



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ANA CAROLINE MELO DOS SANTOS

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS COM A
PROTEÇÃO E SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO E PROGRESSÃO DA DENGUE**

**MACEIÓ/AL
2017**

ANA CAROLINE MELO DOS SANTOS

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS COM A
PROTEÇÃO E SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO E PROGRESSÃO DA DENGUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestra em Ciências da Saúde.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Elaine Virgínia
Martins de Souza Figueiredo

Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Gomes de
Andrade

MACEIÓ/AL
2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S237a Santos, Ana Caroline Melo dos.
Associação de polimorfismos em genes de citocinas com a proteção e susceptibilidade à infecção e progressão da dengue / Ana Caroline Melo dos Santos. – 2017.
130 f. ; il.

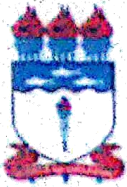
Orientadora: Elaine Virginia Martins de Souza Figueiredo.
Coorientador: Tiago Gomes de Andrade.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2017.

Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Dengue. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Interleucina-10. 4. TNF-alfa.
5. Interferon-gama. I. Título.

CDU: 577.15:616.98



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-901
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1851

Folha de Aprovação

Ana Caroline Melo dos Santos

Associação de polimorfismos em genes de citocinas com a proteção e susceptibilidade a infecção e progressão da dengue

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 14 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora

Elaine Virginia Martins de Souza Figueiredo

Prof.ª Dr.ª Elaine Virginia Martins de Souza Figueiredo (Orientador)

Carolinne de Sales Marques

Prof.ª Dr.ª Carolinne de Sales Marques - (UFAL)

Ana Soraya Lima Barbosa

Prof. Dr. Ana Soraya Lima Barbosa - (CESMAC)

À Deus para quem nada é impossível, a minha amada filha Ane Beatriz, a minha família e aos meus amigos companheiros de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente e acima de tudo, a quem devo minha vida e cada conquista e por me iluminar em todos os caminhos trilhados e por sempre me trazer graças. É em Ti que busco forças para superar cada obstáculo. Obrigada Senhor por ter ouvido minhas preces e ter tornado realidade mais esta conquista. És a minha Fortaleza e minha luz.

A minha família que sempre me apoiou nos meus estudos e nas decisões tomadas, obrigada por tudo.

A minha querida e amada filha Ane Beatriz pela paciência, carinho e compreensão nos diversos momentos que precisei me ausentar.

A minha querida orientadora Prof.^a Dr.^a. Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo meus sinceros agradecimentos pelo ensinamento, conselhos, oportunidade, pela acolhida, atenção, confiança, dedicação, amizade e constante incentivo durante todo o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade pela compreensão, ensinamentos, desenvolvimento crítico reflexivo e pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos Profs. Drs. Carol de Sales Marques e Alexandre Urban Borbely pelas considerações enriquecedoras feitas na qualificação do meu mestrado e por aceitarem compor a banca de defesa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, PPGCS, pela oportunidade e enriquecimento técnico científico proporcionado a uma enfermeira para a realização deste trabalho.

Ao secretário da Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Jhonatan Guedes, pela acessibilidade e paciências na resolutividade das demandas do PPGCS nos momentos que precisei.

Aos pacientes com dengue e os voluntários saudáveis que generosamente contribuíram com as amostras de sangue para o seguimento deste estudo. Meus sinceros agradecimentos.

Agradecimento especial, ao Laboratório de Análises Clínicas Dr. Edler Lins na pessoa de Rosângela pelas sorologias ofertadas para teste do grupo controle deste estudo, meu muito obrigada.

Ao Laboratório Municipal de Arapiraca, especialmente nas pessoas de Fernando e Kely e dos profissionais que se dispuseram em realizar as coletas dos pacientes com dengue durante a rotina.

A Prof^a Msc. Karol Fireman de Farias pela paciência, dedicação, o ensinar, o escutar, o estar perto, que desde a graduação tem me mostrado que és exemplo de docente compromissada com os alunos e exemplo a ser seguido pelos outros.

A Prof^a Dr^a Verônica de Medeiros Alves pela elucidação diante do meu aprendizado em uma nova metodologia ainda obscura na época.

Agradeço a Barbara Rayssa, Edilson Leite, Jean Moisés, Ailson Darlan, Alexandre Wendel, Adriely Ferreira, Denise Macedo, Rubens Pereira, Susana Paiva e William Miguel por todo o apoio, pelas buscas incessantes dos pacientes e pelas noites de sono em laboratório para finalização desta pesquisa.

Aos meus colegas de pós-graduação Mayara, Luiz, Maria, Abel, Aline, Diego e Daniel pelo enriquecimento como profissional, pelas risadas e pela amizade adquirida no decorrer do mestrado.

Aos meus queridos amigos irmãos que adquiri na universidade Alex Sampaio, Elis Mayara, Gilmar Ferreira, Imaculada Pereira, Jackson Santana, Jane Carla, Leilane Camila, Roberta Oliveira e Reudson Douglas. Meu muito obrigado por todos os momentos de companheirismo!!!

Aos funcionários da UFAL que contribuíram indireta ou diretamente para a consolidação deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL) pelo financiamento do projeto que permitiu a execução desta pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

Meu Muito obrigado!!!

SALMO 91

*Você que habita ao amparo do Altíssimo, e vive à sombra do Onipotente,
Diga a Javé: "Meu refúgio, minha fortaleza, meu Deus, eu confio em ti!"
Ele livrará você do laço do caçador, e da peste destruidora.
Ele o cobrirá com suas penas, e debaixo de suas asas você se refugiará. O braço dele é escudo e
armadura. Você não temerá o terror da noite, nem a flecha que voa de dia,
Nem a epidemia que caminha nas trevas, nem a peste que devasta ao meio-dia.
Caíam mil ao seu lado e dez mil à sua direita, a você nada atingirá.
Basta que você olhe com seus próprios olhos, para ver o salário dos injustos,
Porque você fez de Javé o seu refúgio e tomou o Altíssimo como defensor.
A desgraça jamais o atingirá, e praga nenhuma vai chegar à sua tenda,
Pois ele ordenou aos seus anjos que guardem você em seus caminhos.
Eles o levarão nas mãos, para que seu pé não tropece numa pedra.
Você caminhará sobre cobras e víboras, e pisará leões e dragões.
Eu o livrarei, porque a mim se apegou.
Eu o protegerei pois conhece o meu nome. Ele me invocará, e eu responderei.
Na angústia estarei com ele. Eu o livrarei e glorificarei.
Vou saciá-lo de longos dias e lhe farei ver a minha salvação*

RESUMO

Dengue é a arbovirose de maior prevalência no mundo. Diversos fatores foram associados com a susceptibilidade à dengue destacando-se a genética do sistema imune do hospedeiro que pode predispor ao agravamento do quadro clínico. Polimorfismos em genes da resposta imune têm sido associados tanto à proteção quanto a susceptibilidade para o desenvolvimento de casos de dengue em diferentes populações. Diante deste contexto, o objetivo desta pesquisa foi investigar o papel de fatores genéticos do sistema imune inato na infecção e evolução da patogenia da dengue. Realizou-se um estudo do tipo caso-controle que incluiu 127 pacientes diagnosticados laboratorialmente com dengue (78 com febre da dengue e 49 com febre da dengue hemorrágica) e 135 controles saudáveis. Os SNPs nos genes *TNFA* (-308), *IL-10* (-819) e *IFNG* (+874) foram genotipados por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) e por PCR-ARMS. Para análise estatística foi utilizado o software on-line gratuito SNPStats e o programa BioEstat versão 5.0. As frequências genotípicas foram testadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg sendo esta enquadrada dentro dos padrões de equilíbrio como determinado pelo mesmo. Não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas dos SNPs nos genes *TNFA* (-308) e *IFNG* (+874). Entretanto o alelo C da *IL-10* (-819) foi associado com proteção contra o desenvolvimento de febre hemorrágica da dengue quando comparado ao grupo controle (OR com IC 95% = 0.56 [0.34 - 0.9]; p = 0.028). Diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre as distribuições genotípicas do gene *TNFA* (-308) no modelo dominante (GA+AA vs GG) para proteção a febre da dengue, quando comparado o grupo febre da dengue (OR com IC 95% = 0.45 [0.20 - 1.00]; p=0.043) com o grupo controle. Em relação ao SNP no gene *IL-10* (-819), o genótipo T/T foi associado significativamente com a febre da dengue no modelo codominante (OR com IC 95% = 4.21 [1.45-12.25]; p=0.027) e recessivo (OR com IC 95% = 3.82 [1.38-10.59]; p=0.0089). Interessantemente, o genótipo C/T no modelo sobredominante (OR com IC 95% = 2.10 [1.01-4.38]; p=0.047) foi associado com a progressão para a dengue hemorrágica. Quanto ao gene *IFNG* (+874), foi identificada uma associação significativa entre o genótipo T/A com proteção à dengue quando comparado o grupo controle e DEN no modelo codominante (AA; TA; TT) (OR com IC 95% = 0.45 [0.24-0.83]; p=0.026), dominante (AA vs TA+TT) (OR com IC 95% = 0.54 [0.30-0.96]; p = 0.033) e sobredominante (TA vs AA+TT) (OR com IC 95% = 0.46 [0.26-0.82]; p=0.0071). Quando estratificado pela classificação clínica em febre da dengue e febre da dengue hemorrágica, no modelo sobredominante houve associação significativa para proteção contra o desenvolvimento da dengue (OR com IC 95% = 0.46 [0.24-0.89]; p=0.02) e do quadro hemorrágico (OR com IC 95% = 0.43 [0.19-0.95]; p=0.034). Quando os SNPs aqui estudados foram analisados em combinação, foi identificado que a combinação G/T/A (OR com IC 95% = 2.95 [1.18-7.41]; p=0.022) foi associado estatisticamente com a susceptibilidade à febre da dengue e a combinação G/C/T (OR com IC 95% = 0.28 [0.08 - 0.90]; p=0.035) com proteção contra o desenvolvimento da febre da dengue hemorrágica. Nossos resultados sugerem que polimorfismos genéticos envolvidos com moléculas do sistema imunológico podem afetar a susceptibilidade ou promover proteção para fenótipos clínicos da dengue e podem ser considerados como bons marcadores prognósticos.

Palavras-chave: Dengue. Polimorfismo genético. Interleucina-10. TNF-alfa. Interferon-gama.

ABSTRACT

Dengue is the most prevalent arboviruses in the world. Several factors have been associated with susceptibility to dengue, highlighting the genetics of the host immune system that may predispose to clinical severity. Polymorphisms in immune response genes have been associated with both protection and susceptibility to the development of dengue cases in different populations. In this context, the objective of this research was to investigate the role of genetic factors of the innate immune system in the infection and evolution of the dengue pathogenesis. We conducted a study of the case-control which included 127 patients diagnosed with dengue laboratory (78 with dengue fever and 49 with dengue hemorrhagic fever) and 135 healthy controls. SNPs in the TNFA (-308), IL-10 (-819) and IFNG (+874) genes were genotyped by real-time polymerase chain reaction (qPCR) and by ARMS-PCR. For statistical analysis, the free online software SNPStats and the BioEstat version 5.0 software were used. The genotypic frequencies were tested for the Hardy-Weinberg equilibrium and this was framed within the equilibrium standards as determined by the same. There was no statistically significant difference in the allelic frequencies of the SNPs in the TNFA (-308) and IFNG (+874) genes. However, the C allele of IL-10 (-819) was associated with protection against the development of dengue hemorrhagic fever when compared to the control group (OR with 95% CI = 0.56 [0.34 - 0.9]; $p = 0.028$). Statistically significant difference was found between the genotypic distributions of the TNFA gene (-308) in the dominant model (GA + AA vs GG) for protection against dengue fever, when compared to the dengue fever group (OR with 95% CI = 0.45 [0.20 - 1.00], $p = 0.043$) with the control group. The T/T genotype was significantly associated with dengue fever in the codominant model (OR with 95% CI = 4.21 [1.45-12.25], $p = 0.027$) and recessive (OR with 95% CI = 3.82 [1.38-10.59], $p = 0.0089$). Interestingly, the C/T genotype in the overdominant model (OR with 95% CI = 2.10 [1.01-4.38]; $p = 0.047$) was associated with progression to dengue hemorrhagic fever. As for the IFNG gene (+874), a significant association was identified between the T / A genotype with dengue protection when compared to the control group and DEN in the codominant model (AA; TA; TT) (OR with 95% CI = 0.45 [(OR = 95% CI = 0.54 [0.30-0.96], $p = 0.033$) and overdominant (TA vs AA + TT) (OR with 95% CI) % = 0.46 [0.26-0.82], $p = 0.0071$). When stratified by clinical classification in dengue fever and dengue hemorrhagic fever, in the overdominant model there was a significant association for protection against dengue development (OR with 95% CI = 0.46 [0.24-0.89], $p = 0.02$) and dengue hemorrhagic fever (OR with 95% CI = 0.43 [0.19-0.95], $p = 0.034$). When the SNPs studied here were analyzed in combination, it was identified that the combination G/T/A (OR with 95% CI = 2.95 [1.187-4.1]; $p = 0.022$) was statistically associated with susceptibility to dengue fever and combination G/C/T (OR with 95% CI = 0.28 [0.08 0.90], $p = 0.035$) with protection against the development of hemorrhagic dengue fever. Our results suggest that genetic polymorphisms involved with molecules of the immune system may affect susceptibility or promote protection for clinical phenotypes of dengue and can be considered as good prognostic markers.

Keywords: Dengue. Genetic polymorphism. Interleukin-10. TNF-alpha. Interferon-gamma.

LISTADE FIGURAS

Figura 1 - Incidência de dengue nas Américas entre 1980 e 2010.	21
Figura 2 - Incidência dos casos de dengue no estado de Alagoas entre 1996 a 2014.	23
Figura 3 - Genoma do vírus da dengue.....	26
Figura 4 - Patogênese da infecção pelo vírus da dengue de acordo com a fase da doença.	31
Figura 5 - Esquematização dos SNPs em genes de citocinas e seus possíveis efeitos.	33
Figura 6 - Localização do gene TNF no complexo HLA de classe III.....	34
Figura 7 - Localização do gene IL-10 no cromossomo 1.....	36
Figura 8 - Localização do gene IFNG no cromossomo 12.....	38
Figura 9 - Curso do tempo da dengue e a adequação do diagnóstico.....	39
Figura 10 - Exemplo da determinação e amplificação genotípica por qPCR.....	46
Figura 11 - Exemplo da determinação genotípica por PCR –ARMS.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características gerais dos pacientes com dengue e controles recrutados.	44
Tabela 2 – Sequências dos primers utilizados para as genotipagens do SNP no gene IFNG +874T/A.....	47
Tabela 3 - Distribuição genotípica e alélica do SNP-308G/A do gene <i>TNFA</i> em pacientes com dengue e controles	50
Tabela 4 - Associação alélica e dos modelos gênicos do SNP -308G/A do gene <i>TNFA</i>	51
Tabela 5 - Distribuição genotípica e alélica do SNP -819C/T do gene <i>IL-10</i> em pacientes com dengue e controles	52
Tabela 6 - Associação alélica e dos modelos gênicos do SNP -819C/T do gene <i>IL-10</i>	53
Tabela 7 - Distribuição genotípica e alélica do SNP +874T/A do gene IFNG em pacientes com dengue e controles	54
Tabela 8 - Associação alélica e dos modelos gênicos do SNP +874T/A do gene IFNG	55
Tabela 9 - Combinações dos SNPs dos genes <i>TNFA</i> -308G/A, <i>IL-10</i> -819C/T, IFNG +874T/A.....	56
Tabela 10 - Associação das combinações dos genes <i>TNFA</i> -308G/A, <i>IL-10</i> -819C/T, IFNG +874T/A.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ADE	antibody dependent enhancement
AL	Alagoas
ARMS-PCR	Amplification-refractory mutation system
bp	Pares de base
C	Capsídeo
°C	Celsius
CD	Células dendríticas
d. C.	Depois de Cristo
DC-SIGN	Dendritic Cellspecific Intercellular Adhesion Molecule 3 Grabbing Nonintegrin
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DENV	Vírus da Dengue
DENV1	Vírus da Dengue sorotipo 1
DENV2	Vírus da Dengue sorotipo 2
DENV3	Vírus da Dengue sorotipo 3
DENV4	Vírus da Dengue sorotipo 4
DENV5	Vírus da Dengue sorotipo 5
DP	Desvio padrão
E	Glicoproteína do envelope viral
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EUA	Estados Unidos da América
FD	Febre da dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
Fc	Fixação de complemento
G	Guanina
HLA	Human leucocytes antigen/ antígeno leucocitário humano
IC	Intervalo de confiança
IDO	Indolamina 2,3 dioxigenase

IFN γ /IFNG	Interferon gama
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IH	Inibição de hemaglutinação
IL - 1 β	Interleucina 1 β
IL - 2	Interleucina 2
IL - 5	Interleucina 5
IL - 4	Interleucina 4
IL - 6	Interleucina 6
IL - 10	Interleucina 10
IL - 12	Interleucina 12
IL - 13	Interleucina 13
IL - 18	Interleucina 18
Kb	Kilobases
Km ²	Quilômetro quadrado
kDa	Kilodaltons
LABMEG	Laboratorio de Biologia Molecular e Expressão Gênica
M	Proteína da membrana
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MgCL ₂	Cloreto de magnésio
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
Mm ³	Milímetros cúbicos
Nº	Número
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônio
NaCL	Cloreto de sódio
NASBA	Nucleic acid sequence based amplification
Nm	Nanômetro
Nk	Natural killer
NS1Ag	Antígeno NS1
NS	Proteína Viral Não Estrutural
OPAS	Organização Panamericana de Saúde

OR	Odds ratio
ORF	Open Reading Frame
pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Real time Polymerase Chain Reaction
RR	Roraima
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	Ácido Ribonucleico
SCD	Síndrome do choque da dengue
SESAU	Secretaria de Saúde
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNP	Single nucleotide polymorphism
T	Timina
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TGN	TransGolgi
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α /TNFA	Fator de necrose tumoral alfa
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
x^2	Qui – quadrado
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Aspectos histórico - epidemiológicos da dengue	20
2.1.1	Dengue nas Américas	20
2.1.2	Dengue no Brasil	22
2.1.3	Dengue em Alagoas.....	22
2.2	Transmissão	23
2.3	Vetor	24
2.4	Vírus da dengue – DENV	25
2.5	Ciclo viral	26
3	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	27
3.1	Dengue clássica ou febre da dengue.....	27
3.2	Febre hemorrágica da dengue e síndrome de choque da dengue	27
3.3	Nova classificação	28
3.4	Infecções assintomáticas	28
3.5	Manifestações atípicas.....	28
4	IMUNOPATOGÊNESE.....	30
4.1	Polimorfismos em genes envolvidos na regulação do sistema imune e dengue.....	32
4.1.1	Polimorfismo do gene <i>TNF</i> alfa (<i>TNFA</i>)	34
4.1.2	Polimorfismo do gene interleucina-10 (<i>IL-10</i>)	35
4.1.3	Polimorfismo do gene Interferon gama (<i>IFNG</i>)	37
5	MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO VIRAL	38
5.1	Isolamento viral	39
5.2	Amplificação do genoma ou amplificação de ácidos nucleicos.....	39
5.3	Diagnósticos sorológicos.....	40
5.4	Biossensores.....	40
6	TERAPÊUTICA	41
7	PREVENÇÃO	41
8	OBJETIVOS	42
8.1	OBJETIVO GERAL	42
8.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
9	MATERIAL E MÉTODOS	43

9.1	Delineamento do estudo	43
9.2	População e local do estudo	43
9.3	Crêterios de inclusão e exclusão.....	44
9.4	Extra�o de DNA genômico.....	45
9.5	Eletroforese em gel de agarose	45
9.6	Genotipagem dos genes das citocinas <i>TNFA</i> -308G/A e <i>IL-10</i> -819C/T	45
9.7	Genotipagem do gene da citocina <i>IFNG</i> +874T/A.....	47
9.8	Análises estatísticas	48
9.9	Aspectos �ticos	49
10	RESULTADOS	50
10.1	Frequência genotípica e alélica do SNP -308G/A do gene <i>TNFA</i>	50
10.2	Frequência genotípica e alélica do SNP -819C/T do gene <i>IL-10</i>	52
10.3	Frequência genotípica e alélica do SNP +874T/A do gene <i>IFNG</i>	54
10.4	Combina�es dos genes <i>TNFA</i> , <i>IL-10</i> , <i>IFNG</i>	56
11	DISCUSSÃO	58
12	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO	74
	APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL 1.....	89
	APÊNDICE C – ARTIGO ORIGINAL 2.....	112
	ANEXO A - PROTOCOLO DE EXTRA�O DE DNA GENÔMICO POR NaCl	126
	ANEXO B - PARECER DE APROVA�O DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.	127
	ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	128

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a dengue resulta em consequências significativas no que envolve o âmbito da saúde, economia e os aspectos sociais das populações em áreas endêmicas. Estima-se que dois terços da população mundial se encontram em risco de desenvolver dengue, com 50 milhões de pessoas infectadas anualmente por um dos quatro sorotipos (DENV-1 a DENV-4), destas 500 mil evoluem para o quadro com complicações a nível sistêmico (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Em um estudo cartográfico foi identificado um panorama diferente que estimou que cerca de 390 milhões de casos entre sintomáticos e assintomáticos ocorrem no mundo (BHATT et al., 2013).

A dengue abrange manifestações clínicas que envolve desde sintomas inaparentes (assintomático) até as formas graves que pode culminar em óbito. Os pacientes com dengue apresentam febre, cefaleia, mialgia, artralgia e eritema cutâneo, que pode persistir uma semana. A forma mais grave da doença é caracterizada pela presença de hemorragias, hipotensão, trombocitopenia e extravasamento plasmático e manifestações neurológicas associados com a sintomatologia clássica da doença (HUY et al., 2013). A virulência, associada à história de infecção por flavivírus, idade, sexo e o genótipo do hospedeiro parecem ser determinantes da evolução desta patologia (GUZMÁN; KOURÍ, 2002).

