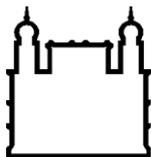


**.facebook.com.br**



**Ministério da Saúde**

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

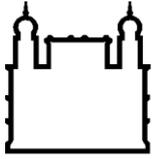
**Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Caroline Xavier de Carvalho**

**Estudo de polimorfismos em genes da resposta imune e gravidade à  
dengue**

**Rio de Janeiro**

**2012**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós graduação em Biologia Celular e Molecular**

Caroline Xavier de Carvalho

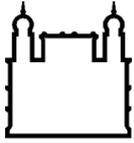
## **Estudo de polimorfismos em genes da resposta imune e gravidade à dengue**

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

Orientador : Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Rio de Janeiro

2012



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós graduação em Biologia Celular e Molecular**

Autora: Caroline Xavier de Carvalho

### **Estudo de polimorfismos em genes da resposta imune e gravidade à dengue**

**Orientador:** Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Aprovada em: 30 de maio de 2012

#### **EXAMINADORES**

Dr<sup>a</sup> Claire Fernandes Kubelka – Fundação Oswaldo Cruz – Presidente/Revisor

Dr. Fernando Augusto Bozza - Fundação Oswaldo Cruz – Titular

Dr. Marcelo Alves Soares– Universidade federal do Rio de Janeiro – Titular

Dr<sup>a</sup>. Anna Beatriz Robottom Ferreira – Fundação Oswaldo Cruz – Suplente

Dr<sup>a</sup>.Gladys Côrrea da Silva - Fundação Oswaldo Cruz – Suplente

Tudo começa com o desejo

(autor desconhecido)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a FIOCRUZ, ao IOC e aos programas financiadores do estudo que tornaram possível a realização deste trabalho. Assim como ao programa e aos professores da Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular que contribuíram para minha formação durante o mestrado.

Aos pesquisadores que participaram do desenho de estudo epidemiológico (Dr<sup>a</sup> Claire Fernades Kubelka, Dr<sup>o</sup> Milton Ozório Moraes, Dr<sup>a</sup> Marília de Sá Carvalho, Dr<sup>a</sup> Patrícia Brasil, Dr<sup>o</sup> Reinaldo de Souza Santos, Dr<sup>o</sup> Oswaldo Cruz e Dr<sup>o</sup> Antônio Pacheco) ao qual esse projeto é parte integrante.

A doutoranda Geresa Gibson que participou diretamente da realização das entrevistas e recrutamento dos controles e novamente a Dr<sup>a</sup> Patrícia Brasil pela seleção e classificação dos casos graves de dengue aqui utilizados.

A Angela Amaral dos Santos e Georg, do IPEC, que foram responsáveis pelo imunodiagnóstico dos casos, através da quantificação de IgGs no soro desses pacientes.

Aos médicos Ralph e Solange pela classificação e recrutamento dos pacientes usados no estudo funcional do presente trabalho.

As Alunas do laboratório de Imunologia Viral: Mariana Gandini, Luciana Santos Barbosa, Maria Carolina Martins pela quantificação de TNF e armazenamento das amostras de sangue total.

Ao Dr<sup>o</sup> Antônio Pacheco, Dr<sup>a</sup> Cynthia Chester Cardoso pela imensa ajuda com as análises estatísticas aqui realizadas e as colegas do laboratório Lucia, Carol e Luana pelas dicas de última hora.

Aos membros da banca que aceitaram o meu convite e com certeza vou colaborar muito para melhorias na versão final da dissertação.

A Dr<sup>a</sup> Claire Fernandes Kubelka pela imensurável colaboração em todas as partes desse trabalho, desde a submissão do projeto inicial passando pela ajuda em toda parte metodológica até a revisão do artigo e da presente dissertação.

Ao meu orientador, Dr<sup>o</sup> Milton Ozório Moraes, pela agradável e gentil orientação que dedica a todos os seus alunos, pela também imensurável ajuda e ensinamentos em todas as fases do desenvolvimento desse projeto e de todo o mestrado.

As meninas do laboratório de Imunologia viral: Amanda Torrentes e Mariana Gandini pelos esclarecimentos e valiosas dicas de várias partes desse trabalho assim como das perspectivas futuras.

A todos os colegas do laboratório de Hanseníase, sem exceção, que me fazem companhia diariamente no laboratório e por todos os momentos de descontração que ajudaram a fazer com que o desenvolvimento desse trabalho fosse sem dúvida, tão agradável em todas as etapas.

E por fim, a minha família, principalmente meus pais e minha irmã que participam diretamente da minha vida e por toda dedicação e paciência nos momentos difíceis.

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 Número de Internações por FHD em 2008 nas cinco regiões brasileiras para todas as faixas etárias.....	6
Figura 1.2 Porcentagem de internações por FHD na região sudeste no ano de 2008 para todas as faixaetárias.....	6
Figura 1.3 Nova classificação da dengue.....	9
Figura 1.4 Fases clínicas da dengue.....	10
Figura 1.5 Resposta humoral contra o vírus da dengue.....	17
Figura 4.1 Genótipos para o polimorfismo $\Delta$ 32.....	40
Figura 4.2 Discriminação alélica por PCR em tempo real.....	41
Figura 4.3 Localização dos SNPs estudados no gene CLEC5A.....	43
Figura 4.4 Valores de $r^2$ para os SNPs nos genes CLEC5A e NOD2.....	47
Figura 4.5 Meta-análise de três estudos de associação do SNP -336 DC-SGN e gravidade a dengue.....	52
Figura 4.6 Meta-análise de estudos de associação do SNP -336 DC-SIGN e gravidade a dengue .....	53
Figura 4.7 Níveis circulantes de TNF no soro de pacientes com dengue de acordo com o SNP rs1285933 no gene CLEC5A.....	56
Figura 4.8 Níveis circulantes de TNF no soro de pacientes com dengue de acordo com o SNP rs4804803 no gene DC-SIGN.....	57

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

		Pág.
Quadro 3.1	Polimorfismos genotipados.....	35
Tabela 4.1	Teste do EHW na população de controles para os SNPs estudados.....	42
Tabela 4.2	Comparação de frequências entre casos e controles para os SNPs no gene CLEC5A. ....	43
Tabela 4.3	Comparação de frequências entre casos e controles para os SNPs presentes nos genes TNF, MIF, IL-10, CCR5, MRC1, NOD2 e DC-SIGN.....	45
Tabela 4.4	Comparação de Frequências haplotípicas entre casos e controles para os SNPs nos genes CLEC5A e NOD2.....	47
Tabela 4.5	Valores de OR para comparação de frequências dos SNPs rs1285933 no gene de CLEC5A e -336 do gene de DC-SIGN de acordo com a reatividade de IgG dengue específico entre controles.....	48
Tabela 4.6	Frequências para o SNP -336 A/G no gene de DC-SIGN dos estudos envolvidos na meta-análise.....	50
Tabela 4.7	Valores do teste qui quadrado ( $\chi^2$ ) para o EHW nas populações de controles.....	50
Tabela 4.8	Valores <i>Egger's test</i> modificado para as categorias de alelos, genótipos e carreadores.....	51
Tabela 4.9	Meta-análise do SNP -336 DC-SIGN (rs4804803).....	51
Tabela 4.10	Valores <i>Egger's test</i> modificado e heterogeneidade (teste Q e I <sup>2</sup> ) para as categorias de alelos, genótipos e carreadores .....	53
Tabela 4.11	Meta-análise do SNP -336 A/G no gene de DC-SIGN (rs4804803) sem os nossos dados.....	53

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac- Anticorpos

ADE – Do inglês, *Antibody dependent enhancement*. Aumento da infecção dependente de anticorpos

APC- Do inglês, *Antigen -presenting Cell*. Células apresentadoras de antígenos profissionais

CDs- Células Dendríticas

CLEC5A (MDL-1) - C-type lectin domain family 5 member A

CTL- Linfócitos Citotóxicos

DC-SIGN(CD209)-Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

DENV – Sorotipos do vírus da dengue (1,2, 3 ou 4)

EHW- Equilíbrio de Hardy Weinberg

FD- Febre da Dengue

FHD- Febre Hemorrágica da Dengue

GWAS – Do inglês *Genome Wide Association Study*. Estudo de associação em todo o genoma

IC- Intervalo de Confiança

MHC- Do inglês, *Major Histocompatibility Complex* Moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade

NS- Do inglês, *non-structural*. Proteínas virais não estruturais

OMS – Organização Mundial da Saúde

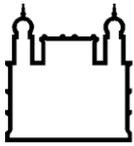
OR- Do inglês, *odds ratio*. Medida de associação

SCD- Síndrome do Choque da Dengue

SNP- Do inglês, *Single-nucleotide Polymorphisms*. Polimorfismos de Base Única

SUS – Sistema Único de Saúde

WHO/TDR- Do inglês, *World Health Organization/ Tropical Disease Research*. Organização Mundial da Saúde



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

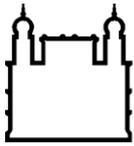
### polimorfismos em genes da resposta imune e gravidade à dengue

#### RESUMO

##### Dissertação de Mestrado

Caroline Xavier de Carvalho

A dengue, que é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos maiores problemas de saúde pública das áreas tropicais urbanas, é causada por quatro sorotipos virais (DENV-1,-2,-3,e -4) e pode se manifestar de formas assintomáticas, brandas até formas muito graves, que podem levar ao óbito. Hipóteses para a gravidade da dengue baseadas em infecções secundárias não explicam inteiramente o fenômeno. Mais recentemente uma hipótese alternativa tem sugerido a contribuição de outros fatores para o desfecho das infecções graves, dentre eles a constituição genética dos pacientes. No presente trabalho, foi realizado um estudo caso-controle, com 88 pacientes com dengue muito grave (com ocorrência de choque) e 335 controles residentes na vizinhança dos casos. Foram selecionados polimorfismos em genes candidatos, como TNF, MIF, IL-10, CLEC5A, DC-SIGN, MRC-1, CCR5 e NOD2 a fim de encontrar uma possível associação destes com o desenvolvimento de dengue grave. Foram encontradas associações estatisticamente significativas para os SNPs rs1285933 no gene do receptor CLEC5A (OR=2,25; p=0,03) e rs4804803 no gene do receptor DC-SIGN (OR=0,12; p=0,04). Posteriormente, nós testamos a produção de TNF em pacientes (brandos e graves incluindo os com choque) que tiveram o sangue coletado na fase crítica da doença (5-7 dias da infecção) e que foram genotipados para os SNPs rs1285933/CLEC5A e rs4804803/DC-SIGN. Foram observados níveis mais elevados de TNF no soro de pacientes carreadores dos genótipos TT/ CT para o SNP rs1285933/CLEC5A comparados aos carreadores do genótipo CC ou pacientes recuperados (mais de 15 dias após os sintomas) que foram usados como controles. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de TNF entre os diferentes genótipos para o SNP rs4804803/DC-SIGN. De forma geral, polimorfismos em genes da resposta imune podem modificar os níveis ou a funcionalidade desses mediadores contribuindo para as diferentes formas de infecção observadas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Polymorphisms in genes of immune response and severe dengue

#### ABSTRACT

#### Dissertação de Mestrado

Caroline Xavier de Carvalho

The Dengue is reported by the World Health Organization (WHO) as a major public health problem in tropical urban areas, this infection is caused by four serotypes (DENV-1,-2,-3,e -4) and its clinical manifestations are vast: ranging from asymptomatic and mild to severe cases, can lead the patient to death. Hypothesis for the severity based on secondary infections do not fully explain the phenomenon. More recently, an alternative hypothesis has suggested the contribution of other factors, as the genetic background of the patients, in the outcome of infection. Here, we performed a case control study enrolled 88 patients with severe dengue (with the occurrence of shock) and 335 controls neighbors of the cases. We selected polymorphisms in candidate genes, such as TNF, MIF, IL-10, CLEC5A, DC-SIGN, MRC-1, CCR5 e NOD2, in order to find associations between these SNPs and severe dengue. Significant association was found for SNPs rs1285933 in the CLEC5A gene (OR=2.25; p=0.03) and rs4804803 in the DC-SIGN gene (OR=0.12; p=0.04). TNF production was then assessed in a second sample of patients who had their blood collected between days 5 -7 of infection (critical phase) and their DNA genotyped for SNPs rs1285933/CLEC5A and rs4804803/DCSIGN. Results demonstrated an increased TNF production in serum of individuals, only among severe cases, presenting the CT/TT genotypes when compared to the CC genotype for SNP rs1285933 or recovered patients (blood samples collected after 15<sup>th</sup> day of infection) used here, as controls. No significant difference was observed in TNF levels among the different genotypes for the SNP rs4804803/ DCSIGN. Overall, polymorphisms in genes involved in immune response can modify the functionality or the levels of these mediators contributing to different outcomes of the infection.

## ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	viii
LISTA DE SIGLAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
<b>1-INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1-Dengue – Considerações Gerais.....	1
1.2-História da dengue e atual situação epidemiológica.....	2
1.3-Dengue nas Américas.....	3
1.4-Dengue no Brasil.....	4
1.5-Classificação das formas clínicas.....	7
1.6-Fases da dengue e quadro clínico.....	9
1.7-O Vírus e seu vetor.....	11
1.8-Diagnóstico e tratamento.....	12
1.9-Infecção e Imunopatogênese.....	13
1.10-Resposta imune humoral e imunopatologia mediada por linfócitos B.....	15
1.11-Resposta imune celular e imunopatologia mediada por linfócitos T.....	18
1.12-Cascata de citocinas na infecção por dengue.....	20
1.13-Receptores de reconhecimento padrão e patogênese da dengue.....	22
1.14-Características genéticas do vírus e gravidade à dengue.....	24
1.15-Características genéticas do hospedeiro e gravidade à dengue.....	25
1.16-Estudos de associações genéticas nas doenças infecciosas.....	25
1.17-SNPs associados a dengue e outras doenças infecciosas.....	27
<b>2-OBJETIVOS</b> .....	31
2.1-Objetivos Gerais .....	31
2.2-Objetivos específicos .....	31
<b>3-MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
3.1- Estudo caso-controle .....	32
3.1.1-Desenho experimental – Estudo caso-controle retrospectivo .....	32
3.2-Seleção de SNPs .....	33
3.3-Extração do DNA .....	34
3.4-Genotipagem por Discriminação Alélica .....	34
3.5-Genotipagem do polimorfismo $\Delta 32$ .....	35
3.6.População do estudo funcional .....	36
3.7- Quantificação de TNF no soro de pacientes .....	36
3.8-Titulação de IgGs dengue específicas entre controles .....	37
3.9-Análises estatísticas .....	37
3.9.1- Caso-controle.....	37
3.9.2- Estudo funcional.....	38
3.10- Meta-análise.....	38
<b>4-RESULTADOS</b> .....	40
4.1- Genotipagem do polimorfismo $\Delta 32$ por tamanho do fragmento	

amplificado.....	40
4.2- Genotipagem por discriminação alélica.....	41
4.3- Obtenção e comparação das frequências entre casos e controles.....	42
4.4- Polimorfismos no gene CLEC5A.....	44
4.5- SNPs nos genes TNF, MIF e IL-10, CCR5, MRC-1, NOD2 e DC-SIGN....	46
4.6- Análises haplotípicas para SNPs nos genes CLEC5A NOD2.....	48
4.7- Comparação das frequências dos SNPs entre casos e controles de acordo com presença de IgG específico para dengue.....	49
4.8- Meta-análise dos estudos de associação ente o SNP -336 A/G no gene de DC-SIGN (rs4804803) e formas graves de dengue .....	54
4.9- Estudos Funcionais .....	54
4.10- Genótipos do SNP rs1285933/ CLEC5A e produção de TNF em pacientes com dengue .....	56
4.11- Genótipos do SNP rs4804803/ DC-SIGN e produção de TNF em pacientes com dengue .....	56
<b>5- DISCUSSÃO</b> .....	58
<b>6-CONCLUSÃO</b> .....	71
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	73

## 1- INTRODUÇÃO

---

### 1.1- Dengue - Considerações Gerais

A dengue é considerada um dos principais problemas de saúde pública das regiões urbanas tropicais e subtropicais do mundo. A doença é responsável, a cada ano, em regiões endêmicas, por aproximadamente 50 milhões de casos e aproximadamente 500.000 internações por casos graves, principalmente entre crianças; sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a doença viral, transmitida por um mosquito, de mais rápida expansão global (Gubler, 2002; World Health Organization., 2009).

A dengue é uma arbovirose, uma doença transmitida por um artrópode, nesse caso, o mosquito vetor do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*. Podendo ser causada por quatro sorotipos virais DENV-1,-2,-3 e 4, uma vez infectado, o indivíduo adquire imunidade duradoura contra esse sorotipo e imunidade temporária e parcial contra os outros sorotipos virais. A dengue é uma doença que apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, desde infecções assintomáticas passando por infecções febris agudas com sintomas clássicos da dengue como: mialgias, artralguas, dores de cabeça e mal estar, podendo chegar até a forma mais grave da doença onde o paciente pode apresentar quadros graves de hemorragias, choque hipovolêmico e envolvimento de alguns órgãos (World Health Organization, 2009).

Historicamente, o Sudeste Asiático e o Pacífico Ocidental sempre foram as regiões mais afetada pela doença (Wilder-Smith et al, 2010; World Health Organization, 2009). Entretanto, o Brasil é atualmente o país com maior número de casos notificados à OMS sendo responsável pela quase totalidade de casos de dengue em toda a América. Na última grande epidemia que assolou o Brasil em 2007/2008, mais da metade dos casos de dengue hemorrágica ocorreram em crianças com menos de 15 anos de idade (Rodriguez-Barraque et al., 2011; Teixeira et al., 2008). Para agravar a situação epidemiológica da dengue no Brasil, em 2010 houve a reintrodução do sorotipo DENV-4 o que pode significar um novo desafio para o controle da doença (Temporão et al., 2011).

Apesar dos desafios, como a ausência de um modelo animal apropriado para se estudar a infecção, várias vacinas com diferentes abordagens estão sendo desenvolvidas e testadas (Murrell et al., 2011, Murphy & Whitehead, 2011). Mesmo assim, as características que

indicam a evolução para a gravidade são pouco conhecidas. Há várias hipóteses para explicar a ocorrência de dengue grave, como a hipótese chamada de facilitação dependente de anticorpos (do inglês, *Antibody dependent enhancement*, ADE), a virulência do sorotipo infectante e a constituição genética do paciente, além dos fatores ambientais. Assim, não há, até o momento, marcadores específicos de gravidade que possam ser usados para uma intervenção clínica eficiente.

## **1.2- História da dengue e atual situação epidemiológica**

Antes do isolamento viral do agente causador da dengue, as ocorrências mais bem documentadas da doença são as de Filadélfia em 1778 e Egito em 1779. 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 & Teixeira, 2008; Rigau-Perez, 2006).

Do final do século XVIII ao 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. Após a segunda guerra mundial, o grande movimento das tropas e a maior circulação de pessoas de um modo geral propiciaram uma maior disseminação dos diferentes sorotipos favorecendo o aparecimento de infecções mais graves (Howe, 1977; Gubler, 1997).

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 freqüentes 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 (Martinez-Torres, 1990).

Atualmente, a dengue é um grande problema de saúde pública em países do sudeste asiático, como: Indonésia, Myanmar, Tailândia, Timor Leste e Sri Lanka, onde ocorre a circulação de diferentes sorotipos e o mosquito vetor está presente tanto em áreas rurais como urbanas. Nessas regiões, a dengue é a maior causa de hospitalizações e morte entre crianças. Populações do Pacífico Ocidental também são consideravelmente atingidas por epidemias de

dengue. Entre 2001 e 2008 mais de um milhão de casos foram relatados no Camboja, Malásia, Filipinas e Vietnã, que foram os países com o maior número de casos e mortes dessa região (World Health Organization, 2009).

A África é uma região que ainda carece de dados sobre casos de dengue, pois esses não são oficialmente reportados a OMS. No entanto, existem várias evidências e alguns relatos de surtos de dengue na África Oriental e em menor extensão na África Ocidental. Regiões do Leste do Mediterrâneo como Paquistão e Arábia Saudita também são afetadas por surtos e epidemias de dengue (Jamil et al., 2007; World Health Organization, 2009). Como pode ser visto, a dengue é atualmente endêmica em praticamente todas as regiões do mundo, exceto na Europa (World Health Organization, 2009).

### **1.3- Dengue nas Américas**

Casos de dengue foram relatados nas Américas no século XIX, até as primeiras décadas do século XX, a partir de então se observou 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 & Teixeira, 2008; World Health Organization, 2009).

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-Perez, 2006).

A maior concentração de casos de dengue está na região que compreende os países do Cone Sul: Argentina, Brasil, Paraguai, Uruguai e Chile representando 64,6% de todos os casos de dengue nas Américas, no período de 2001 a 2007. No entanto, a quase totalidade dos casos foi notificado pelo Brasil. Em segundo lugar no número de casos de dengue nas Américas estão os países da região dos Andes: Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela sendo essa região responsável por 19% dos casos de dengue seguidos pela região da América Central com 12,5% dos casos e a região do Caribe com 3,9% dos casos. Na América do Norte dentre o pequeno número de casos notificados da doença, a maioria são provenientes de pessoas que vieram de áreas endêmicas (World Health Organization, 2009).

## 1.4- Dengue no Brasil

Embora existam relatos anteriores de casos de dengue pelo Brasil, a primeira evidência de uma epidemia no Brasil após a reintrodução do *Aedes aegypti* ocorreu em 1981, quando foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4, em Boa Vista (RO). No entanto, essa epidemia não se expandiu para outras regiões ficando restrita ao estado de Roraima. Em 1986, o sorotipo DENV-1 foi reintroduzido no Brasil e chegou ao Rio de Janeiro provocando uma epidemia de febre da dengue clássica (Schatzmayr et al, 1986). A partir desse momento a dengue começou a se tornar um problema de saúde pública no Brasil se disseminando rapidamente para vários outros estados como São Paulo, Minas Gerais, Alagoas, Ceará e Pernambuco (Barreto & Teixeira, 2008).

Em abril de 1990 foi isolado o sorotipo DENV-2 no Rio de Janeiro caracterizando uma nova epidemia com a circulação do DENV1 e DENV2 e o aparecimento dos primeiros casos de dengue hemorrágica (Nogueira et al, 1990). Nos anos subsequentes ambos os sorotipos, DENV1 e DENV2, mantiveram-se circulando por vários estados do país juntamente com o seu vetor *Aedes aegypti* (Barreto et al., 2008; Oliveira, 1998; Teixeira, 2009a).

Em 2000/2001, o DENV3 foi reintroduzido no país sendo isolado pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro (Nogueira et al., 2001) e se espalhando rapidamente por todo o Brasil resultando assim numa explosiva epidemia entre os anos de 2001 e 2002 e aumentando o número de casos graves com hemorragias. Este sorotipo permaneceu predominante até o final de 2007, quando o DENV-2 foi reintroduzido causando a última grande epidemia de 2007/ 2008, fazendo com que no século XXI o Brasil tenha se tornado o país com o maior número de casos de dengue em todo o mundo, sendo responsável por 61% de todos os casos reportados à OMS (Teixeira et al., 2009).

Nas epidemias de dengue ocorridas no sudeste asiático sempre se observou um maior número de casos graves de dengue com hemorragias entre crianças. Por outro lado, no Brasil, sempre houve maior o número de casos de dengue sem episódios hemorrágicos e com maior incidência entre adultos jovens de 20 a 40 anos de idade. Entretanto, na epidemia de 2008 houve um significativo aumento de notificações de formas graves de dengue principalmente entre crianças com menos de 15 anos. A diferença entre esses dois perfis epidemiológicos pode ser devido a vários fatores e dentre eles destacam-se a subnotificação de casos de dengue

graves nas epidemias anteriores, a identificação incorreta da doença por parte dos agentes de saúde, ou mesmo uma mudança do perfil epidemiológico. Neste contexto, é possível também que a reemergência dos diferentes sorotipos do vírus da dengue no Brasil ao longo de várias décadas e a consequente hiperendemicidade (circulação de vários sorotipos) torna os indivíduos mais velhos mais resistentes a infecção quando comparados com a população mais jovem, pois provavelmente foram expostos ao vírus em epidemias anteriores adquirindo imunidade contra os mesmos.

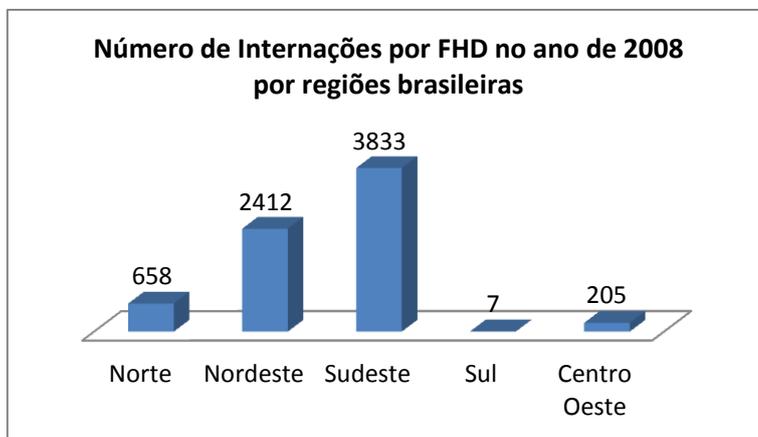
Em 2010, o sorotipo 4 do vírus da dengue (DENV4) reemergiu no estado de Roraima sendo confirmados pouco menos de 20 casos de dengue por este sorotipo. No mesmo ano, o vírus se espalhou para outros estados do norte e nordeste, chegando em 2011 aos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Ainda em 2011, a reemergência do DENV4 confirmou a circulação dos três sorotipos no Brasil: DENV1, DENV2 e DENV4 (DENV3 não tem sido isolado desde 2008) representando um novo desafio para o controle da doença. (Nogueira & Eppinghaus 2011; Temporão et al., 2011).

