid.oxfordjournals.org/content/189/2/221.abstract>.
- Jan, J. et al., 2000. Potential Dengue Virus-Triggered Apoptotic Pathway in Human Neuroblastoma Cells : Arachidonic Acid , Superoxide Anion , and NF- κ B Are Sequentially Involved. , 74(18), pp.8680–8691.
- John, D.V., Lin, Y.-S. & Perng, G.C., 2015. Biomarkers of severe dengue disease -- a review. *Journal of Biomedical Science*, 22(1), p.83. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12929-015-0191-6>.
- Kawai, Taro, and Shizuo Akira. 2007. "Antiviral Signaling through Pattern Recognition Receptors." *Journal of Biochemistry* 141(2): 137–45.

- Kehdy, F.S.G. et al., 2015. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. , 112(28), pp.8696–8701.
- Khor, Chiea Chuen et al. 2012. “Europe PMC Funders Group Genome-Wide Association Study Identifies Susceptibility Loci for Dengue Shock Syndrome at MICB and PLCE1.” 43(11): 1139–41.
- Khurram, M. et al., 2014. Dengue hemorrhagic fever : Comparison of patients with primary and secondary infections. *Journal of Infection and Public Health*, 7(6), pp.489–495. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2014.05.005>.
- Kong, Yong Yean, Chong Heng Thay, Tan Chong Tin, and Shamala Devi. 2006. “Rapid Detection, Serotyping and Quantitation of Dengue Viruses by TaqMan Real-Time One-Step RT-PCR.” *Journal of Virological Methods* 138(1–2): 123–30. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093406002965>.
- Kurane, I, M A Brinton, A L Samson, and F A Ennis. 1991. “Dengue Virus-Specific, Human CD4+ CD8- Cytotoxic T-Cell Clones: Multiple Patterns of Virus Cross-Reactivity Recognized by NS3-Specific T-Cell Clones.” *J Virol* 65(4): 1823–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1705990>.
- Kurane, I. et al., 1991. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *Journal of Clinical Investigation*, 88(5), pp.1473–1480. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295652/>.
- LaFleur, C. et al., 2002. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Human Immunology*, 63(11), pp.1039–1044. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885902006821>.
- Lan, N.T.P. et al., 2008. Protective and Enhancing HLA Alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for Severe Forms of Dengue Virus Infection, Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2(10), p.e304. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000304>.
- Lanciotti, R.S. et al., 2008. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic , Yap State , , 14(8).
- Lazear, Eric, Lance W Peterson, Chris a Nelson, and Daved H Fremont. 2013. “Crystal Structure of the Cowpox Virus-Encoded NKG2D Ligand OMCP.” *Journal of virology* 87(2): 840–50. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3554055&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Leitmeyer, Katrin C et al. 1999. “Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis.” 73(6): 4738–47.
- Libraty, Daniel H et al. 2002. “Differing Influences of Virus Burden and Immune Activation on Disease Severity in Secondary Dengue-3 Virus Infections.” *The Journal of infectious diseases* 185: 1213–21.
- Lin, C.C. et al., 2010. Characteristic of dengue disease in Taiwan: 2002-2007. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(4), pp.731–739.
- Liu, H. et al., 2003. Isolation and characterization of the human DC-SIGN and DC-SIGNR