Estudos têm demonstrado que a resposta imune do hospedeiro desempenha um papel crucial na patogênese da doença (COSTA et al., 2013; GUABIRABA; RYFFEL, 2014; LAN; HIRAYAMA, 2011; SINGLA et al., 2016). As consequências da infecção pelo vírus da dengue associado ao sistema imune do hospedeiro, o qual exerce um importante papel ao longo de todo o processo da infecção, tem sido objeto de estudos por sofrer influência da susceptibilidade para a progressão da doença. Neste contexto diversas pesquisas têm demonstrado que polimorfismos em determinados genes de citocinas predisõem os pacientes a complicações com a infecção pela dengue (ALAGARASU et al., 2013, 2015; FEITOSA et al., 2016a; FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2004; FERNANDO et al., 2015; SAM et al., 2015; XAVIER-CARVALHO et al., 2013).

A resposta inflamatória contra o vírus da dengue desempenha um papel importante na patogênese (COSTA et al., 2013). As discrepâncias em relação às manifestações clínicas de pacientes com febre da dengue e febre hemorrágica da dengue podem ser decorrentes de respostas inflamatórias diferentes. Estudos demonstram que os níveis de mediadores da inflamação, como TNF- α , IFN- γ , IL-8 e IL-10 são elevados em casos com sinais de

agravamento da doença (BECERRA et al., 2009; MALAVIGE et al., 2013; PANDEY et al., 2015; PÉREZ et al., 2004; RATHAKRISHNAN et al., 2012).

A produção de citocinas pode ser mediada por polimorfismos que estão associados com a susceptibilidade a infecção (ABRAHAM; KROEGER, 1999; DE MAAT et al., 2004). As diferenças observadas na expressão das proteínas ocorrem como resultado de variações genéticas funcionais em diversas regiões do gene, de modo a promover um desequilíbrio na produção de citocinas e assim originar uma variabilidade na resposta imune entre indivíduos. As variações mais comuns observadas no seguimento do genoma humano são os polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês: *single nucleotides polymorphism* - SNP), há evidências de que os SNPs estão presentes nos genes de várias moléculas envolvidas no processo inflamatório, o que afeta a expressão gênica, estrutura e função das proteínas codificadas pelos genes (OLLIER, 2004). A presença de certos alelos e genótipos podem contribuir para a proteção, susceptibilidade ou resistência do hospedeiro a várias infecções, assim como pode influenciar na gravidade das doenças infecciosas e na permanência dos sintomas de uma infecção.

Polimorfismos genéticos de muitas moléculas da resposta imune inata foram associados com a febre da dengue hemorrágica. Neste contexto o estudo de Perez (2010) foi crucial para as investigações sobre polimorfismos genéticos de citocinas e dengue, o qual mencionou que vários distúrbios de um único gene (*TNFA*) estavam envolvidos nas alterações provocadas pela dengue na população cubana demonstrando que o *TNFA*, a *IL-10* e outras citocinas possuem papel significativo na progressão da dengue, o que configura estas como um campo de investigação importante. Entretanto, diferenças no perfil genético em genes de citocinas em pacientes com dengue foram identificadas considerando as diferentes etnias nas populações da Malásia (SAM et al., 2015), Venezuela (FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2004) e no Sri Lanka (FERNANDO et al., 2015).

No Brasil o cenário de pesquisas genéticas para a dengue mostra uma discrepância em vista as características relacionadas a miscigenação presente fortemente na população. Três pesquisas evidenciam essa perspectiva. Um estudo caso-controle realizado na região sudeste com crianças que desenvolveram febre hemorrágica da dengue não identificou associação do gene *TNFA* e *IL-10* com a severidade da doença (XAVIER-CARVALHO et al., 2013). Um coorte realizado na mesma região geográfica identificou que o alelo A do gene *TNFA* esteve associado com a não persistência dos sintomas em pacientes convalescentes (DETTOGNI et al., 2015). Enquanto, que na região norte outro estudo caso-controle conduzido com adultos identificou uma correlação entre os SNPs dos genes *TNFA* (-308G/A) e *IFNG* com a proteção

para a infecção (FEITOSA et al., 2016). Ainda não há relatos publicados de pesquisas em outras regiões do Brasil, o que diante desta particularidade se torna relevante a realização de estudos de associação genética.

A investigação de SNPs em genes de citocinas envolvidos na resposta imune inata pode auxiliar na exploração do conhecimento da fisiopatologia da infecção pela dengue e na criação de métodos preventivos e terapias mais efetivos considerando as particularidades destes pacientes. Assim, a determinação de biomarcadores genéticos envolvidos na patogênese da infecção aqui exposta permitirá determinar a susceptibilidade em uma população de Alagoas, Brasil, para infecção e progressão em casos mais grave. Além disso, os dados aqui descritos servirão de modelo básico para outros estudos de associação.

Neste contexto, a identificação do perfil genético específico de cada população por ser diferente em diferentes regiões geográficas permite conhecer os aspectos particulares de cada grupo étnico. Portanto, considerando a hipótese de que polimorfismos genéticos presentes no sistema imune inato humano produzem respostas diferenciais à infecção e conseqüentemente estão associados com uma maior susceptibilidade ou a progressão para a gravidade da doença, a presente pesquisa teve como finalidade investigar polimorfismos genéticos das citocinas *TNFA* (-308G/A), *IL-10* (-819) e *IFNG* (+874) na população do município de Arapiraca, em indivíduos com infecção pelo vírus da dengue e em pessoas não infectadas (saudáveis).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos histórico - epidemiológicos da dengue

A palavra “dengue” tem origem hispânico-caribenha, este termo começou a ser utilizado a partir de 1827 para configurar todas as síndromes febris que acometiam endemicamente as populações da época (GUBLER, 1997). Dentre as evidências sugerindo a existência desta doença, a mais antiga é a que foi publicada por uma enciclopédia chinesa no século III durante a dinastia Chin, datada de 265-420 d.C. (NORMILE, 2013). Entre os anos de 1779 e 1780 nos continentes Asiático, Africano e Norte Americano foram descritos os primeiros relatos de epidemias que provavelmente teriam sido causadas pelo vírus da dengue. Mas, foi Benjamin Rush, no curso de uma epidemia na Filadélfia (EUA) ocorrida em 1780, quem descreveu minuciosamente a doença, inclusive utilizando o termo “*break-bone fever*” (em português “febre quebra ossos”) (BRATHWAITE DICK et al., 2012).

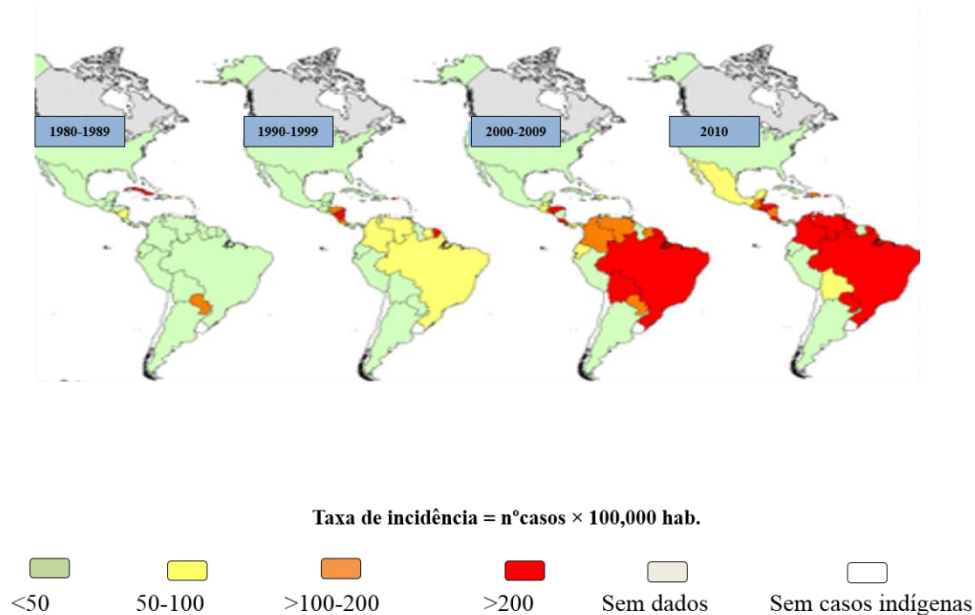
A vinda de escravos da África, no século XVIII, propiciou a disseminação do *Aedes aegypti* para os demais continentes e as epidemias de dengue tornaram-se mais frequentes. Após a Segunda Guerra Mundial ficou evidente uma mudança no comportamento da doença. Diversos fatores implicaram para tal cenário variando desde o crescimento populacional até o aumento das viagens comerciais entre culminando na expansão geográfica do vetor e do vírus (GUBLER, 1997). Nas Filipinas (1953/54) e em Bangkok (1958), ocorreram os primeiros surtos de febre hemorrágica da dengue documentados. A partir de então, casos de febre hemorrágica da dengue passaram a ser frequentes no sudeste asiático nas décadas posteriores, expandindo-se para regiões como Índia e China aumentando exponencialmente o número de epidemias e a circulação dos diferentes sorotipos e conseqüentemente em alterações no panorama epidemiológico (MARTINEZ-TORRES, 1990).

2.1.1 Dengue nas Américas

A partir do século XIX, relatos sobre infecções oriundas da dengue foram comuns em cidades portuárias do Caribe e nas Américas do Norte, Central e do Sul em que a atividade comercial era prevalente (GUZMAN; KOURI, 2003; HALSTEAD, 2006). Em 1818 um surto de dengue acometeu a população peruana e registrou mais de cinquenta mil casos (SCHNEIDER, 2001). Durante 1827 e 1828 uma epidemia de grande curso envolvendo o Caribe e o Golfo do México foram relatados com início nas Ilhas Virgens e estendendo-se para Cuba, Jamaica, Colômbia, Venezuela e algumas cidades portuárias do sul dos Estados

Unidos e México (BRATHWAITE DICK et al., 2012; EHRENKRANZ et al., 1971). Evidências de surtos no Brasil foram relatadas em 1845 e 1849. Sendo a partir de 1980, surtos de caráter epidêmico foram notificadas em vários países: no Brasil, Bolívia, Paraguai, Equador, Peru e Cuba (PORTO, 2014). A Figura 1 representa a evolução da incidência de dengue na região das Américas entre os anos de 1980 e 2010.

Figura 1 - Incidência de dengue nas Américas entre 1980 e 2010



Fonte: Adaptado de Organização Pan-americana de Saúde, 2011.

A transmissão do vírus da dengue (DENV) nas Américas foi interrompida devido a campanhas de erradicação do mosquito vetor na região entre 1960 e 1970. Entretanto, fatores como a descontinuidade nas campanhas de erradicação, urbanização acelerada e a capacidade de sobrevivência do vetor contribuíram para a reemergência da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Em 1981, o DENV-4 foi introduzido no continente Americano e, durante esta mesma década, ocorreu em Cuba, a primeira epidemia de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque da Dengue (SCD) das Américas, causada pelo DENV-2. Nesta epidemia foram notificados mais de 300 mil casos com aproximadamente 116 mil hospitalizações e 158 mortes (KOURI, 1986; GUBLER, 2006). Entre os anos de 1981 e 1996 foram registrados 42 mil casos de febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue distribuídos em cerca de 30 países. A segunda maior epidemia de FHD e SCD das Américas foi oriunda da Venezuela com aproximadamente 22 mil casos, onde foram isolados os sorotipos: DENV-1, DENV-2 e DENV-4 (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 1997).

2.1.2 Dengue no Brasil

Relatos da dengue no Brasil iniciaram-se em 1946, com registro de surtos nos estados do Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco e em outras localidades do País (MARZOCHI et al., 1998; TADEU; FIGUEIREDO, 2003). Entretanto foi em 1981, que houve a notificação do primeiro caso laboratorialmente confirmado de dengue com os sorotipos 1 e 4 no Estado de Roraima (RR). Posteriormente em 1986, um surto epidêmico de DENV-1 ocorreu no Estado do Rio de Janeiro e foi seguido por diversas epidemias em cidades com grandes aglomerados populacionais das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil (HALSTEAD, 1988; SIQUEIRA et al., 2005).

O número de casos de febre da dengue (FD) atingiu o pico epidêmico em 1987 e 1991, possivelmente devido a introdução de diferentes sorotipos no cenário epidemiológico brasileiro (DENV-1 e DENV-2, respectivamente). Os primeiros casos de FHD foram confirmados em 1990, depois que o sorotipo DENV-2 foi introduzido no Brasil. Durante a década seguinte, 893 casos confirmados de FHD com 44 óbitos ocorreram, sendo que 75% destas mortes incidiram no Estado do Rio de Janeiro. Entre 2001-2002, foi detectado um aumento no número de casos de FHD com taxas de incidência de 2,9/100.000 hab. e 12,9/100.000 hab. em 2001 e 2002 respectivamente (SIQUEIRA et al., 2005).

De acordo com o relatório da Organização Pan-americana de Saúde (OPAS, 2016) sobre número de casos notificados de dengue e dengue grave nas Américas, no decorrer de 2016, dentre todos os países que compõem o Cone Sul, o Brasil foi o país que mais notificou casos de dengue nas Américas notificando 1.452,284 de registros suspeitos de dengue, destes 272.419 mil casos foram confirmados laboratorialmente atingindo uma taxa de incidência de 105.09 a cada 100 mil habitantes. O Brasil também se destacou em relação a notificação de dengue severa em que foram registrados 785 casos e confirmados 581 mortes oriundas da infecção por dengue.

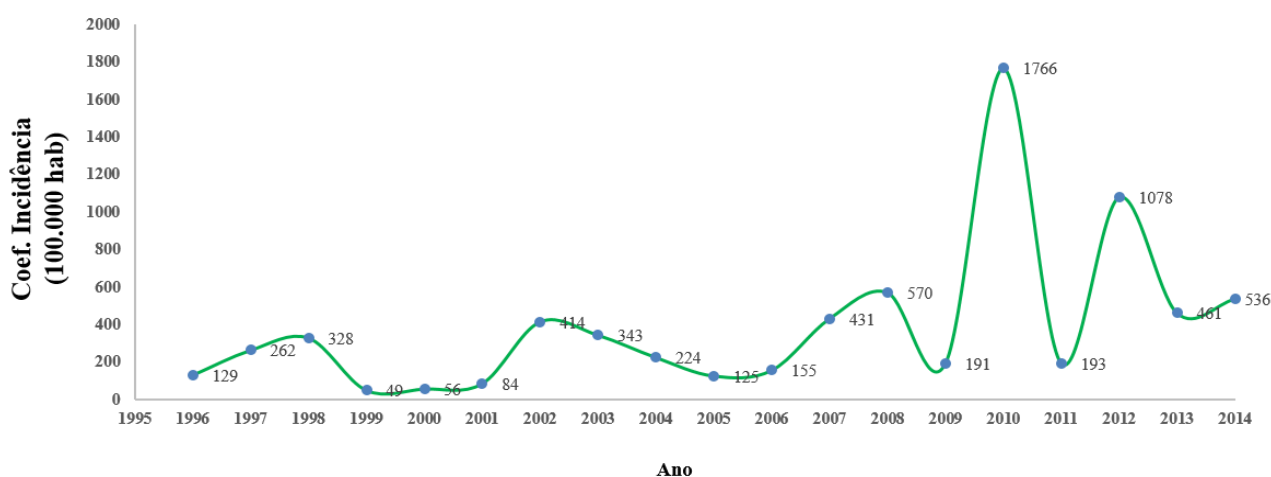
2.1.3 Dengue em Alagoas

O estado de Alagoas possui 102 municípios e uma extensão territorial de 27.779,343 km² com um aglomerado populacional de aproximadamente 3.120,494 habitantes. Há a predominância de duas categorias de clima: o clima do tipo semiárido que é típico do sertão alagoano (sendo predominante em grande parte do território) e o clima tropical úmido (ocorre na costa alagoana com índices pluviométricos mais elevados). A temperatura média anual é em torno de /24°C (IBGE, 2010).

Até a 52ª semana epidemiológica (Nº: 52/2014 de 12 de janeiro de 2015), Alagoas registrou 16.731 casos suspeitos de dengue, 388 casos suspeitos de dengue com sinais de alarme e dengue grave (um aumento em comparação a 2013 de cerca de 150%) e 06 óbitos confirmados. Quando analisados a faixa etária e o gênero mais acometido por dengue com sinais de alarme e dengue grave predominantemente foram acometidos indivíduos da faixa etária de 20 a 39 anos (42,01%) e o gênero feminino (54,38%).

De acordo com a Secretaria de Estado da Saúde (SESAU, 2014), o vetor da dengue infesta todos os municípios alagoanos e os quatro sorotipos circulam o território, estes foram introduzidos em 1986 (DENV-1), 1991 (DENV-2), 2002 (DENV-3) e 2012 (DENV-4). Em relação à incidência de dengue no estado entre 1996 até 2014 pode-se perceber picos epidêmicos de 1996 a 2011 observados nos anos de 1998, 2002, 2003, 2007, 2008, 2010, 2012 e 2013 como representado na Figura 2.

Figura 2 - Incidência dos casos de dengue no estado de Alagoas entre 1996 a 2014



Fonte: Adaptado de Secretaria Estadual de Saúde (SESAU) de Alagoas/SINAN.

Nota: Dados de 2014 sujeitos à alteração.

2.2 Transmissão

A transmissão da dengue acontece quando a fêmea do mosquito adquire o vírus ao picar um indivíduo infectado durante a fase de viremia e após um período de replicação no mesentério do mosquito (período de incubação extrínseco) que varia entre oito a doze dias. Posteriormente, o vírus migra para as glândulas salivares, e a partir deste momento é que o vetor está pronto para transmitir a doença a outros indivíduos, até o final do seu ciclo de vida (6-8 semanas) (JESSIE et al., 2004).

Além destas, outras formas têm sido evidenciadas na literatura. A transmissão vertical foi identificada em diversos estudos realizados na Tailândia, Brasil, Polinésia, Índia e em outras regiões (ARYA; AGARWAL, 2014; GUZMAN; KOURI, 2003; MAROUN et al., 2008; PHONGSAMART et al., 2008; RIBEIRO et al., 2013). A transmissão por meio de transplante (JOOB; WIWANITKIT, 2014; WEERAKKODY et al., 2014) e por contato com agulhas ou transfusão sanguínea ocorrem, embora em menor proporção (RAMOS, 2008; WENDEL; LEVI, 2008).

2.3 Vetor

A primeira comprovação de que a transmissão da dengue foi oriunda de mosquitos é a documentada por Graham em 1903, posteriormente Bancroft em 1906 concluiu em um experimento com voluntários que o *Aedes aegypti* era o vetor da dengue (GUBLER, 2014 apud GRAHAM, 1903; BANCROFT, 1906). O *Aedes (Stegomyia) aegypti* é a principal espécie transmissora do vírus da dengue em humanos como também é responsável por ciclos endêmicos e epidêmicos em centros urbanos de regiões tropicais e subtropicais nos continentes Asiático, Américas, África e regiões orientais do Mediterrâneo (GUBLER, 1998; GUBLER, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; SIMMONS, 2012). Outras espécies do subgênero *Stegomyia* (*Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes scutellaris*) também foram mencionados como vetores em regiões rurais (BRAGA; VALLE, 2007 apud BANCROFT, 1906; RODHAIN, 1997).

O *Aedes aegypti* é um mosquito que possivelmente possui ascendências na África. Originalmente foi referido no Egito, o que posteriormente conferiu o seu nome específico (BRAGA; VALLE, 2007 apud NELSON, 1986; CHRISTOPHERS, 1960). Provavelmente este vetor foi introduzido no território das Américas através das excursões europeias ao Novo Mundo (MARZOCHI et al., 1998). Em território brasileiro, a identificação da presença do *Aedes aegypti* foi realizada por Lutz (1898) e por Ribas (1899) (FRANCO, 1969).

O habitat do *Aedes aegypti* está relacionado às condições domiciliares em vista o modo de vida da população humana nos centros urbanos. Entretanto, há evidências de que o mosquito também possa se desenvolver em ambientes com elevados níveis de poluição ou esgoto doméstico, onde há alta concentração de material orgânico (BESERRA et al., 2009), assim observa-se que esta espécie possui uma elevada capacidade de adaptação as condições ambientais (CASTRO JR. et al., 2013; JANSEN; BEEBE, 2010).

2.4 Vírus da dengue – DENV

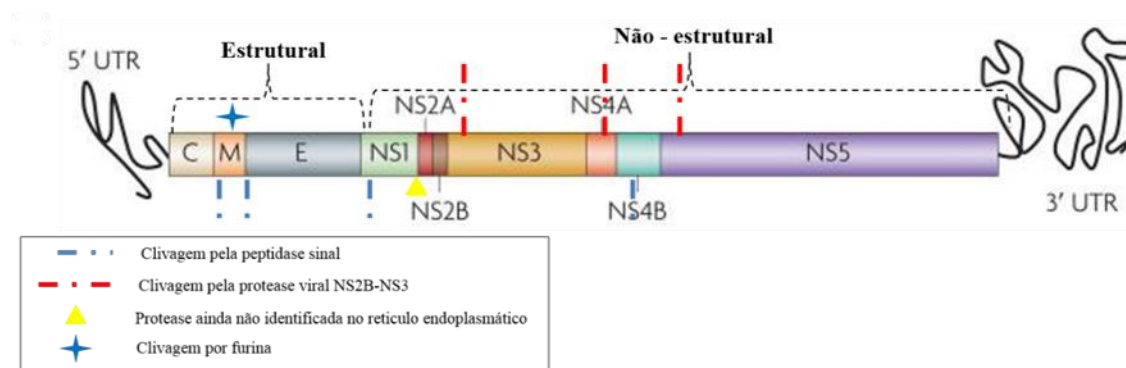
O vírus da dengue (DENV) pertence ao gênero flavivírus (família *Flaviviridae*) que possui outros dois gêneros Pestivirus e Hepacivirus (GUBLER, 1998). O gênero flavivírus (do latim flavus ou "amarelo", referindo-se ao vírus da febre amarela) é composto por aproximadamente 73 vírus transmitidos por artrópodes que infectam roedores, aves, suínos, primatas não humanos, seres humanos e outros hospedeiros mamíferos. Os membros desta classe compreendem vários vírus que desenvolvem diversas doenças que acometem a população humana (DAEP; MUÑOZ-JORDÁN; EUGENIN, 2014).