O Rio de Janeiro é uma das cidades brasileiras mais afetadas pela dengue. Na última grande epidemia em 2008, de acordo com dados do Sistema Único de Saúde (SUS), o sudeste foi a região brasileira com o maior número de internações por dengue hemorrágica, ou febre hemorrágica da dengue, FHD (Figura 1.1). Sendo que o Rio de Janeiro foi responsável por 90% de todos os casos (Figura 1.2). Somente nos primeiros quatro primeiros meses desse mesmo ano foram notificadas 9 mil hospitalizações com mais de 1000 casos de dengue hemorrágica e 110 mortes, sendo que metade das vítimas eram crianças (Teixeira et al., 2009).

Durante todo o ano de 2011 o Rio de Janeiro continuou sendo o estado brasileiro com maior número de internações por FD e FHD ainda segundo dados do SUS, houve 9.615 internações por dengue para todas as faixas etárias (Ministério da Saúde -DATASUS, 2012). Segundo dados da Secretária Estadual de Saúde do Rio de Janeiro, durante os meses de janeiro e fevereiro e março de 2012 foram notificados 38.527 casos suspeito de dengue, incluindo sete óbitos, no estado do Rio de Janeiro, dentre esses casos foi confirmada presença de infecção causada pelos sorotipos DENV-1,- 4 e 3 (Secretária de Saúde do estado do Rio de Janeiro-SES, 2012).

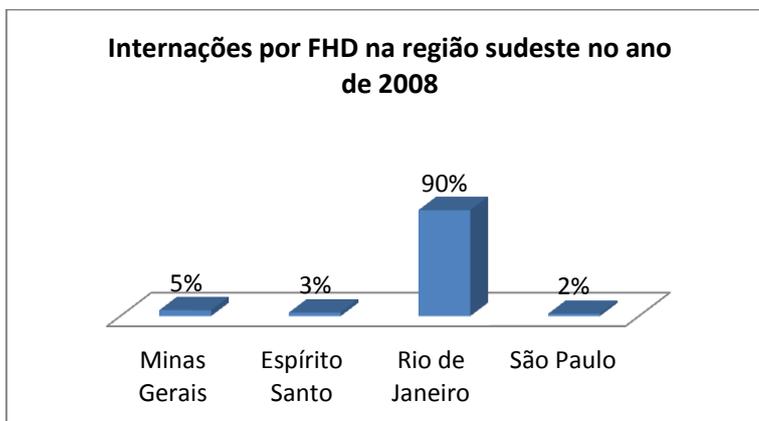
Por ser uma cidade com crescimento urbano descontrolado e condições climáticas favoráveis, o Rio de Janeiro se torna um local bastante propício à alta reprodução do mosquito

vetor, que por sua vez está completamente adaptado ao ambiente peridomiciliar estando densamente distribuído por todo o estado; tais fatores fazem do Rio de Janeiro um local ideal para a transmissão do vírus e conseqüentemente o surgimento de grandes epidemias de dengue.



Fonte: DATASUS

Figura 1.1: Número de Internações por FHD em 2008 nas cinco regiões brasileiras para todas as faixas etárias.



Fonte: DATASUS

Figura 1.2: Porcentagem de internações por FHD na região sudeste no ano de 2008 para todas as faixas etárias.

## 1.5- Classificação das formas clínicas

A dengue é uma doença infecciosa com espectro clínico muito amplo. Após infectados 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. Sendo o grau I 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) (World Health Organization, 1997).

Há muitas décadas, tal classificação vem sendo alvo de muitas críticas, primeiramente porque ela foi estabelecida na década de 60 a partir do estudo de casos clínicos de crianças asiáticas e então essa classificação foi estendida para outras regiões mundiais e aplicada em pacientes com diferentes idades. Além disso, para um correto diagnóstico segundo as definições da OMS, vários testes devem ser realizados repetidamente o que se torna um grande desafio em alguns países (Rigau-Perez, 2006).

Apesar de pequenas modificações terem sido feitas ao longo do tempo, tal classificação permaneceu praticamente a mesma. Um dos grandes problemas sempre foi a diferenciação de casos de FD e casos brandos de FHD, pois apesar da sugestiva nomenclatura, esses grupos não são diferenciados simplesmente pela presença de hemorragias; uma vez que a FD pode ser acompanhada ocasionalmente por sangramentos. Enquanto isso, o termo FHD é usado porque segundo a OMS algumas formas hemorrágicas sempre são acompanhadas por aumento da permeabilidade vascular (Bandyopadhyay et al., 2006; Rigau-Perez, 2006)

Várias inconsistências tem sido encontradas ao longo dos anos em relação ao resultado do teste torniquete positivo, que é um dos testes usados para a identificação de casos de dengue hemorrágica. Segundo parâmetros da OMS, esse teste é considerado positivo quando 20 ou mais petéquias são encontradas numa área dérmica de 2,5 cm<sup>2</sup>. Grande parte dessas

inconsistências se deve a realização do teste em diferentes fases ou diferentes dias da doença. Devido ao grande número de falsos negativos muitos pacientes com FHD são incorretamente diagnosticados o que pode ter sérias conseqüência no tratamento desses pacientes (Bandyopadhyay et al., 2006; Cao et al, 2002).

Níveis de plaquetas utilizados para definir casos de FHD também tem sido um alvo de complicações para um correto diagnóstico. Muitos pacientes com FHD não apresentam níveis de plaquetas abaixo do valor estipulado pela OMS ( $<100.000 \text{ mm}^3$ ). Além disso, a presença de trombocitopenia em pacientes com FHD varia muito em diferentes regiões do mundo, por exemplo, apenas 8,6% dos pacientes da Indonésia desenvolvem trombocitopenia enquanto em Cuba esse valor chegou a 78% (Bandyopadhyay et al., 2006).

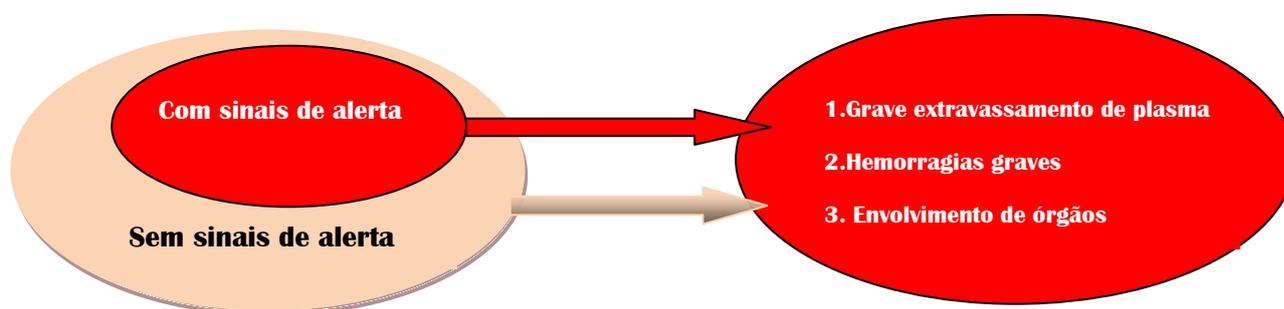
Devido à grande dificuldade para aplicar a classificação: “FD/FHD/SCD” e conseqüentemente um adequado manejo e tratamento dos pacientes, fez com que a WHO/TDR criasse uma nova classificação para os casos de dengue de acordo com os níveis de gravidade da doença. De acordo com a nova classificação, os 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 (figura 1.3).

É provável que o indivíduo tenha contraído dengue, se além de morar ou ter viajado para uma área endêmica apresentar pelo menos dois dos seguintes sintomas: erupções cutâneas, dores no corpo, teste do torniquete positivo, leucopenia ou ainda, algum dos sinais de alerta como: dor ou sensibilidade abdominal, vômitos persistentes, sangramento de mucosas, letargia, aumento do fígado para mais de 2 cm, acumulação de fluido, aumento de hematócrito com rápido decréscimo de plaquetas.

Um paciente será classificado com a forma grave de dengue se apresentar os seguintes sintomas: grave extravasamento plasmático com choque hipovolêmico, graves hemorragias além de envolvimento de órgãos como coração ou fígado (Martínez Torres, 2008; World Health Organization., 2009). É importante ressaltar que tanto casos brandos com ou sem sinais de alerta podem evoluir para dengue grave, comprovando assim a imprevisibilidade do desfecho da doença.

## Dengue com ou sem sinais de alerta

## Dengue grave



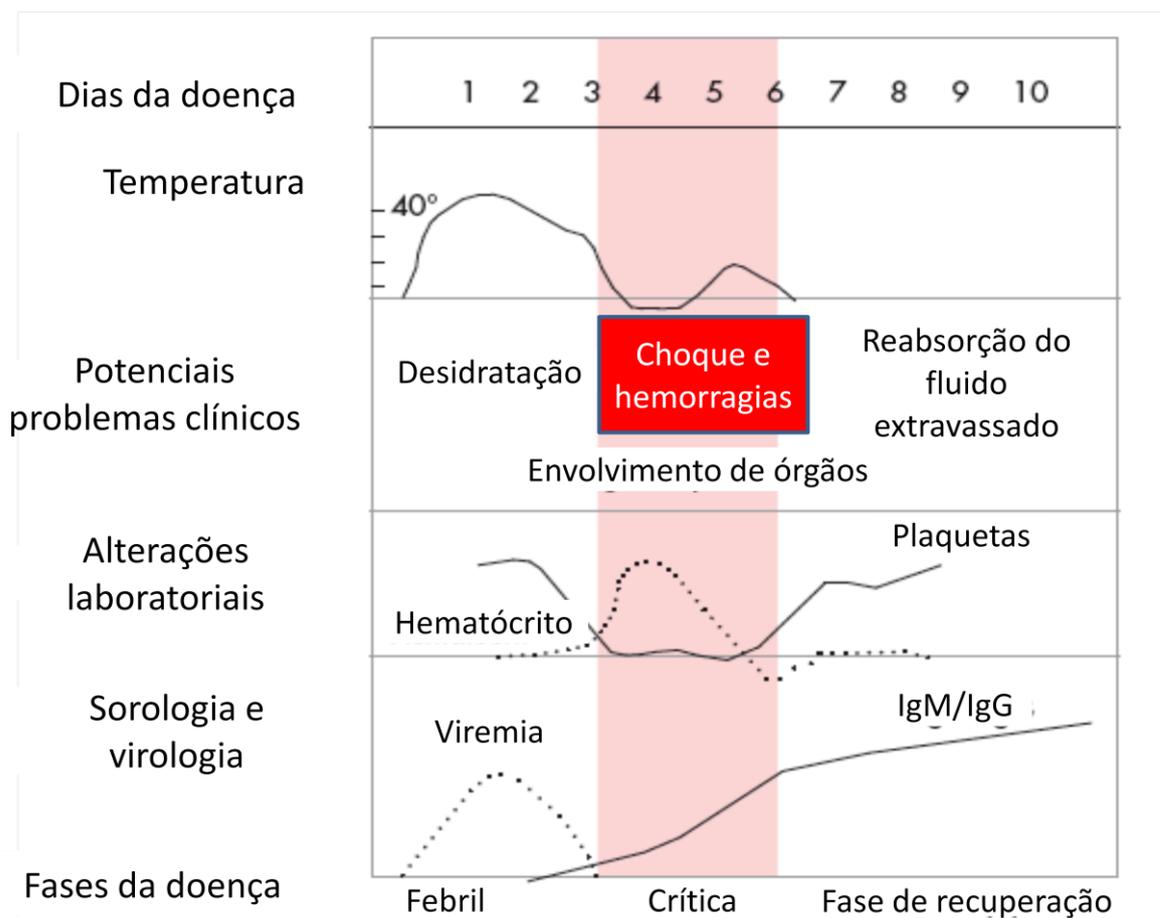
**Figura 1.3: Nova classificação da dengue.** Novo critério WHO/TDR utilizado para classificar os pacientes com infecção por dengue. Os pacientes com formas não graves da doença foram separados em dois subgrupos: com ou sem sinais de alerta. Estes dois subgrupos podem evoluir para formas graves da doença. Os sintomas relacionados às formas não graves assim com as formas graves estão descritos no texto (adaptado de WHO/TDR, 2009).

### 1.6- Fases da dengue e quadro clínico

Depois de ser picada por um mosquito infectado, 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 1.4). 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 necessário 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 caracterizam a fase crítica da dengue e anunciam a eminência do choque. O choque é até cinco vezes mais frequente na etapa crítica do que na etapa febril. Na etapa crítica também pode ocorrer hepatomegalia, além de ser acompanhada por características

laboratoriais como aumento de hematócrito e decaimento de plaquetas (Martínez Torres, 2008; World Health Organization., 2009).

Após a fase crítica, 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. Durante essa fase deve-se tomar cuidado com coinfeções bacterianas. Geralmente os pacientes se mantêm com astenia por vários dias durante essa fase (Martínez Torres, 2008)



**Figura 1.4- 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).

## 1.7- O vírus e seu vetor

O vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivírus*, família *Flaviviridae* e compreende quatro sorotipos relacionados genética e antígenicamente: DENV-1,-2, -3 e 4. Tais sorotipos exibem cerca de 65-70% de seqüências homólogas causando manifestações clínicas semelhantes onde todos podem causar dengue grave (Lindenbach & Rice, 2003; Green & Rothman, 2006).

A partícula viral mede aproximadamente 40 a 50nm de diâmetro e possui um envelope glicoprotéico. 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: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Lindenbach & Rice, 2003). A glicoproteína E do envelope está envolvida em importantes funções do vírus como ligação a receptores, hemaglutinação e neutralização de anticorpos durante a resposta imune do hospedeiro (Gubler, 1998; Guzman et al., 2010). Os vírus Dengue possuem especial tropismo pelas células dendríticas e por monócitos/macrófagos (Jessie et al., 2004; Wu et al., 2000 ; Durbin et al., 2008)

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, sendo que as linhagens que infectam primatas humanos e não humanos são geneticamente distintas (Wang et al., 2000; Rothman, 2011).

O *Aedes aegypti* geralmente se aloja no interior das residências picando preferencialmente durante o dia, seus picos de maior atividade são entre 2 e 3 horas da madrugada e durante a tarde, antes do anoitecer. A fêmea do *Aedes aegypti* por ser um mosquito bastante ativo, 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 dias chegando até a glândula salivar onde poderá ser transmitido novamente aos humanos juntamente com a picada do vetor (Guzman et al., 2010).

## **1.8- Diagnóstico e tratamento**

O diagnóstico de dengue pode ser feito por isolamento viral, detecção direta de antígenos vírais 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 por todo o mundo não são muito confiáveis, pois os níveis de imunoglobulinas não são detectados na fase aguda da doença e os níveis de IgM podem ser indetectáveis em infecções secundárias. Além disso, anticorpos contra dengue podem reagir de forma cruzada com outros flavivírus (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 vírais em uma única reação de PCR em tempo real (Kong et al., 2006). Recentemente tem sido usada a detecção da molécula não estrutural NS1 durante os primeiros dias da infecção, sendo que esse ensaio tem se revelado um bom diagnóstico específico (Lima et al., 2011).

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 o prognóstico do paciente. Após o diagnóstico a doença deve ser notificada e dependendo da manifestação clínica o paciente pode se recuperar em casa. Eventualmente, pode ser necessária a hospitalização do paciente devido à presença de sinais de alerta que indicariam a possibilidade de agravamento. Em casos mais graves de extravasamento plasmático (choque e derrames), graves hemorragias ou comprometimento de outros órgãos é necessário tratamento de emergência (World Health Organization., 2009)

Nos últimos anos houve um grande avanço no desenvolvimento de uma vacina tetravalente eficiente. Atualmente quatro tipos de vacinas com diferentes abordagens estão

sendo testadas: com vírus atenuado, com vírus quimérico atenuado, com vírus inativado e vacina de DNA (Wilder-Smith et al., 2010).

## 1.9- Infecção e Imunopatogênese

Após a entrada do vírus no corpo humano pela picada do mosquito vetor as primeiras células infectadas são as células de Langerhans, um subtipo de células dendríticas imaturas (CDs) presentes na epiderme (Wu et al, 2000). As CDs possuem vários receptores de superfície com importante papel na infecção por dengue, entre eles, o *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin* (DC-SIGN) uma lectina tipo C que é um dos principais receptores de entrada para os quatro sorotipos do vírus da dengue (Tassaneetrithep et al., 2003).

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. (Mukhopadhyay et al., 2005) Adicionalmente, algumas proteínas NS1 virais recém-sintetizadas e partículas virais imaturas podem escapar ou serem secretadas pela membrana da célula infectada (revisado por Rothman, 2011) (Figura 1.5a).

Após capturar os antígenos, as CDs imaturas migram para o linfonodo regional e após maturação processam o antígeno em peptídeos que serão apresentados às células T juntamente com moléculas do complexo maior de histocompatibilidade, MHC (*major histocompatibility complex*) e outros co-estimuladores, resultando no início da resposta

imune celular e humoral (Palucka, 2000). Os principais epítomos apresentados na superfície das células apresentadoras de antígenos, as APCs, são provenientes das proteínas não estruturais NS1 e NS3 (Kurane et al., 1991a; Lobigs et al., 1994; Rothman, 2004; Schlesinger et al., 1987).

Apesar das principais células alvo para DENV serem as células dendríticas e os monócitos/macrófagos, vários estudos *in vitro* mostraram que outras células como hepatócitos, linfócitos B e T, células endoteliais e fibroblastos também são potentes alvos para infecção e replicação do Dengue (Avirutnan, 1998; Jessie et al., 2004; Lin et al., 2002; Marianneau et al., 1997)

A resposta imunológica desencadeada pelo indivíduo infectado tem uma participação essencial na patogênese da dengue podendo direcionar o paciente à cura ou resultar numa desregulada produção de citocinas, devido ao crescente número de epítomos apresentados às células T CD4+ e CD8+ (Rothman, 2011). De fato, níveis elevados de várias citocinas são encontrados no soro de pacientes com dengue grave que podem assim, funcionar como marcadores de gravidade (Azeredo et al., 2001; Ho et al., 2001). Isoladamente ou em conjunto esses mediadores podem ser os responsáveis por alterações fisiológicas, como o aumento da permeabilidade vascular que é observado nos casos mais graves de dengue (Srikiatkachorn et al., 2010)

Ao longo de várias décadas, o principal foco de estudo tem sido a correlação entre infecções sequenciais por um sorotipo heterólogo e o aparecimento de sintomas associados à dengue grave/gravíssima (Dejnirattisai et al., 2010; Halstead, 1970; Halstead, 1981; Sierra et al., 2010). Essas informações são advindas de observações epidemiológicas e estudos prospectivos (Diaz et al., 1988; Guzman et al., 1987; Kouri et al., 1989; Mathew & Rothman, 2008) sugerindo que a dengue grave é resultado de uma resposta imune cruzada e pouco eficiente na segunda infecção por um sorotipo diferente.

Mesmo assim, apesar da maioria das pessoas infectadas com um sorotipo heterólogo do vírus da dengue serem capazes de responder a infecção com a proliferação de células T de memória de reatividade cruzada e aumento da produção de anticorpos, nem todas desenvolvem a forma grave da doença. Além disso, existem casos de dengue grave em infecções primárias, principalmente entre crianças (Balmaseda et al., 2006; Halstead et al., 2002; Lin et al., 2010, Hung et al., 2004 ).

Tais observações indicam que outros fatores, além da imunopatologia mediada pela infecção secundária, podem também estar envolvidos na patogênese da dengue. Entre esses fatores podemos ressaltar a virulência do sorotipo/linhagem do vírus infectante; características do hospedeiro como estado nutricional, idade (crianças e idosos tem maior risco), presença de doenças crônicas (asma, diabetes mellitus, entre outras) e por fim as características genéticas do hospedeiro (World Health Organization., 2009).

### **1.10- Resposta imune humoral e imunopatologia mediada por linfócitos B**

Epítomos da glicoproteína E do envelope viral são os mais bem caracterizados alvos das imunoglobulinas contra dengue (Guzman & Vazquez, 2010; Oliphant et al., 2006; Roehrig et al., 1998). No entanto, outras proteínas não estruturais como NS1, NS3 e NS5 também podem ser alvos da resposta humoral (Valdes et al., 2000). Anticorpos contra essas proteínas reagem tanto especificamente ao sorotipo viral infectante quanto de forma cruzada aos outros sorotipos virais numa infecção subsequente (Beltramello et al., 2010; Dejnirattisai et al., 2010; Schieffelin et al., 2010).

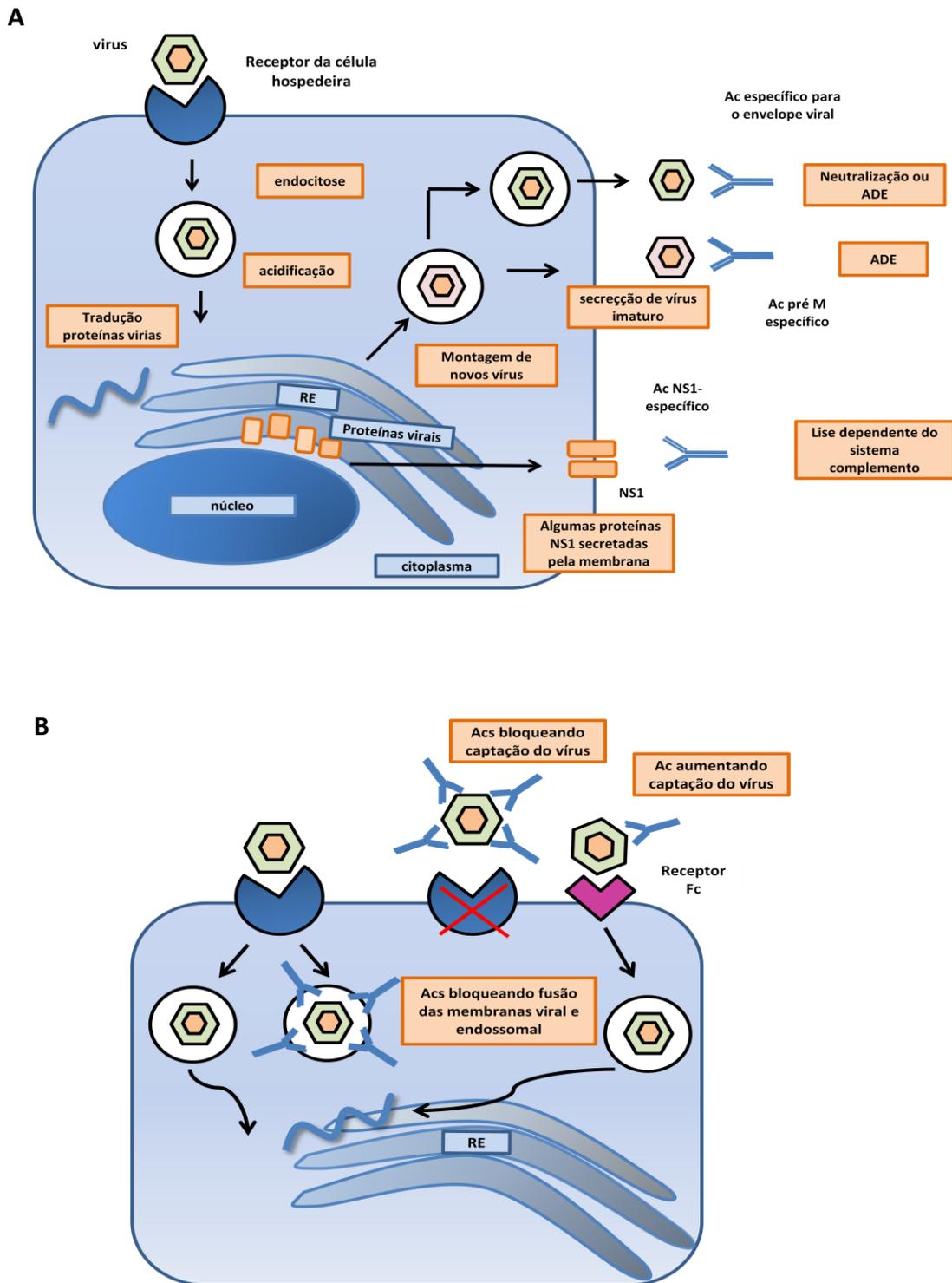
Os anticorpos contra o Dengue podem inibir a ligação do vírus aos receptores da superfície celular ou podem se ligar ao vírus já no interior da célula antes que estes escapem do endossomo; anticorpos neutralizantes são direcionados contra a proteína E do envelope viral e para que a neutralização seja eficiente um número mínimo de epítomos dessa proteína devem ser reconhecidos pelos anticorpos. Adicionalmente, alguns vírus imaturos liberados pela célula infectada e também proteínas virais que são expressas na superfície dessas células podem ser reconhecidos por anticorpos, como é o caso da proteína NS1. (Young et al., 2000) Em casos de baixa concentração de anticorpos específicos ou em condições de baixa avidéz, ao invés de ocorrer a neutralização do vírus ou da partícula viral, a infecção de células que possuem receptores para imunoglobulinas, como monócitos e macrófagos, pode aumentar (Pierson et al., 2007; Rothman, 2011).

Monócitos e macrófagos são alvos para ocorrência do fenômeno ADE (do inglês, “antibody-dependent enhancement”) ou facilitação dependente de anticorpo, que consiste na internalização de complexos vírus-anticorpos não neutralizantes por essas células através dos seus receptores Fc $\gamma$  resultando no aumento da replicação viral que pode ser compatível com o

aumento de viremia observado nos casos graves de dengue (Vaughn et al., 2000; Duyen et al., 2011; Tricou et al., 2011). Esses anticorpos de reatividade cruzada não possuem capacidade neutralizante e são induzidos durante uma infecção prévia (Guzman & Vazquez, 2010; Halstead et al., 1980; Dejnirattisai et al., 2010) (Figura 1.5 a e b).