- promoters. *Gene*, 313, pp.149–159. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111903006747>.
- Lo, Y.-L. et al., 2016. Dengue Virus Infection Is through a Cooperative Interaction between a Mannose Receptor and CLEC5A on Macrophage as a Multivalent Hetero-Complex. *PLOS ONE*, 11(11), p.e0166474. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0166474>.
- Loke, H. et al., 2002. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in Vietnam: Evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and FC γ receptor IIA genes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(1), pp.102–106.
- Loke, P. et al., 2010. Gene Expression Patterns of Dengue Virus-Infected Children from Nicaragua Reveal a Distinct Signature of Increased Metabolism A. M. Powers, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(6), p.e710. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2886038/>.
- Loke, W.M. et al., 2013. Augmentation of 5-lipoxygenase activity and expression during dengue serotype-2 infection. *Virology Journal*, 10(1), p.1. Available at: *Virology Journal*.
- Lozach, P.-Y. et al., 2005. Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN)-mediated Enhancement of Dengue Virus Infection Is Independent of DC-SIGN Internalization Signals. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), pp.23698–23708. Available at: <http://www.jbc.org/content/280/25/23698.abstract>.
- Lucas, D., Esposito, A. & Antônio, B., 2016. Editorial Zika and chikungunya infections in Brazil : reviewing the epidemic and treatment options. , 49(5), pp.535–536.
- Lustig, Y. et al., 2016. Detection of Zika virus RNA in whole blood of imported Zika virus disease cases up to 2 months after symptom onset , Israel , December 2015 to April 2016. , (April), pp.1–4.
- Maria, Rita et al. 2005. “Dengue Virus Type 3 , Brazil , 2002.” 11(9).
- Martínez Torres, E. (2008). Dengue. *Estudos Avançados* 22, 33-52.
- Martinez-Torres, M E. 1990. “Dengue Hemorrágico Em Crianças: Editorial.” *Havana: José Martí* 180.
- Mercado, E.S. et al., 2015. HLA-A*33:01 as Protective Allele for Severe Dengue in a Population of Filipino Children A. Kimura, ed. *PLoS ONE*, 10(2), p.e0115619. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4319754/>.
- MEIRA, R. “Urucubaca” gripe ou dengue? Dengue. In. *Clínica médica*. São Paulo: Gráfica O Estado de S. Paulo, 1916. p.273-85.
- Ministério da Saúde. <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/02/vacina-contradengue-e-vitoria-do-brasil-e-abre-perspectivas-no-combate-ao-zika>. Acessado em junho de 2016
- Modhiran, Naphak, Sirsipen Kalayanaroj, and Sukathida Ubol. 2010. “Subversion of Innate Defenses by the Interplay between DENV and Pre-Existing Enhancing Antibodies: TLRs Signaling Collapse.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(12): 1–12.

- Monteiro, S.P. et al., 2012. HLA-A*01 allele: a risk factor for dengue haemorrhagic fever in Brazil's population. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, pp.224–230.
- Mahalingam, Surendran, and Brett A Lidbury. 2002b. “Suppression of Lipopolysaccharide-Induced Antiviral Transcription Factor (STAT-1 and NF-κB) Complexes by Antibody-Dependent Enhancement of Macrophage Infection by Ross River Virus.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(21): 13819–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC129781/>.
- de Mendonça, Vitor R R, Marilda Souza Goncalves, and Manoel Barral-Netto. 2012. “The Host Genetic Diversity in Malaria Infection.” *Journal of Tropical Medicine* 2012: 940616. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3532872/>.
- Mongkolsapaya, Juthathip et al. 2003. “Original Antigenic Sin and Apoptosis in the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever.” *Nature medicine* 9(7): 921–27.
- Montoya, Romeo H et al. 2012. “Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas.” 87(4): 584–93.
- Mohsin, Saima Naz et al. 2015. “Association of FcγRIIa Polymorphism with Clinical Outcome of Dengue Infection: First Insight from Pakistan.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 93 (4): 691–96. <http://www.ajtmh.org/content/93/4/691.abstract>.
- Morens, D.M., 1994. Antibody-Dependent Enhancement of Infection and the Pathogenesis of Viral Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 19(3), pp.500–512. Available at: <http://cid.oxfordjournals.org/content/19/3/500.abstract>.
- Mustafa, A. S., E. A. Elbishbishi, R. Agarwal, and U. C. Chaturvedi. 2001. “Elevated Levels of Interleukin-13 and IL-18 in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever.” *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 30(3): 229–33.
- Nasirudeen, a. M a et al. 2011. “RIG-I, MDA5 and TLR3 Synergistically Play an Important Role in Restriction of Dengue Virus Infection.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(1).
- Nakaya, H.I. et al., 2012. Gene Profiling of Chikungunya Virus Arthritis in a Mouse Model Reveals Significant Overlap With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 64(11), p.10.1002/art.34631. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3836361/>.
- Nascimento, E.J.M. et al., 2009. Gene Expression Profiling during Early Acute Febrile Stage of Dengue Infection Can Predict the Disease Outcome L. F. P. Ng, ed. *PLoS ONE*, 4(11), p.e7892. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2775946/>.
- Navarro-Sanchez, E. et al., 2003. 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*, 4(7), pp.723–728.
- Noecker, C.A. et al., 2014. Contrasting associations of polymorphisms in FcγRIIa and DC-SIGN with the clinical presentation of dengue infection in a Mexican population. *Acta Tropica*, 138, pp.15–22.
- Ocazonez, Raquel E. 2007. “Serotipo, Patrón de Infección Y Dengue Hemorrágico En Área Endémica Colombiana.” 9(2): 262–74.