Há quatro sorotipos relacionados entre si por seus aspectos genéticos e antigênicos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Estes sorotipos possuem cerca de 70% de sequências homólogas e conseqüentemente manifestações clínicas semelhantes (GREEN; ROTHMAN, 2006; LINDENBACH; RICE, 2003). No cenário epidemiológico da dengue, um quinto sorotipo (DENV-5) foi identificado em um fazendeiro residente da Malásia em 2007 (NORMILE, 2013), este achado possivelmente pode interferir nas intervenções atuais para minimização da ocorrência da doença (MUSTAFA et al., 2014).

O vírus possui a conformação de uma partícula esférica (40 a 50nm de diâmetro) envolvido por um envelope lipídico e uma fita simples de RNA positiva, e apresenta um nucleocapsídeo icosaédrico (aproximadamente 30 nm de diâmetro). Em relação a sua estrutura, o genoma possui na extremidade 5' uma região cap e não exibe uma cauda poliadenilada na extremidade 3' (LINDENBACH, 2007; BOCK; GOODE, 2006). A tradução do RNA viral é controlada por regiões não codificantes localizadas nas extremidades 5' e 3' (DAEP; MUÑOZ-JORDÁN; EUGENIN, 2014).

O genoma tem uma extensão de aproximadamente 11 kilobases que codifica uma poliproteína (com aproximadamente 3.400 aminoácidos) que co-traducionalmente e pós-traducionalmente é processada por proteases do hospedeiro e do próprio vírus. Estas proteases clivam a poliproteína que por fim resulta em três proteínas estruturais: capsídeo (C), proteína da membrana (M) e glicoproteína do envelope viral (E) e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (figura 3) (BOCK; GOODE, 2006; GUZMAN et al., 2010; MURRELL; WU; BUTLER, 2011). As proteínas estruturais possuem importante papel na conformação da partícula viral fornecendo uma estrutura estável para comportar o RNA viral e assim proteger o envelope lipídico, na estruturação dos vírions maduros e no processo de replicação viral (ACOSTA; KUMAR; BARTENSCHLAGER, 2014; KUHN et al., 2002).

Figura 3 - Genoma do vírus da dengue



Fonte: Adaptado de Guzman (2015) e Sreaton (2015).

2.5 Ciclo viral

O vírus da dengue possui tropismo por uma gama de células humanas, englobando as células da linhagem fagocítica mononucleares como as células dendríticas, monócitos, macrófagos e células de Langherans dentre os quais são os alvos primários. Quanto ou sobre...a infecção nos linfócitos B e T, células Natural Killer (NK), células endoteliais, hepatócitos e inclusive células neuronais, os estudos não são conclusivos (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010). Esta variedade de células possivelmente indica que o vírus se liga a moléculas de superfície celular presentes em diferentes linhagens ou explora vários receptores para mediar a infecção (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010). Isto reflete a ampla capacidade de disseminação do vírus em todo o organismo hospedeiro, conduzindo a uma gama de manifestações clínicas (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015).

A interação entre as proteínas superficiais virais e os elementos que compõe a membrana plasmática é peça chave para o reconhecimento do vírus pelas células (GROVE; MARSH, 2011). Identificar qual a possível(eis) molécula(s) estaria envolvida(s) no reconhecimento de vírus da dengue pelas células alvo ainda não foi definitivamente identificado (HIDARI; SUZUKI, 2011). Mas, há diversos candidatos a receptores que tem sido hipotetizados como o heparan-sulfato, receptor de laminina, DC-SIGN, (do inglês *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*), o receptor de manose e CD14 (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015).

O processo de replicação viral da dengue se inicia quando o vírus se fixa diretamente a algum determinado receptor das células hospedeiras (SCREATON et al., 2015). Após a entrada do vírus no citoplasma o genoma é traduzido, iniciando-se a síntese de um

intermediário de cadeia negativa, que serve como um molde para a produção de múltiplas cópias de RNA viral de carga positiva. Sucessivos ciclos de tradução produzem uma única poliproteína que é processada pelas proteases do vírus e do hospedeiro. O RNA é sintetizado novamente e subsequentemente é empacotado pela proteína cápside, formando um nucleocapsídeo. A moldagem do vírus ocorre na superfície do lúmen do retículo endoplasmático rugoso derivando em partículas virais imaturas. Dentre os quais são transportados para o compartimento de Golgi, onde a acidificação induz mudanças conformacionais do vírus (BÄCK; LUNDKVIST, 2013; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; SCREATON et al., 2015).

3 Características clínicas

As manifestações clínicas da dengue variam de inaparente ou assintomático até as formas graves e fatais (CARABALI et al., 2015). Após o período de incubação, a doença começa abruptamente e é seguida por três fases: febril, crítico e recuperação ou convalescença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

3.1 Dengue clássica ou febre da dengue

A dengue clássica é uma doença febril aguda de início abrupto em que o período de incubação dura entre 2-7 dias, a temperatura corporal pode alcançar 38°C. A febre muitas vezes é acompanhada de rubor facial, eritema cutâneo, dor generalizada pelo corpo, mialgia, artralgia e dor de cabeça. Alguns pacientes podem ter tosse, fadiga, dor de garganta, hiperemia conjuntival, além de anorexia, náuseas e vômitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997; TANTAWICHIEEN, 2012).

3.2 Febre hemorrágica da dengue e síndrome de choque da dengue

A principal diferença em termos fisiopatológicos que determina a severidade da doença é o extravasamento plasmático. A Febre hemorrágica da dengue é caracterizada pelas seguintes manifestações clínicas: febre alta, presença de manifestações hemorrágicas (presença de prova do laço positiva, petéquias, equimoses ou púrpuras e etc.), e, muitas vezes, hepatomegalia e problemas circulatórios, trombocitopenia moderada ($<100.000/m/mL$), hemoconcentração com aumento do hematócrito em 20% na admissão ou queda do

hematócrito em 20% após o tratamento, presença de derrames cavitários e hipoproteinemia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

A Febre hemorrágica da dengue era classificada pela Organização Mundial da Saúde (1997), de acordo com sua gravidade, em quatro graus. No primeiro grau, as manifestações clínicas englobam uma febre acompanhada de sintomas inespecíficos em que a única manifestação hemorrágica consiste na prova do laço positiva. No segundo grau, além das manifestações do grau I, ocorrem hemorragias espontâneas leves. Colapso circulatório com pulso fraco e rápido, estreitamento da pressão arterial ou hipotensão, pele pegajosa e fria, e inquietação englobam o terceiro grau. O quarto grau é a classificação que define a síndrome do choque da dengue em que existe o quadro clínico de choque profundo com ausência de pressão arterial e pressão de pulso imperceptível (DIAS et al., 2010).

3.3 Nova classificação

Os critérios da Organização Mundial da Saúde em 2009 classificam a dengue de acordo com os seguintes níveis diferenciados considerando a gravidade: dengue sem sinais de alerta; dengue com sinais de alarme (dor abdominal, vômitos persistentes, acúmulo de líquido, sangramento de mucosas, letargia, aumento do fígado e aumento do hematócrito com a diminuição das plaquetas) e dengue grave (dengue com grave perda plasmática, hemorragia grave ou falência de órgãos) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

3.4 Infecções assintomáticas

O panorama epidemiológico dos indivíduos assintomáticos está relacionado a diversos fatores que englobam o ambiente, as características peculiares do indivíduo, o vetor e o próprio vírus (GUZMÁN; KOURÍ, 2002). A infecção assintomática (inaparente, subclínica ou oligossomática) é definida como uma infecção pelo vírus da dengue sem apresentação de manifestações clínicas ou um quadro leve caracterizado por uma febre indiferenciada (ENDY et al., 2011). Estima-se que três quartos de 390 milhões de infecções pelo vírus da dengue a cada ano são clinicamente assintomáticos, em vista que o indivíduo infectado passa a possuir uma significativa contribuição no ciclo de transmissão (DUONG et al., 2015). Além disso, a imunidade pré-existente por infecções assintomáticas pode afetar a captação da vacina, bem como a interpretação dos ensaios sobre a efetividade das vacinas (GRANGE et al., 2014).

3.5 Manifestações atípicas

Os estudos sobre manifestações atípicas ainda são em menor proporção na literatura. As Manifestações atípicas da dengue são mais comuns do que realmente é relatado. No processo fisiopatológico, o endotélio é o alvo dos mecanismos imunopatológicos na dengue e dengue grave, estes mecanismos podem explicar o diversificado envolvimento sistêmico no organismo (GULATI; MAHESHWARI, 2007). As alterações que acometem o sistema neurológico desenvolvem a encefalopatia na FHD podendo apresentar-se de diversas formas incluindo desde a depressão até distúrbios comportamentais. Pós-infecção pode haver sequelas como amnésia, demência, psicose maníaca, síndrome de Reye¹ e meningoencefalite. Dentre as manifestações gastrintestinais o paciente pode apresentar hepatite, falência hepática fulminante, colecistite acalculosa, pancreatite aguda e diarreia febril (GULATI; MAHESHWARI, 2007).

As manifestações cardíacas da dengue são as mais incomuns, entretanto há relatos de manifestações irregulares incluindo distúrbios do ritmo cardíaco, como bloqueio atrioventricular e fibrilação atrial. No que abrange as manifestações renais, pode ocorrer a insuficiência renal aguda, embora seja rara nos casos de dengue. Nos aspectos respiratórios, a dengue pode culminar na síndrome do desconforto respiratório agudo e hemorragia pulmonar com ou sem hemoptise. Outras manifestações ocorrem mesmo que em menor proporção: complicações linforreticulares e rabdomiólise (GULATI; MAHESHWARI, 2007). A Síndrome de Guillain-Barré foi associada com a infecção por dengue em diversas populações incluindo a brasileira (HIRA; KAUR; SHUKLA, 2012; RALAPANAWA; KULARATNE; JAYALATH, 2015).

Estudos recentes têm evidenciado diversas manifestações atípicas em crianças e adultos. Em uma pesquisa realizada na Índia, as manifestações atípicas mais comuns foram hepatite, diarreia febril, insuficiência renal, colecistite acalculosa e anormalidades cardíacas. Interessantemente nesta população, os níveis séricos de plaquetas não foram correlacionados com a gravidade no quadro hemorrágico (NIMMAGADDA et al., 2014). Em crianças indianas, foi identificado que as principais apresentações clínicas incomuns consistiram em choque prolongado, hemorragia, dor abdominal, melhora clínica deficiente pós convalescença, consciência prejudicada, letargia, agitação e trombocitopenia grave (POTHAPREGADA; KAMALAKANNAN; THULASINGAM, 2016).

¹ Síndrome de Reye é tipicamente precedida por uma infecção viral com um intervalo intermediário sem doença de 3-5 dias. A explicação bioquímica para os sintomas é possivelmente uma desregulação generalizada do metabolismo mitocondrial, resultando eventualmente em falha metabólica do fígado e outros tecidos. Tem sido relacionada com a utilização do Ácido Acetilsalicílico (AAS).

4 Imunopatogênese

Os aspectos que envolvem a patogenia do vírus da dengue têm sido alvo de diversas discussões e postulações de teorias. Três hipóteses tentam explicar a patogênese da FHD e SCD: teoria da virulência (ROSEN, 1977); teoria sequencial (KOURI, 1987) e teoria integral (HALSTEAD, 1980). Em 1977, Rosen defendia que a virulência e conseqüentemente a severidade da dengue era condicionada por determinadas cepas do vírus. Considerando que alterações da virulência do vírus podem ser induzidas por sucessivas passagens pelo sistema do hospedeiro humano e também no vetor, ocorrendo variações genéticas na cepa (ROSEN, 1977).

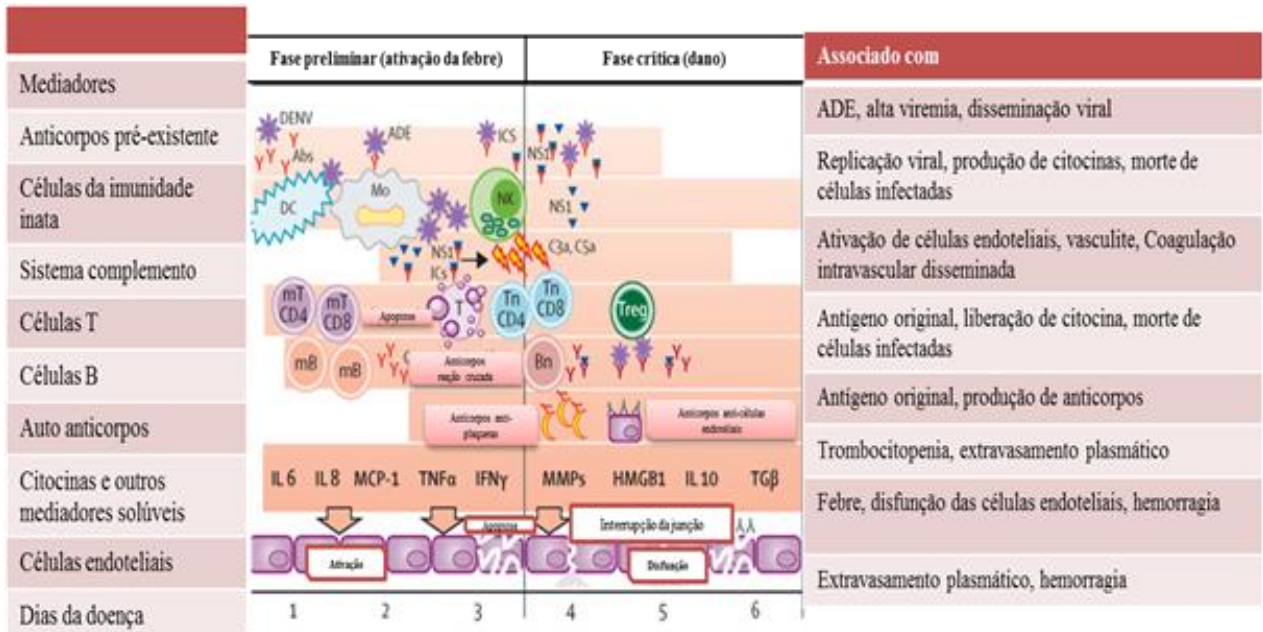
A teoria proposta por Kouri (1987) considera que múltiplos fatores condicionam o desenvolvimento da FHD e SCD. Três grupos de fatores estão nesta teoria: o primeiro grupo de fatores envolve as particularidades individuais do indivíduo como a idade, o sexo, a raça e doenças crônicas; o segundo grupo inclui fatores virais como a virulência e o sorotipo infectante; por fim os fatores epidemiológicos como a presença de alta densidade de infestação do vetor, e ampla circulação do vírus da dengue, interagindo com condições ecológicas (BRAVO; GUZMÁN; KOURI, 1987; KOURI; GUZMÁN; BRAVO, 1987).

O fenômeno ADE (em inglês *antibody dependent enhancement*) ou teoria integral proposta por Halstead (1980) é a atual hipótese de explicação para a ocorrência da severidade da dengue em reinfecções por sorotipos diferentes do DENV. Em que numa infecção secundária com um sorotipo diferente, a presença de pequena quantidade de anticorpos neutralizantes heterotípicos pode evitar a doença grave, entretanto, na ausência destes, os anticorpos formam complexos (receptor Fc e anticorpos não neutralizantes) com os DENV, que passam a infectar os fagócitos mononucleares com maior eficiência resultando na infecção de um maior número de células (HALSTEAD, 1980, 1988, 2012).

A fisiopatologia da severidade da dengue é multifatorial consistindo em um balanço entre o sistema imune do hospedeiro e aspectos genéticos que podem contribuir para a proteção ou o desfecho patológico da doença. Como ilustrado na Figura 4, os possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da dengue incluem a presença de anticorpos preexistentes que podem mediar a ADE, a ativação das células do sistema imune inato durante a infecção, ativação do sistema complemento e das células T e B e enfim a produção de auto-anticorpos (GUZMAN; HARRIS, 2015). Neste contexto, destaca-se o papel das citocinas, que são liberados sequencialmente por diferentes tipos celulares como consequência da ativação

do sistema imune, desempenhando um papel crucial através da mediação do extravasamento plasmático.

Figura 4 - Patogênese da infecção pelo vírus da dengue de acordo com a fase da doença



Fonte: Adaptado de Guzman, 2015.

Nota: DENV = vírus da dengue; Abs = anticorpos; ADE = aumento dependente de anticorpos; Ics = imunocomplexos; DC = células dendríticas; Mo = monócitos/macrófagos; NS1 = proteína NS1; mT = célula T de memória; Tn = célula T; Treg = célula T reguladora; mB = célula B de memória; Bn = célula B; NK = natural killer.

As citocinas consistem em um grupo diversificado de pequenas proteínas que são secretadas por diversas células com a finalidade de promover a sinalização intercelular e comunicação. Possuem específicas atividades parácrinas e endócrinas, através de ligação a receptores, podendo induzir uma variedade de respostas dependendo da citocina e da célula alvo. Dentre as muitas funções das citocinas estão o controle da proliferação e diferenciação celular, regulação da angiogênese e atuação significativa nos desfechos do sistema imune e no processo inflamatório (TISONCIK et al., 2012).

As citocinas também regulam a produção e a atividade de outras citocinas, podendo elevar ou diminuir a resposta inflamatória (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997). Elas foram classificadas como: interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal (RAEBURN et al., 2002). De acordo com as ações no sistema imune as citocinas também foram classificadas em pró-inflamatórias (Th1) ou anti-inflamatórias (Th2).

Dentre as pró-inflamatórias tem-se as interleucinas 1, 2, 6, 7 e FNT (fator de necrose tumoral) e as anti-inflamatórias englobam a interleucinas 4, 10, 13 e FTC- β (fator transformador de crescimento β) (CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997).

O panorama clínico da dengue surge após o período de dois a sete dias no momento pós-incubação em consonância com a viremia. Neste contexto, níveis séricos elevados de citocinas têm sido correlacionados com o desenvolvimento e agravamento do quadro clínico como a IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ e TNF (BUTTHEP et al., 2012; HALSTEAD, 2012; MANGIONE et al., 2014; SRIKIATKHACHORN; GREEN, 2010). Foi desenvolvida uma teoria intitulada “cytokine storm” (em português: tempestade de citocinas) a qual enfatiza que a desregulada produção de citocinas devido a ativação maciça de células T durante o processo infeccioso contribui para a severidade da doença (DONG et al., 2007; ROTHMAN, 2010). De acordo com a teoria do pecado original antigênico o hospedeiro tem uma alteração nos níveis de citocinas que o sensibiliza ao agravamento quando há um aumento considerável de células T de memória que se sobrepõe sobre as células T de alta afinidade para a infecção (MONGKOLSAPAYA et al., 2003).

Adicionalmente, foi proposto um modelo para a fisiopatologia da dengue em que a produção de citocinas por monócitos durante a infecção desencadeia uma cascata de eventos que leva o aumento de citocinas (CHEN; WANG, 2002) e conseqüentemente provoca o aumento da permeabilidade vascular (COSTA et al., 2013; TISONCIK et al., 2012). Em vista a particularidade das citocinas em induzir a liberação e a produção de outras citocinas formando uma rede complexa com aumento dos seus respectivos níveis e mediadores (GREEN; ROTHMAN, 2006; ROTHMAN, 2004). Os efeitos no organismo destas citocinas podem ser sinérgicos, como por exemplo, o TNF- α , a IFN- γ e IL-10 em conjunto induzem o aumento da permeabilidade vascular (LOPEZ-RAMIREZ et al., 2016). Devido a estas particularidades na homeostase do organismo humano as citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 destacam-se na identificação de biomarcadores de severidade da doença em diversas populações e tem sido campo de diversos estudos.

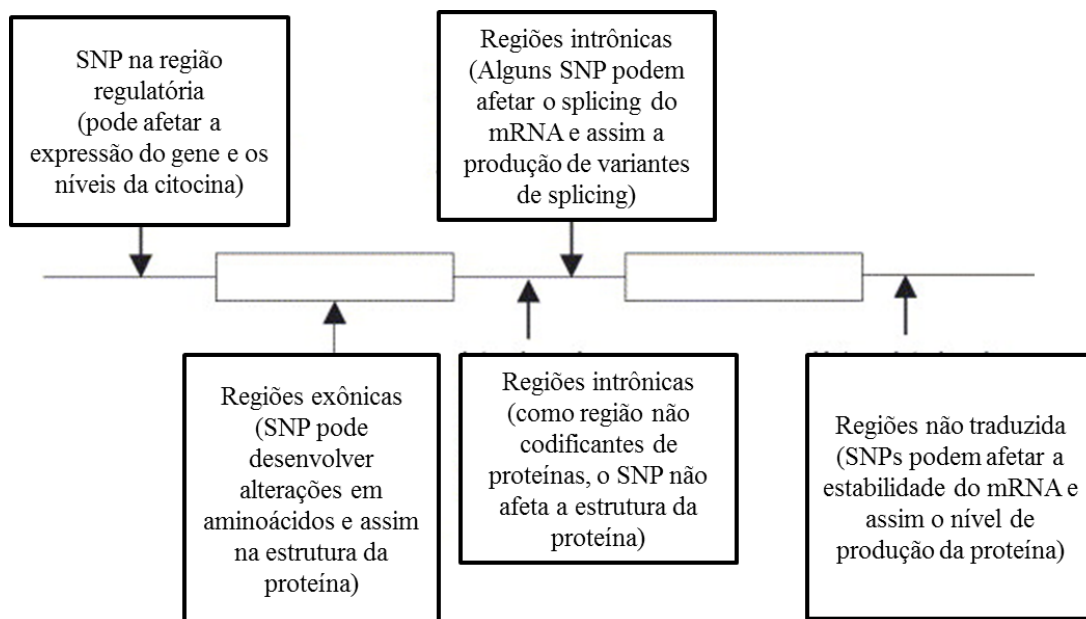
4.1 Polimorfismos em genes envolvidos na regulação do sistema imune e dengue

Polimorfismo de nucleotídeo simples ou SNP (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) configura-se como uma variação do genoma, que ocorre em um ou poucos nucleotídeos e que se distingue de outras raras variações por apresentar uma frequência populacional de pelo menos 1%. O interesse pela pesquisa em relação aos SNPs vem das

perspectivas de contribuição para identificação do perfil genético da população quanto a susceptibilidade a patologias de importância epidemiológica e clínica (BROOKES, 1999).