A ocorrência de ADE é descrita baseada em observações *in vitro* para dengue (Goncalvez et al., 2007) e outras infecções viriais (Ghiasi et al., 2000; Girm et al., 2002). Experimentos *in vivo* realizados em macacos *rhesus* mostraram que quando estes foram previamente imunizados contra dengue com um sorotipo diferente ao sorotipo do desafio, ocorre uma viremia maior do que em macacos usados como controle (Halstead, 1979). Apesar das evidências descritas, a comprovação da ocorrência do ADE *in vivo* em humanos é indireta. Foi demonstrada uma atividade ADE em soro de mães cujos filhos desenvolveram dengue grave durante uma infecção primária e que quanto menor a idade da criança maior a ocorrência do fenômeno, mostrando que de fato ocorre um declínio da resposta imune cruzada contra dengue com o passar dos anos (Kliks et al., 1988). Contraditoriamente, em um estudo conduzido entre crianças não encontrou nenhuma associação significativa entre a maior “atividade de ADE” em soros de crianças que desenvolveram FHD se comparada com a das que desenvolveram FD (Libraty et al., 2009).

O aumento da replicação viral resultante do aumento da entrada viral em células, que possuem receptores Fc $\gamma$  devido ao ADE, pode estar relacionado a modificações na regulação de vias produtoras de mediadores pró e anti-inflamatórios. Estudos mostraram que o aumento da infecção via ADE resulta na supressão da produção de IL-12, IFN $\gamma$ , TNF; além de aumentar a expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-6 e IL-10 (Chareonsirisuthigul et al., 2007a; Mahalingam & Lidbury, 2002). Também foi demonstrado que ADE é capaz de suprimir a produção de óxido nítrico. Esse radical livre é um importante mediador imune em infecções virais, sabe-se que o óxido nítrico é capaz de inibir a síntese de genomas virais assim como bloquear a atividade de proteases virais (Akaike & Maeda, 2000). Na infecção por dengue foi visto que o óxido nítrico é capaz de bloquear a replicação viral através da inibição da proteína viral NS5 (Chareonsirisuthigul et al., 2007b)



**Figura 1.5- Resposta humoral contra o vírus da dengue.** a) DENV se liga a receptores específicos expressos na superfície da célula alvo, sendo endocitado. A acidificação no interior do endossomo faz com que a proteína E sofra alteração conformacional resultando na fusão das membranas viral e endossomal, ocorrendo a liberação do material genético no citoplasma e conseqüente tradução de proteínas virais para produção de novos vírus que serão liberados via exocitose. Adicionalmente, algumas partículas virais imaturas assim como proteínas recém-

sintetizadas são expressas na superfície celular. A interação de Anticorpos (Ac) específicos para a proteína E do envelope pode resultar em neutralização ou aumentar a infecção via *antibody dependent enhancement* (ADE). Anticorpos específicos para a proteína pré M direcionados contra vírus liberados na forma imatura são não neutralizantes resultando em aumento da infecção. A interação de Ac específicos para NS1 ocorre com a proteína ainda ligada a membrana e pode causar a lise da célula infectada via ativação dos sistema complemento. b) antígenos neutralizados por anticorpos não se ligam a receptores celulares. Alguns vírus conseguem penetrar na célula, no entanto são opsonizados por anticorpos que impedem intracelularmente a fusão das membranas viral e endosomal. Estes vírus que não são neutralizados conseguem assim se replicar na célula hospedeira (Adaptado de Rothman, 2011)

Apesar de inúmeras evidências, a imunopatologia mediada por anticorpos ainda é muito controversa. De fato, a resposta imune humoral é capaz de proteger contra a infecção por dengue principalmente por neutralização da glicoproteína E do envelope viral com anticorpos específicos de alta avidéz (Oliphant et al., 2006) ou por ativação do sistema complemento (Walker et al., 1988). Além disso, o fato de que casos graves de dengue podem ocorrer, mesmo que em baixa proporção, durante uma infecção primária tanto em adultos quanto em crianças mais velhas assim como a ausência de correlação entre o aumento da atividade de anticorpos com a viremia e gravidade da dengue (Laoprasopwattana et al., 2005) mostram que o aumento da infecção (facilitação) por complexos de anticorpos não neutralizantes e vírus não é necessariamente requerido para a gravidade a dengue.

### **1.11- Resposta imune celular e imunopatologia mediada por linfócitos T**

Os principais epítomos do vírus da dengue apresentados juntamente com as moléculas de MHC aos linfócitos T são provenientes da proteína NS3. Diferenças de aminoácidos na proteína NS3 entre os diferentes sorotipos virais podem resultar em diferentes graus de avidéz na interação de epítomos provenientes dessa proteína com moléculas de MHC e consequentemente interferir na avidéz do linfócito T resultando na produção de diferentes perfis de citocinas além de interferir na atividade de linfócitos citotóxicos (CTLs) (revisado por Rothman, 2011; Zivny et al., 1999; Mongkolsapaya et al., 2006).

A ativação dos linfócitos pode exacerbar os danos teciduais e causar a doença, principalmente através da produção de citocinas e dos mecanismos de lise celular. Foi

observado, *in vitro*, que tanto linfócitos T CD4+ ou CD8+ possuem capacidade de lise de células infectadas pelo vírus da dengue (Kurane et al., 1989; Bukowski et al., 1989) A elevação dos níveis circulantes de receptores solúveis de TNF, IL-2 assim como marcadores de ativação de linfócitos T CD8+ são indicativos da participação de células T na imunopatogênese da dengue (Mathew & Rothman, 2008). Linfócitos T CD4+ após reconhecerem o peptídeo apresentado pelas moléculas de MHC produzem principalmente citocinas como IFN $\gamma$ , IL-2, TNF, além de quimiocinas como MIP1 $\beta$  (também conhecida como CCL4) (Rothman, 2011). Essas citocinas podem estar envolvidas na patogênese da dengue grave à medida que direta ou indiretamente vão atuar nas células endoteliais; sabe-se que alterações nas células endoteliais podem levar ao extravasamento plasmático.

Segundo Rothman (2011) em condições de alta avides e com os epítomos funcionando como “fortes agonistas”, observa-se elevada produção de IFN $\gamma$ , 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 $\gamma$  e TNF, além de baixa capacidade de lise celular (Rothman, 2011)

Contraditoriamente a esses resultados, Mongkolsapaya & cols (2006) demonstraram que células T específicas para determinado sorotipo viral possuem maior capacidade citotóxica do que células T de reatividade cruzada além dessas últimas serem capaz de produzir mais IFN $\gamma$ . Dong e colaboradores (2007) também demonstraram *in vitro* que células T citotóxicas (CTL) de reatividade cruzada produzem TNF e IFN $\gamma$  em níveis mais elevados do que CTLs específicas (Dong et al., 2007).

Sangue de indivíduos previamente infectados pelo vírus da dengue apresentam tanto linfócitos T específicos para o sorotipo infectante quanto linfócitos de memória com reatividade cruzada. Estes últimos foram gerados durante uma infecção prévia por outro sorotipo e possuem capacidade de proliferação superior a linfócitos T *naive* durante uma infecção secundária. Este fenômeno recebe o nome de *pecado original antigênico*, devido a uma analogia com o conceito teológico do pecado original. No entanto, essas células de memória de reatividade cruzada apresentam baixa avides aos epítomos provenientes de outros sorotipos virais não sendo eficientes em combater a infecção e resultando num perfil diferenciado de produção de citocinas devido a baixa avides com que reconhecem os epítomos de um sorotipo viral heterólogo (Mathew et al., 1996; Rothman, 2011; Rothman & Ennis, 1999; Mongkolsapaya et al., 2003; Mongkolsapaya et al., 2006).

## 1.12- Cascata de citocinas na infecção por dengue

Individualmente ou em conjunto os mediadores imunológicos podem ser os grandes responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular que leva os pacientes com dengue grave ao quadro de choque. Esses mediadores podem ser liberados principalmente de células endoteliais, monócitos/macrófagos ou linfócitos T ou após interação entre a imunidade inata e adquirida. Uma “cascata de citocinas” é fortemente associada com infecções sucessivas e as formas mais graves de dengue e provenientes da resposta cruzada tanto dos linfócitos B quanto T (Pang et al., 2007).

Uma ampla gama de mediadores é encontrada em níveis elevados em pacientes com dengue comparado a indivíduos saudáveis, entre eles IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, IFN $\gamma$ , TNF, MCP1 e receptores solúveis de CD4 e CD8 (Hober et al., 1993; Kurane et al., 1991b; Lee et al., 2006b; Mustafa et al., 2001; Raghupathy et al., 1998). Alguns desses mediadores foram identificados como marcadores de gravidade; principalmente o TNF e seu receptor solúvel, IL-10, MIF, CCL2, CD69, MIP-1 $\beta$ , IL-18 e IL-6 (Azeredo et al., 2001; Bozza et al., 2008; Chuang et al., 2011; Green et al., 1999b; Lee et al., 2006b; Mustafa et al., 2001).

Como descrito anteriormente, 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 pro- 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 $\gamma$  parece estar associado à gravidade a dengue (Bozza et al., 2008; Libraty et al., 2002)

Sabe-se que o IFN $\gamma$  é um importante mediador imune com importantes efeitos antivirais participando da ativação de macrófagos. Ao contrário dos IFN $\alpha/\beta$  que são mais importantes para controlar a infecção em estágios iniciais (Shresta et al., 2004), o IFN $\gamma$  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 o IFN $\gamma$  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; Kontny et al., 1988; Kurane et al., 1989; Libraty et al., 2001). Por outro lado, alguns trabalhos associam o

IFN $\gamma$  a proteção à dengue (Fagundes et al., 2011; Gunther et al., 2011; Mathew & Rothman, 2008). O efeito antiviral do IFN $\gamma$  pode aumentar a produção de TNF e óxido nítrico levando a uma eliminação viral precoce do vírus e reduzindo assim a severidade da doença (Mathew & Rothman, 2008).

A produção de TNF pode contribuir para uma eliminação precoce do vírus Dengue. Por outro lado, essa citocina pode estar entre os principais responsáveis pelo agravamento da infecção por dengue, sendo uma das primeiras citocinas detectadas no soro de pacientes com dengue grave (Azeredo et al., 2001; Braga et al., 2001; Kubelka et al., 1995). Macrófagos ativadas são os principais produtores de TNF. 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 muito altos de TNF (Abbas et al., 2008). 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 I<sub>2</sub> e óxido nítrico (Tracey & Cerami, 1992). O TNF, ainda é capaz de induzir a produção de outras citocinas que quando secretados em conjunto, podem ter efeitos sinérgicos. Por exemplo, TNF, IFN $\gamma$  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 sendo encontrada em níveis elevados no soro de pacientes que desenvolvem essa forma da doença (Chen et al., 2007; Hung et al., 2004; Pérez et al., 2004). Assim como no caso do IFN $\gamma$ , 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 (Abbas et al. 2008) Altos níveis de IL-10 foram associados a uma linfopenia transitória e ao aumento de trombocitopenia (Azeredo et al., 2001; Libraty et al., 2002) . Em alguns estudos foi observado um decréscimo no número de linfócitos na fase aguda da dengue ou outras doenças infecciosas (Azeredo et al., 2001; Chernoff et al., 1995). Adicionalmente, foi encontrada uma correlação entre o decréscimo do número de plaquetas e altos níveis de IL-10 em pacientes

com dengue (Azeredo et al., 2001). Tal correlação já foi observada para pacientes com outras doenças inflamatórias que foram tratados com IL-10 (Sosman et al., 2000).

Como foi dito anteriormente, o aumento da infecção por ADE parece estar acompanhado por uma alta produção de citocinas anti-inflamatórias, entre elas a IL-10 (Chareonsirisuthigul et al., 2007a; Mahalingam & 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- $\gamma$  e TNF assim como uma fraca indução de citocinas anti-inflamatórias como TGF- $\beta$ 1 e IL-10 e durante uma reinfecção por um sorotipo homólogo foi visto um padrão predominante de citocinas anti-inflamatórias (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 $\beta$  e de moléculas de adesão ou diretamente através da sinalização de vias que interferem na estabilidade das junções das células endoteliais (Chuang et al., 2011; Assunção-Miranda et al, 2010).

### **1.13- Receptores de reconhecimento padrão e patogênese da dengue**

Os receptores de reconhecimento padrão, presentes em células do sistema imune que reconhecem estruturas comuns a vários patógenos constituem uma das primeiras linhas de defesa do sistema imune inato. Não se sabe ao certo todos os receptores envolvidos na entrada do vírus da dengue nas células alvo. Embora, DC-SIGN e CLEC5A pareçam ser um dos mais importantes receptores envolvidos na infecção por dengue, outros receptores também podem ter um importante papel, ainda desconhecido, na imunopatogênese da dengue.

DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) também conhecido como CD209 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). Além disso, já foi visto que outros patógenos também são capazes de se ligar ao DC-SIGN, como *Leishmania sp.* (Colmenares et al., 2002), HIV (Geijtenbeek et al., 2000; Kwon et al., 2002) e micobactérias (Tailleux et al., 2003).

Ao contrário do DC-SIGN que está relacionado à entrada do vírus na célula, CLEC5A (C-type lectin domain family 5 member A) - outro importante receptor com participação na imunopatogênese da dengue - parece estar relacionado com 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 e macrófagos e possui um domínio extracelular com uma lectina C; o domínio N terminal citoplasmático é composto por apenas quatro aminoácidos. CLEC5A interage com o imunoreceptor citoplasmático DAP-12, essa interação se dá através do resíduo de lisina na região transmembrana de CLEC5A com o resíduo de aspartato na proteína DAP-12 (Cheung et al., 2011; Watson et al., 2011).

Experimentos *in vitro* mostraram que a glicoproteína E do envelope estaria envolvida na ligação do vírus a esse receptor e que a interação DENV-CLEC5A resulta na fosforilação de DAP-12 concomitantemente com uma aumentada produção de TNF. Entretanto, os níveis de IFN $\gamma$  não parecem ser afetados por essa interação (Chen et al., 2008). Adicionalmente, foi visto que na presença do seu ligante, que ainda permanece não identificado, CLEC5A sofre uma mudança conformacional que pode mediar a sinalização de DAP-12 estimulando a liberação de citocinas pró inflamatórias (Watson et al., 2011).

Outros receptores de reconhecimento padrão também podem ser importantes no reconhecimento ao DENV, como os receptores tipo Toll (TLRs). 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). Foi visto que o nocaute de TLR-3 juntamente com outros sensores intracelulares de RNA viral resultam em suscetibilidade celular ao DENV (Nasirudeen et al., 2011). Interessantemente, foi visto que os complexos DENV-anticorpos quando se ligam a receptores Fc $\gamma$  (ADE) regulam negativamente a expressão de receptores Toll somente em casos graves de dengue (Modhiran et al., 2010).

Adicionalmente, foi visto por Azeredo & cols (2010) que monócitos CD14+ de pacientes com dengue branda expressaram mais receptores Toll tipo 2 e 4 do que pacientes com dengue grave.

#### **1.14- Características genéticas do vírus e gravidade à dengue**

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 identificadas para cada sorotipo, mostrando a grande diversidade genética de cada um deles. 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 caso do DENV2, o genótipo asiático foi associado à FD e FHD, enquanto o genótipo americano foi associado apenas a FD (Fried et al., 2010; Leitmeyer et al., 1999; Rico-Hesse, 2007). Em relação ao DENV3, quatro genótipos distintos foram identificados para esse sorotipo e estudos epidemiológicos e filogenéticos sugerem que diferenças genéticas entre essas linhagens podem estar relacionadas à virulência (Lanciotti et al., 1994; Messer et al., 2003). O sorotipo DENV1 que foi reintroduzido no Brasil em 1986 reemergindo no país em 2009/2010 possui cinco genótipos, sendo que no Brasil só há indícios da circulação de linhagens do genótipo V (dos Santos et al., 2011).

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 numa 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.

### **1.15- Características genéticas do hospedeiro e gravidade à dengue**

Estudos epidemiológicos conduzidos em Cuba durante a epidemia de dengue ocorrida em 1981 mostraram que o número de casos FHD é consideravelmente aumentado em brancos. Como revisado por De La e cols (2006), 86% dos casos de FHD ocorreram em brancos e apenas 7% em negros, sendo os 7% restantes em mulatos. Resultados similares foram obtidos em estudos de epidemias subseqüentes em 1997 e 2001. 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 (de la et al., 2006).

Em acordo com essas observações está também a baixa incidência de FHD em populações negras da África (Gubler et al., 1986; Halstead et al., 2001; Saluzzo et al., 1986). Adicionalmente um estudo conduzido com crianças do Haiti mostrou uma completa ausência de casos de FHD, mesmo havendo uma taxa de soropositividade entre os indivíduos recrutados de 85% e a circulação de três sorotipos virais (Halstead et al., 2001).

Outro estudo conduzido com indivíduos infectados no estado da Bahia mostrou uma associação entre marcadores de ancestralidade Africana e proteção à FHD (Blanton et al., 2008). A consistência desses resultados apóiam a idéia de que fatores genéticos do hospedeiro podem ter importante envolvimento na patogênese da dengue.

### **1.16- Estudos de associações genéticas á doenças infecciosas**

Assim como foi visto para dengue uma marcante característica da maioria das doenças infecciosas por todo o mundo é sua variação fenotípica inter-individual, abrangendo desde uma infecção assintomática até uma infecção letal (Casanova & Abel, 2007). Como observado por vários estudos que mostraram que muitas doenças infecciosas como malária, hanseníase e leishmaniose quando observadas numa mesma área endêmica com similar exposição ao patógeno apresentam diferentes taxas de prevalência entre diferentes grupos étnicos (Beiguelman, 1968; Bucheton et al, 2002; Dolo et al., 2005)

A epidemiologia genética tem por objetivo determinar se existe um componente genético para uma certa doença observada na população levando em consideração os fatores ambientais. Estudos desse tipo fazem uso de duas abordagens fundamentais para encontrar um

gene patológico, o estudo de ligação, que é baseado em famílias e o estudo de associação, baseado em populações. O estudo de ligação acompanha a transmissão de doença ao longo de poucas gerações procurando por uma herança consistente e repetida de um locus gênico sempre que a doença é transmitida em uma família. Esse tipo de estudo é realizado a partir da análise de ligação fazendo uso da presença de marcadores polimórficos ao longo de genoma. Enquanto isso, o estudo de associação estuda a variação das frequências de um alelo em um grupo de indivíduos afetados comparado com um grupo de pessoas não afetadas retirado da mesma população fonte (Thompson & Thompson, 2008).

Os estudos de associação tem por finalidade encontrar uma significativa associação entre um fator de exposição e um desfecho. No caso dos estudos de associação genética o fator de exposição é um gene, mais precisamente um alelo; enquanto o desfecho é a doença ou suas diferentes formas clínicas. Um dos principais desenhos de estudos de associação é o caso-controle (Pacheco & Moraes, 2009) que nesse caso pode seguir duas principais metodologias: de genes candidatos ou estudo de associação em todo o genoma (GWAS, do inglês *Genome-wide association studies*). Ao contrário do GWAS, onde são genotipados um grande número de casos e controles para milhares de marcadores por todo o genoma, na abordagem de genes candidatos o número de indivíduos e marcadores selecionados é bem mais modesto (Marian, 2012).

Na estratégia de genes candidatos, a correta escolha dos genes assim como dos indivíduos que irão compor o grupo de casos e controles é de extrema importância para o sucesso do estudo. Para a escolha adequada de um gene candidato, é preciso ter um conhecimento prévio dos mecanismos de patogênese da doença. No caso da dengue, por exemplo, sabe-se que citocinas, quimiocinas e receptores de entrada viral estão relacionados a sua imunopatogênese, logo genes que codificam algumas dessas proteínas são bons candidatos.

Após a seleção dos genes, o próximo passo é a seleção dos marcadores. Estes podem estar tanto em regiões internas quanto regiões flanqueadoras do gene candidato. Vários polimorfismos podem ser usados como marcadores genéticos, porém, na maioria das vezes os polimorfismos de base única (SNPs) são os polimorfismos preferidos, pois estão amplamente distribuídos por todo o genoma e são de fácil genotipificação (Pacheco & Moraes, 2009).

Dentre os critérios utilizados para a escolha dos SNPs que serão estudados estão a sua prévia associação em estudos anteriores com outras doenças ou com a doença em questão.

Entretanto, pode-se fazer uso de buscas de *tags SNPs* em bancos repositórios de polimorfismos humanos como o Hapmap.

Outra etapa desafiadora no desenho caso-controle é a escolha dos representantes de cada um desses grupos. Obviamente, os casos devem ser diagnosticados corretamente; devem ser usados métodos de diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade. Enquanto isso, a correta escolha dos controles pode ser o passo mais difícil durante um estudo caso-controle. O ideal é que cada controle tenha sido exposto às mesmas condições que os casos diferindo apenas no fator que se busca a associação, nesse caso a doença. Outro importante fator que deve ser levado em consideração nos estudos caso-controle é o tamanho amostral, o ideal é que sejam feitos cálculos fim de se obter o número mínimo de casos e controles necessários para se encontrar uma associação consistente e significativa estatisticamente (Pacheco & Moraes, 2009).

### **1.17- SNPs associados à dengue e outras doenças infecciosas**

Alguns genes são altamente polimórficos, especialmente os relacionados à resposta imune. Um ótimo exemplo de variação genética do sistema imune é o complexo maior de histocompatibilidade (MHC) que inclui os genes do *locus* antígeno leucocitário humano (HLA). Esse *locus* é altamente polimórfico e está localizado próximo de muitos outros genes com importantes e conhecidas funções imunológicas, como por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF) e a linfotóxina- $\alpha$  (LTA). A grande diversidade genética do HLA pode ter surgido como uma estratégia do hospedeiro para conter a diversidade antigênica dos organismos infecciosos. Tal pressão seletiva pode ter ocorrido também em outros genes da resposta imune (Kwiatkowski et al., 2000).

Muitos SNPs ou haplótipos em genes de citocinas/mediadores já foram associados suscetibilidade/ proteção a várias doenças, inclusive a dengue. Como dito anteriormente, esses genes são ótimos candidatos para estudos de associação em doenças infecciosas.

Um bom exemplo é o SNP -308 A/G no gene TNF; foi observado que a forma alélica do gene que contém o nucleotídeo adenina (A) possui maior afinidade a fatores de transcrição resultando em um aumento da sua atividade (e conseqüentemente maior produção da proteína) quando comparado à forma alélica que contém o nucleotídeo guanina (G) (Bayley et al., 2004). Esse polimorfismo já foi associado à proteção/suscetibilidade a várias

doenças. No caso da dengue e malária, por exemplo, a variante alélica que contém a adenina foi associada à gravidade (Bayley et al., 2004; Fernandez-Mestre et al., 2004; Perez et al., 2010a). Por outro lado, essa mesma variante está associada à proteção à hanseníase (Cardoso et al., 2011).

Outro gene da resposta imune muito estudado é o da IL-10. Devido à participação fundamental da IL-10 no sistema imune e nos processos inflamatórios, muitos trabalhos tem descrito o estudo da associação entre vários polimorfismos nesse gene e o risco de desenvolvimento de doenças associadas com desordens da imunidade e inflamação, incluindo, câncer, doenças neurodegenerativas e autoimunes (Di Bona et al., 2012; Gibson et al., 2001; Lazarus, 2006; Shao, 2011; Wei et al., 2011). Em doenças infecciosas, tanto virais quanto bacterianas e micobacterianas, várias associações tem sido encontradas entre SNPs no gene de IL-10 e suscetibilidade/ resistência a essas doenças, como hepatites B e C (Lu et al., 2010), AIDS (Opdal, 2004), tuberculose (Pacheco et al., 2008), hanseníase (Moraes et al., 2004) e dengue (Perez et al., 2010a).

Além dos SNP -308 A/G no gene TNF e do haplótipo contendo o SNP -819 C/T no gene da IL-10 (Fernandez-Mestre et al., 2004; Perez et al., 2010a), vários outros SNPs presentes em genes como DC-SIGN (Sakuntabhai et al., 2005; Wang et al., 2011), receptor de vitamina D (VDR) (Loke et al., 2002), lectina ligadora de manose (MBL) (Acioli-Santos et al., 2008), JAK1 (Silva et al., 2010), transportador associado ao processamento antigênico (TAP-1) (Soundravally & Hoti, 2008), HLA (Appanna et al., 2010; Falcon-Lezama et al., 2009) foram associados ao desenvolvimento de formas graves de dengue. Mais recentemente dois estudos, incluindo um GWAS, encontraram fortes associações entre genes relacionados ao complexo maior de histocompatibilidade classe 1 (MIC), Esses genes estão na região MHC, porém fora do locus HLA (Garcia et al., 2011; Khor et al., 2011)

Devido ao considerável aumento de crianças infectadas pelo vírus da dengue que desenvolveram manifestações clínicas graves como choque durante a epidemia de 2008, esse trabalho procurou avaliar a participação da constituição genética dos indivíduos infectados como sendo um dos fatores envolvidos na patogênese da dengue.

Para isso, foi desenhado um estudo de associação do tipo caso-controle, onde buscou-se encontrar associações entre polimorfismos genéticos nos indivíduos e o desenvolvimento de dengue grave. Foram utilizados como casos, crianças com dengue grave internadas em unidades de tratamento intensivo de quatro importantes hospitais do Rio de Janeiro. Para cada

caso, foram selecionados até cinco controles residentes na mesma casa ou na vizinhança. Devido as características do mosquito vetor, como descrito anteriormente, é muito provável que indivíduos vivendo muito próximos tenham sido infectados pelo mesmo vírus transmitido pela mesma fêmea do *Aedes aegypti*.

Inicialmente foram selecionados SNPs (TNF-308, IL-10-819, DC-SIGN -336) que já haviam sido associados à gravidade à dengue em trabalhos anteriores. Além desses, foram selecionados também os SNPs: MIF-173, assim como três SNPs, provenientes de uma busca de SNPs realizado no HapMap, no gene do receptor CLEC5A. Adicionalmente, outros genes candidatos com participação na patogênese de outras doenças foram selecionados para este estudo, dentre eles, MRC-1 (mannose receptor, C type 1, CCR5 (chemokine (C-C motif) receptor 5) e NOD1 e 2, donucleotide-binding oligomerization domain”, são receptores de reconhecimento padrão intracelulares relacionados a detecção de peptídeo-glicanos bacterianos e ativação de vias que resultam na liberação de citocinas pró inflamatórias. Polimorfismos em NOD2 podem contribuir para suscetibilidade a doenças inflamatórias crônicas como Doença de Crohn e doenças infecciosas como hanseníase (Cardoso et al., 2011b; Le Bourhis et al., 2007).