- Oliveira, L.F. De, Lima, C.P.S. De, et al., 2014. Polymorphism of DC-SIGN (CD209) promoter in association with clinical symptoms of dengue fever. *Viral immunology*, 27(5), pp.245–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24797508>.
- Pacheco, A.G. & Moraes, M.O., 2009. Genetic Polymorphisms of Infectious Diseases in Case-Control Studies. *Disease markers*, 27(3–4), pp.173–186. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3835071/>.
- Paradowska-Gorycka, A. & Jurkowska, M., 2013. Structure, expression pattern and biological activity of molecular complex TREM-2/DAP12. *Human Immunology*, 74(6), pp.730–737. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2013.02.003>.
- Pasquier, B. et al., 2005. Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: Dual role of FcR γ ITAM. *Immunity*, 22(1), pp.31–42.
- Pastor, André F et al. 2013. “Complement Factor H Gene (CFH) Polymorphisms C-257T, G257A and Haplotypes Are Associated with Protection against Severe Dengue Phenotype, Possible Related with High CFH Expression.” *Human immunology* 74(9): 1225–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3909654/>.
- Pastorino, B. et al., 2010. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral Research*, 87(3), pp.281–294. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354210006030>.
- PEDRO, A. O dengue em Nictheroy. *Brazil-Médico*, v.1, n.13, p.173-7, 1923
- Pérez, Ana B. et al. 2004. “IL-10 Levels in Dengue Patients: Some Findings from the Exceptional Epidemiological Conditions in Cuba.” *Journal of Medical Virology* 73(February): 230–34.
- Perez, A.B. et al., 2010. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-1, and interleukin-10 gene polymorphisms: Implication in protection or susceptibility to dengue
- Polizel, J.R. et al., 2004. Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white Southern Brazilian population . *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* , 99, pp.559–562.
- Pongsiri, P., Praianantathavorn, K. & Theamboonlers, A., 2012. Multiplex real-time RT-PCR for detecting chikungunya virus and dengue virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(5), pp.342–346. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60055-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60055-8).
- Priya, R., Patro, I.K. & Parida, M.M., 2014. TLR3 mediated innate immune response in mice brain following infection with Chikungunya virus. *Virus Research*, 189, pp.194–205. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170214002147>.
- Quirico-Santos, T. et al., 2006. *Tropical Infectious Diseases*,
- Riedmaier, I. & Pfaffl, M.W., 2013. Transcriptional biomarkers – High throughput screening, quantitative verification, and bioinformatical validation methods. *Methods*, 59(1), pp.3–9. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202312002319>.
- Rigau-Pérez, José G. 2016. “Severe Dengue: The Need for New Case Definitions.” *The Lancet Infectious Diseases* 6(5): 297–302. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70465-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70465-0).