Os SNPs podem abranger diversas regiões no gene, alguns ocorrem nos éxons (também denominados estruturais) podendo modificar a sequência de aminoácidos codificadas que posteriormente serão expressas. Geralmente é responsável por mudanças na estruturada proteína podendo culminar na perda ou redução da função ou da capacidade de ligação (NUSSBAUM et al.,2002). SNPs encontrados em regiões gênicas não-codificantes (íntrons) ou em regiõesr eguladoras/promotoras não ocasionam em alterações na sequência de aminoácidos, entretanto, podem alterar a expressão gênica (OLLIER, 2004). A figura 5 representa um esquema dos possíveis efeitos dos SNPs em genes de citocinas.

Figura 5 - Esquematização dos SNPs em genes de citocinas e seus possíveis efeitos



Fonte: adaptado de Ollier, 2004

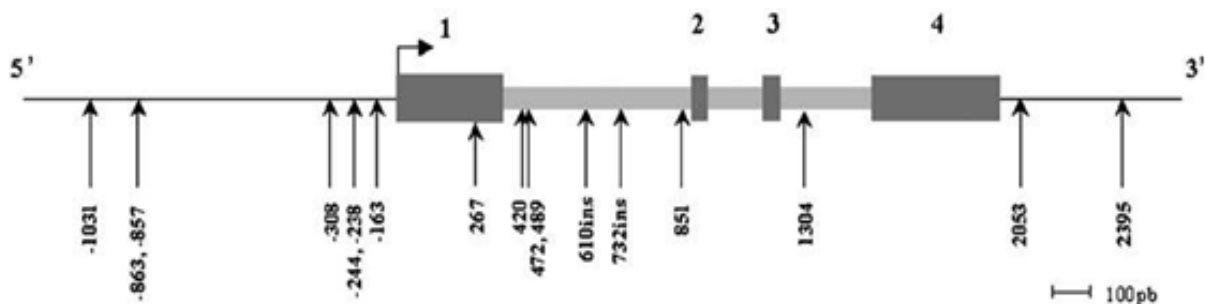
Há evidências de que SNPs que estão presentes nos genes de várias moléculas envolvidas no processo inflamatório podem interferir na síntese e na modulação da resposta inflamatória (ABRAHAM; KROEGER, 1999; DE MAAT et al., 2004; MULLER et al., ; WILSON et al., 1997). Diversos polimorfismos em genes de proteínas envolvidas no sistema imune têm sido relacionados com a susceptibilidade para a dengue: antígenos leucocitários humanos (HLA), receptores de anticorpos, mediadores imunes/inflamatórios, moléculas ligantes, citocinas e outros fatores que exercem efeitos imunomoduladores (LAN;

HIRAYAMA, 2011). As evidências genéticas relacionadas ao sistema imune fornecem dados sobre a patogênese da dengue e perspectivas sobre novas opções de prevenção e tratamento (LAN; HIRAYAMA, 2011; VANNBERG; CHAPMAN; HILL, 2011). A cascata de citocinas tem sido citada como a causa de extravasamento plasmático (ROTHMAN, 2010). A produção destas pode ser mediada por polimorfismos que estão associados com a susceptibilidade à infecção (FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2004).

4.1.1 Polimorfismo do gene *TNF*-alfa (*TNFA* -308G/A)

O fator de necrose tumoral (em inglês: *Tumour Necrosis Factor* - TNF) (Figura 6) é uma citocina pró-inflamatória produzida por monócitos/macrófagos e células T e B. O gene *TNF* encontra-se na região do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe III no braço curto do cromossomo 6 (6p21.31) (AGUILLÓN G et al., 2002; JACOB, 1992). Estas citocinas possuem um papel fundamental na regulação da diferenciação, proliferação e morte celular, no processo inflamatório e nas respostas do sistema imune adaptativo e inato (QIDWAI; KHAN, 2011).

Figura 6 - Localização do gene TNF no complexo HLA de classe III



Fonte: Flori, 2005.

Nota: símbolos da cor (■) representa éxon e (□) íntron.

A regulação transcricional do gene do *TNFA* é essencial para evitar os efeitos deletérios na síntese inadequada ou excessiva de TNF. Variações genéticas localizadas na região promotora deste gene potencialmente afetam a transcrição e sua expressão, e, por conseguinte, desempenha um papel em certas doenças associadas com a expressão elevada de TNF (ABRAHAM; KROEGER, 1999; JACOB, 1992). A variação genética na região promotora do *TNFA* na posição -308G/A (rs1800629) é a mais investigada em estudos de associação, e resulta em duas formas alélicas, em que a presença de guanina (G) define a variante comum e a presença de adenina (A) define a variante menos comum. Neste contexto,

o alelo A foi associado com o aumento transcricional em comparação com o alelo G (WILSON et al., 1997).

Diversos estudos têm associado polimorfismos na região promotora na posição -308 com a susceptibilidade e agravamento a diversas doenças, como o risco para o desenvolvimento da hipertensão arterial crônica na população Malasiana (GHODSIAN et al., 2015), susceptibilidade a diabetes mellitus tipo 2 (SAXENA; SRIVASTAVA; BANERJEE, 2013) e agravamento do quadro clínico da Malária na população Indiana (SINHA et al., 2008) e com o risco para o desenvolvimento o câncer cervical na população Argentina (BARBISAN et al., 2012).

Um estudo caso-controle realizado com uma população do sudeste do Brasil identificou uma associação entre o alelo A do gene *TNFA* na posição -308 com a proteção à hanseníase (CARDOSO et al., 2011) essa associação esteve em consonância com outros estudos realizados no Brasil (SANTOS et al., 2000, 2002). Em um estudo caso-controle realizado com pacientes com colite ulcerativa na região nordeste, o gene *TNFA* evidenciou o alelo A como fator de risco para a susceptibilidade à doença (TAVARES et al., 2016). Nenhuma associação foi identificada quando investigado este polimorfismo com a tuberculose em um estudo caso-controle conduzido com pacientes do sudeste brasileiro (MILANO et al., 2016).

Os estudos têm evidenciado altos níveis séricos de TNF- α em pacientes com febre hemorrágica da dengue e febre da dengue (LIAO et al., 2015; SOUNDRAVALLY et al., 2014; VILLAR et al., 2013). O alelo A foi identificado como possível fator de risco genético para a febre hemorrágica da dengue em estudo realizado com a população cubana (PEREZ et al., 2010), enquanto que na população do Sri Lanka o genótipo GG foi associado como risco para o desenvolvimento da febre hemorrágica da dengue (FERNANDO et al., 2015).

Entretanto, na população Mexicana e Venezuelana não foi identificado nenhuma associação (GARCÍA-TREJO et al., 2011; VEJBAESYA et al., 2009). Na população brasileira, este polimorfismo não foi associado com a infecção em crianças com febre hemorrágica da dengue na região sudeste (XAVIER-CARVALHO et al., 2013) e em adultos com febre da dengue na região norte (FEITOSA et al., 2016).

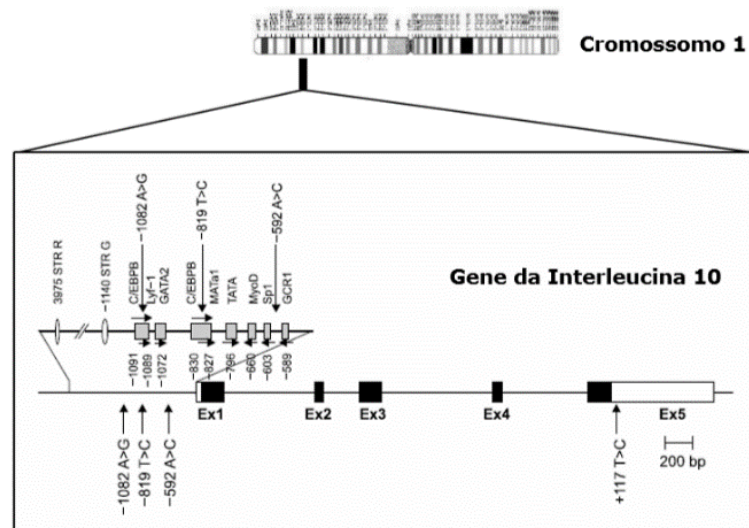
4.1.2 Polimorfismo do gene interleucina-10 (IL-10 -819C/T)

A Interleucina 10 (IL-10) é uma citocina que possui efeitos pleiotrópicos e regula as funções imunitárias, promovendo a supressão das respostas imunes. As capacidades autócrina

e parácrina da IL-10 através da ligação direta com leucócitos e controle das respostas imunes são consideradas a principal função desta citocina. A secreção ocorre a partir de células T, macrófagos e outros leucócitos seguidos por subsequente ligação aos receptores de macrófagos e células dendríticas (CD) (SHALEV et al., 2011). Esta citocina também atua na minimização da produção de citocinas relacionadas com Th1 (IL-12 e IFN- γ) e estimula o aumento dos níveis de citocinas relacionadas com Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) (COPE et al., 2011).

Além disso, o aumento dos níveis de IL-10 tem sido associado com o aumento da atividade da morte celular programada (HATACHI et al., 2003; SHALEV et al., 2011). Adicionalmente, a IL-10 é eficaz na redução dos níveis de outras citocinas pró-inflamatórias: IL-2, IL-6, IL-1 β , IL-12, TNF- α e IFN- γ , em ambas as situações estimuladoras e relacionadas com a presença ou ausência de antígenos suficientes (SHALEV et al., 2011; TANG-FELDMAN et al., 2011). Conseqüentemente, a redução destas citocinas minimiza a maturação de leucócitos, o recrutamento e o processo inflamatório (FROSSARD; EIGENMANN, 2008). O gene *IL-10* corresponde ao cromossomo 1q31-32 como é representado pela Figura 7.

Figura 7 - Localização do gene *IL-10* no cromossomo 1



Fonte: Aguilon, 2002.

O SNP -819 do gene *IL-10* tem sido evidenciado na literatura pelo seu papel na susceptibilidade à endometriose na população da Romênia (MALUTAN et al., 2016), síndrome do ovário policístico em mulheres egípcias (TALAAT et al., 2016) e pré-eclâmpsia

na população chinesa (LIU et al., 2015). Análises metanalíticas identificaram a associação deste SNP com o risco de câncer de pulmão (LAN; LAN; FAXIANG, 2015) e o risco para desenvolvimento de tuberculose especialmente em asiáticos (GAO et al., 2015). Um estudo realizado no Brasil na região sudeste com enfoque na hanseníase (SANTOS et al., 2002) identificaram associação do genótipo TT com a susceptibilidade a doença, enquanto que uma metanálise concluiu que o alelo T está associado com o desfecho clínico da hanseníase (ALVARADO-ARNEZ et al., 2015). Na região norte, o SNP -819 do gene *IL-10* foi correlacionado com a predisposição à malária e a consecutiva diminuição dos níveis séricos desta citocina e com a baixa densidade parasitária (PEREIRA et al., 2015).

Altos níveis séricos de *IL-10* em pacientes com febre hemorrágica da dengue têm sido relatados na literatura (MALAVIGE et al., 2012, 2013; PANDEY et al., 2015; PÉREZ et al., 2004). A maioria dos estudos não evidenciou associação genotípica e alélica do polimorfismo do gene *IL-10* na posição -819 com a dengue (FERNANDO et al., 2015; PEREZ et al., 2010; SAM et al., 2015; XAVIER-CARVALHO et al., 2013). Entretanto, na população Indiana o genótipo T/C foi associado com a redução do risco para o desenvolvimento da febre hemorrágica da dengue (ALAGARASU et al., 2015).

4.1.3 Polimorfismo do gene Interferon gama (IFNG +874A/T)

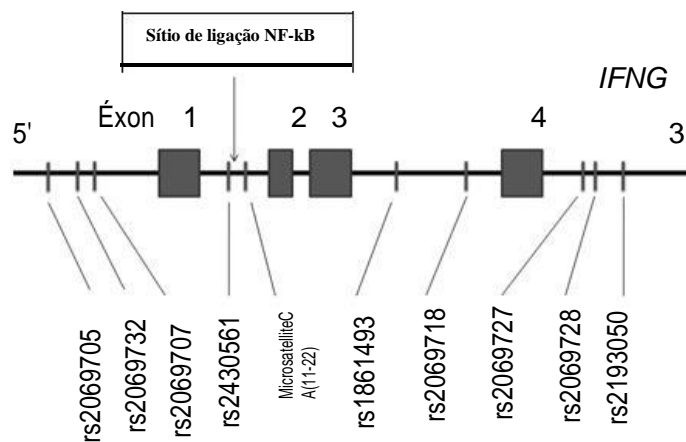
Os interferons são citocinas que desempenham um papel complexo na resistência do hospedeiro em consequência a atuação de agentes patogênicos. Células que são infectadas por vírus secretam o interferon alfa e beta (interferons tipo I) enquanto que o interferon - γ (interferon do tipo II) é secretado principalmente por células Natural Killer (NK). Dentre as propriedades do IFN- γ estão incluídos a regulação da resposta imune, estimulação da atividade fagocitária e de moléculas componentes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e II, interações de leucócito com o endotélio, proliferação celular e apoptose (BOEHM et al., 1997). O IFN- γ é capaz de regular positivamente a expressão de receptores Fc γ em monócitos e macrófagos, assim, facilita a replicação viral (PRESTWOOD et al., 2012).

O gene do *IFNG*, representado na figura 8, está localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q24.1), estende-se por cerca de 5,4kb e contém quatro éxons que codificam uma proteína de 146 aminoácidos (HAYDEN et al., 1997). O polimorfismo funcional (rs2430561) do gene *IFNG* que consiste na substituição da adenina (A) por uma timina (T) na posição +874 foi correlacionado com o aumento da expressão desta citocina, Os

genótipos TT, TA e AA estão associados com a alta, intermediária e baixa produção de IFN- γ , respectivamente (PRAVICA et al., 2000). Revisões sistemáticas com metanálise identificaram a associação genotípica e alélica deste gene com a susceptibilidade e proteção com a tuberculose (CHANG et al., 2010; DE ALBUQUERQUE et al., 2012) e o quadro clínico da hanseníase (SILVA et al., 2014).

Um estudo conduzido com a população brasileira na região norte sugeriu que a presença do alelo A do gene IFNG na posição +874 conferiu susceptibilidade a infecção pelo HIV e consequente diminuição dos linfócitos T CD4+(BONFIM FREITAS et al., 2015). Na região centro-oeste o genótipo TT foi correlacionado com o desenvolvimento de pré-eclâmpsia grave e o aumento dos níveis séricos (PINHEIRO et al., 2015). Recentemente, o genótipo A/T foi associado com a proteção à febre da dengue na população brasileira (FEITOSA et al., 2016a) e o alelo A foi associado com a não persistência dos sintomas da dengue na infecção primária e a persistência dos sintomas na infecção secundária.

Figura 8 - Localização do gene *IFNG* no cromossomo 12



Fonte: Adaptado de Nie, 2014.

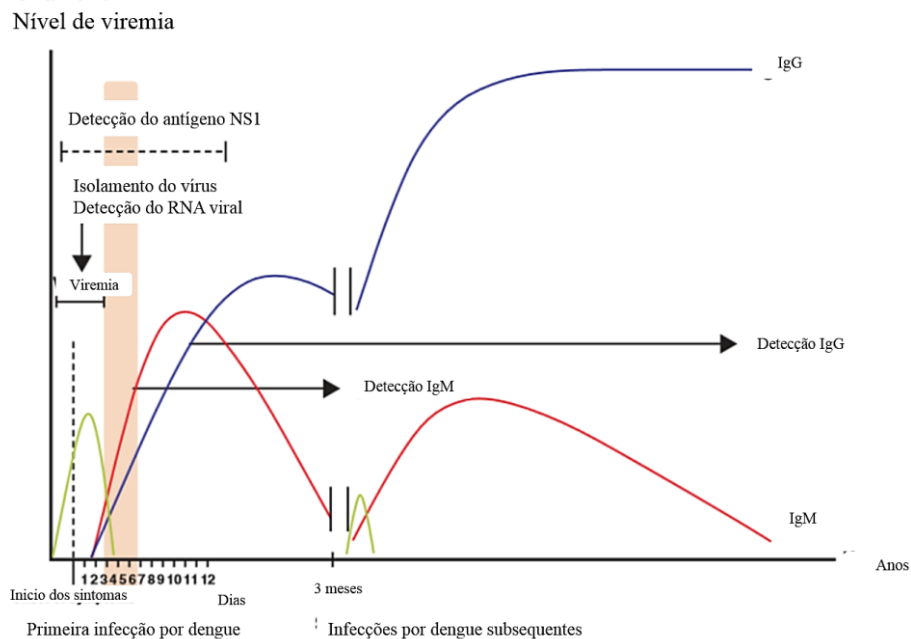
Nota: São apresentados nove polimorfismos de nucleotídeos simples e o microssatélite no íntron 1, um sítio de ligação (NF-kB), que pode ter consequências funcionais para a transcrição da proteína.

5 Métodos de identificação viral

O diagnóstico da dengue é exclusivamente laboratorial, considerando que as características clínicas da doença não são específicas e presumíveis de confusão no diagnóstico com outras doenças exantemáticas. Várias técnicas convencionais laboratoriais estão disponíveis para o diagnóstico, a confirmação da dengue pode ser feita através de

isolamento viral, amplificação do genoma, detecção de antígenos e anticorpos específicos através de sorologia e biossensores (BHAT et al., 2015). Há duas fases diferentes no diagnóstico da dengue, sendo a primeira fase febril quando o paciente está em pico virêmico e, segundo, quando os pacientes começam a formar anticorpos específicos como representado na Figura 9 (RATHAKRISHNAN; SEKARAN, 2013).

Figura 9 - Curso do tempo da dengue e a adequação do diagnóstico



Fonte: Adaptado de Rathakrishnan (2013).

5.1 Isolamento viral

O isolamento viral é considerado a técnica padrão-ouro para a identificação de infecção por dengue (PARKASH; SHUEB, 2015). É realizado através da inoculação no soro ou plasma do paciente com o vírus da dengue, cérebro de camundongo ou em cultura de células de mamífero ou de mosquito. Entretanto, esta técnica não é geralmente útil no diagnóstico clínico e para a gestão devido as limitações em relação à disponibilidade e o alto custo (BHAT et al., 2015).

5.2 Amplificação do genoma ou amplificação de ácidos nucleicos

A detecção do vírus pode ser realizada pela amplificação de ácido nucleico utilizando qPCR (reação da polimerase em cadeia em tempo real). Esta técnica proporciona várias

vantagens, incluindo a capacidade de diferenciar os sorotipos, pode ser um ensaio quantitativo que quando combinado com a tecnologia em tempo real possui maior sensibilidade (KONG et al., 2006). No entanto, o teste de qPCR é caro e exige equipamento especializado e pessoal qualificado, assim, limitando sua utilização em muitos países em desenvolvimento (CASTRO-JORGE et al., 2010). Outros métodos de PCR têm sido descritos como metodologia de identificação viral: PCR convencional, Nested PCR, PCR multiplex e amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos (NASBA) (WRIGHT; PRITT, 2012).

5.3 Diagnósticos sorológicos

Os testes sorológicos são os mais amplamente utilizados para a detecção de infecções pela dengue em países com recursos limitados além disso são relativamente baratos e fáceis de manusear. Estes testes incluem a inibição de hemaglutinação (IH), NS1 e ELISA (em inglês: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para detectar anticorpos de imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) (PARKASH; SHUEB, 2015). Ainda há o teste de fixação de complemento e o teste de neutralização (DE PAULA; FONSECA, 2004).

O ensaio ELISA específico para IgM e IgG é dependente da resposta imune do hospedeiro e do tempo necessário para a produção de anticorpos IgM/IgG contra os antígenos do vírus da dengue. Na maioria dos casos, o primeiro anticorpo IgM detectável aparece apenas entre o quarto e quinto dia doença, enquanto o anticorpo IgG aparece no sétimo dia. O teste ELISA IgG identifica infecções secundárias e é utilizado para distinguir a infecção em primária ou secundária (BHAT et al., 2015).

Os anticorpos IgM são detectáveis em 80% dos casos de dengue no quinto dia da doença e em 99% até o décimo dia da doença, o que pode, em seguida, permanecer detectável durante mais de três meses (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Este teste somente identifica a infecção recente (IgM) ou passada (IgG) e não pode identificar o tipo de vírus infectante. Ainda há a limitação em relação à infecção cruzada, em vista que os flavivirus compartilham de epítomos antigênicos (BHAT et al., 2015).

5.4 Biossensores

O desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico da dengue ainda está em sua fase inicial e não tem sido comercializada. Os biossensores podem superar as limitações de ELISA por exemplo, pois a tecnologia do biossensor tem sensibilidade semelhante ou superior à do ELISA e com possibilidade de portabilidade e compartimentalização. Além

disso, a tecnologia é de fácil manejo e o custo é acessível, possibilitando também a monitorização contínua ao analisar o alvo em matrizes complexas com a utilização de uma quantidade mínima de amostra (PARKASH; SHUEB, 2015).