MRC-1, outro receptor de reconhecimento padrão lectina tipo C, reconhece moléculas que contem manose, fucose e N acetil glicosamina (Ezekowitz et al.,1990).O polimorfismo G396S, aqui estudado, está localizado no éxon 7 do gene MRC-1 sendo um polimorfismo não sinônimo resultante da troca de uma adenina para uma guanina que resulta na mudança do aminoácido glicina para serina na posição 396 da proteína. Esse mesmo SNP já foi associado a suscetibilidade a hanseníase. (Alter et al., 2010)

O polimorfismo  $\Delta$  32, também selecionado para o presente estudo, está localizado no gene que codifica o receptor de quimiocina CCR5 resultando na deleção de 32 pares de base modificando o quadro de leitura do RNA mensageiro e produzindo uma proteína não funcional (Konishi et al., 2004; Samson et al., 1996). Sabe-se que o CCR5 é um importante co receptor de entrada para o HIV presentes em linfócitos T. Carreadores da mutação  $\Delta$  32 são resistentes a infecção por HIV, essa mutação possui uma frequência de 0,092 em caucasianos, porém ausente em negros da África Central e Ocidental assim como na população japonesa (Konishi et al., 2004; Samson et al., 1996). Acredita-se que polimorfismos no CCR5 podem ter um papel protetor em outras doenças assim como contribuir para processos inflamatórios resultando em injúria tecidual (Klein, 2008). O polimorfismo  $\Delta$  32 pode ser um fator de risco

para infecções por flavivírus como encefalites (Kindberg et al., 2008) e vírus *West Nile* (Glass et al., 2006)

## 2- OBJETIVOS

---

### 2.1- Gerais

Este trabalho teve por objetivo avaliar a contribuição da constituição genética na gravidade da dengue entre crianças através de um estudo de associação do tipo caso-controle.

### 2.2- Objetivos específicos

- I. Selecionar SNPs em genes candidatos com importante participação na patogênese da dengue ou outras doenças infecciosas.
- II. Obter e comparar a distribuição das frequências genotípicas, alélicas, de carreadores e haplotípicas entre os casos e controles.
- III. Avaliar os efeitos funcionais dos SNPs associados ao desfecho da dengue

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.1- Estudo caso-control

##### 3.1.1- Desenho experimental - Estudo caso-control retrospectivo

Foi realizado um estudo do tipo caso-control retrospectivo pareado onde os casos são representados por crianças/adolescentes internados durante a epidemia de 2007/2008 com sintomas de dengue gravíssimo em quatro centros de excelência de atenção infantil no município do Rio de Janeiro, são eles: Instituto Fernandes Figueira- IFF/FIOCRUZ, Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira- IPPMG/UFRJ, Hospital Municipal Jesus e Prontobaby- Hospital da Criança.

O diagnóstico dos casos foi obtido através da revisão dos prontuários dos mesmos por médicos especialistas, usando como critérios os sintomas da síndrome do choque: reposição capilar lenta, pele fria e pegajosa, pressão sistólica abaixo de 80mmHg para menores de cinco anos de idade e abaixo de 90mmHg para maiores ou iguais a cinco anos de idade além de pulsação menor ou igual a 20mmHg. Pacientes transplantados, com neoplasias, com doenças autoimunes ou HIV positivos foram excluídos do estudo.

Não foi possível obter a confirmação do diagnóstico, por métodos laboratoriais, para todos os casos envolvidos no estudo. Mesmo assim 49 (56%) dos casos foram reativos no teste IgM para dengue. E todos foram reativos para IgG na mesma época (2010) em que o soro do controles foi submetido ao teste de quantificação. Os responsáveis legais dos casos e dos controles recrutados foram contatados dois anos após a epidemia (2010) e após aplicação de questionário e termo de consentimento o sangue foi coletado para estudos genéticos e sorológicos.

Para cada caso foram amostrados pelo menos quatro controles com idade próxima (3 anos para mais ou para menos) provenientes no entorno dos casos. Controles com alguma relação de parentesco entre si ou com os casos foram excluídos deste estudo. O histórico de infecção prévia por dengue entre os controles não foi considerada. No entanto, aqueles que haviam sido internados em UTI (unidade de tratamento intensivo) durante o período da

epidemia foram excluídos, a fim de se evitar casos graves de dengue entre o grupo controle. A taxa de soropositividade para dengue entre os controles, obtida através da quantificação de IgG dengue específico foi de 48%, sendo que 4% dos indivíduos permaneceram indeterminados.

Entre os casos, 45 indivíduos são do sexo feminino com média de idade igual a  $9,8 \pm 3,9$  anos e 43 são do sexo masculino  $10,2 \pm 3,62$ . Entre os controles 152 são do sexo feminino com média de idade igual a  $9,7 \pm 3,3$  e 183 são do sexo masculino com média de idade igual  $10,3 \pm 3,6$ .

Após os critérios de exclusão (relações de parentesco ou controles não elegíveis) permaneceram no estudo 88 casos e 335 controles. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética 37230.0.000.009-08 Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas /FIOCRUZ.

### 3.2- Seleção de SNPs

Foram genotipados SNPs em genes candidatos de citocinas/mediadores como tumor de necrose tumoral (TNF), fator de inibição de macrófagos (MIF) e interleucina 10 (IL-10). Além de SNPs em genes de receptores de reconhecimento padrão como MRC-1 (mannose receptor, C type 1), DC SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*), CLEC5A (*C-type lectin domain family 5, member A*) e o polimorfismo  $\Delta 32$  (deleção de 32 pares de base) no gene do receptor CCR5 (*chemokine (C-C motif) receptor 5*). Todos os polimorfismos genotipados, assim como sua identificação no dbSNP sua localização e troca alélica estão listados no quadro 1.

Os SNPs rs1800629 (-308G>A no promotor do gene *TNF*), rs1800871 (-819C>T no promotor do gene de *IL10*), rs755622 (-173G>C no promotor do gene *MIF*), rs4804803 (-336G>A no promotor do gene *DC-SIGN*), rs1926736 (396S na região codificante de *MRC1*), rs2066843 e rs751271 (no gene *NOD2*) já foram descritos na literatura em associações a suscetibilidade/proteção à dengue grave ou outras doenças infecciosas. Os SNPs no gene CLEC5A (rs1285933, rs13237944 e rs1285935) aqui estudados são resultado de uma busca de *tag SNPs* no *International Project Hap Map*, que foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: população CEU e YRI, *cut off* para  $R^2$  de 0,8 e *cut off* para menor frequência alélica de 0,05.

### 3.3- Extração do DNA

O sangue total de cada indivíduo foi coletado em tubos contendo EDTA. A extração do DNA genómico foi realizada pelo método de *salting out*. A princípio, as hemácias foram lisadas com tampão TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM e água Mili-Q *qsp*). Após lise das hemácias, as células brancas foram lisadas overnight à 37 °C com uma solução contendo tampão de lise (Tris.HCl 10 mM, NaCl 400 mM e EDTA 2 mM), SDS 10% e proteinase K (solução a 25 mg/mL). Após a incubação, os restos celulares assim como as proteínas foram precipitadas com uma solução de acetato de sódio saturada (aproximadamente 6,83 M) sendo o sobrenadante transferido para outro tubo ao qual foi acrescentado etanol absoluto (2 vezes o volume total) a fim de precipitar o DNA. O DNA precipitado foi posteriormente lavado com etanol 70%. E por fim diluído à 56°C por aproximadamente 3 horas em tampão TE (Tris.HCl 5 mM; EDTA 0,1 mM). Finalmente, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Nanodrop Technologies) e estocado à -20 °C até o uso.

### 3.4- Genotipagem por Discriminação Alélica

Todos os SNPs com exceção do polimorfismo  $\Delta 32$  no gene CCR5 foram genotipados pelo método de discriminação alélica por PCR em tempo real usando sistema *TaqMan* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em termocicladores ABI Prism 7000 Sequence Detection System ou Step One Plus Real time PCR System (Life Technologies) utilizando as condições padrões de ciclagem.

O volume final utilizado para a reação foi de 5 $\mu$ L sendo 3 $\mu$ L de mix contendo o respectivo ensaio 40X concentrado (primers e sondas) diluído para concentração final de 1X e *TaqMan* PCR Master Mix 1X juntamente com 2 $\mu$ L de DNA com concentração média de 50ng/ $\mu$ L. As amostras que não amplificaram tiveram a reação refeita em um volume final de 10  $\mu$ L.

### 3.5- Genotipagem do polimorfismo $\Delta 32$

O polimorfismo  $\Delta 32$  no gene CCR5, que consiste em uma deleção de 32 pares de bases, foi determinado a partir do tamanho do fragmento amplificado. Foram usados os seguintes primers: 5'-GGT CCT CAT ACA CCT GC-3' (sense) e 5'-AGG ATT CCC GAG TAG CAG ATG-3' (antisense) nas seguintes condições de ciclagem: 95°C por 3 min para desnaturação inicial seguidos de 35 ciclos a 95°C por 20 sec; 54°C por 20 sec e 72°C por 30 sec. Um ciclo final a 72°C por 3 min para extensão final foi incluído. Após a reação de PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 2%, preparado em tampão TBE 0,5 X (Tris-borato 0,045 M, EDTA 1 mM), e submetidas à eletroforese a 100 V utilizando o marcador de peso molecular de 123pb (Invitrogen). As bandas foram visualizadas em transluminador e fotografadas em sistema de fotodocumentação L-Pix Touch (Loccus Biotecnologia).

Quadro 3.1: Polimorfismos genotipados. Localização cromossômica e região gênica, troca alélica e identificação no dbSNP para todos os polimorfismos genotipados.

Gene/proteína	Cromossomo/Região	dbSNP	Troca de base
MIF	Chr:22/promotor	rs755622	G/A
TNF	Chr:6/promotor	rs1800629	G/A
IL-10	Chr:1/promotor	rs1800871	C/T
CLEC5A	Chr:7/ínton 4	rs13237944	C/A
	Chr7:/3' UTR	rs1285935	C/T
	Chr:7/3' <i>near gene</i>	rs1285933	C/T
DC-SIGN (CD209)	Chr 19:/promotor	rs4804803	G/A
MRC-1	Chr:10/éxon 7	rs1926736	G/A
CCR5	Chr:3/éxon 3	rs333	Deleção de 32 pb
NOD2	Chr:16/éxon4	rs2066843	C/T
	Chr:16/intron6	rs751271	A/G

### **3.6- População do estudo funcional**

A fim de fundamentar os resultados obtidos no estudo caso-controle, foi realizado um estudo funcional. Uma segunda população de crianças, independentes do estudo caso-controle, com diagnóstico de dengue confirmado por sorologia (IgM) admitidas no Hospital Municipal Jesus (HMJ), localizado no Rio de Janeiro durante a mesma epidemia de 2008, foram utilizados para essa análise funcional.

Cinquenta e um pacientes classificados por médicos e especialistas como casos brandos, graves ou choque e que tiveram seu sangue coletado no período de defervescência (fase crítica, entre os dias 5 e 7 da infecção) ou depois de 15 dias do início do aparecimento dos sintomas (fase de recuperação) foram utilizados para esse estudo. Depois de coletado, o soro foi estocado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até uso.

Dentre essas 51 crianças, 13 foram classificadas como casos brandos de dengue (6 do sexo masculino e 7 do sexo feminino com média de idade igual a  $8.3 \pm 2.6$ ); 20 foram classificadas como casos graves (7 do sexo masculino e 13 do sexo feminino com idade média de  $9.5 \pm 3.0$ ) e 5 foram classificados como choque (1 do sexo masculino e 4 do sexo feminino com idade média de  $11.7 \pm 1.1$ ). Os pacientes recuperados que foram usados como controle são representados por 9 indivíduos do sexo masculino e 4 do sexo feminino com idade média de  $8.4 \pm 3.0$ .

Devido ao pequeno número de pacientes com choque, estes foram agrupados com os casos graves.

### **3.7- Quantificação de TNF no soro de pacientes**

O TNF foi quantificado por multiplex Luminex, de acordo com instruções do fabricante (Milliplex, Millipore). Um “pool” de microesferas foram adicionadas em placas de 96 poços juntamente com as amostras. Estas foram incubadas overnight à  $4^{\circ}\text{C}$  sob agitação. No dia seguinte, a placa foi lavada a vácuo e foi adicionado um “pool” de anticorpos biotinizados para as citocinas. Após incubação por 90 minutos à temperatura ambiente e sob agitação foi adicionado estreptavidina-PE prosseguindo de incubação por 30 minutos nas mesmas condições. Uma solução STOP fornecida foi adicionada e a placa foi lavada à vácuo. Após ressuspensão das microesferas com tampão, foi realizada a leitura da

placa no aparelho Luminex® Instrumentation System. O cálculo das amostras foi processado pelo programa fornecido pelo aparelho.

### **3.8- Titulação de IgGs dengue específicas entre controles**

O soro de todos os controles envolvidos no estudo foram testados quanto a presença de imunoglobulinas IgG para dengue usando o kit ELISA IgG Panbio, de acordo com instruções do fabricante. Tal teste é utilizado para uma detecção qualitativa de anticorpos contra aos sorotipos 1, 2, 3 e 4 do vírus da dengue e apresenta uma sensibilidade de 96,3%. Valores de IR acima de 1 foram considerados como reativos.

### **3.9- Análises estatísticas**

#### **3.9.1- Estudo caso-controle**

As análises estatísticas referentes ao estudo caso-controle foram feitas no software R versão 2.11.1 utilizando os pacotes Genetics e haplo.stats (R Development Core Team, 2008). Primeiramente foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas que foram posteriormente testadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) através de teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Frequências de carreadores também foram calculadas para casos e controles.

Todas as frequências obtidas em casos e controles foram comparadas por regressão logística condicional devido ao pareamento por idade entre esses dois grupos. Assim foram obtidos os valores da medida de associação, odds ratio (OR) com 95 % de intervalo de confiança (IC). Foram obtidos valores de OR para modelos de regressão logística condicional com e sem ajuste para a co-variável sexo. O teste holm foi aplicado para correção de múltiplas comparações.

Para os genes CLEC5A e NOD2 foram calculados os valores de desequilíbrio de ligação entre os SNPs estudados através das medidas de  $D'$  e  $r^2$ . As frequências haplotípicas foram comparadas nos dois grupos por regressão logística.

Durante o desenho do estudo caso-controle foram realizados cálculos de tamanho amostral baseados no modelo mais simples da regressão logística, considerando um intervalo de confiança de 95%, 80% de poder, razão caso/controle de 1 para 4, frequência do menor alelo entre controles de 40%, uma OR igual a 2 seria detectável em uma amostra de 88 casos e 367 controles.

Devido ao resultado de reatividade (positivo ou negativo) para IgG dengue específico entre os controles; foram realizadas análises estatísticas alternativas, onde os casos, controles reativos e controles não reativos foram comparados entre si, obtendo-se valores de OR com 95% de IC para cada uma das comparações (controles reativos *versus* não reativos; casos *versus* controles reativos e casos *versus* controles não reativos).

### **3.9.2- Estudo Funcional**

As análises estatísticas do estudo funcional foram realizadas no Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). As medianas dos níveis de TNF foram comparadas entre os diferentes grupos (casos brandos, incluindo com e sem sinais de alerta, casos graves incluindo choque e pacientes na fase de recuperação que foram usados como controles). Foi utilizado em todos os casos o teste Kruskal Wallis e o pós teste Dunn's para múltiplas comparações.

### **3.10- Meta-análise**

Foi realizada uma meta-análise utilizando dados de trabalhos descrevendo associações entre o SNP -336 no receptor DC-SIGN e gravidade à dengue. A pesquisa bibliográfica foi realizada no MEDLINE usando citações do Pubmed. Para a realização da busca foram utilizadas combinações das seguintes palavras chaves: “DC-SIGN”, “polimorfismos”, “SNPs” e “dengue”. As referências dos trabalhos selecionados a partir da busca de palavras chave também foram revisadas. Foram incluídos na meta-análise, estudos com dados genéticos suficientes para obtenção dos valores de OR, assim como foram excluídos aqueles que não apresentavam grupos de estudos equivalentes, como controles saudáveis.

Para cada estudo foram obtidas as frequências e números de alelos. A partir do cálculo das frequências genotípicas esperadas foi utilizado o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para testar se os

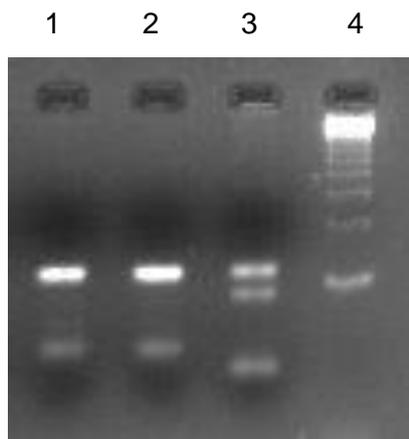
grupos controles provenientes dos diferentes estudos se encaixavam no EHW. Caso os trabalhos apresentassem frequências genóticas desviando do EHW seriam excluídos. Todas as análises foram feitas em relação ao alelo de menor frequência. Um teste equivalente ao *Egger's test* foi realizado para testar o viés de publicação. A heterogeneidade entre os estudos foi avaliada utilizando os testes Q de Cochran e  $I^2$ . Os valores de OR cumulativa com IC de 95% foram obtidos através dos métodos Mantel–Haenszel para modelos fixos, enquanto os métodos DerSimonian e Laird foram usados para os modelos aleatórios.

Foram realizadas análises para alelos, genótipos e carreadores. Adicionalmente foram realizadas análises omitindo os nossos resultados. Todas as análises foram realizadas no software R versão 2.11.1 utilizando os pacotes meta e metafor.

## 4-RESULTADOS

### 4.1-Genotipagem do polimorfismo $\Delta 32$ por tamanho do fragmento amplificado

A genotipagem para o polimorfismo  $\Delta 32$ , no gene CCR5 foi realizada por observação do tamanho do fragmento amplificado por PCR convencional. O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3% como descrito em material e métodos. Fragmentos com a deleção apresentam 105 pb, enquanto fragmentos sem a deleção possuem 137 pb (Figura 4.1). Nenhum dos indivíduos estudados apresentou genótipo homozigoto para a deleção. Do total de amostras, somente 10 não tiveram seu genótipo determinado para esse polimorfismo devido a problemas na amplificação.

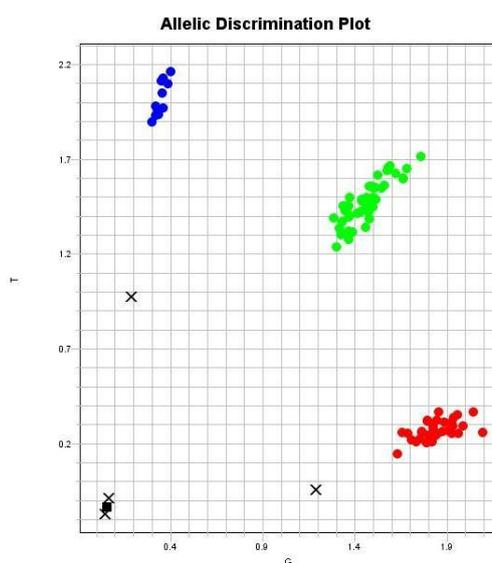


**Figura 4.1- Genótipos para o polimorfismo  $\Delta 32$ .** Gel de agarose 3% mostrando os genótipos encontrados para o polimorfismo delta 32 no gene CCR5. Faixas 1 e 2 genótipo homozigoto sem a deleção (delta 32 +/+); faixa 3, genótipo heterozigoto (delta 32 +/-); faixa 4, padrão de peso molecular de 123 pb.

### 4.2-Genotipagem por discriminação alélica

Os SNPs rs1800629 (-308G>A no promotor do gene de *TNF*), rs1800871 (-819C>T no promotor do gene de *IL10*), rs755622 (-173G>C no promotor do gene de *MIF*), rs4804803 (-336G>A no promotor do gene *DC-SIGN*), rs1926736 (396S na região codificante de *MRC1*), rs2066843 e rs751271 (localizados no éxon 4 e íntron 6, respectivamente, do gene

*NOD2*), assim como os três SNPs no gene *CLEC5A*: rs13237944, 1285933 e 1285935 foram genotipados por discriminação alélica a partir de PCR em tempo real, como descrito em material e métodos. O sucesso de amplificação e genotipagem foi superior a 98% para todos os SNPs. Na figura 4.2 podemos ver o exemplo de um de gráfico de amplificação para o SNP rs751271 no *NOD2*.



**Figura 4.2-** Discriminação alélica por PCR em tempo real para o SNP rs751271 no gene *NOD2*. Cada ponto representa uma amostra. A intensidade de fluorescência para cada sonda que carrega um fluoróforo diferente é definida em cada eixo. Em verde estão representados os heterozigotos TG. Em azul e vermelho, os homozigotos TT e GG, respectivamente. Em preto no canto inferior podemos ver o controle negativo juntamente com as amostras não discriminadas representadas por “x”.

### 4.3-Obtenção e comparação das frequências entre casos e controles

A variação nas frequências obtidas entre casos e controles foi avaliada através dos valores de “odds ratio” (OR). A razão de chances é uma das medidas de associação utilizada em estudos do tipo caso-controle. No presente estudo, considera-se a presença de determinado alelo como fator de exposição para desenvolvimento da forma grave de dengue. Se a exposição não estiver relacionada com a doença, a OR será igual a 1. Se a exposição estiver positivamente ou negativamente relacionada a doença, a OR será maior e menor do que 1, respectivamente. Devido ao pareamento das amostras, foi utilizada a regressão logística condicional em todos os casos, exceto para as análises haplotípicas.

Todos os controles apresentaram distribuição de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para todos os loci aqui estudados (Tabela 4.1).

Tabela 4.1- Teste do EHW na população de controles para os SNPs estudados.

<b>Polimorfismos</b>	<b><math>\chi^2</math> (p valor) para EHW</b>
rs1800629 (TNF-308)	0,06 (0,80)
rs1800871 (IL10-819)	0,00 (0,94)
rs755622 (MIF-173)	0,09 (0,75)
rs1926736 (MRC1)	0,81 (0,37)
rs4804803 (NOD2)	0,85 (0,35)
rs751271 (NOD2)	0,28 (0,59)
rs13237944 (CLEC5A)	0,00 (0,92)
rs1285933 (CLEC5A)	0,68 (0,40)
rs1285935 (CLEC5A)	0,00 (0,93)
rs333 ( $\Delta$ 32 CCR5)	1,10 (0,29)
rs4804803 (DC-SIGN-336)	0,65 (0,41)

Valores de  $\chi^2$  (p valor) para o teste do EHW entre os controles. Todos os SNPs mostraram distribuição de acordo com o esperado pela lei na população de controles.

#### 4.4-Polimorfismos no gene CLEC5A

Os três SNPs selecionados para esse gene são provenientes de uma busca de *Tag SNPs* no HapMap. Como pode ser visto na Figura 4.3, esses SNPs estão localizados em regiões não-codificantes do gene, estando presentes nas regiões 3' UTR (rs1285935), 3'near gene (rs1285933) e intrônica (rs13237944).

Na tabela 4.2, estão listadas todas as frequências obtidas para casos e controles, os valores de OR assim como o p valor para os três SNPs no CLEC5A. Foi encontrado um valor de OR significativo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) para o genótipo TT do SNP rs1285933 (OR=2,25,  $p=0,03$ ), além uma associação borderline para carreadores T (CT/TT) desse

mesmo SNP (OR= 1,90, p=0,06). Entretanto, p valor global para a análise genotípica desse SNP não foi significativo (p=0,09).

Não foram encontradas associações significativas para os SNPs rs1285935 e 13237944.



**Figura 4.3- Localização dos SNPs estudados no gene CLEC5A.** Barras em verde representam as regiões não traduzidas; barras em azul os éxons. O SNP rs1285933 está localizado na região 3' near gene; o SNP rs1285935 na região 3'UTR e o rs13237944 no íntron 4.

Tabela 4.2- Comparação de frequências entre casos e controles para os SNPs no gene CLEC5A.

SNP	Genótipo/ alelo	N <sup>a</sup> (frequências)		Regressão logística condicional	
		Casos	Controles	OR (95% CI)	p valor
CLEC5A intron (rs13237944)	CC	56(067)	209(0.63)	referência	
	CA	25(0.30)	109(0.33)	0,83 (0.48-1,45)	0.52
	AA	2(0.02)	13(0.04)	0.53 (0.11-2,50)	0.43
	Alelo C	137(0.83)	527(0.80)	referência	
	Alelo A	29(0.17)	135(0.21)	0.87 (0,54-1.42)	0.60
	Carreadores A	27(0.32)	122 (0.37)	0.80 (0.47-1.37)	0.42
CLEC5A 3' near gene (rs1285933)	CC	12 (0.14)	76 (0.23)	referência	
	CT	46 (0.53)	175 (0.53)	1.74 (0.85-3.55)	0.12
	TT	28 (0.33)	81 (0.24)	2.25 (1.07-4.87)	0.03*
	Alelo T	102 (0.59)	339 (0.51)	1.23 (0.85-1.80)	0.27
	Alelo C	70 (0.41)	327 (0.49)	referência	

	Carreadores T	74 (0.86)	256 (0.77)	1.90 (0.97-3.76)	0.06**
CLEC5A 3'UTR (rs1285935)	CC	64 (0.74)	252 (0.76)	referência	
	CT	21 (0.24)	75 (0.23)	1.06 (0.61-1.84)	0.81
	TT	2 (0.02)	6 (0.02)	1.25 (0.25-6.26)	0.78
	Alelo C	149 (0.86)	579 (0.87)	referência	
	Alelo T	25 (0.14)	87 (0.13)	1.06 (0.63-1.78)	0.81
	Carreadores T	23 (0.26)	81 (0.24)	1.08 (0.64-1.83)	0.74

Número total de casos e controles genotipados para cada SNP no gene CLEC5A pode variar devido a problemas na amplificação do DNA. Alelo ou genótipo de maior frequência foi utilizado como referência, exceto para o SNP rs1285933. Odds ratio (OR) com 95% de intervalo de confiança (CI) e p valor (\* p<0.05; \*\*p<0.10).