- Rivadeneira, L. et al., 2016. Regulation of platelet responses triggered by Toll-like receptor 2 and 4 ligands is another non-genomic role of nuclear factor-kappaB. *Thrombosis Research*, 133(2), pp.235–243. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2013.11.028>.
- Roberto, M. et al., 2015. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil.
- Robinson, Matthew J et al. 2006. “Myeloid C-Type Lectins in Innate Immunity.” *Nature immunology* 7(12): 1258–65.
- Rothman, Alan L 2011. “Immunity to Dengue Virus: A Tale of Original Antigenic Sin and Tropical Cytokine Storms.” *Nature reviews. Immunology* 11(July): 532–43. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3014>.
- Ruiz-Pacheco, J. A. et al. 2014. “TREM-1 Modulation during Early Stages of Dengue Virus Infection.” *Immunology Letters* 158(1-2): 183–88.
- Sa-ngasang, Areerat et al. 2014. “Association of IL1B – 31C / T and IL1RA Variable Number of an 86-Bp Tandem Repeat With Dengue Shock Syndrome in Thailand.”
- Sakuntabhai, A. et al., 2005. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nature genetics*, 37(5), pp.507–513.
- Saloum de Neves Manta, F. et al., 2013. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. *PLoS ONE*, 8(9), pp.1–11.
- Sam, S. et al., 2015. High Producing Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Alleles in Protection against Severe Manifestations of Dengue. , 12.
- Santiago, G.A. et al., 2013. Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. , 7(7), pp.36–38.
- Secretaria de Vigilância em Saúde, Boletins epidemiológicos <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/11955-boletins-epidemiologicos-arquivos>. Acessado em agosto de 2016.
- Shah, S.S. et al., 2014. Genetic determinants of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Kenya. , pp.1–10.
- Sharma, S. et al., 2016. Analysis of TLR4 (Asp299Gly and Thr399Ile) gene polymorphisms and mRNA level in patients with dengue infection: A case-control study. *Infection, Genetics and Evolution*, 43, pp.412–417.
- Shresta, Sujana et al. 2004. “Interferon-Dependent Immunity Is Essential for Resistance to Primary Dengue Virus Infection in Mice, Whereas T- and B-Cell-Dependent Immunity Are Less Critical.” *Journal of virology* 78(6): 2701–10.
- Sierra, B.D.E.L.A.C. et al., 2006. Ethnicity and Difference in Dengue Virus-Specific Memory T Cell Responses in Cuban Individuals. , 19(4), pp.662–668.
- Sierra, B. et al., 2007. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: Advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Human Immunology*, 68(6), pp.531–540. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019888590700050X>.

- Sierra, Beatriz et al. 2010. “Secondary Heterologous Dengue Infection Risk: Disequilibrium between Immune Regulation and Inflammation?” *Cellular Immunology* 262(2): 134–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.02.005>.
- Silva, L.K., Blanton, R.E., Parrado, A.R., Melo, P.S., Vanessa, G., et al., 2010. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. *European journal of human genetics*, 18(11), pp.1221–1227.
- Silva, L.K., Blanton, R.E., Parrado, A.R., Melo, P.S., Morato, V.G., et al., 2010. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. , (May), pp.1221–1227.
- Simmons, C.P. et al., 2007. Patterns of Host Genome—Wide Gene Transcript Abundance in the Peripheral Blood of Patients with Acute Dengue Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(8), pp.1097–1107. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4042601/>.
- Singla, Mohit et al. 2016. “Immune Response to Dengue Virus Infection in Pediatric Patients in New Delhi, India-Association of Viremia, Inflammatory Mediators and Monocytes with Disease Severity.” *PLoS neglected tropical diseases* 10(3): e0004497. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26982706>.
- Soo, K. et al., 2016. Meta-Analysis of Dengue Severity during Infection by Different Dengue Virus Serotypes in Primary and Secondary Infections. , pp.4–14.
- Sosman, Jeffrey A et al. 2000. “Interleukin 10-Induced Thrombocytopenia in Normal Healthy Adult Volunteers: Evidence for Decreased Platelet Production.” *British Journal of Haematology* 111(1): 104–11. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2000.02314.x>.
- Soundravally, R. & Hoti, S.L., 2008. Polymorphisms of the TAP 1 and 2 gene may influence clinical outcome of primary dengue viral infection. *Scandinavian Journal of Immunology*, 67(6), pp.618–625.
- Stefanova, I. et al., 2003. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat Immunol*, 4(3), pp.248–254. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ni895>.
- Stephens, H. a F. et al., 2002. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue antigens*, 60(1), pp.309–318.
- Tassaneetrithep, B. et al., 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 197(7), pp.823–829.
- Temporão, José Gomes et al. 2011. “Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil.” *Emerging Infectious Diseases* 17(5): 938–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321786/>.
- Thamizhmani, R. & Vijayachari, P., 2014. Association of dengue virus infection susceptibility with polymorphisms of 2’-5’-oligoadenylate synthetase genes: a case_control study . *Brazilian Journal of Infectious Diseases* , 18, pp.548–550.
- Tracey, K.J., and Cerami, A. (1992). Pleiotropic effects of TNF in infection and neoplasia: beneficial, inflammatory, catabolic, or injurious. *Immunol Ser* 56, 431-452.
- Tran, T.M. et al., 2016. Transcriptomic evidence for modulation of host inflammatory responses during febrile Plasmodium falciparum malaria. , (April), pp.1–12.