6 Terapêutica

Atualmente, nenhum tratamento farmacológico está disponível para a terapia da dengue. A maioria dos casos sintomáticos pode ser tratada no ambiente domiciliar do paciente com repouso e terapia de suporte sem a necessidade de hospitalização. O tratamento a nível hospitalar é realizado em casos mais graves e inclui soroterapia, transfusão de hemoderivados, terapia de suporte e gerenciamento das complicações (BHAT et al., 2015).

No manejo domiciliar a maioria dos pacientes é tratado com medicamentos antipiréticos como paracetamol, banho morno, repouso adequado complementado com hidratação oral. A monitoração diária de perda de peso e da urina, se possível, auxilia na manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico. A ingestão de antiagregantes plaquetários como a aspirina, ácido mefenâmico e ibuprofeno deve ser evitada, devido ao risco de complicações da doença (trombocitopenia). Adicionalmente, pacientes que desenvolvem sinais de alerta necessitam monitorização constante imediata a nível hospitalar (BHAT et al., 2015).

7 Prevenção

Aumento das taxas de hospitalização por dengue grave, durante os surtos, resulta em perdas econômicas enormes para os serviços de saúde. Na ausência de terapia antiviral específica, o controle da transmissão de DENV pelo vetor é o método mais viável para a diminuição da morbidade associada à dengue (FARES et al., 2015; GHOSH; DAR, 2015). Entretanto, as estratégias de controle do vetor por si só não têm sido capazes de alcançar satisfatoriamente a redução na transmissão viral (PEPIN et al., 2013; REGIS et al., 2013). Neste contexto, a implementação de uma vacina contra a dengue que seja eficaz e de baixo custo como medida suplementar é uma alta prioridade para a saúde pública (GHOSH; DAR, 2015).

8 OBJETIVOS

8.1 GERAL

Identificar o papel de fatores genéticos do sistema imune inato na infecção e progressão da dengue.

8.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar as frequências alélicas e genóticas dos SNPs nos genes *TNFA* (-308G/A), *IL-10* (-819C/T) e do *IFNG* (+874T/A) em pacientes com dengue e controles da população alagoana;
- Investigar a associação dos SNPs nos genes *TNFA* (-308G/A), *IL-10* (-819C/T) e do *IFNG* (+874T/A) com a infecção e progressão da dengue em uma população alagoana;
- Identificar a associação da combinação de SNPs nos genes *TNFA* (-308G/A) *IL-10* (-819C/T) e do *IFNG* (+874T/A) na infecção e progressão da dengue em uma população alagoana.

9 MATERIAL E MÉTODOS

9.1 Delineamento do estudo

O tipo de estudo observacional o desenvolvimento desta pesquisa foi o de caso-controle, propõe determinar a possível associação entre a infecção por dengue e os polimorfismos genéticos dos SNPs *TNFA* -308G/A, *IL-10* -819C/T e *IFNG* +874T/A. As análises moleculares foram conduzidas no LABMEG - Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica, vinculados à Universidade Federal de Alagoas - *Campus* Arapiraca. Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL) através do edital Programa Primeiros Projetos (PPP) 02/2011 com o projeto de pesquisa intitulado “Polimorfismo genético de pacientes com dengue: associação com a infecção e progressão da doença”.

9.2 População e local do estudo

A pesquisa foi realizada no município de Arapiraca, estado de Alagoas, Brasil, que consiste no principal município da região metropolitana do Agreste. Os locais de coleta de amostras de sangue periférico do grupo caso foram realizados em convênio com o Laboratório Municipal de Arapiraca. A amostragem do presente estudo consistiu em uma seleção de participantes não probabilística por conveniência.

Os pacientes com suspeita de dengue que procuraram o atendimento nos centros de saúde do município foram encaminhados ao Laboratório Municipal para confirmação laboratorial. Após a chegada na instituição, os profissionais de saúde informavam a todos os pacientes sobre a pesquisa, liam o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), e os que aceitavam participar, assinaram o TCLE o para fornecimento da amostra biológica. A amostra final foi composta por 78 indivíduos confirmados laboratorialmente para a infecção por febre da dengue (FD) pelo teste imunológico ELISA (Panbio® Dengue IgM Capture ELISA, Brasil).

Pacientes com complicações devido à dengue e que foram hospitalizados na instituição filantrópica Nossa Senhora do Bom Conselho (Hospital Regional de Arapiraca) durante os anos de 2010 a 2015 foram incluídos no grupo caso. O recrutamento dos pacientes do grupo febre hemorrágica da dengue (FHD) teve como base a análise das fichas de notificação compulsória presentes no Hospital Regional de Arapiraca. Após a identificação, listagem e

organização de acordo com as manifestações clínicas registradas dos pacientes hospitalizados foram iniciadas as coletas de material biológico que ocorreram nas residências durante seis meses. As manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes foram revisadas e todos os pacientes com trombocitopenia (<80.000 plaquetas/ mm^3) e confirmados laboratorialmente para a infecção foram incluídos para coleta de material biológico.

A lista inicial de pacientes era composta por 130 indivíduos, entretanto alguns não concordaram em participar da pesquisa, vieram a óbito ou haviam se mudado no momento das visitas nas residências. Assim, a amostra final deste estudo compreendeu 49 pacientes que foram classificados como febre da dengue hemorrágica. A classificação dos casos de dengue nas instituições de saúde foi obtida segundo os critérios definidos pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

O grupo controle foi composto por 135 voluntários saudáveis sem relatos de hospitalização por dengue e/ou sinais clínicos da dengue ou de outra patologia que se dispuseram a participar da pesquisa. Todos os indivíduos foram investigados laboratorialmente para a presença do vírus da dengue através do teste imunológico ELISA (Panbio[®] Dengue IgM Capture ELISA, Brasil) e o teste rápido (Abon-Bioeasy Diagnóstica, Brasil). Os testes foram realizados pelo Laboratório de Análises Clínicas Dr. Edler Lins. As características gerais das populações em estudo estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características gerais dos pacientes com dengue e controles recrutados

Grupo	Gênero		Média de idade (anos) \pm DP
	Masculino	Feminino	
DEN	50	77	33.99 \pm 16.4
Febre da dengue	30	48	32.77 \pm 15.4
Febre hemorrágica da dengue	20	29	35.4 \pm 18.1
Controle saudável	72	63	22.4 \pm 4.9

Fonte: Autor, 2017.

Nota: DEN= febre da dengue + febre hemorrágica da dengue; DP=desvio padrão.

9.3 Critérios de inclusão e exclusão

Os pacientes com febre dengue incluídos no estudo foram aqueles que procuraram o serviço de saúde e tiveram confirmação laboratorial para a infecção. Os pacientes incluídos no grupo febre hemorrágica da dengue foram os que apresentaram trombocitopenia (80.000 plaquetas/ mm^3) hospitalizados entre os anos de 2010 a 2015 e que consentiram participar

desta pesquisa. Os pacientes que não concordaram em participar da pesquisa, com resultado sorológico negativo para infecção da dengue, gestação ou puerpério foram excluídos da pesquisa.

9.4 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada de duas formas: para o grupo casos e controles foi realizada extração a partir de sangue periférico conservado em tudo para coleta sanguínea contendo EDTA de acordo com as instruções do fabricante do Kit comercial (FlexiGene[®] DNA Handbook- Qiagen, Germany e Wizard[®] Genomic DNA, Brasil). Para o grupo dos pacientes com progressão da doença, a extração do material genético foi realizada através do swab de células da mucosa oral pelo método de NaCl, etanol e proteinase K diluída em 10 mg/mL, resultando em 50 ng/mL de DNA como descrito no anexo A. Esta técnica foi realizada devido a alguns pacientes se sentiram incomodados pela realização da punção venosa periférica (ABRÃO et al., 2005b). Após o processo de extração, todas as amostras foram quantificadas por espectrofotometria através do espectrofotômetro BioPhotometer plus (Eppendorf[®] AG, Hamburg, Germany) e a razão das absorbâncias nos comprimentos de onda 260 e 280 nm (nanômetro) que estiveram entre 1,7 e 1,9 apresentaram um DNA mais puro. Adiante, as amostras foram estocadas a -20 °C.

9.5 Eletroforese em gel de agarose

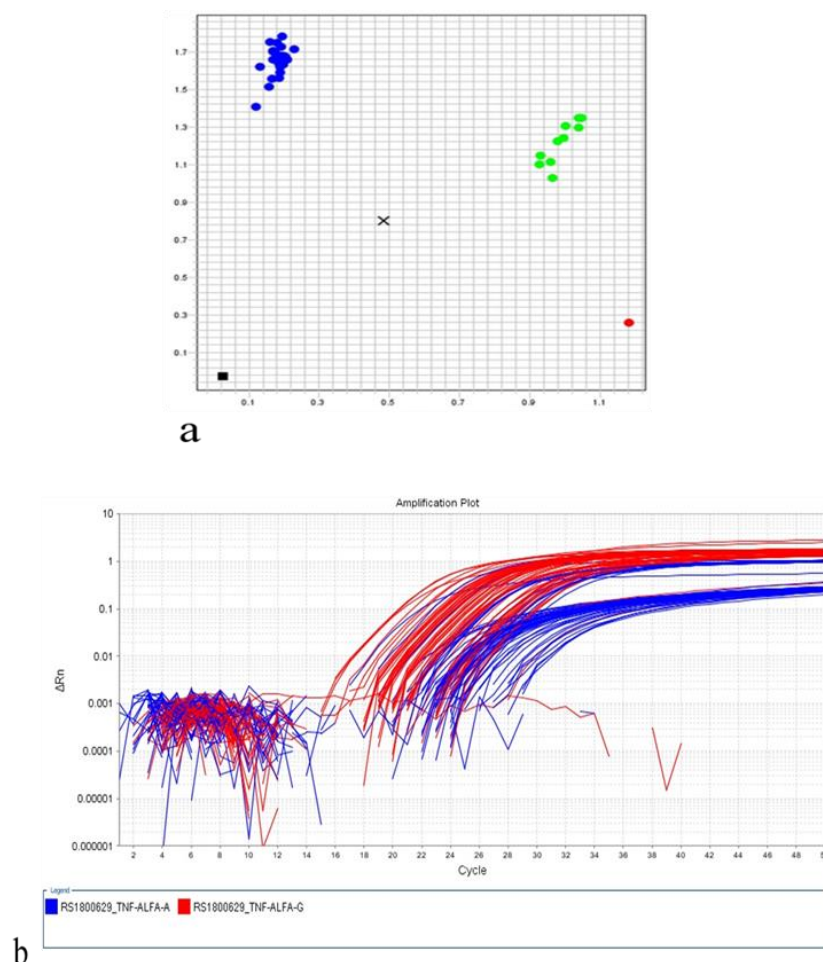
A integridade quantitativa e qualitativa das amostras de DNA genômico foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando tampão TAE (Tris mmoles/L, acetato e EDTA a 1mmol/L com pH 8,0). A migração eletroforética foi realizada a 100V, 60mA por 60 minutos em cuba horizontal com fonte LPS 1000V (Loccus biotecnologia[®], Brasil). Para referência em relação ao tamanho molecular de DNA foi utilizado um marcador de 100pb (Invitrogen[®] Corporation, USA). As bandas foram visualizadas por luz ultravioleta após coloração do gel com brometo de etídio (mg/mL) e documentadas através do sistema de captura de imagem (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

9.6 Genotipagem dos genes das citocinas *TNFA* -308G/A e *IL-10* -819C/T

A identificação dos SNPs dos genes das citocinas *TNFA* -308G/A e *IL-10* -819C/T foram determinadas pela técnica de reação de cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), através

do método de discriminação alélica utilizando o ensaio Taqman (Applied Biosystem®, Califórnia, USA) como ilustrado na figura 10. As amostras de DNA diluídas foram amplificadas através de uma reação de qPCR com um volume final de 10 μL , contendo 5 μL de solução TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems®, Califórnia, USA); 0,125 μL de sonda referente ao SNP alvo e 4,87 μL de cada amostra. As reações foram realizadas pelo equipamento ABI StepOne plus da Applied Biosystems® sob as seguintes condições: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 92°C por 15s e 60°C por 1min. Em todas as reações foram utilizados um controle negativo (reação sem a amostra do DNA) e um controle positivo (amostra de DNA com o polimorfismo previamente identificado). Os resultados das reações foram fornecidos pelo software do aparelho em forma de relatório com as curvas de amplificação da discriminação alélica de cada indivíduo.

Figura 10 - Exemplo da determinação e amplificação genotípica por qPCR



Fonte: Autor, 2017.

Nota: Exemplo da genotipagem (a) e da curva de amplificação (b) do gene *TNFA* -308G/A, mostrando os genótipos GG (em azul), GA (verde) e AA (vermelho) e as amostras indeterminadas representadas pelo símbolo x.

9.7 Genotipagem do gene da citocina *IFNG* +874T/A

O SNP do gene *IFNG* na posição +874T/A foi identificado pelo método ARMS – PCR (do inglês: *Amplification Refractory Mutation System*). O volume final de 20µL era composto por 1 µL de primer genérico, 1 µL de primer específico A ou 1 µL de primer específico T (a depender do mix da reação), 1 µL de controle interno sense (hormônio de crescimento humano), 1 µL de controle interno antisense, 0.8µL de dNTP (10 mM), 2.4 µL de MgCl₂ (25 mM), 3 µL de tampão (NH₄)₂SO₄, 0.5 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL), 7.3µL água livre e 2 µL de DNA genômico. Os primers utilizados para a genotipagem estão listados na Tabela 2.

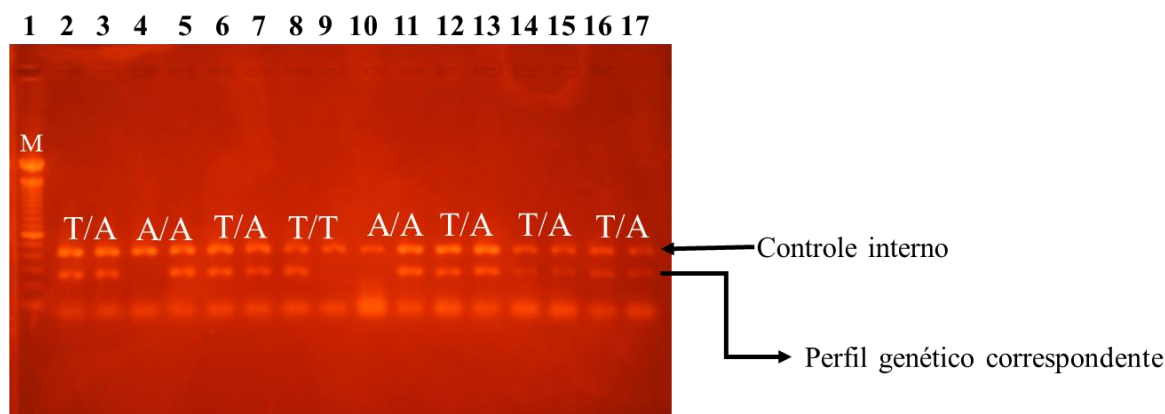
Tabela 2 – Sequências dos primers utilizados para as genotipagens do SNP no gene *IFNG* +874T/A.

	Sequência dos primers
Primer genérico	5'-TCAACAAAGCTGATACTCCA-3'
Alelo específico A	5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3'
Alelo específico T	5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3'
Controle interno (hormônio do crescimento) sense	5'-GCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3'
Controle interno (hormônio do crescimento) antisense	5'-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3'

Fonte: Autor, 2017.

ARMS-PCR foi realizado em um termociclador (Biocycle[®], China) com o seguinte ciclo: 95°C (3 min), 10 ciclos de 95°C (15 s), 65°C (50s) e 72°C (40 s), seguido por 20 ciclos de 95°C (20 s), 55°C (50 s) e 72°C (50 s), 72°C (7 min) e 4°C (temperatura de finalização). A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética utilizando o tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) em gel de agarose a 3% com um marcador de peso molecular de 100bp (Invitrogen[®] Corporation, USA). Posteriormente, os fragmentos foram observados utilizando equipamento de foto documentação (Loccus biotecnologia[®], Brasil) conectado a um computador com um sistema de captura de imagens como representado pela Figura 11.

Figura 11 - Exemplo da determinação genotípica por PCR –ARMS



Fonte: Autor, 2017.

9.8 Análises estatísticas

As frequências gênicas e alélicas foram organizadas manualmente com o auxílio pelo Microsoft® Office Excel. A análise de Equilíbrio de Hardy-Weinberg da população em estudo foi realizada através do Teste Qui-quadrado (χ^2) utilizando a tabela de contingência de 2x2, considerando um intervalo de confiança limite de $\alpha/5\%$. As análises das correlações entre as frequências gênicas e alélicas em relação a susceptibilidade à infecção foi realizada pelo software on line gratuito SNPstats - <https://www.snpstats.net/snpstats/start.htm> (SOLÉ et al., 2006) e pelo software BioEstat versão 5.0, respectivamente.

Foram considerados os fatores intrínsecos que poderiam influenciar o perfil da população e assim ajustados pelos dados em relação a idade e gênero. O modelo codominante, dominante, recessivo, sobredominante e log-aditivo foram considerados para avaliar o risco de susceptibilidade ou progressão a dengue associado a cada SNP. Os critérios Akaike information criterion (AIC) e Bayesian Information Criterion (BIC) foram utilizados para determinar o melhor modelo de herança. O odds ratios (OR) e os intervalos de confiança de 95% (IC) foram calculados considerando OR <1 associado com proteção e OR/ 1 associado a susceptibilidade/risco.

Para ilustração dos resultados das frequências alélicas e genotípicas e respectivas associações e combinações houve a distribuição dos pacientes com dengue em três grupos: “DEN” que consiste no agrupamento de todos os indivíduos diagnosticados com dengue sem distinção em relação a classificação clínica, os pacientes com características de dengue clássica foram enquadrados no grupo “FD” e os pacientes com complicações da doença foram

denominados “FHD”. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

9.9 Aspectos éticos

O estudo obteve a anuência da secretaria de saúde do município de Arapiraca e do hospital regional. E posteriormente, o projeto foi provado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) sob parecer número: 1.073.204 (anexo B) e todos os participantes assinaram o termo consentimento livre e esclarecido (TCLE) como descrito no anexo C.

10 RESULTADOS

As frequências genótípicas dos três polimorfismos aqui estudados estavam dentro dos parâmetros do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na população em estudo.

10.1 Frequência genotípica e alélica do SNP-308G/A do gene *TNFA*

Na Tabela 3 é evidenciada a distribuição genotípica e alélica do polimorfismo do respectivo gene no grupo caso e controles saudáveis. A análise das frequências genótípicas e alélicas mostrou que o genótipo G/G apresentou a maior prevalência em todos os grupos em investigação: DEN (80,3%), FD (80,8%) e FHD (79,6%) controles (73,3%). O grupo FHD não apresentou nenhuma frequência em relação ao genótipo A/A. Quanto à distribuição alélica do polimorfismo-308 do gene TNF- α , o alelo G foi o mais frequente em todos os grupos.

Tabela 3 - Distribuição genotípica e alélica do SNP-308G/A do gene *TNFA* em pacientes com dengue e controles

	Genótipo	N (frequência %)				EHW
		Controle	DEN	FD	FHD	$\chi^2 (p)$
TNFA -308G/A	G/G	99(73,3)	102(80,3)	63(80,8)	39(79,6)	0,0003 (0,98)
	G/A	33(24,4)	24(18,9)	14(17,9)	10(20,4)	
	A/A	3(2,2)	1(0,8)	1 (1,3)	0 (0)	
	Alelo					
		G	231 (85,6)	228 (86,3)	140 (89,7)	88 (89,7)
		A	39 (14,4)	36 (13,7)	16 (10,3)	10 (10,3)

Fonte: Autor, 2017.

Na Tabela 4 é evidenciada a associação alélica e dos modelos gênicos do SNP -308G/A do gene TNF- α entre o grupo caso e suas respectivas categorizações e o grupo controle. A comparação das frequências do grupo controle com o grupo DEN identificou uma associação protetora para a susceptibilidade à infecção (OR com IC = 0.51 [0.26-0.99]; p=0.043) no modelo dominante G/A+A/A vs GG. Panorama semelhante foi encontrado quando comparado o grupo controle com o grupo FD (OR com IC 95% = 0.45 [0.20 – 1.00]; p = 0.043). Em relação às frequências alélicas, diferenças estatísticas não foram identificadas.

Tabela 4 - Associação alélica e dos modelos gênicos do SNP -308G/A do gene *TNFA*

<i>TNFA</i> -308G/A		Controle versus DEN		Controle versus FD		Controle versus FHD		FD versus FHD	
		OR com 95% IC	<i>P</i>	OR com 95% IC	<i>p</i>	OR com 95% IC	<i>p</i>	OR com 95% IC	<i>p</i>
Associação alélica									
	G	1,06 (0,65-1,74)	0,88	1,47 (0,79 - 2,74)	0,27	1,48 (0,71 - 3,10)	0,37	1,00 (0,43 – 2,31)	0,84
	A								
Modelos gênicos									
Codominante									
	GG								
	GA	0,52 (0,26-1,05)	0,12	0,45 (0,20-1,03)	0,13	0,49(0,19-1,27)	0,17	1,21(0,48-3,02)	0,54
	AA								
Dominante	GA+AA vs GG	0,51 (0,26-0,99)	0,043	0,51 (0,26-0,99)	0,043	0,46(0,18-1,18)	0,09	1,12 (0,45-2,77)	0,8
Recessivo	GG+GA vs AA	0,36 (0,03-3,92)	0,38	0,58 (0,05-6,32)	0,64	0,00 (0,00-NA)	0,26	0,00 (0,00-NA)	0,31
Sobredominante	GG+AA vs GA	0,54 (0,27-1,07)	0,07	0,46(0,20-1,04)	0,054	0,50 (0,19-1,30)	0,14	1,23(0,49-3,07)	0,66
Log aditivo	--	0,53 (0,29-0,98)	0,03	0,50 (0,24-1,04)	0,052	0,45 (0,18-1,13)	0,07	1,03 (0,44-2,41)	0,95

Fonte: autor, 2017.