#### 4.5- SNPs nos genes TNF, MIF e IL-10, CCR5, MRC-1, NOD2 e DC-SIGN

As frequências para casos e controles dos SNPs rs1800629 (TNF), rs755622 (MIF), rs1800871 (IL-10), rs333 (CCR5), rs1926736 (MRC-1), rs4804803 (DC-SIGN), rs2066843 e rs751271 (NOD2) são mostradas na tabela 4.3.

Na nossa população foi encontrada uma associação de proteção estatisticamente significativa para o genótipo GG do SNP -336 (rs4804803) (OR=0,12; p=0,04; p global=0,01). Após o ajuste para múltiplas comparações, utilizando o teste Holm, obteve-se um p-valor global de 0,2.

Para os demais SNPs (nos genes TNF, IL-10, MIF, MRC-1, CCR5 e NOD2) não foram encontradas diferenças significativas na distribuição das frequências entre casos e controles (Tabela 4.3). Mesmo assim, com um olhar mais cuidadoso na distribuição de frequências nestes SNPs observamos que o SNP -819C>T no gene de IL-10 tem uma frequência de genótipo CC de 49% nos casos, enquanto que em controles apenas 40%.

Tabela 4.3- Comparação de frequências entre casos e controles para os SNPs presentes nos genes TNF, MIF, IL-10, CCR5, MRC1, NOD2 e DC-SIGN.

SNP	Genotipo/alelo	Nº (frequências)		Regressão Logística Condicional	
		Casos	Controles	OR (IC 95%)	p valor
rs1800629 (TNF-308)	GG	64 (0.78)	271 (0.80)	referência	
	GA	16 (0.20)	66 (0.19)	1.04 (0.55-1.98)	0.89
	AA	2 (0.02)	6 (0.02)	2.55 (0.42-15.46)	0.31
	Alelo A	20 (0.12)	73 (0.11)	1.09 (0.61-1.96)	0.76
	Alelo G	144 (0.88)	585 (0.89)	referência	
	Carreadores A	18 (0,22)	72 (0,21)	1.12(0.60-2.08)	0.72
rs755622 (MIF-173)	GG	43 (0.50)	168 (0.51)	referência	
	CG	34 (0.40)	134 (0.40)	1.01 (0.61-1.67)	0.96
	CC	9 (0.10)	30 (0.09)	1.12 (0.49-2.54)	0.79
	Alelo G	120 (0.70)	470 (0.71)	referência	
	Alelo C	52 (0.30)	194 (0.29)	1.02 (0.68-1.54)	0.92
	Carreadores C	43 (0.50)	164 (0.50)	1.03 (0.63-1.66)	0.90
rs1800871 (IL10-819)	TT	11 (0.13)	44 (0.14)	0,79 (0,37-1,64)	0,51
	CT	33 (0.38)	149 (0.46)	0,69 (0,40-1,17)	0,16
	CC	42 (0.49)	132 (0.40)	referência	
	Alelo T	55 (0.32)	237 (0.37)	0,85 (0,57-1,27)	0,43
	Alelo C	117 (0.68)	413 (0.64)	referência	
	Careadores T	44 (0.51)	193 (0.60)	0.70 (0.43-1.16)	0.17
rs333 (Δ 32 CCR5)	DD	82 (0.94)	313 (0.96)	referência	
	Dd	5 (0.03)	13 (0.04)	1.44 (0.46-4.07)	0.62
	Alelo D	169 (0.97)	639 (0.98)	Referência	
	Alelo d	5 (0.03)	13 (0.02)	1.24 (0.40-3.85)	0.70
	Carreadores d	5 (0.06)	13 (0.04)	1.32 (0.43-4.07)	0.53
rs1926736 (MRC1)	GG	48 (0.56)	182 (0.56)	Referência	
	GA	32 (0.37)	119 (0.37)	1.0 (0.61-1.66)	0.99
	AA	6 (0.07)	26 (0.08)	0.83 (0.33-2.14)	0.70
	Alelo G	128 (0.74)	483 (0.74)	Referência	
	Alelo A	44 (0.26)	171 (0.26)	0.97 (0.63-1.48)	0.90
	Carreadores A	38 (0.44)	145(0.45)	0.97 (0.60-1.56)	0.91
rs2066843 (NOD2)	CC	57 (0.65)	231 (0.69)	Referência	
	TC	26 (0.30)	90 (0.27)	1.21 (0.71-2.06)	0.48

	TT	5 (0.06)	13 (0.04)	1.39 (0.47-4.13)	0.55
	Alelo T	36 (0.2)	116 (0.17)	1.16 (0.73-1.85)	0.52
	Alelo C	140 (0.8)	552 (0.83)	Referência	
	carreadores T	31(0.36)	103 (0.30)	1,23 (0,74-2,05)	0.41
rs751271 (NOD2)	GG	35 (0.40)	112 (0.34)	Referência	
	TG	43 (0.49)	163 (0.49)	0.83 (0.50-1.38)	0.48
	TT	10 (0.11)	59 (0,18)	0.55 (0.25-1.19)	0.13
	Alelo T	63 (0.36)	281 (0.42)	0.83 (0.57-1.22)	0.36
	Allele G	113 (0.64)	387 (0.58)	Referência	
	Carreadores G	78 (0.89)	275 (0.82)	1,61 (0,8-3,29)	0.18
rs4804803 (DC-SIGN - 336)	GG	1 (0,01)	28 (0,09)	0,12 (0,01-0,9)	0,04*
	GA	33 (0,39)	122 (0,38)	0,90 (0,55-1,47)	0,68
	AA	51 (0,60)	172 (0,54)	referência	
	Alelo G	35 (0,21)	178 (0,28)	0,81(0,53-1,26)	0,35
	Alelo A	135 (0,8)	466 (0,72)	referência	
	Carreadores G	34 (0,40)	150 (0,47)	0,76(0,47-1,22)	0,25

Número total de casos e controles genotipados para cada SNP no gene DCSIGN pode variar devido a problemas na amplificação do DNA. Em todos os casos foi usado como referência o alelo ou genótipo de maior frequência. Odds ratio (OR) com 95% de intervalo de confiança (CI) e p valor (\* p<0.05; \*\*p<0.10).

#### 4.6-Análises haplotípicas para SNPs nos genes CLEC5A e NOD2

Os valores de desequilíbrio de ligação (LD) para os SNPs nos genes CLEC5A e NOD2 foram obtidos através do cálculo de  $r^2$  (Figuras 4.4 A e B). Esses valores foram baixos, indicando que os mesmos provavelmente não estão em desequilíbrio de ligação sugerindo diferentes *bins*. Assim, foram realizadas análises haplotípicas com o arranjo dos SNPs pertencentes aos diferentes *bins*. Na tabela 4.4 estão listadas as frequências para casos e controles dos possíveis haplótipos para os SNPs estudados nos genes CLEC5A e NOD2.

Como pode ser visto, foi encontrada uma associação de proteção, significativa para o haplótipo contendo o alelo C para os três SNPs (C/C/C) no gene CLEC5A (OR=0,54; p=0,03). Esse resultado é complementar ao que foi observado anteriormente (Tabela 2) de que o genótipo TT do SNP rs1285933 estaria associado ao risco de desenvolvimento de dengue grave.

Não foram encontradas associações significativas para os haplótipos no gene NOD2.

**A** **CLEC5A**

	rs1285933	rs1285935
rs13237944	0,21	0,38
rs1285933		0,15

**B** **NOD2**

rs2066843	rs2066843
rs751271	0,13

**Figura 4.4- Valores de  $r^2$  para SNPs nos genes CLEC5A e NOD2.** O desequilíbrio de ligação entre os SNPs nos genes CLEC5A e NOD2 foram estimados a partir dos valores de  $r^2$  obtidos para cada par de SNPs

Tabela 4.4-Comparação de frequências haplotípicas entre casos e controles para os SNPs nos genes CLEC5A e NOD2.

Haplótipos CLEC5A				
rs13237944/rs1285933/rs1285935	casos	controles	OR (IC 95%)	p valor
A/C/C	0,16	0,19	0,71 (0,44-1,17)	0,18
C/C/C	0,10	0,17	0,54 (0,30-0,97)	0,03*
C/C/T	0,14	0,13	0,97 (0,58-1,61)	0,90
C/T/C	0,59	0,50	Referência	
Haplótipos NOD2				
rs2066843/rs751271	casos	controles	OR (IC 95%)	p valor
C/G	0,44	0,41	Referência	
C/T	0,36	0,41	0,80 (0,55-1,16)	0,25
T/G	0,20	0,17	1,14 (0,73-1,77)	0,56

Haplótipos com maior frequência foram usados como referência e aqueles com frequência inferior a 0,05 foram excluídos da análise. Odds ratio (OR) com 95% de intervalo de confiança (CI) e p valor (\*  $p < 0,05$ )

#### 4.7-Comparação das frequências dos SNPs entre casos e controles de acordo com presença de IgG específico para dengue.

Devido ao resultado da quantificação de imunoglobulinas IgG específicas para dengue, entre os controles, que mostrou reatividade de 48% entre os mesmos; foram realizadas novas comparações entre as frequências dos SNPs dos casos com os controles estratificados de acordo com a reatividade ao IgG: controles não reativos e controles reativos.

Como pode ser visto na tabela 4.5, para o SNP rs1285933/ CLEC5A, quando os casos foram comparados somente com os controles reativos para IgG, obtivemos um valor de OR igual a 2,03. Apesar desse valor continuar alto e próximo da OR obtida anteriormente, que foi igual a 2,24 esta não foi significativa estatisticamente. Adicionalmente, quando os casos foram comparados aos controles não reativos para IgG, observa-se uma diferença significativa da frequência do genótipo TT (OR=3,07, p valor= 0,03) entre os dois grupos.

Em relação genótipo GG do SNP rs4804803/-336 DC-SIGN, quando os casos foram comparados somente com os controles reativos, o valor de OR sofreu uma pequena modificação passando de 0,12 para 0,14. No entanto, o p valor passou a ser borderline (OR=0,14; p=0,06). Não foi observada diferença significativa entre a OR dos casos com os controles não reativos para esse SNP. Para os demais SNPs, presentes nos outros genes, não foram observadas diferenças nas significâncias dos valores de OR antes e depois das análises de acordo com a presença de IgG dengue específico entre os controles (dados não mostrados).

Tabela 4.5- Valores de OR para comparação de frequências dos SNPs rs1285933 no gene de CLEC5A e -336A/G no gene de DC-SIGN de acordo com a reatividade de IgG dengue específico entre controles.

SNP	OR (p valor)		
	Controles reativos vs não reativos	Controles não reativos vs casos	Controles reativos vs casos
CLEC5A /rs1285933			
CC		Referência	
CT	1,54 (0,28)	1,73 (0,28)	1,60 (0,25)
TT	1,93 (0,17)	3,07 (0,03*)	2,03 (0,12)
Alelo C		Referência	
Alelo T	1,20 (0,45)	1,38 (0,20)	1,18 (0,43)

Carreadores T	0,65 (0,19)	2,23 (0,09**)	1,69 (0,19)
rs4804803/-336DC-SIGN			
GG	0,62 (0,18)	0,22 (0,18)	0,14 (0,06**)
GA	1,57 (0,45)	0,96(0,91)	0,96(0,88)
AA		Referência	
Alelo G	0,93 (0,80)	0,90 (0,75)	0,78(0,46)
Alelo A		Referência	
Carreadores G	0,76 (0,4)	0,86 (0,66)	0,82 (0,46)

Odds ratio (OR) e p valor (\* p<0.05; \*\*p<0.10).

#### 4.8- Meta-análise dos estudos de associação ente o SNP -336 A/G no gene de DC-SIGN (rs4804803) e formas graves de dengue

Devido à associação de proteção encontrada no presente estudo, para o SNP -336 (rs4804803) promotor do gene *DC-SIGN* foi realizada uma meta-análise de nossos resultados juntamente com dados obtidos de outros artigos. Ao todo foram encontrados no Pubmed três artigos sobre estudos de associações (com ou sem significância estatística) entre esse SNP e gravidade a dengue (Sakuntabhai et al., 2005; Wang et al., 2011; Silva et al., 2010). Entretanto, um dos artigos (Silva et al., 2010) foi excluído por não possuir dados genéticos suficientes para a reanálise.

Nos estudos remanescentes, foram selecionados somente os casos de FHD, que foram comparadas aos nosso grupo de casos, além dos grupos controle representados por indivíduos saudáveis (independente da história de infecção por dengue). No estudo de Sakuntabhai e cols. (2005) as três coortes estudadas foram analisadas separadamente. Na tabela 4.6 estão listadas as frequências alélicas, genotípicas e de carreadores em relação ao alelo de menor frequência para o SNP -336 DC SIGN para cada estudo envolvido na meta-análise.

Tabela 4.6- Frequências para o SNP -336 DC-SIGN dos estudos envolvidos na meta- análise.

	-336 DC-SIGN	Sakuntabhai (2005) Coorte RA	Sakuntabhai (2005) Coorte SI	Sakuntabhai (2005) Coorte KK	Wang (2011)	nossos resultados
casos	GG	4 (0,02)	0 (0)	0 (0)	2 (0,01)	1(0,01)
	GA	38 (0,21)	43 (0,26)	16 (0,15)	29 (0,22)	33 (0,39)
	AA	140 (0,77)	124 (0,74)	87 (0,84)	104 (0,77)	51 (0,60)
	Total	182	167	103	135	85
	Alelo A	318 (0,87)	291 (0,87)	190 (0,92)	238 (0,88)	135 (0,79)
	Alelo G	46 (0,13)	43 (0,13)	16 (0,08)	33 (0,12)	35 (0,21)
	Carr G	42 (0,23)	43 (0,26)	16 (0,15)	31(0,23)	34 (0,40)
controles	GG	5 (0,02)	1 (0)	3 0,02)	0 (0)	28 (0,09)
	GA	51 (0,17)	44 (0,21)	31 (0,17)	9 (0,07)	122 (0,38)
	AA	240 (0,81)	169 (0,79)	149 (0,81)	111 (0,93)	172 (0,53)
	Total	296	214	183	120	322
	Alelo A	531 (0,90)	0,90 (0,89)	329 (0,90)	230 (0,96)	466 (0,72)
	Alelo G	61 (0,10)	46 (0,11)	37 (0,10)	9 (0,04)	178 (0,28)
	Carr G	56 (0,19)	45 (0,21)	34 0,18)	9 (0,07)	150 (0,46)

Números e frequências genótípicas, alélicas e de carreadores em relação ao alelo de menor frequência. Os casos dos trabalhos de Sakuntabhai et al.(2005) e Wang et al. (2011) são representados por pacientes com FHD e foram comparados aos nossos casos. Todos os controles são representados por indivíduos saudáveis, independente do histórico de dengue.

Todos os grupos controles apresentaram distribuição de frequências genótípicas como esperado pelo EHW (Tabela 4.7). Além disso, todas as categorias testadas (alelos, genótipos e carreadores) não apresentaram p-valor significativo para o teste equivalente ao *Egger's teste* para *funnel plot symmetry*, que avalia possíveis vieses de publicação (Tabela 4.8). Nesse teste, a hipótese alternativa é a presença de assimetria no gráfico condizente com a presença de viés.

A análise de alelos e carreadores mostraram significativa heterogeneidade entre os estudos como indicado pelo teste Q Enquanto isso, para a análise de genótipos não foi observado significativa heterogeneidade entre os mesmos (Tabela 4.8). A heterogeneidade também foi avaliada através do teste  $I^2$ . Quanto mais alto for o valor de  $I^2$ , maior será a heterogeneidade entre os estudos (Tabela 4.8)

Tabela 4.7-Valores do teste qui quadrado ( $\chi^2$ ) para o EHW nas populações de controles

Referências	Qui quadrado (p valor)
Sakuntabhai (2005) Coorte RA	1,36 (0,24)
Sakuntabhai (2005) Coorte SI	1,10 (0,29)
Sakuntabhai (2005) Coorte KK	0,84 (0,17)
Wang (2011)	0,19 (0,66)

Tabela 4.8-Valores *Egger's test* modificado para as categorias de alelos, genótipos e carreadores

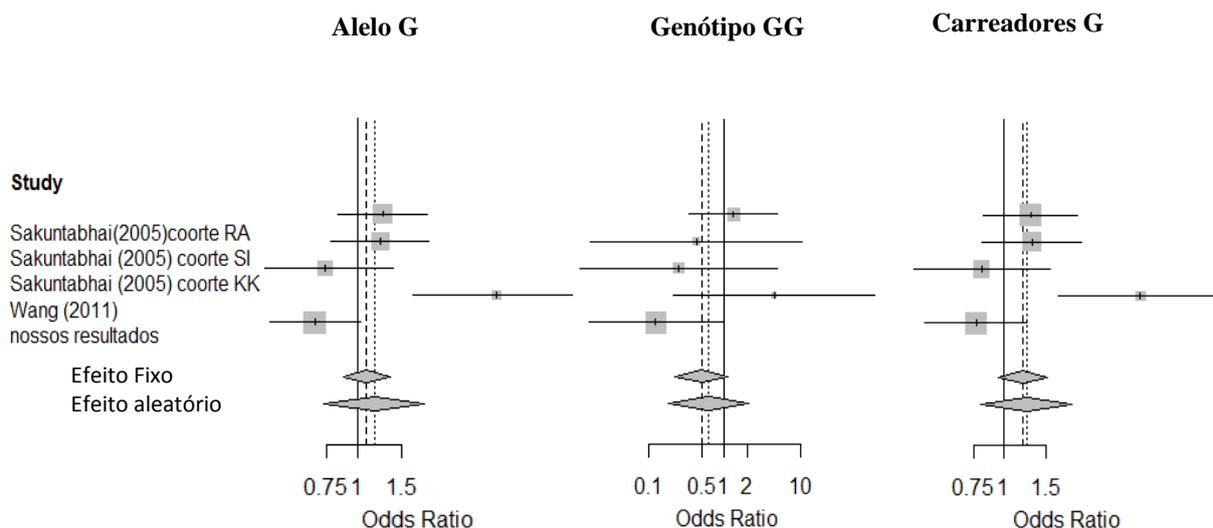
	Egger teste modificado(p valor)	Q (p valor)	I <sup>2</sup> %
Alelos G	1,07 (0,36)	16,6 (0,0023)	76
Genótipos GG	-0,38 (0,73)	6,06 (0,19)	34
Carreadores G	0,97 (0,40)	12,7 (0,013)	68,4

A contagem total de alelos, genótipos e carreadores, assim como os valores de OR cumulativa, os intervalos de confiança e o p valor são mostrados na tabela 4.9, tanto para o efeito fixo quanto para o efeito aleatório. Como pode ser visto, o p-valor foi maior que 0,05 para todas as ORs em ambos os efeitos. Somente na análise genotípica, foi observada uma maior diferença entre a significância das ORs obtidas pelos modelos fixo e aleatórios (OR=0,5; p=0,09 e OR=0,61; p=0,43), respectivamente.

Na figura 4.5 podemos ver a representação gráfica da meta-análise, mostrando os valores das ORs de cada um dos estudos, para o alelo G, genótipos GG e carreadores G (GG/GA) para os modelos de efeito fixo e aleatório.

Tabela 4.9- Meta-análise do SNP -336 DC-SIGN (rs4804803)

	Meta-análise/ efeito fixo					Meta-análise/ efeito aleatório		
	Casos	controles	OR	95% CI	p valor	OR	95% CI	p valor
Alelo G	173	331	1,08	[0,88; 1,34]	0,43	1,16	[0,74; 1,83]	0,51
GenótipoGG	7	37	0,50	[0,22; 1,11]	0,09	0,61	[0,18; 2,07]	0,43
Carreadores G	166	294	1,19	[0,95; 1,51]	0,13	1,24	[0,80; 1,92]	0,33



**Figura 4.5- Meta-análise de três estudos de associação do SNP -336 DC-SGN e gravidade a dengue.** A Meta-análise foi feita com modelos de efeito fixo e aleatório. Barras representam 95% CI. O tamanho de cada quadrado indica o peso do estudo na OR final.

Posteriormente, foram realizadas análises alternativas sem os nossos dados. Os valores dos testes de viés de publicação (*Egger's test* modificado) assim como dos testes de heterogeneidade (teste Q e  $I^2$ ) para essas novas análises podem ser vistos na tabela 4.10.

A partir dessas análises foram observadas grandes diferenças nos valores de OR, principalmente para as análises de alelos e carreadores utilizando modelos de efeito fixo, nesses casos as ORs obtidas foram (OR=1,30; p=0,03) e (OR=1,37; p=0,02), para o alelo G e carreadores G, respectivamente. Apesar dos valores de OR obtidas pelo modelo de efeito aleatório não terem apresentado significância estatística estas também foram maiores do que 1 (tabela 4.11 e figura 4.6).

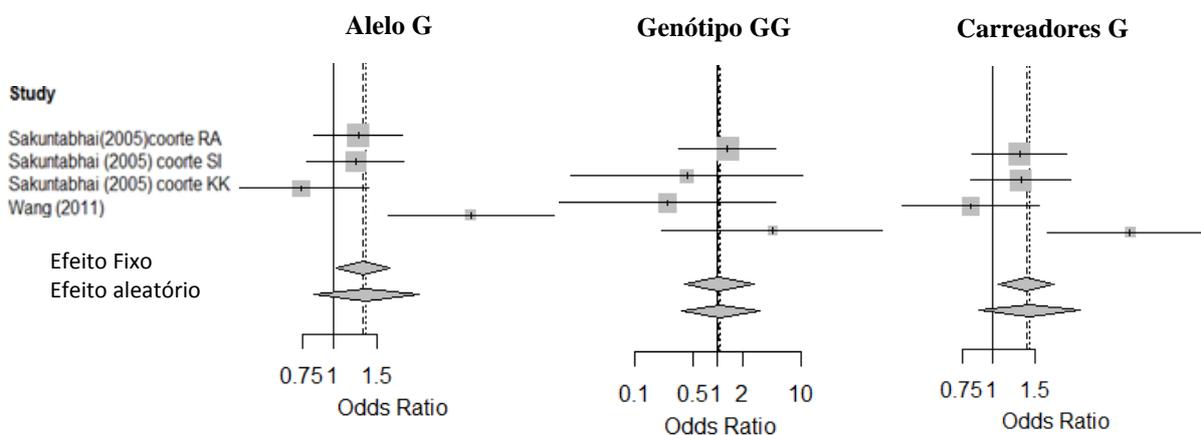
Por outro lado, as análises genóticas sem os nossos dados, não apresentaram ORs estatisticamente significativas para ambos os modelos, embora esses valores também tenham sido direcionados ao risco (tabela 4.11 e figura 4.6).

Tabela 4.10-Valores *Egger's test* modificado e heterogeneidade (teste Q e I<sup>2</sup>) para as categorias de alelos, genótipos e carreadores

	Egger teste modificado(p valor)	Q (p valor)	I <sup>2</sup> %
Alelos G	0,67 (0,58)	9,92 (0,02)	69,8
Genótipos GG	0,45 (0,69)	2,19 (0,53)	0
Carreadores G	0,73 (0,54)	8,7 (0,03)	65,5

Tabela 4.11- Meta-análise do SNP -336 A/G no gene de DC-SIGN (rs4804803) sem os nossos dados

	Meta-análise/ efeito fixo					Meta-análise/ efeito aleatório		
	casos	controles	OR	95% CI	p valor	OR	95% CI	p valor
Alelo G	173	303	1,30	[1,02; 1,67]	0,03	1,35	[0,83; 2,20]	0,22
GenótipoGG	6	9	1,04	[0,40; 2,72]	0,93	1,08	[0,37; 3,14]	0,88
Carreadores G	131	116	1,37	[1,05; 1,80]	0,02	1,41	[0,87; 2,30]	0,16



**Figura 4.6- Meta-análise de estudos de associação do SNP -336 DC-SIGN e gravidade a dengue.** A meta-análise foi feita com modelos de efeito fixo e aleatório excluindo nossos dados. Barras representam 95% CI. O tamanho de cada quadrado indica o peso do estudo na OR final.