- Tricou, Vianney et al. 2011. “Kinetics of Viremia and NS1 Antigenemia Are Shaped by Immune Status and Virus Serotype in Adults with Dengue.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(9).
- Tung, Y.T. et al., 2014. Nanostructured electrochemical biosensor for th0065 detection of the weak binding between the dengue virus and the CLEC5A receptor. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(6), pp.1335–1341. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2014.03.009>.
- Turnbull, I.R. & Colonna, M., 2007. Activating and inhibitory functions of DAP12. , 7(February), pp.155–161.
- Ubol, S. et al., 2008. Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases*, 197, pp.1459–1467.
- Vaughn, D W et al. 2000. “Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity.” *The Journal of infectious diseases* 181(1): 2–9.
- Vasquez Velasquez, Clara et al. 2015. “Alpha Tryptase Allele of Tryptase 1 (TPSAB1) Gene Associated with Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) and Dengue Shock Syndrome (DSS) in Vietnam and Philippines.” *Human Immunology* 76(5): 318–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2015.03.009>.
- Vejbaesya, S. et al., 2009. *TNF* and *LTA* Gene, Allele, and Extended HLA Haplotype Associations with Severe Dengue Virus Infection in Ethnic Thais. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(10), pp.1442–1448. Available at: <http://jid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/597422>.
- Xavier-Carvalho, Caroline et al. 2013. “Single Nucleotide Polymorphisms in Candidate Genes and Dengue Severity in Children: A Case-Control, Functional and Meta-Analysis Study.” *Infection, Genetics and Evolution* 20: 197–205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.017>.
- Xavier Eurico de Alencar, L. et al., 2013. HLA-B*44 Is Associated with Dengue Severity Caused by DENV-3 in a Brazilian Population. *Journal of Tropical Medicine*, 2013, p.648475. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3684019/>.
- Wang, E et al. 2000. “Evolutionary Relationships of Endemic/epidemic and Sylvatic Dengue Viruses.” *Journal of virology* 74(7): 3227–34.
- Wang, L. et al., 2011. DC-SIGN (CD209) promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(1).
- Watts, Douglas M et al. 1999. “Failure of Secondary Infection with American Genotype Dengue 2 to Cause Dengue Haemorrhagic Fever.” 354: 1431–34
- Watson, Aleksandra a. et al. 2011. “Structural Flexibility of the Macrophage Dengue Virus Receptor CLEC5A: Implications for Ligand Binding and Signaling.” *Journal of Biological Chemistry* 286(27): 24208–18.
- WHO, 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Special*

Programme for Research and Training in Tropical Diseases, p.147.

Wu, M. et al., 2013. CLEC5A is critical for dengue virus – induced inflammasome activation in human macrophages. , 121(1), pp.95–106.

Zhang, Xunlei et al. 2013. “Increased Risk of Developing Digestive Tract Cancer in Subjects Carrying the PLCE1 rs2274223 A>G Polymorphism: Evidence from a Meta-Analysis.” *PLoS ONE* 8(10): 1–9.