Nota: OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; DEN: febre da dengue + febre hemorrágica da dengue; FD: febre da dengue; FHD: febre hemorrágica da dengue.

10.2 Frequência genotípica e alélica do SNP -819C/T do gene *IL-10*

Na Tabela 5 encontra-se a distribuição das frequências alélicas e genotípicas do SNP -819C<T. Na frequência dos genótipos e alelos do SNP -819C<T do gene *IL-10* pôde-se observar que o genótipo C/C foi o mais frequente no grupo controle (53,3%) e FD (47,4%). Quando analisado pela classificação clínica, destaca-se que o genótipo C/T foi o mais predominante no grupo FHD (53,1%). O alelo C foi o mais frequente em todos os grupos do estudo, entretanto o grupo controle apresentou maior frequência (73,7%).

Tabela 5 - Distribuição genotípica e alélica do SNP -819C/T do gene *IL-10* em pacientes com dengue e controles

	Genótipo	N (frequência %)				EHW
		Controle	DEN	FD	FHD	$\chi^2 (p)$
<i>IL-10</i> -819C/T	C/C	72(53,3)	54(42,5)	37 (47,4)	17 (34,7)	0,225 (0,63)
	C/T	55(40,7)	54(42,5)	28 (35,9)	26 (53,1)	
	T/T	8(5,9)	19(15)	13 (16,7)	6 (12,2)	
	Alelo					
	C	199 (73,7)	162 (63,7)	102 (65,4)	60 (61,2)	
	T	71 (26,3)	92 (36,3)	54 (34,6)	38 (38,8)	

Fonte: Autor, 2017.

Como visualizado na Tabela 6, quando o grupo controle foi comparado com o grupo DEN, o genótipo T/T foi associado com o risco (OR com IC 95% = 4.07 [1.52-10.85]; p = 0.014) para susceptibilidade a febre da dengue no modelo codominante. Nessa mesma comparação, outros modelos genéticos foram associados com a susceptibilidade: dominante (OR com IC 95% = 1.78 [1.02-3.11]; p=0.04) e recessivo (OR com IC 95% =3.41 [1.33-8.72; p=0.008]. Quando comparado o grupo FD contra FHD, o genótipo C/T foi associado significativamente com a progressão para FHD no modelo sobredominante (OR com IC 95% =2.10 [1.01-4.38]; p=0.047). Destaca-se que o alelo C foi associado significativamente com a proteção para FHD quando comparado com o grupo controle (OR com IC 95% =0.56 [0.34 - 0.91]; p = 0.028).

Tabela 6 - Associação alélica e dos modelos gênicos do SNP -819C/T do gene *IL-10*

<i>IL-10</i> -819C/T		Controle versus DEN		Controle versus FD		Controle versus FHD		FD versus FHD	
		OR com 95% CI	P	OR com 95% CI	P	OR com 95% CI	p	OR com 95% IC	p
Associação alélica									
	C	0,62 (0,43-0,91)	0,018	0,67 (0,43 - 1,03)	0,088	0,56 (0,34 - 0,91)	0,028	0,83 (0,49 - 1,41)	0,59
	T								
Modelos gênicos									
Codominante	CC	4,07(1,52-10,85)	0,01	4,21 (1,45-12,25)	0,027	3,37 (0,89-12,82)	0,17	1,05 (0,34-3,2)	0,14
	CT								
	TT								
Dominante	CT+TT vs C/C	1,78 (1,02-3,11)	0,04	1,62 (0,86-3,08)	0,13	1,83 (0,84-3,97)	0,12	1,78 (0,84-3,77)	0,13
Recessivo	CC+CT vs T/T	3,41 (1,33-8,72)	0,008	3,82 (1,38-10,59)	0,008	2,66 (0,75-9,43)	0,14	0,71 (0,25-2,01)	0,51
Sobredominante	CC+CT vs T/C	1,13 (0,65-1,97)	0,67	0,95 (0,50-1,83)	0,89	1,32 (0,61-2,83)	0,48	2,10 (1,01-4,38)	0,04
Log aditivo	--	1,79 (1,18-2,73)	0,005	1,75 (1,09-2,82)	0,02	1,75 (0,97-3,18)	0,064	1,21 (0,3-2,02)	0,46

Fonte: autor, 2017.

Nota: OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; DEN: febre da dengue + febre hemorrágica da dengue; FD: febre da dengue; FHD: febre hemorrágica da dengue.

10.3 Frequência genotípica e alélica do SNP +874T/A do gene *IFNG*

A Tabela 7 mostra a distribuição genotípica e alélica do SNP +874T/A do gene *IFNG*. Pode-se identificar que o genótipo A/A foi o mais frequente no grupo controle com 52,2%, enquanto que o genótipo A/T teve predominância no grupo FD (44,9%). Quanto a distribuição alélica, o alelo A foi o mais frequente em todos os grupos com maior representação no grupo controle (62,8%).

Tabela 7 - Distribuição genotípica e alélica do SNP +874T/A do gene *IFNG* em pacientes com dengue e controles

	Genótipo	N (frequência %)				EHW
		Controle	DEN	FD	FHD	$\chi^2(p)$
<i>IFNG</i> +874T/A	A/A	43(35,2)	54(42,5)	35 (44,9)	19 (38,8)	1,260 (0,26)
	A/T	64(52,5)	46(36,2)	28 (35,9)	18 (36,7)	
	T/T	15(12,3)	27(21,3)	15 (19,2)	12 (24,5)	
	Alelo					
	T	58 (37,2)	136 (39,7)	94 (38,5)	42 (42,8)	
	A	98 (62,8)	206 (60,3)	150 (61,5)	56 (57,2)	

Fonte: Autor, 2017.

Como evidenciado na Tabela 8, quando comparado o grupo controle e o grupo DEN o genótipo A/T foi associado significativamente com proteção para a susceptibilidade à infecção por dengue (OR com 95% IC = 0.45 [0.24-0.83]; $p=0.026$). O modelo sobredominante também foi associado com proteção (OR com 95% IC = 0.46 [0.26-0.82]; $p=0.0071$). Quando estratificado pela classificação clínica o mesmo genótipo foi associado com proteção tanto para o grupo FD (OR com 95% IC = 0.46 [0.24-0.89]; $p=0.02$) quanto para o grupo FHD (OR com 95% IC = 0.43 [0.19-0.95]; $p=0.034$).

Tabela 8 - Associação alélica e dos modelos gênicos do SNP +874T/A do gene *IFNG*

<i>IFNG</i> +874T/A		Controle versus DEN		Controle versus FD		Controle versus FHD		FD versus FHD	
		OR com 95% CI	<i>p</i>	OR com 95% CI	<i>p</i>	OR com 95% CI	<i>p</i>	OR com 95% IC	<i>p</i>
Associação alélica									
	T	1,11(0,75-1,64)	0,65	0,94 (0,62-1,42)	0,86	1,19 (0,74-1,92)	0,53	1,26 (0,75-2,12)	0,44
	A								
Modelos gênicos									
Codominante	AA	0,45 (0,24-0,83)	0,02	0,45(0,22-0,92)	0,066	0,45(0,19-1,07)	0,1	1,15 (0,50-2,61)	0,79
	TA								
	TT								
Dominante	AA vs TA+TT	0,54 (0,30-0,96)	0,03	0,53(0,27-1,03)	0,061	0,58(0,26-1,29)	0,18	1,23 (0,58-2,60)	0,59
Recessivo	TT vs AA+TA	1,39 (0,64-3,05)	0,4	1,39 (0,56-3,44)	0,48	1,81 (0,66-5,00)	0,26	1,31 (0,54-3,23)	0,55
Sobredominante	TA vs AA+TT	0,46 (0,26-0,82)	0,007	0,46 (0,24-0,89)	0,02	0,43(0,19-0,95)	0,034	1,02 (0,48-2,15)	0,96
Log aditivo	--	0,80 (0,54-1,20)	0,29	0,79 (0,49-1,27)	0,33	0,91 (0,51-1,60)	0,73	1,18 (0,3-1,92)	0,5

Fonte: autor, 2017.

Nota: OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; DEN: febre da dengue + febre hemorrágica da dengue; FD: febre da dengue; FHD: febre hemorrágica da dengue. Para o gene *IFNG* foram utilizadas 122 pacientes com dengue (DEN) devido a não amplificação de algumas amostras durante a genotipagem.

10.4 Combinações dos genes *TNFA*, *IL-10*, *IFNG*.

Os três SNPs avaliados apresentaram combinações como mostrado na tabela 9 e a combinação GCA foi a mais frequente no grupo controle (0,414%) e no grupo FHD (0,406%).

Tabela 9 - Combinações dos SNPs dos genes *TNFA* -308G/A, *IL-10* -819C/T, *IFNG* +874T/A

Frequências						
<i>TNFA</i>	<i>IL10</i>	<i>IFNG</i>	Controles	DEN	FD	FHD
G	C	A	0,414	0,388	0,354	0,406
G	C	T	0,210	0,197	0,216	0,165
G	T	A	0,111	0,145	0,202	0,124
G	T	T	0,124	0,147	0,124	0,201
A	C	A	0,049	0,050	0,052	0,040
A	C	T	0,050	0,044	0,031	0
A	T	A	0,039	0,025	0,019	NA

Fonte: autor, 2017.

Na tabela 10, são evidenciadas as comparações entre as combinações dos três SNPs *TNFA* -308G/A, *IL-10* -819C/T, *IFNG* +874T/A. Quando comparado o grupo controle e o grupo FD, a combinação GTA foi associada significativamente com a susceptibilidade à infecção por dengue (OR com 95% IC = 2.95 [1.18-7.41]; p=0.022). A combinação GCT foi associado significativamente com proteção contra o desenvolvimento de FHD (OR com 95% IC=0.28 [0.08 - 0.90]; p=0.035).

Tabela 10 - Associação das combinações dos genes *TNFA* -308G/A, *IL-10* -819C/T, *IFNG* +874T/A

Combinações			Controles vs DEN		Controles vs FD		Controles vs FHD		DF vs FHD	
<i>TNFA</i>	<i>IL10</i>	<i>IFNG</i>	OR* com 95% CI	<i>p</i>	OR com 95% CI	<i>p</i>	OR com 95% CI	<i>p</i>	OR com 95% CI	<i>p</i>
G	C	A	1,00	-	1,00	-	1,00	-	1,00	-
G	C	T	0,60 (0,28 - 1,26)	0,18	0,89 (0,38 - 2,10)	0,79	0,28 (0,08 - 0,90)	0,035	0,42 (0,17 - 1,05)	0,066
G	T	A	1,28 (0,68 - 2,42)	0,45	2,95 (1,18 - 7,41)	0,022	0,79 (0,23 - 2,71)	0,71	0,59 (0,24 - 1,46)	0,25
G	T	T	2,22 (0,97 - 5,08)	0,06	1,04 (0,48 - 2,23)	0,92	1,14 (0,48 - 2,67)	0,77	1,94 (0,92 - 4,10)	0,086
A	C	A	0,82 (0,22 - 2,98)	0,76	0,72 (0,15 - 3,38)	0,68	0,48 (0,09 - 2,72)	0,41	1,06 (0,31 - 3,57)	0,93
A	C	T	1,04 (0,30 - 3,66)	0,95	0,86 (0,17 - 4,40)	0,86	0,08 (0,00 - 4,91)	0,23	0,83 (0,13 - 5,23)	0,84
A	T	A	0,22 (0,03 - 1,41)	0,11	0,29 (0,04 - 2,00)	0,21	-	-	-	-

Fonte: autor, 2017.

Nota: OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; DEN: febre da dengue + febre hemorrágica da dengue; FD: febre da dengue; FHD: febre hemorrágica da dengue. Para o gene *IFNG* foram utilizadas 122 pacientes com dengue (DEN) devido a não amplificação de algumas amostras durante a genotipagem.

11 DISCUSSÃO

Os estudos sobre polimorfismos configuram-se como uma importante ferramenta prognóstica para a identificação do panorama genético do hospedeiro que torna grupos e populações mais ou menos susceptíveis a desenvolver alguma patologia. Para a prática clínica, estudos genéticos possuem dois benefícios fundamentais na prevenção de doenças, consistindo na detecção de diferentes riscos para o desenvolvimento da doença e promoção de uma maior compreensão dos mecanismos etiológicos que atuam na patogênese da doença (KELADA et al., 2003).

Nesse contexto, relatos de associação de polimorfismos em genes de citocinas e patologias importantes para o cenário epidemiológico mundial têm sido relatado, como a susceptibilidade para o desenvolvimento da tuberculose em Europeus e Asiáticos (KE et al., 2015), risco elevado para a susceptibilidade a Leishmaniose visceral em Iranianos (AHMADI et al., 2015), susceptibilidade a doença pulmonar obstrutiva crônica (GANE; STOCKLEY; SAPEY, 2015) e doença celíaca (DE ALBUQUERQUE MARANHÃO et al., 2015) na população Italiana e o risco para infecção por dengue na população Indiana (CHATURVEDI; NAGAR; SHRIVASTAVA, 2006).

Na infecção por dengue, polimorfismos em genes de citocinas podem mediar a produção a níveis séricos e consecutivamente proporcionar susceptibilidade a progressão da doença (FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2004). Aqui foi identificado o papel de três polimorfismos genéticos: *TNFA* (-308 G/A), *IL10* (-819 C/T) e *IFNG* (+874 T/A), que já foram previamente listados na literatura pelo papel na susceptibilidade ou proteção da infecção por dengue em diferentes populações do mundo e em algumas regiões brasileiras.

Este estudo corrobora com outros na literatura quanto ao aspecto do desenvolvimento da febre da dengue e da febre hemorrágica da dengue seguir padrões demográficos em relação ao gênero, uma vez que a prevalência entre as mulheres é mais evidente em pesquisas realizadas em Taiwan (HSU; HSIEH; LU, 2017), China (SANG et al., 2016) e Brasil (SANTOS et al., 2016). Este cenário poderia ser atribuído ao fato de a mulher permanecer a maior parte do tempo em sua residência (RIBEIRO et al., 2006). A presença do vetor próximo aos domicílios aumenta assim o risco de transmissão, em vista a característica hematófaga da fêmea do mosquito que possui maior atividade pela manhã e no final da tarde (CHADEE, 1988).

O TNF- α é uma importante citocina pro – inflamatória que atua na homeostase do sistema imune. Possui um significativo papel na regulação da proliferação e morte celular bem como na resposta a infecções e no processo inflamatório. Na fisiopatologia da dengue, a sinergia entre o TNF- α e o vírus DENV foi associado com a indução da febre, aumento da permeabilidade vascular e indução do processo apoptótico em células endoteliais culminando no extravasamento plasmático (ALAGARASU et al., 2015; INYOO; SUTTITHEPTUMRONG; PATTANAKITSAKUL, 2016). O polimorfismo -308G<A desta citocina tem sido postulada pelo seu papel na susceptibilidade a diversas doenças infecciosas, autoimunes e neurodegenerativas (ELAHI et al., 2009; QIDWAI; KHAN, 2011).

Neste estudo, foi identificado que o modelo dominante (GA+AA) do gene *TNFA* na posição -308G/A foi associado com a proteção à infecção por dengue em uma amostra populacional de

Alagoas, Brasil. Estudos experimentais evidenciaram que o alelo A está relacionado com a alta expressão do gene e consecutivamente com o aumento da atividade transcricional (ABRAHAM; KROEGER, 1999; WILSON et al., 1997). Um estudo *in vitro* identificou que os níveis séricos de TNF- α em altas e médias concentrações foi associado com a inibição da replicação do vírus da dengue em células dendríticas humanas culminando na diminuição da infecção viral. Considerando estas premissas, nossos achados sugerem que a presença do alelo A de alta expressão do gene *TNFA* na posição -308G/A consiste em um fator protetor para a susceptibilidade à infecção. Em um coorte prospectiva realizada com adultos no sudeste do Brasil foi identificada uma associação entre o alelo A com a não persistência dos sintomas da dengue durante a convalescença (DETTOGNI et al., 2015).

Em sintonia com nosso resultado, um estudo caso-controle realizado na Malásia, concluiu que o modelo dominante (GA+AA) do gene *TNFA* -308G<A foi relacionado com a redução do risco para o desenvolvimento da febre hemorrágica da dengue (SAM et al., 2015). Já em estudos realizados com adultos na região norte (FEITOSA et al., 2016a) e crianças na região do sudeste brasileiro (XAVIER-CARVALHO et al., 2013) em que foi investigado o papel do polimorfismo em diversas citocinas inclusive do gene *TNFA* -308G/A, os autores concluíram que este gene não foi correlacionado com a predisposição ou proteção à infecção pela dengue.

Pesquisas conduzidas na população Tailandesa (VEJBAESYA et al., 2009) e Mexicana (GARCÍA-TREJO et al., 2011) também não identificaram associação deste polimorfismo com a infecção. Alguns estudos mostraram a associação do alelo A com a severidade da doença em crianças Venezuelanas (FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2004) e em pacientes com infecção secundária que foram confirmados laboratorialmente para o sorotipo 2 (DENV-2) em Cuba (PEREZ et al., 2010). Na população Tailandesa, o alelo A foi associado com o risco para o desenvolvimento do quadro hemorrágico (CHUANSUMRIT et al., 2013).

A citocina IL-10 possui efeitos imunomodulatórios sendo uma eficaz molécula anti-inflamatória (TSAI et al., 2013). A literatura reporta a associação entre os níveis séricos elevados desta citocina com o quadro clínico da dengue (MALAVIGE et al., 2013; SRIKIATKHACHORN; GREEN, 2010), por exemplo, um estudo realizado com crianças no sudeste brasileiro, mostrou uma consistente relação entre o desenvolvimento da trombocitopenia e os níveis séricos desta citocina (FERREIRA et al., 2015).

Ademais, estudos *in vitro* demonstraram uma correlação entre os níveis de IL-10 e o fenômeno ADE (do inglês: *antibody dependent enhancement*) (CHAREONSIRISUTHIGUL; KALAYANAROOJ; UBOL, 2007). Os anticorpos relacionados a este fenômeno levam a uma reação cruzada com sorotipos heterólogos, favorecendo o desenvolvimento da doença e infectando um abrangente número de células, o que pode levar a forma grave de doença. Tal perspectiva é reportada por um ensaio *in vitro* que mostrou uma associação positiva entre os níveis de IL-10 com polimorfismos na região promotora do gene, sugerindo que os efeitos do ADE são influenciados pela genética do hospedeiro (BOONNAK et al., 2011).

Os estudos relevantes envolvendo o fenômeno ADE foram reconhecidos como um evento importante na sintomatologia da dengue de acordo com Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). É provável que a IL-10 seja regulada a nível

transcricional por vários polimorfismos na região promotora deste gene, entre eles o SNP -819 C/T (PEROVIC et al., 2016; TSAI et al., 2013).

Em nosso estudo, o genótipo T/T do SNP-819C/T do gene *IL-10* foi significativamente associado com a susceptibilidade a febre da dengue, enquanto que o genótipo C/T foi relacionado com a progressão para a febre hemorrágica da dengue diferentemente de outros estudos publicados sobre o SNP -819C<T realizados com crianças do sudeste brasileiro (XAVIER-CARVALHO et al., 2013) e com adultos na população Venezuelana (FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2004), Singalesa (FERNANDO et al., 2015) e Cubana (PEREZ et al., 2010). No entanto, o genótipo C/T foi previamente associado à proteção contra o desenvolvimento da dengue na população Indiana (ALAGARASU et al., 2015). O estudo também apresentou associação entre o alelo C e o desenvolvimento da febre hemorrágica da dengue. Estudos realizados com uma população infantil do sudeste brasileiro (XAVIER-CARVALHO et al., 2013) e com adultos nas populações Indiana (ALAGARASU et al., 2015) e Cubana (PEREZ et al., 2010) não identificaram associação alélica do SNP -819C<T com a infecção pelo vírus da dengue.

O papel do IFN- γ na imunidade contra a dengue não está bem elucidado. Os interferons são citocinas que desempenham um papel complexo na resistência do hospedeiro devido à ação de agentes patogênicos. Nossos achados indicam uma associação entre o genótipo A/T do gene *IFNG* na posição +874T/A e um efeito protetor contra a susceptibilidade a dengue e febre da dengue hemorrágica. O alelo A mostrou previamente uma relação com a não persistência dos sintomas na infecção primária durante 30 dias e com a persistência de sintomas na infecção secundária (DETTOGNI et al., 2015), em uma coorte prospectiva com adultos do sudeste brasileiro. No entanto, na população do Norte do Brasil, o genótipo de A/T em comparação foi associado com a proteção à susceptibilidade a infecção em adultos (FEITOSA et al., 2016). Outros estudos realizados com adultos nas populações Indiana (ALAGARASU et al., 2015), Venezuelana (FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2004) e Mexicana (PEREZ et al., 2010) não encontraram associações entre esse SNP e a infecção por dengue.

O possível papel do IFN- γ no catabolismo do triptofano poderia ser considerado com uma hipótese para compreender a via de proteção desta citocina na patogênese da dengue. A enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) tem sido implicada pelo seu desempenho em mecanismos de defesa antimicrobiana e na regulação imunológica. A IDO catalisa a quinurenina que consiste em um metabólito tóxico, e é a principal via de degradação para o triptofano em mamíferos. Neste contexto, o maior estimulador da IDO é o interferon gama (KING; THOMAS, 2007).

Em um estudo que avaliou a atividade do IFN- γ em comparação com os níveis de triptofano e quinurenina em doadores saudáveis, foi identificado que a presença do alelo T de alta expressão foi associada com o aumento dos níveis séricos da IDO. Estes dados evidenciam que o catabolismo do triptofano pode ser regulado pelo gene *IFNG* e possivelmente estaria relacionado com patologias associadas a polimorfismos genéticos (RAITALA et al., 2005). Recentemente o aumento de quinurenina foi associado significativamente com a severidade do quadro clínico em pacientes com febre hemorrágica da dengue na população de Singapura (CUI et al., 2016b). Em nosso estudo hipotetizamos que a presença do genótipo de expressão intermediária A/T não proporciona o aumento da atividade da IDO culminando na diminuição dos níveis séricos de

quinurenina e assim consecutivamente pode vir a ter um efeito protetor contra a susceptibilidade a febre hemorrágica da dengue.