#### **4.9- Estudos Funcionais**

Como foi visto por outros autores, a interação do vírus Dengue com o receptor CLEC5A resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias dentre elas, o TNF, o que pode contribuir muito para o agravamento da dengue. Devido a essas evidências, nós analisamos a produção de TNF de acordo com genótipos do SNP rs1285033/ CLEC5A. Adicionalmente a produção de TNF também foi avaliada de acordo com o SNP -336 DC-SIGN (rs4804803)

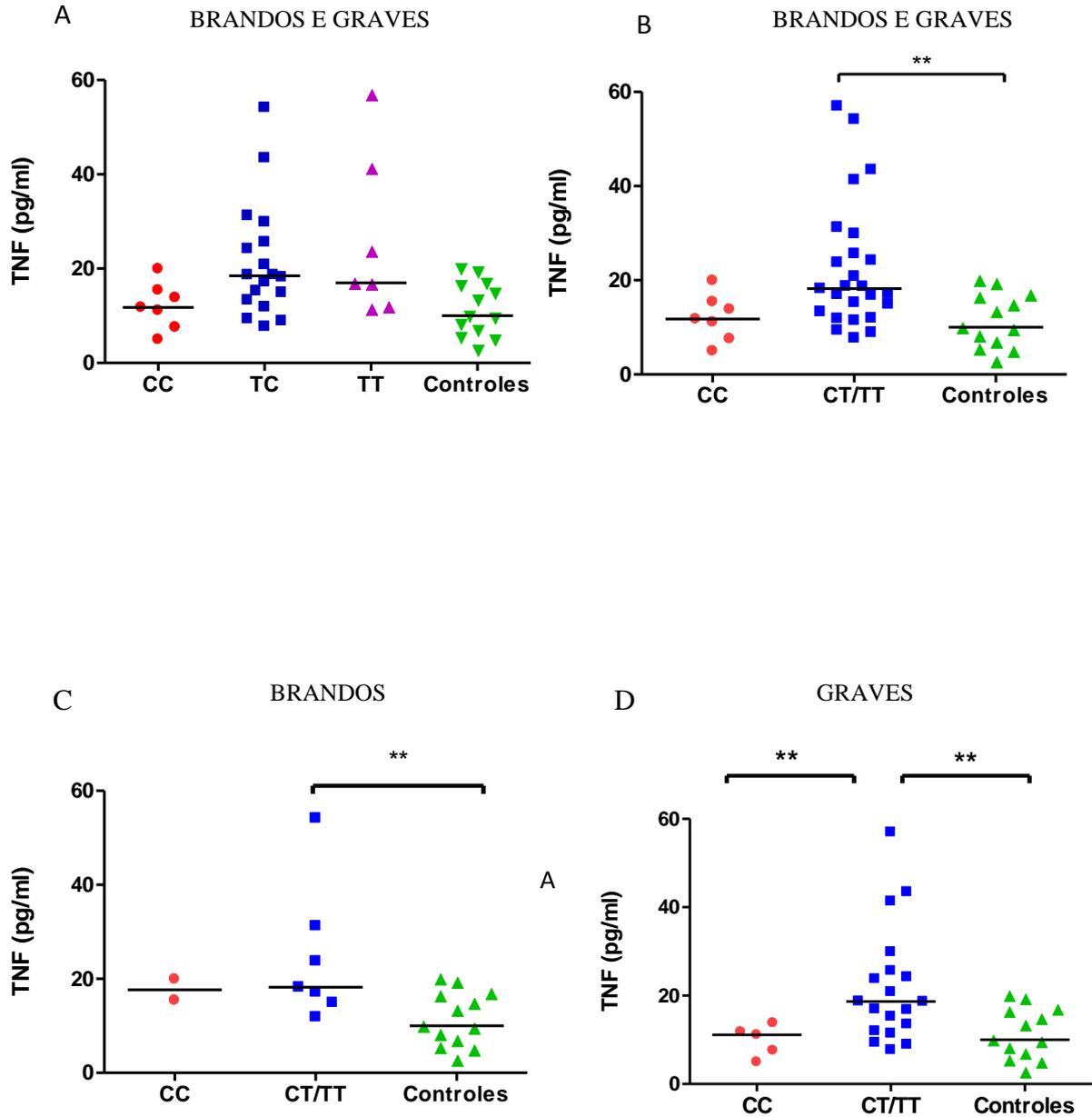
Uma segunda população, composta por 51 pacientes, também crianças, com diagnóstico confirmado de dengue e que tiveram o soro coletado entre os dias 5 e 7 da infecção ou durante a fase de recuperação (15 dias após os sintomas) foi selecionada para o estudo funcional. Devido ao pequeno número amostral após a estratificação por dia (5,6 ou 7) esses pacientes foram todos agrupados sem repetição do mesmo indivíduo em dias diferentes. O período entre os dias 5 e 7 da infecção corresponde ao período de defervescência, considerado como a fase crítica da dengue, onde é consideravelmente maior a ocorrência de choque.

#### **4.10-Genótipos do SNP rs1285933/ CLEC5A e produção de TNF em pacientes com dengue.**

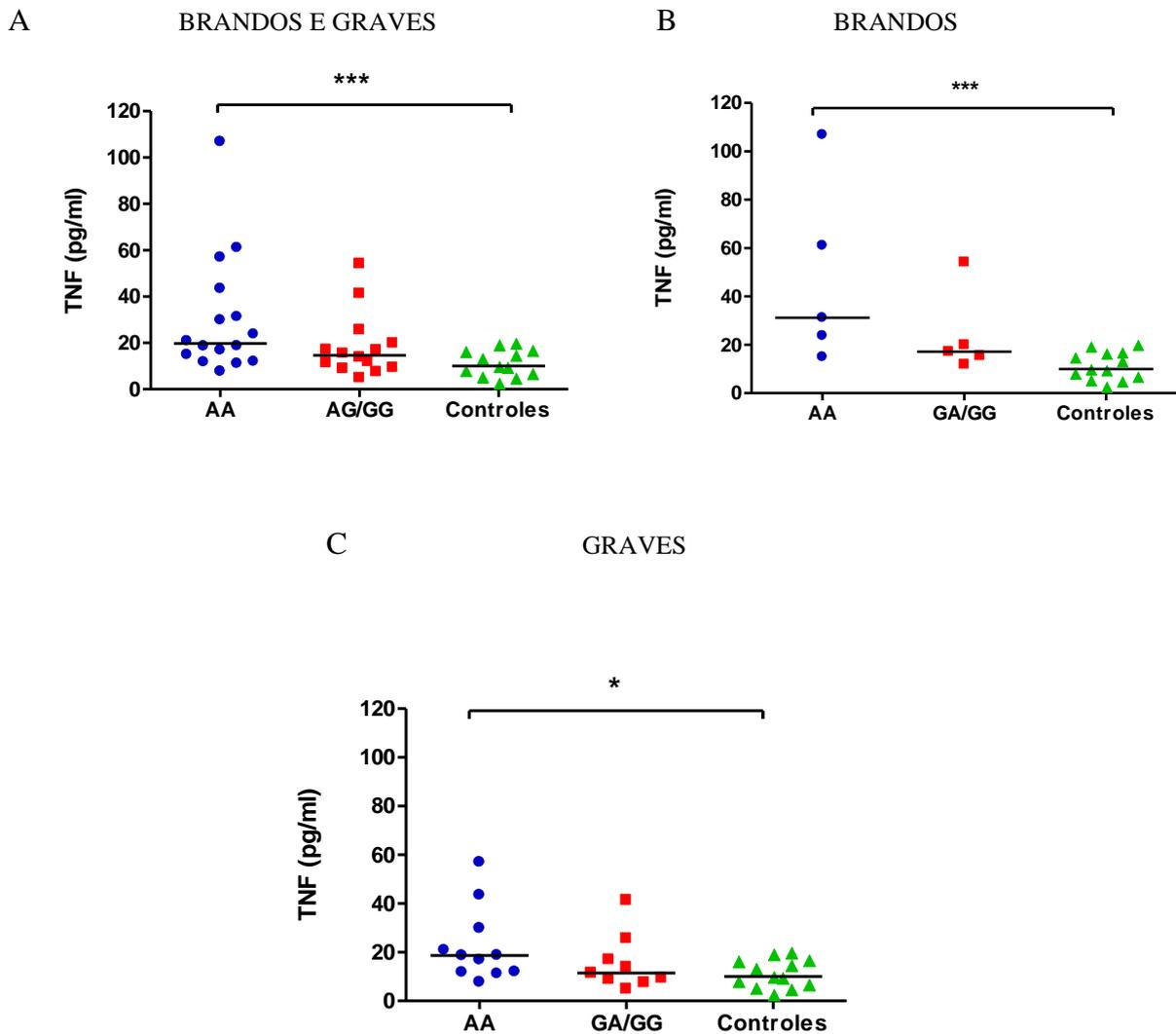
Quando as medianas dos níveis de TNF foram comparadas nos pacientes, independente da forma clínica da dengue (brandos e graves), apesar de ser observado um aumento de TNF a partir de indivíduos CC em direção a indivíduos TT, esse aumento não foi significativo (Figura 4.7 A). Entretanto, quando essa mesma análise foi realizada levando em consideração carreadores T (CT/TT) podemos observar um significativo ( $p < 0,05$ ) aumento nos níveis de TNF nesse grupo em relação aos controles (Figura 4.7 B).

Posteriormente, quando os níveis de TNF foram comparados somente entre os casos brandos, nenhuma diferença foi observada entre indivíduos CC vs CT/TT, mesmo assim indivíduos CT/TT produziram significativamente mais TNF ( $p < 0,05$ ) do que controles (Figura 4.7 C). Adicionalmente, quando somente os casos graves foram comparados, podemos observar que indivíduos carreadores T (CT/TT) produziram significativamente mais TNF do que indivíduos CC e controles (figura 4.7 D). Curiosamente, quando essa mesma

análise foi realizada levando-se em consideração os três genótipos separadamente, nenhuma diferença significativa foi observada em relação aos níveis de TNF (Figura 4.7 E)







**Figura 4.8- Níveis circulantes de TNF no soro de pacientes com dengue de acordo com o SNP rs4804803 no gene DC-SIGN.** TNF foi quantificado entre os dias 5 e 7 da infecção (fase de defervescência e período crítico), pacientes que tiveram o soro coletado 15 dias após o aparecimento dos sintomas (fase de recuperação) foram utilizados como controles. Mediana dos níveis de TNF foram comparadas em indivíduos: A) independente da forma clínica da dengue. B) Somente nos casos brandos C) somente nos casos graves. \*\*\*  $P < 0.01$ , \*\*  $p < 0,05$  e  $p < 0,10$  obtido por Kruskal-Wallis teste e correção de Dunn para múltiplas comparações;

## 5- DISCUSSÃO

---

Apesar das evidências de que a resposta imune secundária a sucessivas infecções por sorotipos heterólogos do vírus Dengue possa ser a principal causa para o agravamento da infecção, outros fatores como as características da cepa viral infectante e as características genéticas do hospedeiro também parecem ser importantes para o curso e desfecho da doença. Nesse trabalho, são apresentados resultados que apóiam a hipótese da participação da constituição genética dos indivíduos no desenvolvimento de formas graves de dengue.

No presente estudo, dois SNPs localizados em genes de importantes receptores virais envolvidos na infecção e patogênese da dengue foram associados ao risco e proteção a dengue grave. Um deles é o SNP rs1285933, presente na região 3' "near gene" do receptor CLEC5A. O outro é o SNP rs4804803, localizado no promotor do gene do receptor DC-SIGN. Tais associações foram encontradas a partir de um estudo caso-controle composto por 88 crianças 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 (Teixeira et al., 2009b; Honorio et al., 2009).

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 estritamente 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.

Sabe-se que a maioria dos casos graves de dengue em infecções primárias ocorre em crianças com menos de um ano de idade. A principal explicação para esse fenômeno é a transferência de anticorpos maternos para o filho. Adicionalmente, sabe-se que crianças dentro dessa faixa etária tem menor capacidade de compensar a hipovolemia, o que facilita o aparecimento de outras complicações (Hung et al., 2004).

Entretanto, diferentemente das epidemias asiáticas, no Brasil o número de casos de FHD sempre foram baixos comparados aos casos de FD. Além disso, somente a partir da epidemia de 2007/2008 observou-se um considerável aumento no número de crianças/adolescentes com dengue grave. Durante essa epidemia, mais da metade dos casos de FHD ocorreram em crianças de até 15 anos de idade (Teixeira et al., 2009b; Barreto and

Teixeira, 2008; Halstead, 2006). Os afro-descendentes possuem maior resistência a FHD (Gubler et al., 1986; Halstead et al., 2001; Saluzzo et al., 1986) e sabendo da grande miscigenação da população brasileira com componente africano relevante, poder-se-ia sugerir esse fato como explicação para o diferente perfil epidemiológico em relação as epidemias ocorridas no continente asiático.

Durante as epidemias ocorridas na década de 90 predominaram no Brasil os sorotipos 1 e 2 do vírus da dengue. Com a reintrodução do DENV-3 em 2000-2001 houve uma substituição do sorotipo predominante assim como o perfil de indivíduos suscetíveis. Este fato ocorreu novamente na epidemia de 2007, em que houve predomínio do DENV-2 tornando a população jovem mais suscetível a esse sorotipo, uma vez que indivíduos mais velhos provavelmente possuem anticorpos contra estes sorotipos. Esse evento, também pode explicar o crescente número de pacientes mais jovens com dengue na epidemia de 2007/2008 (Teixeira et al., 2009b).

Já foi observado que o receptor CLEC5A, também conhecido como MDL-1, está relacionado à patogênese da dengue induzindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios. Experimentos *in vitro*, mostraram que o silenciamento de CLEC5A inibe a produção de mediadores como TNF, IL-8, proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 $\alpha$ ) e proteína induzível por interferon (IP-10) (Chen et al., 2008). Adicionalmente, experimentos com camundongos suscetíveis infectados com vírus Dengue mostraram que quando estes são tratados com anticorpos que inibem a ligação do vírus a CLEC5A ocorre uma redução do extravasamento plasmático e da mortalidade, além de ocorrer diminuição dos níveis séricos de TNF e IP-10 sem, no entanto, ocorrer supressão da replicação viral (Chen et al., 2008; Martin et al., 2004).

Outros trabalhos mostraram que lesões teciduais induzidas no fígado de camundongos estão associadas com o acúmulo de células MDL<sup>+</sup> e que a ativação dessas células por agonistas como o vírus Dengue pode resultar em uma resposta inflamatória sistêmica e progredir para o choque e morte (Cheung et al., 2011; Ward, 2011). A indução da inflamação por ativação de CLEC5A também parece ter uma participação na artrite autoimune; foi observado que a ativação de MDL-1 induz o recrutamento de macrófagos e neutrófilos para as articulações promovendo a erosão de ossos durante a inflamação articular auto-imune (Joyce-Shaikh et al., 2010). Todos esses achados/dados mostram que CLEC5A tem uma participação ativa na indução da inflamação.

O SNP rs1285933, que está presente em uma região proximal do gene CLEC5A (near gene) é resultante da troca de uma citocina (C) por uma timina (T). Neste estudo, encontramos numa amostra de pacientes, da população do Rio de Janeiro, uma associação significativa do genótipo TT a casos graves de dengue, uma associação borderline para carreadores dos genótipos CT/TT, além de uma associação significativa de proteção para carreadores do haplótipo contendo o alelo C para os três SNPs estudados nesse gene.

A associação de proteção encontrada para o haplótipo contendo o alelo C para o SNP rs1285933 é complementar ao resultado que mostra uma associação do genótipo TT ao risco de desenvolvimento de dengue grave. Apesar de nenhuma associação significativa ter sido encontrada para o alelo T desse mesmo SNP, se ao invés do genótipo CC, o TT tivesse sido usado como referência nas análises estatísticas, o primeiro teria mostrado uma associação significativa com uma OR de proteção. No entanto, nós optamos por mostrar o genótipo TT associado ao risco de dengue grave.

O SNP rs1285933 está localizado em uma região “near gene”, dessa forma é mais difícil inferir a sua consequência funcional. Entretanto, sabe-se que a regulação da expressão de genes eucarióticos é controlada tanto por “elementos” proximais ou presentes a longas distâncias da região promotora, esses elementos podem ser definidos como regiões presentes no DNA que podem aumentar ou diminuir consideravelmente as taxas de transcrição gênica (Dyner, 1989). Como o genótipo TT foi associado à gravidade da dengue, provavelmente o alelo que contém a base timina pode de alguma forma ser responsável por um aumento nas taxas de expressão do receptor CLEC5A aumentando a ligação de vírus e consequentemente induzindo uma maior liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Outra possibilidade é que esse SNP esteja em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo que seja o real responsável por uma possível modificação nas taxas de expressão do gene, por isso, o ideal seria realizar o sequenciamento de todo o gene CLEC5A a fim de detectar com precisão todos os polimorfismos, que eventualmente estejam em LD com o SNP rs1285933.

Mais recentemente foi descrito que o vírus da encefalite japonesa também pode se ligar a CLEC5A e induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Chen et al., 2012). Ainda é muito reduzido o número de estudos de associação entre doenças e polimorfismos no CLEC5A. Yan & cols (2012) não encontraram associações entre os SNPs rs1285933 e rs1285935 e uma doença que causa vasculite sistêmica (Kawasaki disease). Tsai & cols.

(2012) estudaram a associação de 21 SNPs ao longo de todo o gene CLEC5A, entre eles o SNP rs1285933. No entanto, nenhuma associação significativa foi encontrada para esses SNPs. Nesse trabalho foram utilizados 49 pacientes com FD com média de idade de 54 anos e 51 pacientes com FHD com média de idade de 53 anos, como pode ser visto além da faixa etária e dos grupos de comparação serem diferentes dos utilizados no presente estudo. O tamanho amostral é muito baixo, o que pode talvez explicar a ausência de associação.

Outro polimorfismo, que está presente no gene que codifica o receptor DC-SIGN foi encontrado associado à proteção à dengue grave, na nossa amostra. O SNP rs4804803 localizado na região promotora do gene, na posição -336, resultante da troca de uma guanina (G) por uma adenina (A), está inserido no principal sítio de início de transcrição do DC-SIGN, essa região interage com vários fatores de transcrição, como SP1, GATA1, CACCC e CAC. Dessa forma, a variante que contém o alelo G está relacionada com a presença do sítio de ligação e a variante com alelo A, com ausência desse sítio (Liu et al., 2003). Experimentos realizados por Sakuntabhai & cols. (2005) mostraram que, de fato, o SNP -336 afeta o sítio de ligação à Sp1, estando a variante alélica G relacionada a uma maior ligação a esse fator de transcrição assim como à uma menor atividade promotora quando comparada a variante alélica A.

No presente trabalho, foi encontrada uma associação de proteção entre o genótipo GG e casos graves de dengue. Contraditoriamente aos nossos resultados outros dois estudos encontraram esse mesmo genótipo associado ao risco de FHD (Sakuntabhai et al., 2005; Wang et al., 2011). Como dito anteriormente, nossos casos, além de terem sido classificados de acordo com o novo critério de classificação para dengue da OMS (WHO, 2009) foram comparados a um grupo controle, independente do histórico de infecção por dengue, mas com exclusão de casos gravíssimos. Nos outros estudos citados acima, foram utilizados os seguintes grupos de comparação: pacientes com FD, pacientes com FHD e um grupo controle onde aparentemente pode ter havido inclusão de possíveis casos graves em frequência desconhecida.

Na coorte Taiwanense estudada por Wang et al. (2011), pacientes com FHD tiveram uma frequência significativamente maior de genótipos GA/GG do que pacientes com FD ou controles, indicando uma associação desses genótipos à gravidade à dengue. Nesse mesmo trabalho, foi visto que células de indivíduos AG expressavam mais DC-SIGN na superfície celular, bem como tiveram a produção de TNF e IP-10 elevada quando comparada a células de indivíduos AA. Entretanto, curiosamente a replicação viral foi significativamente mais

baixa em carreadores AG do que em indivíduos AA. 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).

Por outro lado, no estudo realizado por Sakuntabhai et al. (2005) numa coorte tailandesa, foi observado uma associação dos genótipos GG/GA (carreador G) com proteção a FD, uma vez que a frequência desses genótipos foi significativamente mais alta na população de controles, quando esta foi comparada com os pacientes com FD. Entretanto, ao mesmo tempo que os genótipos AG/GG foram associados a proteção a FD, também foram associados à risco de FHD, quando as comparações foram realizadas entre esses dois grupos (FD vs FHD), estando a frequência desses genótipos significativamente elevada nos pacientes com FHD quando comparado a pacientes com FD. É possível que a associação de proteção encontrada para FD quando esse grupo foi comparado aos controles, novamente, possa ter sido resultado de uma viesada seleção deste último grupo, uma vez que não foi considerado o histórico de infecção prévia destes indivíduos.

As inconsistência observada entre os resultados apresentados nesses três conjuntos de dados genéticos pode eventualmente ser devido à classificação dos pacientes. No estudo feito por Wang et al., foi utilizada a antiga classificação da OMS (FD versus FHD). Sakuntabhai et al., também classificou os pacientes em FD e FHD. No entanto, dentre os pacientes com FD foram selecionados somente os casos mais graves, que de alguma forma pode ser semelhante aos nossos casos, representados por pacientes com dengue grave (derrame e choque que não tiveram plaquetopenia, por exemplo, uma vez que decaimento de plaquetas segundo a antiga classificação da OMS era um dos principais critérios para classificar o paciente em FHD). O uso da nova classificação da OMS passa a evitar esses incidentes já que esses indivíduos seriam classificados como graves (World Health Organization., 2009).

Outras possibilidades para as discrepâncias entre os estudos podem ser a idade dos pacientes assim como a diferença das frequências do alelo G entre as populações. No estudo de Wang et al. foram selecionados pacientes adultos com idade em torno de 45 anos, aqui os casos são representados por crianças e adolescentes com média de idade em torno de 10 anos. Em relação à frequência do alelo G, na população de Taiwan ela é de 3,8% (Wang et al., 2011), na população tailandesa é em torno de 10% (Sakuntabhai et al., 2005; Wichukchinda et al., 2007) e na nossa população é de 28%.

Devido aos resultados contraditórios em relação ao SNP -336 do DC-SIGN, foi realizada uma meta-análise utilizando os dados dos trabalhos de Sakuntabhai et al., 2005 e Wang et al., 2011 juntamente com os nossos resultados. Nossos casos graves foram agrupados aos casos de FHD dos outros estudos e comparados com os controles, que em todos os estudos são representados por indivíduos saudáveis. Todos os grupos controles, provenientes dos diferentes estudos, mostraram distribuição semelhante à prevista pelo EHW. Em relação ao teste de *Egger* que avalia a existência de vieses de publicação, os p valores obtidos, maiores que 0,05, foram consistentes com a presença de simetria no gráfico de funil (*funnel plot symmetry*), indicando a ausência de viés.

Ao total obtivemos para a análise 672 casos e 1135 controles. Apesar da heterogeneidade entre os estudos, obtida através do teste Q de *Cochran's*, ter sido significativa para alelos e carreadores e não significativa para genótipos, foram utilizados para os cálculos de OR cumulativas tanto o modelo de efeito fixo quanto de efeito aleatório.

A hipótese nula do teste Q é a de que os estudos envolvidos na meta-análise são homogêneos, ou seja, que não existem diferenças quanto ao efeito de interesse entre os diferentes estudos. Nesse caso recomenda-se a utilização de modelos de efeito fixo para a obtenção da OR total. No entanto, quando o número de estudos envolvidos na meta-análise é muito pequeno, o teste Q não é capaz de detectar a heterogeneidade com precisão (Kavvoura and Ioannidis, 2008; Rodrigues & Zielgelmann, 2010; Pacheco et al., 2008).

Como resultado da meta-análise, nós podemos observar que para as análises de alelos e carreadores, as ORs obtidas indicaram uma modesta direção de associação do alelo G ao risco não sendo esses valores significativos estatisticamente. Já para a análise genotípica, embora os valores das ORs tenham sido parecidos e direcionados a proteção (OR<1), a significância destes foi bastante diferenciada entre os modelos de efeito fixo e aleatório (OR=0,5; p=0,09) e (OR=0,61; p=0,43), respectivamente.

Adicionalmente, quando foram realizadas análises alternativas, onde nossos dados foram omitidos da meta-análise podemos observar que os valores de OR, obtidos através do modelo efeito fixo, tanto para análises alélicas quanto de carreadores apresentaram valores estatisticamente significativo para o alelo G e carreadores G. Enquanto isso, para análises genotípicas apesar do resultado não apresentar significância estatística, houve uma inversão na direção do valor de OR, passando de um indicativo de proteção (OR=0,5;p=0,09) para um indicativo de risco (OR=1,04;p=0,93).

Em relação aos modelos de efeito aleatório todas as ORs foram direcionadas ao risco ( $OR > 1$ ) embora nenhum valor tenha sido estatisticamente significativo. A partir desses resultados podemos observar que a omissão dos nossos dados influenciaram significativamente todos os valores de OR totais para todas as categorias (alelos, genótipos e carreadores).

Além dos SNPs nos receptores DC-SIGN e CLEC5A, nós selecionamos polimorfismos em outros receptores devido a importante participação destes em outras doenças infecciosas. É o caso do SNP G396S no MRC-1, do polimorfismo  $\Delta 32$ , e os dois SNPs (rs2066843 e rs751271) no NOD2. No entanto, nenhuma associação significativa foi encontrada entre esses polimorfismos e gravidade à dengue na nossa amostra.

Devido a hipótese de que uma desregulada produção de citocinas provenientes de uma resposta imune secundária ineficiente tanto de células B quanto de células T possa contribuir para o extravasamento plasmático (Rothman & Mathew 2008, Sierra et al., 2010, Dejnirattisai et al., 2010), nós selecionamos SNPs em genes de citocinas e outros mediadores com importante participação na infecção pelo vírus Dengue, a fim de compreender se polimorfismos nesses genes podem influenciar os níveis ou a função de suas proteínas. Entretanto, nenhuma associação significativa foi encontrada na nossa população para SNPs nos genes do TNF, IL-10 e MIF.

Ao contrário dos nossos resultados, trabalhos prévios encontram associações significativas para o SNP -308 no TNF e FHD (Fernandez-Mestre et al., 2004; Perez et al., 2010). Diferente dos nossos pacientes com dengue grave que são representados por crianças, os pacientes envolvidos nesses dois estudos são na maioria adultos com média de idade de 38 e 27 anos. Além disso, a frequência do genótipo AA na população cubana estudada por Perez & cols. (2010) foi de aproximadamente 16%, que é muito diferente da frequência de 2% observada para esse mesmo genótipo na nossa população de controles. Ainda nesse mesmo trabalho foi descrito que as frequências genotípicas observadas entre os controles, desviaram do EHW. Tal fato pode ser um indicativo de distorções e erros durante a metodologia de genotipagem. Não foi possível comparar nossas frequências alélicas ou genotípicas com as frequências dos controles venezuelanos usados no estudo de Fernandez-Mestre & cols (2004) devido à ausência de tal informação no manuscrito.

Além disso, nosso estudo realizou comparações entre casos muito graves de dengue e controles saudáveis (indivíduos com histórico de internação por dengue foram excluídos desse

grupo). No trabalho de Fernandez-Mestre & cols (2004), as diferenças significativas foram obtidas por comparações entre pacientes com FD e FHD. Entretanto, no estudo de Perez & cols (2010) apesar dos controles também serem representados por indivíduos saudáveis, não há nenhum relato sobre o histórico de infecção por dengue neste grupo. Além disso, o desvio das frequências genótípicas do EHW observada nesse grupo pode indicar que houve um enviesamento durante a seleção desses indivíduos ou na genotipagem das amostras.