Zeller, T. et al., 2010. Genetics and beyond - the transcriptome of human monocytes and disease susceptibility. *PLoS ONE*, 5(5).

Zompi, Simona, and Eva Harris. 2013. “Original Antigenic Sin in Dengue Revisited.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(22): 8761–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3670385/>.

ANEXO 1

GENE	
------	--

AFMID	Aryformidase
AIM2	absent in melanoma 2
ALOX5	arachidonate 5 lipoxygenase
ALOX5AP	arachidonate 5 lipoxygenase activation protein
ASMT	acetylserotonin o-methyltransferase
BCL2	apoptosis regulator
CARD9	caspase recruitment domain family member 9
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
CCL4	C-C motif chemokine ligand 2
CD209	CD209 molecule
CFH	complement factor H
CLEC5A	C-type lectin domain family 5 member A
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10
EGF	epidermal growth factor
FCGR1A	Fc fragment of igg receptor 1A
FOXP3	forkhead box p3
IDO2	indoleamine 2,3-dioxygenase 2
IFI16	interferon gamma inducible protein 16
IFI35	interferon inducible protein 35
IFI44	interferon inducible protein 44
IFIH1	interferon induced with helicase c, domain 1
IFIT5	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 5
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3
IFNAR	interferon alpha and beta receptor
IFN β	interferon beta
IFN γ	interferon gamma
IL2	Interleukin 2

IL10	interleukin 10
IL12	interleukin 12
IL13	Interleukin 13
IL15	interleukin 15
IL17	Interleukin 17
IL18	interleukin 18
IL1A	Interleukin 1 ^a
IL1 β	interleukin 1 beta
IL23A	interleukin 23
IL23R	Interleukin 23 receptor
IL5	Interleukin 5
IL6	interleukin 6
IL7	interleukin 7
IL21	Interleukin 21
IL22RA1	Interleukin 22 receptor subunit 1 alpha
INOS	nitric oxide synthase
IRF3	interferon regulatory factor 3
IRF7	interferon regulatory factor 7
IRF9	interferon regulatory factor 9
KYNU	Kynureninase
LDLR	low density lipoprotein receptor
LTA4H	leukotriene a4 hydrolase
NLRP3	nlr family pyrin domain containing 3
NOD2	nucleotide binding oligomerization domain containing 2
OAS1	2'-5' oligoadenylate synthetase 1
OAS2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2
OAS3	2'-5' oligoadenylate synthetase 3
OASL	2'-5' oligoadenylate synthetase like

PARK	Parkin
PPAR γ	peroxisome proliferator activated receptor gamma
PTGES2	prostaglandin synthase 2
RIGI	DExD/H box helicase 58
RIPK2	receptor interacting serine/threonine kinase 2
RNASEL	ribonuclease L
SOCS3	supressor of citokyne signaling 3
SOD2	superoxide dismutase 2 mitochondrial
STING	transmembrane protein 173
TBK1	TANK binding kinase 1
TGF β	transforming growth factor beta
TLR1	toll like receptor 1
TLR2	toll like receptor 2
TLR3	toll like receptor 3
TLR4	toll like receptor 4
TLR6	toll lke receptor 6
TLR7	toll lke receptor 7
TLR8	toll lke receptor 8
TLR9	toll lke receptor 9
TNF	tumor necrosis factor
TNFSF15	tumor necrosis factor superfamily member 15
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily member 9
TNFRSF18	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 18
BAD	BCL2 associated agonist of cell death
CFB	Complement factor B
COX2	Cytochrome oxidase subunit II
CYP27A1	Cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1
FCGR1B	Fc fragment IF IgG receptor 1b

IDO	indoleamine 2,3-dioxygenase
IFIT1	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1
IFN α R	interferon alpha receptor
LRRK2	leucine rich repeat kinase 2
PACRG	PARK2 coregulated
TREX1	Tree prime repair exonuclease 1
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
RPL13	ribosomal protein L13
ACTB	Actin beta
B2M	Beta-2 microglobulin