Realizou-se também uma análise de combinação alélica para investigar o efeito entre o polimorfismo das citocinas. Nossos resultados mostraram associação entre a combinação GTA *TNFA/IL10/IFNG* com a susceptibilidade para a infecção por dengue, enquanto que a combinação GCT -*TNFA/IL10/IFNG* foi associada com um efeito protetor contra a DHF.

Nossos resultados indicam que polimorfismos genéticos envolvidos na resposta imune do hospedeiro podem contribuir com a suscetibilidade a infecção, progressão ou proteção a fenótipos clínicos de dengue e podem ser considerados como bons marcadores prognósticos. Considerando que o agravamento da doença possa estar relacionado com alterações genéticas no sistema imune inato, realizar pesquisas de cunho molecular para prognóstico da doença pode incidir no número de óbitos por dengue, uma vez que a monitorização clínica prévia garante medidas preventivas e terapêuticas com maior efetividade. Portanto a inserção da biologia molecular se torna uma ferramenta interessante para as instituições de saúde.

Aqui nós também atentamos para o estímulo de futuros estudos com a inclusão de indivíduos assintomáticos, um número amostral maior e o perfil sérico de citocinas para poder investigar o panorama genético-imunológico do hospedeiro a proteção para o desenvolvimento da infecção pelo vírus da dengue. Uma das estratégias poderia estar atrelada a estudos de investigação da validade funcional em genes de citocinas para desvendar o papel específico destes com a susceptibilidade a dengue.

12 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados neste estudo, nós concluimos que:

- O modelo dominante GA + AA do SNP -308 do gene *TNFA* foi associado significativamente à proteção para dengue quando comparado com o grupo controle e o grupo febre da dengue em uma população de Alagoas;
- O genótipo T/T do SNP -819 do gene *IL-10* foi significativamente associado com a susceptibilidade à infecção da dengue, enquanto o genótipo T/C foi associado com a progressão para a febre hemorrágica da dengue diferentemente de outros estudos prévios que não identificaram associação nas populações;
- Neste estudo, foi identificada uma associação entre o alelo C do SNP -819 do gene *IL-10* e proteção ao desenvolvimento para a febre da dengue hemorrágica;
- Nossos resultados também sugerem uma associação significativa entre o genótipo A/T do polimorfismo do gene *IFNG* (+874) e um efeito protetor para a susceptibilidade a dengue e a febre hemorrágica da dengue;
- As análises das combinações gênicas identificaram uma combinação G/T/A estatisticamente associada com a susceptibilidade a febre da dengue e a combinação G/C/T com proteção contra o desenvolvimento da febre da dengue hemorrágica.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, L. J.; KROEGER, K. M. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. **Journal of leukocyte biology**, v. 66, n. 4, p. 562–566, 1999.
- ABRÃO, M. G. et al. Standardization of DNA extraction with NaCl from oral mucosa cells: application in PROP1 gene study. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 49, n. 6, p. 978–82, 2005.
- ACOSTA, E. G.; KUMAR, A.; BARTENSCHLAGER, R. Revisiting dengue virus-host cell interaction: new insights into molecular and cellular virology. **Advances in virus research**, v. 88, p. 1–109, jan. 2014.
- AGUILLÓN G, J. C. et al. El polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral alfa como factor de riesgo en patología. **Revista médica de Chile**, v. 130, n. 9, p. 1043–1050, set. 2002.
- AHMADI, A. et al. Interleukin-4 receptor alpha T1432C and A1652G polymorphisms are associated with risk of visceral leishmaniasis. **Advanced biomedical research**, v. 4, p. 195, jan. 2015.
- ALAGARASU, K. et al. Association of HLA-DRB1 and TNF genotypes with dengue hemorrhagic fever. **Human Immunology**, v. 74, n. 5, p. 610–617, 2013.
- ALAGARASU, K. et al. Association of combinations of interleukin-10 and pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms with dengue hemorrhagic fever. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 130–136, 2015.
- ALVARADO-ARNEZ, L. E. et al. Association of IL10 polymorphisms and leprosy: A meta-analysis. **Plos one**, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2015.
- ARYA, S. C.; AGARWAL, N. Implications of a possible route of vertical transmission of dengue virus by breast milk. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine**, v. 27, n. 13, p. 1394–5, set. 2014.
- BÄCK, A. T.; LUNDKVIST, A. Dengue viruses - an overview. **Infection ecology & epidemiology**, v. 3, jan. 2013.
- BARBISAN, G. et al. TNF- α and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk. **Tumour Biology**, p. 1549–1556, 2012.
- BECERRA, A. et al. Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators in vivo. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 8, p. 1403–1411, ago. 2009.
- BESERRA, E. B. et al. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 99, n. 3, p. 281–285, set. 2009.
- BHAT, V. G. et al. Challenges in the Laboratory Diagnosis and Management of Dengue Infections. **The open microbiology journal**, v. 9, p. 33–7, jan. 2015.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.
- BOCK, G.; GOODE, J. (EDS.). *New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006. v. 277.

- BOEHM, U. et al. Cellular Responses to Interferon- γ . **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 749–795, 1997.
- BONFIM FREITAS, F. et al. Polymorphisms in the IFN γ , IL-10, and TGF β Genes May Be Associated with HIV-1 Infection. **Disease Markers**, v. 2015, p. 1–9, 2015.
- BOONNAK, K. et al. Cell Type Specificity and Host Genetic Polymorphisms Influence ADE of Dengue Virus Infection. **Journal of virology**, v. 85, n. 4, p. 1671–1683, 2011.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 179–293, dez. 2007.
- BRAITHWAITE DICK, O. et al. The history of dengue outbreaks in the Americas. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584–93, out. 2012.
- BRAVO, J. R.; GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. P. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 816–20, jan. 1987.
- BREAM, J. H. et al. A single nucleotide polymorphism in the proximal IFN- γ promoter alters control of gene transcription. **Genes and immunity**, v. 3, n. 3, p. 165–9, maio 2002.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, p. 177–186, 1999.
- BUTTHEP, P. et al. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 31, n. 12, p. e232–8, dez. 2012.
- CARABALI, M. et al. Why are people with dengue dying? A scoping review of determinants for dengue mortality. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 301, 30 jan. 2015.
- CARDOSO, C. . ET AL. TNF -308G/A Single Nucleotide Polymorphism Is Associated With Leprosy Among Brazilians: A Genetic Epidemiology Assessment, Meta-Analysis, and Functional Study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 204, p. 1256–1263, 2011.
- CASTRO JR., F. P. DE et al. Ciclos de vida comparados de Aedes aegypti (Diptera, Culicidae) do semiárido da Paraíba. **Iheringia. Série Zoológica**, v. 103, n. 2, p. 118–123, jun. 2013.
- CHADEE, D. D. Landing periodicity of the mosquito Aedes aegypti in Trinidad in relation to the timing of insecticidal space-spraying. **Medical and veterinary entomology**, v. 2, n. 2, p. 189–92, abr. 1988.
- CHANG, H. et al. Association of the interferon- γ single nucleotide polymorphism +874(T/A) with response to immunosuppressive therapy in patients with severe aplastic anemia. **Blood Cells Molecular Diseases**, v. 45, n. 4, p. 313–316, 2010.
- CHAPMAN, S. J.; HILL, A. V. S. Human genetic susceptibility to infectious disease. Nature reviews. **Genetics**, v. 13, n. 3, p. 175–88, mar. 2012.
- CHAREONSIRISUTHIGUL, T.; KALAYANAROOJ, S.; UBOL, S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. **Journal of general virology**, v. 88, n. 2, p. 365–375, 2007.
- CHATURVEDI, U.; NAGAR, R.; SHRIVASTAVA, R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 47, n. 2, p. 155–66, 1 jul. 2006.
- CHEN, Y.-C.; WANG, S.-Y. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate

cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. **Journal of virology**, v. 76, n. 19, p. 9877–87, out. 2002.

CHUANSUMRIT, A. et al. Tumour necrosis factor gene polymorphism in dengue infection: association with risk of bleeding. **Pediatrics and international child health**, v. 33, p. 97–101, 2013.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of virology**, v. 80, n. 23, p. 11418–31, dez. 2006.

COPE, A. et al. The Th1 life cycle: molecular control of IFN- γ to IL-10 switching. **Trends in immunology**, v. 32, n. 6, p. 278–86, jun. 2011.

COSTA, V. V. et al. Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction. **The American journal of pathology**, v. 182, n. 6, p. 1950–61, jun. 2013.

CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 2, 2015.

CUI, L. et al. Serum Metabolomics Reveals Serotonin as a Predictor of Severe Dengue in the Early Phase of Dengue Fever. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004607, abr. 2016.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 4, p. 742–80, out. 1997.

DAEP, C. A.; MUÑOZ-JORDÁN, J. L.; EUGENIN, E. A. Flaviviruses, an expanding threat in public health: focus on dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus. **Journal of neurovirology**, v. 20, n. 6, p. 539–60, dez. 2014.

DE ALBUQUERQUE, A. C. et al. Association of polymorphism +874 A/T of interferon- γ and susceptibility to the development of tuberculosis: meta-analysis. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 11, p. 2887–95, nov. 2012.

DE ALBUQUERQUE MARANHÃO, R. M. et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin-6 gene polymorphism association with susceptibility to celiac disease in Italian patients. **Genetics and molecular research**, v. 14, n. 4, p. 16343–52, jan. 2015.

DE MAAT, M. P. M. et al. Genetic influence on inflammation variables in the elderly. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 11, p. 2168–73, 1 nov. 2004.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. DA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 8, n. 6, p. 390–8, dez. 2004.

DETTOGNI, R. S. et al. Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons. **Human immunology**, v. 76, n. 10, p. 717–23, out. 2015.

DIAS, L. B. D. A. et al. Dengue: Transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **Medicina**, v. 43, n. 2, p. 143–152, 2010.

DONG, T. et al. 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**, v. 2, n. 12, p. e1192, 5 dez. 2007.

- DUONG, V. et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 47, p. 14688–14693, 9 nov. 2015.
- EHRENKRANZ, N. J. et al. Pandemic dengue in Caribbean countries and the southern United States--past, present and potential problems. **The New England journal of medicine**, v. 285, n. 26, p. 1460–9, 23 dez. 1971.
- ELAHI, M. M. et al. Tumor necrosis factor alpha –308 gene locus promoter polymorphism: An analysis of association with health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, n. 3, p. 163–172, 2009.
- ENDY, T. P. et al. Determinants of inapparent and symptomatic dengue infection in a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 3, p. e975, 3 jan. 2011.
- FARES, R. C. G. et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- FEITOSA, R. N. M. et al. Gene Polymorphisms and Serum Levels of Pro- and Anti-Inflammatory Markers in Dengue Viral Infections. **Viral Immunology**, v. 00, n. 00, p. vim.2016.0026, 2016.
- FERNÁNDEZ-MESTRE, M. T. et al. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue antigens**, v. 64, n. 4, p. 469–72, out. 2004.
- FERNANDO, A. N. et al. Polymorphisms of Transporter Associated with Antigen Presentation, Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 and their Implications for Protection and Susceptibility to Severe Forms of Dengue Fever in Patients in Sri Lanka. **Journal of global infectious diseases**, v. 7, n. 4, p. 157–64, jan. 2015.
- FERREIRA, R. A. X. et al. Circulating cytokines and chemokines associated with plasma leakage and hepatic dysfunction in Brazilian children with dengue fever. **Acta tropica**, v. 149, p. 138–147, 2015.
- FROSSARD, C. P.; EIGENMANN, P. A. The role of IL-10 in preventing food-induced anaphylaxis. **Expert opinion on biological therapy**, v. 8, n. 9, p. 1309–17, set. 2008.
- GANE, J. M.; STOCKLEY, R. A.; SAPEY, E. The rs361525 polymorphism does not increase production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from alpha-1 antitrypsin deficient subjects with chronic obstructive pulmonary disease - a pilot study. **Journal of Negative Results in BioMedicine**, v. 14, n. 1, p. 20, 1 dez. 2015.
- GAO, X. et al. Interleukin-10 Promoter Gene Polymorphisms and Susceptibility to Tuberculosis: A Meta-Analysis. **Plos one**, v. 10, n. 6, p. e0127496, 1 jun. 2015.
- GARCÍA-TREJO, A. R. et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with dengue fever. **Acta tropica**, v. 120, n. 1-2, p. 67–71, jan. 2011.
- GHODSIAN, N. et al. Association of TNF- α G308A gene polymorphism in essential hypertensive patients without type 2 diabetes mellitus. **Genetics and molecular research**, v. 14, n. 4, p. 18974–9, jan. 2015.
- GHOSH, A.; DAR, L. Dengue vaccines: challenges, development, current status and prospects. **Indian journal of medical microbiology**, v. 33, n. 1, p. 3–15, 1 jan. 2015.
- GRANGE, L. et al. Epidemiological risk factors associated with high global frequency of inapparent dengue virus infections. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 280, jan. 2014.

- GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 5, p. 429–36, out. 2006.
- GROVE, J.; MARSH, M. The cell biology of receptor-mediated virus entry. **The Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 7, 2011.
- GUABIRABA, R.; RYFFEL, B. Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. **Immunology**, v. 141, n. 2, p. 143–56, fev. 2014.
- GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Review**, v. 11, n. 3, p. 480–496, 1998.
- GULATI, S.; MAHESHWARI, A. Atypical manifestations of dengue. **Tropical medicine & international health**, v. 12, n. 9, p. 1087–95, set. 2007.
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, dez, 2010.
- _____; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453–465, jan. 2015.
- _____; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **Journal of clinical virology**, v. 27, n. 1, p. 1–13, maio 2003.
- _____; KOURÍ, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious diseases**, v. 2, n. 1, p. 33–42, jan. 2002.
- HALSTEAD, S. B. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 58, n. 1, p. 1–21, jan. 1980.
- _____. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science (New York, N.Y.)**, v. 239, n. 4839, p. 476–81, 29 jan. 1988.
- _____. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? **Revista panamericana de salud pública**, v. 20, n. 6, p. 407–15, dez. 2006.
- _____. Controversies in dengue pathogenesis. **Pediatrics and international child health**, v. 32 Suppl 1, p. 5–9, maio 2012.
- HARAPAN, H. et al. Non-HLA gene polymorphisms and their implications on dengue virus infection. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2013.
- HATACHI, S. et al. CD4+ PD-1+ T cells accumulate as unique anergic cells in rheumatoid arthritis synovial fluid. **The Journal of rheumatology**, v. 30, n. 7, p. 1410–9, jul. 2003.
- HAYDEN, C. et al. Mutation screening of interferon-gamma (IFN γ) as a candidate gene for asthma. **Clinical and experimental allergy**, v. 27, n. 12, p. 1412–6, dez. 1997.
- HERRERO, L. J. et al. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 137, n. 2, p. 266–282, 2013.
- HIDARI, K. I. P. J.; SUZUKI, T. Dengue virus receptor. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4SUPPLEMENT, p. S37–S43, dez. 2011.
- HIRA, H. S.; KAUR, A.; SHUKLA, A. Acute neuromuscular weakness associated with dengue infection. **Journal of neurosciences in rural practice**, v. 3, n. 1, p. 36–9, jan. 2012.
- HSU, J. C.; HSIEH, C.-L.; LU, C. Y. Trend and geographic analysis of the prevalence of dengue in Taiwan, 2010–2015. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 54, p. 43–49, jan. 2017.
- HUY, N. T. et al. Factors Associated with Dengue Shock Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. e2412, 26 set. 2013.

- INYOO, S.; SUTTITHEPTUMRONG, A.; PATTANAKITSAKUL, S. Synergistic effect of TNF- α and dengue virus infection on adhesion molecule reorganization in human endothelial cells. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 31 ago. 2016.
- JACOB, C. O. Tumor necrosis factor alpha in autoimmunity: pretty girl or old witch? **Immunology today**, v. 13, n. 4, p. 122–5, abr. 1992.
- JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes and infection**, v. 12, n. 4, p. 272–9, abr. 2010.
- JESSIE, K. et al. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 8, p. 1411–8, 15 abr. 2004.
- JOOB, B.; WIWANITKIT, V. Dengue transmission via transplantation: Need further evidence. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 25, n. 1, p. 152, 1 jan. 2014.
- KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 1, p. 49–62, 2015.
- KE, Z. et al. IL-10 Polymorphisms and Tuberculosis Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. **Yonsei medical journal**, v. 56, n. 5, p. 1274–87, set. 2015.
- KELADA, S. N. et al. The role of genetic polymorphisms in environmental health. **Environmental health perspectives**, v. 111, n. 8, p. 1055–64, jun. 2003.
- KING, N. J. C.; THOMAS, S. R. Molecules in focus: Indoleamine 2,3-dioxygenase. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 12, p. 2167–2172, 2007.
- KONG, Y. Y. et al. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. **Journal of virological methods**, v. 138, n. 1-2, p. 123–30, dez. 2006.
- KOURI, G. P.; GUZMÁN, M. G.; BRAVO, J. R. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 821–823, set. 1987.
- KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717–25, 8 mar. 2002.
- LAN, N. T. P.; HIRAYAMA, K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. **Tropical medicine and health**, v. 39, n. 4 Suppl, p. 73–81, dez. 2011.
- _____; LAN, T.; FAXIANG, Q. Interleukin-10 promoter polymorphism and susceptibility to lung cancer: a systematic review and meta-analysis. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 9, p. 15317–28, 2015.
- LIAO, B. et al. Serum levels of soluble vascular cell adhesion molecules may correlate with the severity of dengue virus-1 infection in adults. **Emerging microbes & infections**, v. 4, n. 4, p. e24, abr. 2015.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, v. 59, p. 23–61, jan. 2003.
- LIU, Q. Y. et al. Investigations into the association between polymorphisms in the interleukin-10 gene and risk of early-onset preeclampsia. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 19323–19328, 29 dez. 2015.
- LOPEZ-RAMIREZ, M. A. et al. Role of Caspases in Cytokine-Induced Barrier Breakdown in Human Brain Endothelial Cells. **Journal Immunology**, v. 15; 189(6):3130-9, 2012.

- MALAVIGE, G. N. et al. Cellular and Cytokine Correlates of Severe Dengue Infection. **Plos one**, v. 7, n. 11, 2012.
- MALAVIGE, G. N. et al. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 341, 2013.
- MALUTAN, A. M. et al. The association between interleukin-10 (IL-10) –592C/A, –819T/C, –1082G/A promoter polymorphisms and endometriosis. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, 21 dez. 2016.
- MANGIONE, J. N. A. et al. The association of cytokines with severe dengue in children. **Tropical medicine and health**, v. 42, n. 4, p. 137–44, dez. 2014.
- MAROUN, S. L. C. et al. Relato de caso: transmissão vertical de dengue. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 6, p. 556–559, dez. 2008.
- MARZOCHI, K. et al. Dengue no Brasil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 5, n. 1, p. 173–215, jun. 1998.
- MILANO, M. et al. Single Nucleotide Polymorphisms in IL17A and IL6 Are Associated with Decreased Risk for Pulmonary Tuberculosis in Southern Brazilian Population. **Plos one**, v. 11, n. 2, p. e0147814, 3 fev. 2016.
- MOHSIN, S. N. et al. Association of FcγRIIIa Polymorphism with Clinical Outcome of Dengue Infection: First Insight from Pakistan. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 4, p. 691–6, out. 2015.
- MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature Medicine**, v. 9, n. 7, p. 921–927, 15 jul. 2003.
- MULLER, B. L. A. et al. Inflammatory and immunogenetic markers in correlation with pulmonary tuberculosis. **Jornal brasileiro de pneumologia**, v. 39, n. 6, p. 719–27, jan. .
- MURRELL, S.; WU, S.-C.; BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 2, p. 239–47, jan. .
- MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67–70, nov. 2014.
- NIMMAGADDA, S. S. et al. Atypical Manifestations of Dengue Fever (DF) - Where Do We Stand Today? **Journal of clinical and diagnostic research**, v. 8, n. 1, p. 71–3, jan. 2014.
- NORMILE, D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science (New York, N.Y.)**, v. 342, n. 6157, p. 415, 25 out. 2013.
- OLLIER, W. E. R. Cytokine genes and disease susceptibility. **Cytokine**, v. 28, n. 4-5, p. 174–178, nov. 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and severe dengue. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 15 fev. 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue, Annual Cases Reported of Dengue. PAHO/WHO Data, Maps and Statistics. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6290&Itemid=40734/>. Acesso em: 15 fev. 2016.
- PANDEY, N. et al. Serum levels of IL-8, IFN, IL-10, and TGF and their gene expression levels in severe and non-severe cases of dengue virus infection. **Archives of Virology**, v. 160, n. 6, p. 1463–1475, 2015.