A variação das frequências dos alelos para o SNP -819 no gene da IL-10 também foi estudada por Perez & cols (2010) na mesma população onde foi encontrada a associação de proteção do genótipo GG para SNP -308 no gene do TNF. Vários estudos relatam observações de altos níveis de IL-10 no soro de pacientes com dengue grave (Chen et al., 2007; Hung et al., 2004; Pérez et al., 2004). Apesar da frequência do genótipo CC para o SNP -819, na nossa amostra, ter sido bastante diferenciada entre casos e controles, 49 e 40 %, respectivamente, nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada.

No trabalho de Perez & cols (2010) embora, nenhuma associação tenha sido encontrada para as frequências das variantes do SNP -819/IL-10 isoladamente, quando foram realizadas analisadas haplotípicas incluindo outros SNPs presentes na região promotora do gene da IL-10 foi observada uma associação significativa de risco a FHD para o haplótipo contendo alélica C do SNP -819.

Nem todos os casos aqui estudados foram submetidos a teste sorológicos, como detecção de anticorpos IgM específicos para dengue. No entanto, esses, foram diagnosticados por médicos especialistas de acordo com os critérios de choque definidos pela OMS. De acordo com a própria OMS, durante uma epidemia não é necessário a confirmação da doença por testes sorológicos ou moleculares. Além disso, se realizado em um dia incorreto, o teste sorológico pode simplesmente não detectar a doença. A realização de ELISA, para detecção de imunoglobulinas IgM em pacientes não deve ser realizada antes do 5º dia da infecção, sendo mais indicada a partir do 6º dia (Torres, 2008). Mesmo assim, 56% dos pacientes envolvidos nesse estudo tiveram confirmação de dengue por IgM+ e 100% tiveram confirmação por IgG+ , durante o recrutamento dos controles.

Apesar dos nossos controles não terem tido dengue grave (nenhum indivíduo chegou a ser internado em UTI durante a epidemia de 2007/2008) esse grupo mostrou reatividade em cerca da metade dos indivíduos para o teste sorológico de detecção de imunoglobulinas IgG dengue específicas indicando que eles muito possivelmente tiveram uma exposição prévia a

algum sorotipo do vírus Dengue. Como esses controles foram coletados somente 2 anos após a epidemia, não podemos confirmar que esses anticorpos possam ser provenientes da epidemia de 2007/2008, sendo possível, ainda, que entre os indivíduos mais velhos, esses anticorpos sejam provenientes de epidemias anteriores por outros sorotipos virais.

Em 1987, logo após a reintrodução do vírus da dengue no Brasil, a taxa de soroprevalência para dengue no Rio de Janeiro foi de 44,5% entre crianças com idade escolar e, em 1992, após a reintrodução do DENV2 essa taxa foi de 66% na cidade de Niterói, outra área endêmica (Figueiredo et al.,1990 & Cunha et al., 1992). Um estudo mais recente descreveu as seguintes taxas de soroprevalência para dengue: 60,26%, 56,07% e 77,4%. Estes resultados foram obtidos a partir de um estudo de modelagem de soro-prevalência realizado em três regiões da cidade do Rio de Janeiro após a epidemia de 2008 (Honorio et al., 2009).

A taxa de soro-prevalência, de 48%, observada entre nossos controles foi inferior as taxas mais recentes, descritas no estudo de Honório et al. (2009). Entretanto, esses valores variam bastante de acordo com a idade dos indivíduos envolvidos em cada estudo e ao longo do tempo e das diferentes regiões dentro de uma mesma cidade; tornando difícil inferir se os indivíduos não reativos realmente não foram expostos ou possuem resistência inata. Ainda, esses indivíduos podem ser falsos-negativos ou mesmo não terem se convertido sorologicamente, uma vez que foram recrutados em uma área endêmica para dengue.

Partindo dos resultados de reatividade de IgG entre os controles, foram realizadas novas análises estatísticas, onde as frequências dos casos foram comparados com a dos controles reativos para IgG e não reativos, separadamente. Ao realizarmos essa estratificação entre os controles, nosso grupo de controles reativos para IgG passa a ser comparável aos grupo de FD utilizados nos outros estudos citados ao longo dessa discussão. Uma vez que o resultado positivo para IgG indica que estes indivíduos já contraíram dengue e que a doença se manifestou de uma forma não tão grave quanto os casos de FHD, uma vez que foram excluídos desse estudo controles com histórico de internação por suspeita de dengue.

Quando as frequências dos SNPs rs1285933/CLEC5A e rs4804803/DC-SIGN, que previamente haviam sido associados à dengue grave, foram comparadas entre casos e controles reativos pra IgG dengue específico, a nova OR apesar de continuar apresentando uma forte indicação de risco e proteção, respectivamente, não foi significativa.

Essa alteração na significância dos valores de OR pode ter sido devido à diminuição do tamanho amostral entre o grupo controle, principalmente porque no caso do SNP

rs4804803 a associação entre as frequências dos casos e controles reativos para IgG apresentou um p valor borderline de 0,06 e ao contrário do SNP rs1285933, não apresentou uma OR significativa quando os casos foram comparados somente com os controles não reativos para IgG.

A manutenção da direção de OR observada antes e depois da estratificação dos controles, principalmente em relação ao genótipo GG do SNP -336 no DC-SIGN mostra que de fato, na nossa amostra de brasileiros tal genótipo parece realmente estar associado à proteção a dengue grave, diferente do que foi visto nas populações taiwanense e tailandesa estudada por Wang & cols. (2010) e Sakunthabai & cols. (2005), respectivamente, onde as frequências de carreadores G (GA/GG) foi elevada em pacientes com FHD comparado a pacientes com FD. Embora não tenhamos observado nenhuma associação significativa para carreadores de G antes ou depois da estratificação; estamos extrapolando nossa comparação a esse grupo, devido o número de genótipo GG nesses outros estudos ser extremamente baixo, impossibilitando qualquer comparação.

É possível, que os nossos controles não reativos para IgG realmente não tenham sido expostos ao vírus da dengue e assim não sejam os indivíduos mais adequados para compor esse grupo.

Sabe-se que uma das maiores dificuldades durante a realização de um estudo caso-controle é a correta escolha dos controles que deveriam diferir dos casos apenas em relação à questão em estudo e que tenha exatamente todas as outras variáveis. Por mais que tentemos minimizar as diferenças entre os grupos essa é uma tarefa praticamente impossível.

Outra importante questão que deve ser abordada, diz respeito ao uso de testes de correção para múltiplas comparações. Como foram selecionados para o presente estudo vários SNPs em diferentes genes, o mais recomendado seria a utilização de testes de correção. Nós aplicamos o teste Holm para a correção do p-valor global de 0,01 encontrado para a associação do genótipo GG do DC-SIGN. Após essa correção, o p valor global passou de 0,01 para 0,2. A utilização desse tipo de teste em abordagens de genes candidatos é complicada, uma vez que o número de SNPs é razoável (10-20) e, portanto, o fator de correção é alto e conseqüentemente muito estrigente.

Alternativas a essa abordagem, é a utilização de testes tipo FDR (do inglês, false discovery ratio) mas este teste não é aplicável em análises genéticas com o número de SNPs que testamos aqui. Normalmente esses são adequados a abordagens do tipo de GWAS ou

quando o número de SNPs testados é muito grande, como é o caso do trabalho de Silva & cols. (2010) onde foram selecionados 593, e os resultados obtidos foram ajustados pelo teste FDR. Além disso, o pequeno número amostral, geralmente utilizado em estudos caso-controle faz com que as associações encontradas não apresentem um p-valor muito baixo. A melhor alternativa é a replicação do achado genético em outras populações. Entretanto, isso ainda não foi possível.

Levando em consideração as evidências encontradas por trabalhos anteriores, de que a interação do vírus Dengue com os receptores CLEC5A e DC-SIGN pode resultar na indução de mediadores pró-inflamatórios, foi conduzido um estudo funcional a fim de avaliar se os SNPs rs1285933 e rs4804803 poderiam ter alguma relação com os níveis de TNF no soro de pacientes com dengue.

Em relação aos níveis de TNF de acordo com o SNP rs1285933/CLEC5A, nós podemos observar que dentre os pacientes classificados como graves incluindo aqueles com choque, os carreadores dos genótipos CT/TT do SNP rs1285933 apresentaram níveis mais elevados de TNF quando comparados aos carreadores do genótipo CC ou controles (pacientes na fase de recuperação). Entretanto, quando essa mesma análise foi realizada utilizando os três genótipos possíveis para esse SNP (CC, CT ou TT) apesar de ser notável a ocorrência do aumento dos níveis de TNF em direção ao genótipo TT, nenhuma significância estatística pôde ser observada. O pequeno número de indivíduos com genótipo TT e CC pode resultar na perda de associações significativas quando ocorre a estratificação para os todos os genótipos possíveis. Mesmo assim, esse resultado suporta a nossa especulação prévia de que o SNP rs1285933 possa regular os níveis de expressão de CLEC5A consequentemente interferindo nos níveis de TNF séricos dos pacientes. No entanto, não foi possível, ainda, determinar os níveis de expressão do receptor e assim obtermos uma associação direta do SNP com a expressão de CLEC5A.

Como mencionado anteriormente, no estudo realizado por Wang & cols. (2011) foi observado que células de indivíduos com genótipo AG do SNP -336, além de expressarem mais DC-SIGN na superfície celular, produzem níveis mais elevados de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF, quando comparados a células de indivíduos carreadores do genótipo AA e que curiosamente suportam uma menor replicação viral. Aqui, nós observamos que indivíduos AA para SNP -336 produzem mais TNF do que controles ( $p < 0,01$ ), nas três análises realizadas: independente da forma de dengue, somente entre casos brandos e somente

entre casos graves. Não sendo observadas diferenças significativas nos níveis de TNF entre carreadores G (AG/GG) versus AA ou versus controles.

Nossos resultados funcionais sugerem que de alguma forma o SNP -336 também poderia regular a produção de TNF, e até mesmo de outras citocinas. De acordo com as observações realizadas por Sakuntabhai et al. (2005), o alelo G do SNP -336 possui o sítio de ligação ao fator de transcrição Sp1 assim como possui menor atividade promotora quando comparado ao alelo A. A ligação de Sp1 a essa região promotora do DC-SIGN parece inibir a transcrição desse gene, o que resultaria em uma reduzida expressão desse receptor na superfície celular o que pode também estar relacionado a uma menor produção de TNF em carreadores do genótipo GA/GG em comparação à carreadores AA. Esses dados ainda precisam ser confirmados funcionalmente na nossa população.

A ausência, até o momento, de uma vacina eficiente, as características de adaptação do vetor *A. aegypti* ao ambiente urbano, o estilo de vida da população brasileira que contribui para a disseminação do mosquito vetor aliados a medidas ineficientes de controle e prevenção da doença por parte dos órgãos públicos tornam o controle da dengue uma tarefa bastante difícil. Adicionalmente, as características da doença onde tanto os pacientes com ou sem sinais de alerta podem evoluir para formas gravíssimas somadas a ausência de um marcador de gravidade tornam o tratamento da dengue bastante complicado. Nesse contexto, um melhor entendimento da genética molecular na suscetibilidade a infecções é útil para o desenvolvimento de vacinas, identificação de alvos terapêuticos e melhorias no tratamento de importantes doenças que atualmente possuem mecanismos moleculares pouco conhecidos, como é o caso da dengue.

As associações genéticas encontradas nesse trabalho, suportadas pelos achados funcionais juntamente com outras evidências provenientes de estudos prévios realizados por outros autores podem contribuir para um melhor entendimento da participação genética dos pacientes no desenvolvimento de dengue muito grave. O ideal seria uma identificação mais precisa de todos os SNPs presentes em cada um desses genes, principalmente no caso do SNP rs1285933 que como foi dito anteriormente, por estar em uma região “near gene” torna mais difícil inferir qual seu efeito na funcionalidade da proteína, existindo ainda a possibilidade de que outro SNP ligado a ele, seja o principal responsável pelo efeito observado.

Além dos SNPs presentes em regiões regulatórias, a identificação de polimorfismos que possam ter uma grande impacto na estrutura ou função das proteínas aqui estudadas,

como os SNPs que resultam em troca de aminoácido em regiões codificantes, podem fornecer grandes esclarecimentos para nossos achados. Foi descrito que os genes dos receptores tipo Toll que são expressos na superfície celular estão muito mais propensos a mutações não sinônimas do que aqueles que são expressos intracelularmente e que são responsáveis pela identificação de ácidos nucléicos (Barreiro et al., 2009). O mesmo pode acontecer com outros receptores expressos na superfície celular, dentre eles CLEC5A e DC-SIGN, e dessa forma essas mutações não sinônimas podem resultar em modificações estruturais nessas proteínas interferindo na ligação destes com o vírus Dengue. Dessa forma, pretende-se futuramente realizar um mapeamento fino de todos os SNPs presentes nas regiões exônicas e seus limites assim como nas regiões regulatórias dos genes CLEC5A e DC-SIGN, a fim de buscar os SNPs que possam ter grande impacto na funcionalidade desses receptores.

## 6-CONCLUSÕES

---

A partir dos resultados encontrados nesse trabalho, podemos concluir que:

- O genótipo TT do SNP rs1285933, localizado na região 3' “near gene” do receptor CLEC5A apresentou uma associação significativa de gravidade à dengue na nossa amostra de casos e controles, embora o p valor global para a análise genotípica tenha sido borderline. Após a estratificação dos controles de acordo com a reatividade de IgG, não foram observadas associações significativas para a comparação de casos versus controles reativos, somente para a comparação casos versus controles não reativos.
- O SNP rs4804803 localizado na região promotora, posição -336, do gene do receptor DC-SIGN foi associado com proteção à dengue grave na nossa amostra de casos e controles. Após a estratificação por reatividade de IgG, a associação obtida através da comparação de casos versus controles reativos foi borderline.
- Não foram encontradas associações significativas entre os SNPs selecionados nos genes de TNF, IL-10, MIF, CCR5, MRC-1 e NOD2.
- Através da meta-análise realizada com dados da literatura sobre associações do SNP -336/DC-SIGN com formas da dengue não foram encontradas associações significativas para as análises alélicas, de carreadores e genotípicas. Entretanto, as ORs das duas primeiras mostraram uma modesta direção ao risco, enquanto a OR da análise genotípica mostrou-se direcionada com proteção à dengue grave.
- Quando a meta-análise foi realizada sem nossos dados genéticos, todas as ORs (para análises genotípicas, alélicas e de carreadores) mostraram direção ao risco. Entretanto, somente as ORs das análises alélicas e de carreadores foram significativas.
- Através dos estudos funcionais, podemos concluir que pacientes carreadores de T (CT/TT) para o SNP rs1285933/ CLEC5A que desenvolveram dengue grave incluindo choque mostraram níveis mais elevados de TNF no soro, entre os dias 5-7 da infecção,

comparados aos níveis de TNF no soro de pacientes com genótipo CC ou controles (pacientes em fase de recuperação).

- Pacientes com dengue grave, branda ou independente da forma, com genótipo AA para o SNP rs4804803/ DC-SIGN produziram níveis mais elevados de TNF durante a fase crítica da doença (5º ao 7º dia) quando comparados aos níveis de TNF no soro dos controles. O mesmo não aconteceu com pacientes carreadores dos genótipo AG/GG.

Dessa forma podemos concluir que a constituição genética dos pacientes pode contribuir para a gravidade da dengue na nossa amostra, e que a presença de polimorfismos presentes nos genes de CLEC5A e DC-SIGN, que conhecidamente são receptores com participação crucial na infecção e imunopatogênese da dengue, podem estar relacionados a modificações na produção de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF, contribuindo assim para a gravidade da doença.

Como perspectivas deste trabalho, pretende-se futuramente:

- 1- Realizar um mapeamento fino de todos os SNPs presentes no gene de DC-SIGN e CLEC5A
- 2- Quantificar a expressão desses receptores em células de indivíduos com diferentes genótipos para os SNPs rs1285933 e rs4804803. Assim como quantificar a expressão dos RNAs mensageiros desses genes.
- 3- Quantificar a produção de citocinas na sobrenadante de culturas, novamente, de células de indivíduos com esses mesmos SNPs assim como quantificar a carga viral.

## 7-REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.

Acioli-Santos, B., Segat, L., Dhalia, R., Brito, C.A., Braga-Neto, U.M., Marques, E.T., and Crovella, S. (2008). MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. *Hum Immunol* 69, 122-128.

Akaike, T., and Maeda, H. (2000). Nitric oxide and virus infection. *Immunology* 101, 300-308.

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., *et al.* (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., and Sekaran, S.D. (2010). Susceptible and protective HLA class 1 alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population. *PLoS One* 5.

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., *et al.* (2010). Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J* 24, 218-228.

Avirutnan, P., Malasit, P., Seliger, B., Bhakdi, S., and Husmann, M. (1998). Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol* 161, 6338-6346.

Azeredo, E.L., Zagne, S.M., Santiago, M.A., Gouvea, A.S., Santana, A.A., Neves-Souza, P.C., Nogueira, R.M., Miagostovich, M.P., and Kubelka, C.F. (2001). Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* 204, 494-507.

Azeredo, E.L., Neves-Souza, P.C., Alvarenga, A.R., Reis, S.R., Torrentes-Carvalho, A., Zagne, S.M., Nogueira, R.M., Oliveira-Pinto, L.M., and Kubelka, C.F. (2010). Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology* 130, 202-216.

Balmaseda, A., Hammond, S.N., Perez, L., Tellez, Y., Saborio, S.I., Mercado, J.C., Cuadra, R., Rocha, J., Perez, M.A., Silva, S., *et al.* (2006). Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg* 74, 449-456.

Bandyopadhyay, S., Lum, L.C.S., and Kroeger, A. (2006). Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Tropical Medicine & International Health* 11, 1238-1255.

Barreto, M.L., and Teixeira, M.G. (2008). Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos Avançados* 22, 53-72.

Barreiro, L.B., Ben-Ali, M., Quach, H., Laval, G., Patin, E., Pickrell, J.K., Bouchier, C., Tichit, M., Neyrolles, O., Gicquel, B., *et al.* (2009). Evolutionary dynamics of human Toll-like receptors and their different contributions to host defense. *PLoS Genet* 5, e1000562.

Bayley, J.P., Ottenhoff, T.H., and Verweij, C.L. (2004). Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun* 5, 315-329.

Beiguelman, B. (1968). Some remarks on the genetics of leprosy resistance. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 17, 584-594.

Beltramello, M., Williams, K.L., Simmons, C.P., Macagno, A., Simonelli, L., Quyen, N.T., Sukupolvi-Petty, S., Navarro-Sanchez, E., Young, P.R., de Silva, A.M., *et al.* (2010). The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe* 8, 271-283.

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., *et al.* (2008). Genetic ancestry and income are associated with dengue hemorrhagic fever in a highly admixed population. *Eur J Hum Genet* 16, 762-765.

Bozza, F.A., Cruz, O.G., Zagne, S.M., Azeredo, E.L., Nogueira, R.M., Assis, E.F., Bozza, P.T., and Kubelka, C.F. (2008). Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis* 8, 86.

Braga, E.L., Moura, P., Pinto, L.M., Ignácio, S.R., Oliveira, M.J.C., Cordeiro, M.T., and Kubelka, C.F. (2001). Detection of circulating tumor necrosis factor- $\alpha$ , soluble tumor necrosis factor p75 and interferon- $\gamma$  in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 229-232.

Bucheton, B., Kheir, M.M., El-Safi, S.H., Hammad, A., Mergani, A., Mary, C., Abel, L., and Dessein, A. (2002). The interplay between environmental and host factors during an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Microbes Infect* 4, 1449-1457.

Bukowski, J.F., Kurane, I., Lai, C.J., Bray, M., Falgout, B., and Ennis, F.A. (1989). Dengue virus-specific cross-reactive CD8<sup>+</sup> human cytotoxic T lymphocytes. *Journal of virology* 63, 5086-5091.

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.

Cao, X.T., Ngo, T.N., Wills, B., Kneen, R., Nguyen, T.T., Ta, T.T., Tran, T.T., Doan, T.K., Solomon, T., Simpson, J.A., *et al.* (2002). Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test and a modified tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Viet Nam. *Trop Med Int Health* 7, 125-132.

Cardoso, C.C., Pereira, A.C., Brito-de-Souza, V.N., Duraes, S.M., Ribeiro-Alves, M., Nery, J.A., Francio, A.S., Vanderborcht, P.R., Parelli, F.P., Alter, A., *et al.* (2011a). 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.

Cardoso, C.C., Pereira, A.C., de Sales Marques, C., and Moraes, M.O. (2011b). Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol* 6, 533-549.

Casanova, J.L., and Abel, L. (2007). Human genetics of infectious diseases: a unified theory. *EMBO J* 26, 915-922.

Chareonsirisuthigul, T., Kalayanarooj, S., and Ubol, S. (2007a). 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. *J Gen Virol* 88, 365-375.

Chareonsirisuthigul, T., Kalayanarooj, S., and Ubol, S. (2007b). 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. *Journal of General Virology* 88, 365-375.

Chen, R.-F., Yang, K.D., Wang, L., Liu, J.-W., Chiu, C.-C., and Cheng, J.-T. (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, 1106-1113.

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., and Hsieh, S.L. (2008). CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* 453, 672-676.

Chen, S.T., Liu, R.S., Wu, M.F., Lin, Y.L., Chen, S.Y., Tan, D.T., Chou, T.Y., Tsai, I.S., Li, L., and Hsieh, S.L. (2012). CLEC5A Regulates Japanese Encephalitis Virus-Induced Neuroinflammation and Lethality. *PLoS Pathog* 8, e1002655.

Chernoff, A., Granowitz, E., Shapiro, L., Vannier, E., Lonnemann, G., Angel, J., Kennedy, J., Rabson, A., Wolff, S., and Dinarello, C. (1995). A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *The Journal of Immunology* 154, 5492-5499.

Cheung, R., Shen, F., Phillips, J.H., McGeachy, M.J., Cua, D.J., Heyworth, P.G., and Pierce, R.H. (2011). Activation of MDL-1 (CLEC5A) on immature myeloid cells triggers lethal shock in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 121, 4446-4461.

Chuang, C.C., Chuang, Y.C., Chang, W.T., Chen, C.C., Hor, L.I., Huang, A.M., Choi, P.C., Wang, C.Y., Tseng, P.C., and Lin, C.F. (2010). Macrophage migration inhibitory factor regulates interleukin-6 production by facilitating nuclear factor-kappa B activation during *Vibrio vulnificus* infection. *BMC Immunol* 11, 50.

Chuang, Y.-C., Lei, H.-Y., Liu, H.-S., Lin, Y.-S., Fu, T.-F., and Yeh, T.-M. (2011). Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability. *Cytokine* 54, 222-231.

Colmenares, M., Puig-Kroger, A., Pello, O.M., Corbi, A.L., and Rivas, L. (2002). Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania amastigotes*. *J Biol Chem* 277, 36766-36769.

de la, C.S.B., Garcia, G., Perez, A.B., Morier, L., Alvarez, M., Kouri, G., and Guzman, M.G. (2006). Ethnicity and difference in dengue virus-specific memory T cell responses in Cuban individuals. *Viral Immunol* 19, 662-668.

Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirisakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., Puttikhunt, C., Edwards, C., Duangchinda, T., Supasa, S., *et al.* (2010). Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 328, 745-748.

Di Bona, D., Rizzo, C., Bonaventura, G., Candore, G., and Caruso, C. (2012). Association Between Interleukin-10 Polymorphisms and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*.

Diamond, M.S., Roberts, T.G., Edgil, D., Lu, B., Ernst, J., and Harris, E. (2000). Modulation of Dengue Virus Infection in Human Cells by Alpha, Beta, and Gamma Interferons. *Journal of Virology* 74, 4957-4966.

Diaz, A., Kouri, G., Guzman, M.G., Lobaina, L., Bravo, J., Ruiz, A., Ramos, A., and Martinez, R. (1988). Description of the clinical picture of dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) in adults. *Bull Pan Am Health Organ* 22, 133-144.

Dolo, A., Modiano, D., Maiga, B., Daou, M., Dolo, G., Guindo, H., Ba, M., Maiga, H., Coulibaly, D., Perlman, H., *et al.* (2005). Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali. *Am J Trop Med Hyg* 72, 243-248.

Dong, T., Moran, E., Vinh Chau, N., Simmons, C., Luhn, K., Peng, Y., Wills, B., Phuong Dung, N., Thi Thu Thao, L., Hien, T.T., *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, e1192.

dos Santos, F.B., Nogueira, F.B., Castro, M.G., Nunes, P.C., de Filippis, A.M., Faria, N.R., Simoes, J.B., Sampaio, S.A., Santos, C.R., and Nogueira, R.M. (2011). First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virol J* 8, 387.

Duyen, H.T., Ngoc, T.V., Ha do, T., Hang, V.T., Kieu, N.T., Young, P.R., Farrar, J.J., Simmons, C.P., Wolbers, M., and Wills, B.A. (2011). Kinetics of plasma viremia and soluble nonstructural protein 1 concentrations in dengue: differential effects according to serotype and immune status. *The Journal of infectious diseases* 203, 1292-1300.

Durbin, A.P., Vargas, M.J., Wanionek, K., Hammond, S.N., Gordon, A., Rocha, C., Balmaseda, A., and Harris, E. (2008). Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology* 376, 429-435.

Dynan, W.S. (1989). Modularity in promoters and enhancers. *Cell* 58, 1-4.

Ezekowitz, R.A., Sastry, K., Bailly, P., and Warner, A. (1990). Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 172, 1785-1794

Falcon-Lezama, J.A., Ramos, C., Zuniga, J., Juarez-Palma, L., Rangel-Flores, H., Garcia-Trejo, A.R., Acunha-Alonzo, V., Granados, J., and 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., and Layrisse, Z. (2004). TNF-alpha-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., and 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-Trejo, A.R., Falcon-Lezama, J.A., Juarez-Palma, L., Granados, J., Zuniga-Ramos, J., Rangel, H., Barquera, R., Vargas-Alarcon, G., and Ramos, C. (2011). Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with dengue fever. *Acta Trop* 120, 67-71.

Garcia, G., del Puerto, F., Perez, A.B., Sierra, B., Aguirre, E., Kikuchi, M., Sanchez, L., Hirayama, K., and Guzman, M.G. (2011). Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection. *Hum Immunol* 72, 904-907.

Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., *et al.* (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-597.

Ghiasi, H., Perng, G.C., Nesburn, A.B., and Wechsler, S.L. (2000). Antibody-dependent enhancement of HSV-1 infection by anti-gK sera. *Virus Res* 68, 137-144.

Gibson, A.W., Edberg, J.C., Wu, J., Westendorp, R.G., Huizinga, T.W., and Kimberly, R.P. (2001). Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166, 3915-3922.

Girn, J., Kavosi, M., and Chantler, J. (2002). Enhancement of coxsackievirus B3 infection by antibody to a different coxsackievirus strain. *J Gen Virol* 83, 351-358.

Glass, W.G., McDermott, D.H., Lim, J.K., Lekhong, S., Yu, S.F., Frank, W.A., Pape, J., Cheshier, R.C., and Murphy, P.M. (2006). CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J Exp Med* 203, 35-40.

Goncalvez, A.P., Engle, R.E., St Claire, M., Purcell, R.H., and Lai, C.J. (2007). Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9422-9427.

Green, S., Pichyangkul, S., Vaughn, D.W., Kalayanarooj, S., Nimmannitya, S., Nisalak, A., Kurane, I., Rothman, A.L., and Ennis, F.A. (1999a). Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 180, 1429-1435.

Green, S., and Rothman, A. (2006). Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis* 19, 429-436.

Green, S., Vaughn, D.W., Kalayanarooj, S., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Nisalak, A., Lew, R., Innis, B.L., Kurane, I., Rothman, A.L., *et al.* (1999b). Early Immune Activation in Acute Dengue Illness Is Related to Development of Plasma Leakage and Disease Severity. *Journal of Infectious Diseases* 179, 755-762.

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

Gubler, D.J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11, 480-496.

Gubler, D.J., Sather, G.E., Kuno, G., and Cabral, J.R. (1986). Dengue 3 virus transmission in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 35, 1280-1284.

Gubler, D.J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 10, 100-103.

Gunther, V.J., Putnak, R., Eckels, K.H., Mammen, M.P., Scherer, J.M., Lyons, A., Szein, M.B., and Sun, W. (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, 3895-3904.

Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H.S., Martinez, E., *et al.* (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 8, S7-16.

Guzman, M.G., Kouri, G., Martinez, E., Bravo, J., Riveron, R., Soler, M., Vazquez, S., and Morier, L. (1987). Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Bull Pan Am Health Organ* 21, 270-279.

Guzman, M.G., and Vazquez, S. (2010). The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses* 2, 2649-2662.

Halstead, S.B. (1970). Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med* 42, 350-362.

Halstead, S.B. (1979). In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis* 140, 527-533.

Halstead, S.B. (1981). The Alexander D. Langmuir Lecture. The pathogenesis of dengue. Molecular epidemiology in infectious disease. *Am J Epidemiol* 114, 632-648.

Halstead, S.B. (2006). Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica* 20, 407-415.

Halstead, S.B. (2007). Dengue. *Lancet* 370, 1644-1652.

Halstead, S.B., Lan, N.T., Myint, T.T., Shwe, T.N., Nisalak, A., Kalyanarooj, S., Nimmannitya, S., Soegijanto, S., Vaughn, D.W., and Endy, T.P. (2002). Dengue hemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored. *Emerg Infect Dis* 8, 1474-1479.

Halstead, S.B., O'Rourke, E.J., and Allison, A.C. (1977). Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. *J Exp Med* 146, 218-229.

Halstead, S.B., Streit, T.G., Lafontant, J.G., Putvatana, R., Russell, K., Sun, W., Kanesa-Thanan, N., Hayes, C.G., and Watts, D.M. (2001). Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg* 65, 180-183.

Ho, L.J., Wang, J.J., Shiao, M.F., Kao, C.L., Chang, D.M., Han, S.W., and Lai, J.H. (2001). Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol* 166, 1499-1506.

Hober, D., Poli, L., Roblin, B., Gestas, P., Chungue, E., Granic, G., Imbert, P., Pecarere, J.L., Vergez-Pascal, R., Wattré, P., *et al.* (1993). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg* 48, 324-331.

Honorio, N.A., Nogueira, R.M., Codeco, C.T., Carvalho, M.S., Cruz, O.G., Magalhaes Mde, A., de Araujo, J.M., de Araujo, E.S., Gomes, M.Q., Pinheiro, L.S., *et al.* (2009). Spatial evaluation and modeling of Dengue seroprevalence and vector density in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e545.

HOWE, G. M. A world geography of human diseases. New York: Academic Press, 1977. p.302-17

Hung, N.T., Lei, H.-Y., Lan, N.T., Lin, Y.-S., Huang, K.-J., Lien, L.B., Lin, C.-F., Yeh, T.-M., Ha, D.Q., Huong, V.T.Q., *et al.* (2004). Dengue Hemorrhagic Fever in Infants: A Study of Clinical and Cytokine Profiles. *Journal of Infectious Diseases* *189*, 221-232.

Jamil, B., Hasan, R., Zafar, A., Bewley, K., Chamberlain, J., Mioulet, V., Rowlands, M., and Hewson, R. (2007). Dengue virus serotype 3, Karachi, Pakistan. *Emerg Infect Dis* *13*, 182-183.

Jessie, K., Fong, M.Y., Devi, S., Lam, S.K., and Wong, K.T. (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis* *189*, 1411-1418.

Joyce-Shaikh, B., Bigler, M.E., Chao, C.C., Murphy, E.E., Blumenschein, W.M., Adamopoulos, I.E., Heyworth, P.G., Antonenko, S., Bowman, E.P., McClanahan, T.K., *et al.* (2010). Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 regulates synovial inflammation and bone erosion associated with autoimmune arthritis. *J Exp Med* *207*, 579-589.

Kavvoura, F.K., and Ioannidis, J.P. (2008). Methods for meta-analysis in genetic association studies: a review of their potential and pitfalls. *Hum Genet* *123*, 1-14.

Kawai, T., and Akira, S. (2007). Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem* *141*, 137-145.

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., *et al.* (2011). Genome-wide association study identifies susceptibility loci for dengue shock syndrome at MICB and PLCE1. *Nat Genet* *43*, 1139-1141.

Kindberg, E., Mickienè, A., Ax, C., Åkerlind, B., Vene, S., Lindquist, L., Lundkvist, Å., and Svensson, L. (2008). A Deletion in the Chemokine Receptor 5 (CCR5) Gene Is Associated with Tickborne Encephalitis. *Journal of Infectious Diseases* *197*, 266-269.

Klein, R.S. (2008). A Moving Target: The Multiple Roles of CCR5 in Infectious Diseases. *Journal of Infectious Diseases* *197*, 183-186.

Kliks, S.C., Nimmanitya, S., Nisalak, A., and Burke, D.S. (1988). Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg* *38*, 411-419.

Kong, Y.Y., Thay, C.H., Tin, T.C., and Devi, S. (2006). Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J Virol Methods* *138*, 123-130.

Konishi, I., Horiike, N., Hiasa, Y., Michitaka, K., and Onji, M. (2004). CCR5 promoter polymorphism influences the interferon response of patients with chronic hepatitis C in Japan. *Intervirology* 47, 114-120.

Kontny, U., Kurane, I., and Ennis, F.A. (1988). Gamma interferon augments Fc gamma receptor-mediated dengue virus infection of human monocytic cells. *Journal of Virology* 62, 3928-3933.

Kouri, G.P., Guzman, M.G., Bravo, J.R., and Triana, C. (1989). Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ* 67, 375-380.

Kubelka, C.F., Borges, P.A., VonSydow, F.F., and Lampe, E. (1995). Analysis of tumor necrosis factor-alpha serum level in Brazilian patients with Dengue-2. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90, 741-742.

Kurane, I., Brinton, M.A., Samson, A.L., and Ennis, F.A. (1991a). 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, 1823-1828.

Kurane, I., Innis, B.L., Nimmannitya, S., Nisalak, A., Meager, A., Janus, J., and Ennis, F.A. (1991b). 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. *The Journal of Clinical Investigation* 88, 1473-1480.

Kurane, I., Meager, A., and Ennis, F.A. (1989). Dengue virus-specific human T cell clones. Serotype crossreactive proliferation, interferon gamma production, and cytotoxic activity. *J Exp Med* 170, 763-775.

Kwiatkowski, D. (2000). Science, medicine, and the future: susceptibility to infection. *BMJ* 321, 1061-1065.

Kwon, D.S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A., and Littman, D.R. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 16, 135-144.

Lanciotti, R.S., Lewis, J.G., Gubler, D.J., and Trent, D.W. (1994). Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol* 75 ( Pt 1), 65-75.

Laoprasopwattana, K., Libraty, D.H., Endy, T.P., Nisalak, A., Chunsuttiwat, S., Vaughn, D.W., Reed, G., Ennis, F.A., Rothman, A.L., and Green, S. (2005). Dengue Virus (DV)

enhancing antibody activity in preillness plasma does not predict subsequent disease severity or viremia in secondary DV infection. *J Infect Dis* 192, 510-519.

Le Bourhis, L., Benko, S., and Girardin, S.E. (2007). Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochem Soc Trans* 35, 1479-1484.

Lee, Y.-R., Liu, M.-T., Lei, H.-Y., Liu, C.-C., Wu, J.-M., Tung, Y.-C., Lin, Y.-S., Yeh, T.-M., Chen, S.-H., and Liu, H.-S. (2006a). MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *Journal of General Virology* 87, 3623-3630.

Lee, Y.R., Liu, M.T., Lei, H.Y., Liu, C.C., Wu, J.M., Tung, Y.C., Lin, Y.S., Yeh, T.M., Chen, S.H., and Liu, H.S. (2006b). MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol* 87, 3623-3630.

Leitmeyer, K.C., Vaughn, D.W., Watts, D.M., Salas, R., Villalobos, I., de, C., Ramos, C., and Rico-Hesse, R. (1999). Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 73, 4738-4747.

Libraty, D.H., Endy, T.P., Houg, H.-S.H., Green, S., Kalayanarooj, S., Suntayakorn, S., Chansiriwongs, W., Vaughn, D.W., Nisalak, A., Ennis, F.A., *et al.* (2002). Differing Influences of Virus Burden and Immune Activation on Disease Severity in Secondary Dengue-3 Virus Infections. *Journal of Infectious Diseases* 185, 1213-1221.

Libraty, D.H., Pichyangkul, S., Ajariyakhajorn, C., Endy, T.P., and Ennis, F.A. (2001). Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol* 75, 3501-3508.

Lima Mda, R., Nogueira, R.M., Bispo de Filippis, A.M., and dos Santos, F.B. (2011). Comparison of two generations of the Panbio dengue NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 18, 1031-1033.

Lin, C.C., Huang, Y.H., Shu, P.Y., Wu, H.S., Lin, Y.S., Yeh, T.M., Liu, H.S., Liu, C.C., and Lei, H.Y. (2010). Characteristic of dengue disease in Taiwan: 2002-2007. *Am J Trop Med Hyg* 82, 731-739.

Lin, Y.W., Wang, K.J., Lei, H.Y., Lin, Y.S., Yeh, T.M., Liu, H.S., Liu, C.C., and Chen, S.H. (2002). Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J Virol* 76, 12242-12249.

- Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research* 59, 23-61.
- Liu, H., Yu, W., Liou, L.Y., and Rice, A.P. (2003). Isolation and characterization of the human DC-SIGN and DC-SIGNR promoters. *Gene* 313, 149-159.
- Lobigs, M., Arthur, C.E., Mullbacher, A., and Blanden, R.V. (1994). The flavivirus nonstructural protein NS3 is a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *Virology* 202, 195-201.
- Loke, H., Bethell, D., Phuong, C.X., Day, N., White, N., Farrar, J., and 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 IIa genes. *Am J Trop Med Hyg* 67, 102-106.
- Lozach, P.Y., Burleigh, L., Staropoli, I., Navarro-Sanchez, E., Harriague, J., Virelizier, J.L., Rey, F.A., Despres, P., Arenzana-Seisdedos, F., and Amara, A. (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. *J Biol Chem* 280, 23698-23708.
- Lu, Y.L., Wu, X., Huang, H.L., and Dai, L.C. (2010). Allele polymorphisms of interleukin-10 and hepatitis B, C virus infection. *Chin Med J (Engl)* 123, 1338-1344.
- Mahalingam, S., and Lidbury, B.A. (2002). Suppression of lipopolysaccharide-induced antiviral transcription factor (STAT-1 and NF-kappa B) complexes by antibody-dependent enhancement of macrophage infection by Ross River virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13819-13824.
- Marian, A.J. (2012). Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Transl Res* 159, 64-79.
- Marianneau, P., Cardona, A., Edelman, L., Deubel, V., and Desprès, P. (1997). Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. *Journal of Virology* 71, 3244-3249.
- MARTINEZ-TORRES, M. E. Dengue hemorrágico em crianças: editorial. Havana: José Martí, 1990. 180p
- Martínez Torres, E. (2008). Dengue. *Estudos Avançados* 22, 33-52.

Mathew, A., Kurane, I., Rothman, A.L., Zeng, L.L., Brinton, M.A., and Ennis, F.A. (1996). Dominant recognition by human CD8+ cytotoxic T lymphocytes of dengue virus nonstructural proteins NS3 and NS1.2a. *J Clin Invest* 98, 1684-1691.

Mathew, A., and Rothman, A.L. (2008). Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev* 225, 300-313.

Messer, W.B., Gubler, D.J., Harris, E., Sivananthan, K., and de Silva, A.M. (2003). Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* 9, 800-809.

Ministério da Saúde. Departamento de informática do SUS- DATASUS- Disponível em <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>. Recuperado em fevereiro de 2012.

Modhiran, N., Kalayanarooj, S., and Ubol, S. (2010). Subversion of innate defenses by the interplay between DENV and pre-existing enhancing antibodies: TLRs signaling collapse. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e924.

Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X.N., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A., Sawasdivorn, S., Duangchinda, T., Dong, T., Rowland-Jones, S., *et al.* (2003). Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 9, 921-927.

Mongkolsapaya, J., Duangchinda, T., Dejnirattisai, W., Vasanawathana, S., Avirutnan, P., Jairungsri, A., Khemnu, N., Tangthawornchaikul, N., Chotiyarnwong, P., Sae-Jang, K., *et al.* (2006). T Cell Responses in Dengue Hemorrhagic Fever: Are Cross-Reactive T Cells Suboptimal? *J Immunol* 176, 3821-3829.

Moraes, M.O., Pacheco, A.G., Schonkeren, J.J., Vanderborght, P.R., Nery, J.A., Santos, A.R., Moraes, M.E., Moraes, J.R., Ottenhoff, T.H., Sampaio, E.P., *et al.* (2004). Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun* 5, 592-595.

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3, 13-22.

Murrell, S., Wu, S.C., and Butler, M. (2011). Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol Adv* 29, 239-247.

Murphy, B.R., and Whitehead, S.S. (2011). Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine\*. *Annual Review of Immunology* 29, 587-619.

Mustafa, A.S., Elbishbishi, E.A., Agarwal, R., and Chaturvedi, U.C. (2001). Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 30, 229-233.

Nasirudeen, A.M., Wong, H.H., Thien, P., Xu, S., Lam, K.P., and Liu, D.X. (2011). RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e926.

Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and 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.

Nogueira, R.M., Miagostovich, M.P., de Filippis, A.M., Pereira, M.A., and Schatzmayr, H.G. (2001). Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96, 925-926.

Oliphant, T., Nybakken, G.E., Engle, M., Xu, Q., Nelson, C.A., Sukupolvi-Petty, S., Marri, A., Lachmi, B.E., Olshevsky, U., Fremont, D.H., *et al.* (2006). Antibody recognition and neutralization determinants on domains I and II of West Nile Virus envelope protein. *J Virol* 80, 12149-12159.

Oliveira, R.M.d. (1998). A dengue no Rio de Janeiro: repensando a participação popular em saúde. *Cadernos de Saúde Pública* 14, S69-S78.

Opdal, S.H. (2004). IL-10 gene polymorphisms in infectious disease and SIDS. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42, 48-52.

Pacheco, A.G., Cardoso, C.C., and 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.

Pacheco, A.G., and Moraes, M.O. (2009). Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers* 27, 173-186.

Palucka, A.K. (2000). Dengue virus and dendritic cells. *Nat Med* 6, 748-749.

Pang, T., Cardoso, M.J., and Guzman, M.G. (2007). Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* 85, 43-45.

Pérez, A.B., García, G., Sierra, B., Alvarez, M., Vázquez, S., Cabrera, M.V., Rodríguez, R., Rosario, D., Martínez, E., Denny, T., *et al.* (2004). IL-10 levels in Dengue patients: Some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *Journal of Medical Virology* 73, 230-234.

Perez, A.B., Sierra, B., Garcia, G., Aguirre, E., Babel, N., Alvarez, M., Sanchez, L., Valdes, L., Volk, H.D., and Guzman, M.G. (2010a). Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* 71, 1135-1140.

Perez, A.B., Sierra, B., Garcia, G., Aguirre, E., Babel, N., Alvarez, M., Sanchez, L., Valdes, L., Volk, H.D., and Guzman, M.G. (2010b). Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Human Immunology* 71, 1135-1140.

Pierson, T.C., Xu, Q., Nelson, S., Oliphant, T., Nybakken, G.E., Fremont, D.H., and Diamond, M.S. (2007). The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. *Cell Host Microbe* 1, 135-145.

Raghupathy, R., Chaturvedi, U.C., Al-Sayer, H., Elbishbishi, E.A., Agarwal, R., Nagar, R., Kapoor, S., Misra, A., Mathur, A., Nusrat, H., *et al.* (1998). Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* 56, 280-285.

Reid-Lombardo, K.M., and Petersen, G.M. (2010). Understanding genetic epidemiologic association studies Part 1: fundamentals. *Surgery* 147, 469-474.

Rico-Hesse, R. (2007). Dengue virus evolution and virulence models. *Clin Infect Dis* 44, 1462-1466.

Rigau-Perez, J.G. (2006). Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis* 6, 297-302.

Rodriguez-Barraquer, I., Cordeiro, M.T., Braga, C., de Souza, W.V., Marques, E.T., and Cummings, D.A.T. (2011). From Re-Emergence to Hyperendemicity: The Natural History of the Dengue Epidemic in Brazil. *Plos Neglect Trop D* 5.

Roehrig, J.T., Bolin, R.A., and Kelly, R.G. (1998). Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology* 246, 317-328.

Rothman, A.L. (2004). Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 113, 946-951.

Rothman, A.L. (2011). Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* 11, 532-543.

Rothman, A.L., and Ennis, F.A. (1999). Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology* 257, 1-6.

Sakuntabhai, A., Turbpaiboon, C., Casademont, I., Chuansumrit, A., Lowhnoo, T., Kajaste-Rudnitski, A., Kalayanarooj, S.M., Tangnararatchakit, K., Tangthawornchaikul, N., Vasanawathana, S., *et al.* (2005). A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet* 37, 507-513.

Saluzzo, J.F., Cornet, M., Castagnet, P., Rey, C., and Digoutte, J.P. (1986). Isolation of dengue 2 and dengue 4 viruses from patients in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80, 5.

Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.-M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., *et al.* (1996). Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382, 722-725.

Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio de Janeiro -SES 2012. Relatório de Casos de Dengue. Disponível em <http://www.saude.rj.gov.br/imprensa-noticias/11030-relatorio-de-casos-de-dengue-semana-13-2012>. Recuperado em 09 de abril de 2012.

Schieffelin, J.S., Costin, J.M., Nicholson, C.O., Orgeron, N.M., Fontaine, K.A., Isern, S., Michael, S.F., and Robinson, J.E. (2010). Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. *Virology* 7, 28.

Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W., and Walsh, E.E. (1987). Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol* 68 ( Pt 3), 853-857.

Shao, N., Xu, B., Mi, Y.Y., and Hua, L.X. (2011). IL-10 polymorphisms and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 14, 129-135.

Shresta, S., Kyle, J.L., Snider, H.M., Basavapatna, M., Beatty, P.R., and Harris, E. (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. *J Virol* 78, 2701-2710.

Sierra, B., Perez, A.B., Vogt, K., Garcia, G., Schmolke, K., Aguirre, E., Alvarez, M., Kern, F., Kouri, G., Volk, H.D., *et al.* (2010). Secondary heterologous dengue infection risk: Disequilibrium between immune regulation and inflammation? *Cell Immunol* 262, 134-140.

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., *et al.* (2010). Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. *European Journal of Human Genetics* 18, 1221-1227.

Siqueira, J. B., Jr., C. M. Martelli, *et al.* (2005) Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis*, v.11, n.1, Jan, p.48-53.

Sosman, J.A., Verma, A., Moss, S., Sorokin, P., Blend, M., Bradlow, B., Chachlani, N., Cutler, D., Sabo, R., Nelson, M., *et al.* (2000). Interleukin 10-induced thrombocytopenia in normal healthy adult volunteers: evidence for decreased platelet production. *British Journal of Haematology* 111, 104-111.

Soundravally, R., and Hoti, S.L. (2008). Polymorphisms of the TAP 1 and 2 gene may influence clinical outcome of primary dengue viral infection. *Scand J Immunol* 67, 618-625.

Srikiatkachorn, A., and Green, S. (2010). Markers of dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol* 338, 67-82.

Stram, D.O. (2004). Tag SNP selection for association studies. *Genet Epidemiol* 27, 365-374.

Sudiro, T.M., Zivny, J., Ishiko, H., Green, S., Vaughn, D.W., Kalayanarooj, S., Nisalak, A., Norman, J.E., Ennis, F.A., and Rothman, A.L. (2001). Analysis of plasma viral RNA levels during acute dengue virus infection using quantitative competitor reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 63, 29-34.

Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J.L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L.P., Gluckman, J.C., *et al.* (2003). DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 197, 121-127.

Tang, Y., Kou, Z., Zhang, F., Yao, X., Liu, S., Ma, J., Zhou, Y., Zhao, W., Tang, X., and Jin, X. (2010). Both Viremia and Cytokine Levels Associate with the Lack of Severe Disease in Secondary Dengue 1 Infection among Adult Chinese Patients. *PLoS One* 5, e15631.

Tassaneeritthep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D.L., *et al.* (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 197, 823-829.

Teixeira, M.G., Costa, M.C., Coelho, G., and Barreto, M.L. (2008). Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14, 1663.

Teixeira, M.G., Costa Mda, C., Barreto, F., and Barreto, M.L. (2009a). Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica* 25 *Suppl 1*, S7-18.

Teixeira, M.G., Costa, M.d.C.N., Barreto, F., and Barreto, M.L. (2009b). Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 25, S7-S18.

Temporao, J.G., Penna, G.O., Carmo, E.H., Coelho, G.E., do Socorro Silva Azevedo, R., Teixeira Nunes, M.R., and da Costa Vasconcelos, P.F. (2011). Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 17, 938-940.

Thompson & Thompson. *Genética Médica*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p

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.

Tricou, V., Minh, N.N., Farrar, J., Tran, H.T., and Simmons, C.P. (2011). Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS neglected tropical diseases* 5, e1309.

Tsai, J.-J., Liu, L.-T., Chang, K., Wang, S.-H., Hsiao, H.-M., Clark, K.B., and Perng, G.C. (2012). The importance of hematopoietic progenitor cells in dengue. *Therapeutic Advances in Hematology* 3, 59-71.

Valdes, K., Alvarez, M., Pupo, M., Vazquez, S., Rodriguez, R., and Guzman, M.G. (2000). Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 856-857.

Vaughn, D.W., Green, S., Kalayanaroj, S., Innis, B.L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T.P., Raengsakulrach, B., Rothman, A.L., Ennis, F.A., *et al.* (2000). Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181, 2-9.

Vejbaesya, S., Luangtrakool, P., Luangtrakool, K., Kalayanaroj, S., Vaughn, D.W., Endy, T.P., Mammen, M.P., Green, S., Libraty, D.H., Ennis, F.A., *et al.* (2009). TNF and LTA gene,

allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. *J Infect Dis* 199, 1442-1448.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.

Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A.D., Watowich, S.J., Gubler, D.J., and Weaver, S.C. (2000). Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* 74, 3227-3234.

Wang, L., Chen, R.F., Liu, J.W., Lee, I.K., Lee, C.P., Kuo, H.C., Huang, S.K., and 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.

Ward, P.A. (2011). Do MDL-1 cells play a broad role in acute inflammation? *J Clin Invest* 121, 4234-4237.

Watson, A.A., Lebedev, A.A., Hall, B.A., Fenton-May, A.E., Vagin, A.A., Dejnirattisai, W., Felce, J., Mongkolsapaya, J., Palma, A.S., Liu, Y., *et al.* (2011). Structural flexibility of the macrophage dengue virus receptor CLEC5A: implications for ligand binding and signaling. *J Biol Chem* 286, 24208-24218.

Wei, Y.G., Liu, F., Li, B., Chen, X., Ma, Y., Yan, L.N., Wen, T.F., Xu, M.Q., Wang, W.T., and Yang, J.Y. (2011). Interleukin-10 gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma susceptibility: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 17, 3941-3947.

Wilder-Smith, A., Ooi, E.E., Vasudevan, S.G., and Gubler, D.J. (2010). Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. *Curr Infect Dis Rep* 12, 157-164.

World Health Organization. (2007). Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control: 2nd edition. (Geneva, World Health Organization).

World Health Organization. (2009). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control : new edition (Geneva, World Health Organization).

Wu, S.J., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J.R., Brachtel, E., Putvatana, R., Louder, M.K., Filgueira, L., Marovich, M.A., Wong, H.K., *et al.* (2000). Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* 6, 816-820.

Young, P.R., Hilditch, P.A., Bletchly, C., and Halloran, W. (2000). An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol* 38, 1053-1057.

Zivny, J., DeFronzo, M., Jarry, W., Jameson, J., Cruz, J., Ennis, F.A., and Rothman, A.L. (1999). Partial Agonist Effect Influences the CTL Response to a Heterologous Dengue Virus Serotype. *The Journal of Immunology* 163, 2754-2760.