- PARKASH, O.; SHUEB, R. H. Diagnosis of Dengue Infection Using Conventional and Biosensor Based Techniques. **Viruses**, v. 7, n. 10, p. 5410–27, jan. 2015.
- PEPIN, K. M. et al. Cost-effectiveness of novel system of mosquito surveillance and control, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 4, p. 542–50, abr. 2013.
- PEREIRA, V. A. et al. IL10A genotypic association with decreased IL-10 circulating levels in malaria infected individuals from endemic area of the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 30, 28 jan. 2015.
- PEREZ, A. B. et al. Tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. **Human immunology**, v. 71, n. 11, p. 1135–40, nov. 2010.
- PÉREZ, A. B. et al. IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. **Journal of medical virology**, v. 73, n. 2, p. 230–4, jun. 2004.
- PEROVIC, D. et al. Evaluation of cytokine genetic polymorphisms in adult patients with common variable immunodeficiency: A single-center study. **Immunology letters**, 8 jun. 2016.
- PERREY, C. et al. Genotyping for polymorphisms in interferon- γ , interleukin-10, transforming growth factor- β 1 and tumour necrosis factor- α genes: a technical report. **Transplant Immunology**, v. 6, n. 3, p. 193–197, set. 1998.
- PHONGSAMART, W. et al. Dengue virus infection in late pregnancy and transmission to the infants. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 27, n. 6, p. 500–4, jun. 2008.
- PINHEIRO, M. B. et al. Severe preeclampsia: Association of genes polymorphisms and maternal cytokines production in Brazilian population. **Cytokine**, v. 71, n. 2, p. 232–237, fev. 2015.
- POTHAPREGADA, S.; KAMALAKANNAN, B.; THULASINGAM, M. Clinical Profile of Atypical Manifestations of Dengue Fever. **Indian journal of pediatrics**, 4 jan. 2016.
- PRAVICA, V. et al. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. **Human immunology**, v. 61, n. 9, p. 863–6, set. 2000.
- PRESTWOOD, T. R. et al. Gamma interferon (IFN- γ) receptor restricts systemic dengue virus replication and prevents paralysis in IFN- α/β receptor-deficient mice. **Journal of virology**, v. 86, n. 23, p. 12561–70, dez. 2012.
- QIDWAI, T.; KHAN, F. Tumour Necrosis Factor Gene Polymorphism and Disease Prevalence. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 74, n. 6, p. 522–547, 2011.
- RAEBURN, C. D. et al. Cytokines for surgeons. **American journal of surgery**, v. 183, n. 3, p. 268–73, mar. 2002.
- RAITALA, A. et al. Association of interferon- γ +874(T/A) single nucleotide polymorphism with the rate of tryptophan catabolism in healthy individuals. **Scandinavian journal of immunology**, v. 61, n. 4, p. 387–90, abr. 2005.
- RALAPANAWA, D. M. P. U. K.; KULARATNE, S. A. M.; JAYALATH, W. A. T. A. Guillain-Barre syndrome following dengue fever and literature review. **BMC research notes**, v. 8, p. 729, jan. 2015.
- RAMOS, E. F. Sobre a transmissão transfusional da febre dengue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 418–420, out. 2008.
- RATHAKRISHNAN, A. et al. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e52215, jan. 2012.

- RATHAKRISHNAN, A.; SEKARAN, S. D. New development in the diagnosis of dengue infections. **Expert opinion on medical diagnostics**, v. 7, n. 1, p. 99–112, 2013.
- REGIS, L. N. et al. Sustained reduction of the dengue vector population resulting from an integrated control strategy applied in two Brazilian cities. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e67682, 7 jan. 2013.
- RIBEIRO, A. F. et al. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 4, p. 671–676, ago. 2006.
- RIBEIRO, C. F. et al. Perinatal transmission of dengue: a report of 7 cases. **The Journal of pediatrics**, v. 163, n. 5, p. 1514–6, nov. 2013.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and molecular life sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773–86, ago. 2010.
- ROSEN, L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 26, n. 3, p. 337–43, maio 1977.
- ROTHMAN, A. L. Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 338, p. 83–98, jan. 2010.
- SAM, S.-S. et al. High producing tumor necrosis factor alpha gene alleles in protection against severe manifestations of dengue. **International journal of medical sciences**, v. 12, n. 2, p. 177–86, 2015.
- SANG, S. et al. The Epidemiological Characteristics and Dynamic Transmission of Dengue in China, 2013. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005095, nov. 2016.
- SANTOS, A. R. et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases**, v. 68, n. 3, p. 325–7, set. 2000.
- SANTOS, A. R. et al. Role of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 Promoter Gene Polymorphisms in Leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 11, p. 1687–1691, 1 dez. 2002.
- SANTOS, L. L. DA S. et al. Epidemiological analysis of dengue in a Brazilian Northeast region population. **Journal of Nursing UFPE on line**, v. 10, n. 6, p. 1944–1956, 2016.
- SAXENA, M.; SRIVASTAVA, N.; BANERJEE, M. Association of IL-6, TNF- α and IL-10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 11, p. 6271–9, nov. 2013.
- SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature**, v. 15, n. 12, p. 745–759, 2015.
- SHALEV, I. et al. Making sense of regulatory T cell suppressive function. **Seminars in immunology**, v. 23, n. 4, p. 282–92, ago. 2011.
- SHI, Y.; JIANG, Z.; ZENG, K. Effect of IL-6 and TNF- α on Dengue virus infection of human dendritic cells. **Xi bao yu fen zi mian yi xue za**, v. 22, n. 4, p. 469–71, jul. 2006.
- SILVA, G. A. V et al. Association between the IFNG +874A/T gene polymorphism and leprosy resistance: a meta-analysis. **Cytokine**, v. 65, n. 2, p. 130–3, fev. 2014.

- SINGLA, M. et al. Immune Response to Dengue Virus Infection in Pediatric Patients in New Delhi, India—Association of Viremia, Inflammatory Mediators and Monocytes with Disease Severity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004497, 16 mar. 2016.
- SINHA, S. et al. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcγRIIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. **Malaria journal**, v. 7, p. 13, jan. 2008.
- SIQUEIRA, J. B. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 48–53, 2005.
- SOLÉ, X. et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 22, n. 15, p. 1928–9, 1 ago. 2006.
- SOUNDRAVALLY, R. et al. Association between proinflammatory cytokines and lipid peroxidation in patients with severe dengue disease around defervescence. **International journal of infectious diseases**, v. 18, p. 68–72, jan. 2014.
- SRIKIATKHACHORN, A.; GREEN, S. Markers of dengue disease severity. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 338, p. 67–82, jan. 2010.
- TADEU, L.; FIGUEIREDO, M. Dengue in Brazil : Past , Present and Future Perspective Brazilian flaviviruses. **Dengue Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 25–33, 2003.
- TALAAT, R. M. et al. Interleukin 10 (–1082 G/A) and (–819 C/T) gene polymorphisms in Egyptian women with polycystic ovary syndrome (PCOS). **Meta Gene**, v. 9, p. 254–258, set. 2016.
- TANG-FELDMAN, Y. J. et al. Interleukin-10 repletion suppresses pro-inflammatory cytokines and decreases liver pathology without altering viral replication in murine cytomegalovirus (MCMV)-infected IL-10 knockout mice. **Inflammation research**, v. 60, n. 3, p. 233–43, mar. 2011.
- TANTAWICHIEEN, T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever in adolescents and adults. **Pediatrics and international child health**, v. 32 Suppl 1, p. 22–7, maio 2012.
- TAVARES, M. et al. Tumour necrosis factor-alpha (-308G/A) promoter polymorphism is associated with ulcerative colitis in Brazilian patients. **International Journal of Immunogenetics**, v. 43, n. 6, p. 376–382, dez. 2016.
- TEIXEIRA, L. K. et al. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100 Suppl , p. 137–44, mar. 2005.
- THEOFILOPOULOS, A. N. et al. The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. **Arthritis research**, v. 3, n. 3, p. 136–41, jan. 2001.
- TISONCIK, J. R. et al. Into the Eye of the Cytokine Storm. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 16–32, 5 mar. 2012.
- TSAI, T.-T. et al. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. **Journal of biomedical science**, v. 20, n. 1, p. 40, 2013.
- VANNBERG, F. O.; CHAPMAN, S. J.; HILL, A. V. S. Human genetic susceptibility to intracellular pathogens. **Immunological Reviews**, v. 240, n. 1, p. 105–116, 2011.
- VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. The history and evolution of human dengue emergence. **Advances in virus research**, v. 72, p. 1–76, jan. 2008.

VEJBAESYA, S. et al. TNF and LTA gene, allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 10, p. 1442–8, 15 maio 2009.

VILLAR, L. Á. et al. Biomarkers for the prognosis of severe dengue. **Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 33 Suppl 1, p. 108–16, set. 2013.

XAVIER-CARVALHO, C. et al. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: A case-control, functional and meta-analysis study. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 20, p. 197–205, 2013.

WEERAKKODY, R. M. et al. Dengue fever in a liver-transplanted patient: a case report. **Journal of medical case reports**, v. 8, p. 378, jan. 2014.

WENDEL, S.; LEVI, J. E. Dengue em doadores de sangue: necessitamos de triagem laboratorial no Brasil? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 417–418, out. 2008.

WILSON, A. G. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 3195–9, 1 abr. 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control. [s.l: s.n.].

_____. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. [s.l: s.n.].

_____, T. D. R. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO Library, 2009b.

WRIGHT, W. F.; PRITT, B. S. Update: The diagnosis and management of dengue virus infection in North America. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 73, n. 3, p. 215–20, jul. 2012.

APÊNDICE A – Artigo derivado da dissertação submetido**Association of *TNFA* (-308G/A), *IFNG* (+874 A/T) and *IL-10* (-819 C/T) polymorphisms with protection and susceptibility to dengue in Brazilian population**

Ana Caroline Melo dos Santos^a, Edilson Leite de Moura^a, Jean Moises Ferreira^a, Alexandre Wendel Araújo de Moura^a, Ailson Darlan Sales Ferreira^a, Rubens Pereira Bezerra^a, Diego de Siqueira Figueiredo^a, Karol Fireman de Farias^a, Tiago Gomes de Andrade^{a,b}, Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo^{a,1}.

^a Molecular Biology and gene expression Laboratory, Federal University of Alagoas, Campus Arapiraca, Av Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso, 57309-005. - Arapiraca - AL - Brazil.

^b Federal University of Alagoas (UFAL) – Faculty of Medicine (FAMED), Campus AC Simões, Tabuleiro dos Martins, Maceió, Alagoas, Brazil.

First author: Ana Caroline Melo dos Santos,

Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, CEP 57072-970, Maceió, Alagoas, Brazil.

Phone: +55-82- 99603.3197

E-mail: anacaroline12305@gmail.com

Corresponding author: Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo

Laboratory of Molecular Biology and Gene Expression, Federal University of Alagoas, CEP: 57309-005, Arapiraca, Brazil.

Phone: +55-82-99931.0827

E-mail: elainevms@yahoo.com.br

Association of *TNFA* (-308G/A), *IFNG* (+874 A/T) and *IL-10* (-819 C/T) polymorphisms with protection and susceptibility to dengue in Brazilian population

Abstract

Objective: In the study, gene polymorphisms and their association with susceptibility to dengue will be evaluated. **Subjects and methods:** A retrospective case-control study was development with 262 subjects, comprising 78 Dengue fever (DF) patients, 49 Dengue hemorrhagic Fever (DHF) patients and 135 healthy controls. Genotypic and allelic profile were identified using polymerase chain reaction (PCR) based in real time and amplification-refractory mutation system (ARMS). **Results:** We observed a protective association of *IL-10* (-819 C/T) C allele ($p = 0.018$, OR = 0.62, CI = 0.43 - 0.91) against DHF, while the C/T ($p = 0.047$, OR = 2.10, CI = 1.01 - 4.38) and T/T ($p = 0.008$, OR = 3.41, CI = 1.33 - 8.72) genotypes were association with DHF and DF, respectively. The dominant model *TNFA* -308GA+AA ($p = 0.043$, OR = 0.45, CI = 0.20 - 1.00) genotypes were found to protective effect against dengue infection. A protective association among the *IFNG* (+874 A/T) A/T genotype against DF ($p = 0.02$, OR = 0.46, CI = 0.24 - 0.89) and DHF ($p = 0.034$, OR = 0.43, CI = 0.19 - 0.95) was observed. When the studied SNPs were analyzed in combination, the combination GTA ($p = 0.022$, OR = 2.95, CI = 1.18 - 7.41) was statistically associated with susceptibility to DF and the combination GCT ($p = 0.035$, OR= 0.28, CI= 0.08 - 0.90) with protection against the development of DHF. **Conclusions:** In this research was identified the association of the *IFNG* (+874 A/T), *TNFA* (-308G/A), *IL-10* (-819 C/T) genotypes as a factor for protection, susceptibility and severity to dengue.

Keywords: Immune system; *IFNG*; *TNFA*; *IL-10*; dengue; polymorphism.

1. Introduction

Dengue is a public health problem and its incidence has a wide geographical spread [1,2]. It is endemic in more than 100 countries and the World Health Organization (WHO) [3] estimated a 50–100 million dengue infections reported worldwide each year. However, a cartographic study estimated that there is approximately 390 million dengue cases per year around the world including symptomatic and asymptomatic[4]. According to the Pan American Health Organization[5] in 2015, Brazil was the country that reported most cases of dengue in the Americas with 1,649.008 of suspected dengue records and an incidence rate of 820.27 cases.

Dengue infection presents diverse a wide spectrum of clinical presentation, from asymptomatic and mild dengue fever (DF), to the most serious forms: dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). DHF is characterized by increased vascular permeability, followed by vascular leakage, which promote the appearance of hemorrhagic manifestations and thrombocytopenia while DSS includes hypotension and hypovolemic shock[6]. Clinical manifestations of dengue to severe clinical conditions which may lead to death[7]

The mosquito *Aedes Aegypti* is the main vector that transmits the viruses that cause dengue in tropical and subtropical regions and there are five serotypes distinct: DENV 1-4 [8]. Environmental factors, the serotype/genotype of dengue virus, the immune response and genetic background of host have significant influence on the development of clinical manifestations of dengue and, therefore, in disease severity[9]. Additionally, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in cytokine genes have significantly contributed to the comprehension of the physiopathology and the role of host genetic in dengue infection[10].

There are various factors associated with the development of dengue and the host immune response has been highlighted as an genetic biomarker for the disease [11] with the production of several cytokines. Therefore, polymorphisms in genes coding can influence the production and function of these proteins and consequently the protection, susceptibility or disease progression [12].

TNF- α is a pro-inflammatory cytokine involved in several physiological processes, immune conditions and tumor growth. TNF- α has been associated with DHF and DSS influencing the activity in endothelial cells, induction of inflammatory mediators, recruitment of inflammatory cells, survival of inflammatory cells, induction of tissue-destructive enzymes, apoptosis, among others[13]. The SNP -380G/A (rs1800629) has been reported to directly affect TNF- α expression in autoimmune and infectious diseases[14].

IL-10 presents a pleiotropic role with immune regulation and inflammatory in infectious diseases. In DENV pathogenesis, IL-10 has immunomodulatory activity with consequences in persistent infection viral enable an inflammatory that promotes aggravation of infection [15]. There are few studies investigating the role of polymorphisms of IL10 gene (SNP -819C/T-rs1800871) in the pathogenesis of dengue.

Interferons are a family of pleiotropic cytokines produced by T helper cells and natural killer cells during the initial phase of infection. Interferon-gamma (IFN- γ) is noteworthy due to its essential role in the regulation of the inflammatory response[16], in which it enhances the transcription of genes involved in antiviral response and antitumor activity[17]. The increase of *IFNG* expression was identified as a consequence of a functional polymorphism A/T (rs2430561), located at the +874 position in the first intron[18].

The investigation of SNPs in pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IFN- γ , as well as the anti-inflammatory cytokine of IL-10, has been associated with the variation of cytokine levels in the immune response. In this study, we investigated if SNPs from *IL-10*, *TNFA* and *IFNG* gene regions (-819C/T, -308G/A and +874A/T, respectively) influence the susceptibility to infection or dengue progression in a sample of Brazilian patients.

2. Materials and methods

2.1. Study design and samples

Dengue patients attended in the city of Arapiraca by Unified Health System (Brazilian National Public Health System), Northeast Brazil, during the years 2010 and 2015 were recruited for this research. The patients were classified by medical records and clinical laboratory results

obtained at hospital or health center. The classification of dengue cases were in accordance with the criteria of WHO guidelines [6]. DF was characterized by the presence of high fever accompanied by the following symptoms: myalgia, severe headache, retro-orbital, abdominal pain, arthralgia or rash. The DHF has the same clinical condition, however with hemorrhagic manifestations. We recruited hospitals patients who presented medical records of hemorrhagic manifestations and thrombocytopenia less than $80.000/\text{mm}^3$. Case population was positive for ELISA anti-dengue IgM realized in the Municipal Laboratory of Arapiraca (Dengue IgM Capture Elisa, PanBio, Brazil).

Control population was a group of healthy volunteer's blood donor. They all reported no history, signs and symptoms of dengue infection and, consequently without hospitalization. The laboratories tests in this group was performed using immunochromatographic rapid test (Bioeasy/Abon,Brazil) and enzyme linked immunosorbent assay (Dengue IgM Capture Elisa, PanBio, Brazil). This retrospective case-control study was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of Federal University Alagoas and consent from all study participants was obtained (Protocol: 1.073.204).

2.2. DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood in anticoagulant solution EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid), and it was performed in accordance to the manufacturer instructions (Qiagen FlexiGene® DNA Handbook, Qiagen, Germany). For patients with dengue laboratory confirmed before, samples were obtained from swab oral mucosa cells for NaCl solution extraction method [19]. DNA was quantified in a BioPhotometer plus (Eppendorf® AG, Hamburg, Germany), and visualized in a 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. The DNA samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Polymorphisms in the *TNFA* gene (-308G/A - rs1800629) and *IL-10* gene (-819 C/T - rs1800871) were genotyped by Real-time PCR, performed by allelic discrimination method using TaqMan assays (Applied Biosystem®, California, USA). Amplification of the target DNA was performed in Step One Plus equipment (Applied Biosystem®, California, USA) with the following conditions: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, followed by 40 cycles of $92\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 sec and $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min. Data were analyzed by StepOne Plus software (Applied Biosystems®, California, USA).

The polymorphism of *IFNG* (+874A/T - rs2430561) gene was identified by Amplification Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction (ARMS-PCR). The primer sequences were as follows [20]: *IFNG* primer A allele, 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3'; *IFNG* primer T allele, 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3'; GH (growth hormone) Internal Control 1, 5'-GCCTTCCCAACCATTCCTTA-3'; GH (growth hormone) Internal Control 2, 5'-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3'; and *IFNG* generic primer, 5'-TCAACAAAGCTGATACTCCA-3'. Amplification of the target DNA was performed in a thermocycler (Esco technologies®, USA) under the following conditions: heating at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min, 10 cycles of denaturation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s, annealing at $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 50 s, elongation at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 40 s, followed by 20 cycles of denaturation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 s, annealing at $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 50 s, elongation at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 50 s, final elongation at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 min, and final hold at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min.

ARMS-PCR amplicons were then submitted to a 2% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide (Amresco Inc., USA), and visualized under ultraviolet light.

2.3. Statistical analysis

The data were presented as mean and standard deviation. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested using goodness-of-fit chi-square test to compare the observed and expected genotype frequencies among cases and controls. Statistical analyses were performed using BioEstat version 5.0 for allelic frequencies and associations. For association analysis, a logistic regression model was carried out by using SNPstats software, the intrinsic factors that could influence the profile of the population and thus adjusted by the data in relation to age and gender. Codominant model, dominant model, recessive model, over dominant model and log-additive model were considered to evaluate the risk of dengue associated with each SNP. Akaike information criterion (AIC) and Bayesian Information Criterion (BIC) was used to determine the best model of inheritance. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated considering $OR < 1$ associated with protection and $OR > 1$ associated with susceptibility/risk. Values $p < 0.05$ were considered statistically significant. The power of sample size was calculated by G*power software version 3.0 using as test family: Chi-squared test; Statistical test: Goodness-of-fit tests-contingency tables and Type of power analysis: Post hoc [21].

3. Results

The genotypic distribution was in accordance to the Hardy-Weinberg equilibrium. Seventy-eight patients with DF (age 32.77 ± 15.4), 49 (35.4 ± 18.1) patients with DHF and 135 (age 22.4 ± 4.9) control subjects were recruited for this study. Tables 1 and 2 show the genotypic and allelic frequencies of *TNFA* (-308G/A), *IL-10* (-819 C/T) and *IFNG* (+874 A/T) SNPs in dengue clinical forms and healthy controls.

Genotypic frequencies between group dengue (DEN=DF+DHF) and controls were compared, and was observed an association of protection with *TNFA* (-308G/A) polymorphism gene G/A+A/A in model dominant ($p = 0.043$, OR = 0.51, CI = 0.26 - 0.99). Comparing DF group and healthy controls for *TNFA* (-308G/A) polymorphism in a dominant model (GG vs G/A+A/A), G/A+A/A genotypes were positively associated with protection for dengue fever ($p = 0.043$, OR = 0.45, CI = 0.20 - 1.00) (Table 1). Genotypic (table 1) and allelic (table 2) frequencies were not significantly different between DF and DHF.

To analyze the association of *IL-10* (-819 C/T) polymorphism with disease susceptibility, the genotype frequency was compared between DEN and controls. In a codominant model ($p = 0.014$, OR = 4.07, CI = 1.52 - 10.85), dominant model ($p = 0.04$, OR = 1.78, CI = 1.02 - 3.11) and recessive model ($p = 0.008$, OR = 3.41, CI = 1.33 - 8.72) the T/T genotype was significantly associated with DEN. The genotypic distribution of *IL-10* (-819 C/T) were compared between DF group and healthy controls and a high frequency of genotype C/C was observed in group control. The T/T genotype of *IL-10* (-819 C/T) was significantly associated with DF but not with the severe form DHF (Table 1) in a co-dominant model ($p = 0.014$, OR = 4.07, CI = 1.52 - 10.85) and ($p = 0.0089$, OR = 3.82, CI = 1.38 - 10.59). When compared between DF group with DHF, the C/T genotype was significantly associated with the progression for DHF in an over dominant

model ($p = 0.047$, $OR = 2.10$, $CI = 1.01 - 4.38$) (table 1). Interestingly, the C allele were significantly associated with protection for DHF when compared to healthy controls ($p = 0.028$, $OR = 0.56$, $CI = 0.34 - 0.91$) (Table 3).

We also evaluated the association of *IFNG* (+874 A/T) polymorphisms with DEN group and healthy controls, in a codominant model ($p = 0.026$, $OR = 0.45$, $CI = 0.24 - 0.83$), dominant model ($p = 0.033$, $OR = 0.54$, $CI = 0.30 - 0.96$) and over dominant model ($p = 0.0071$, $OR = 0.46$, $CI = 0.26 - 0.82$) the T/A genotype was significantly associated with protection a disease. The T/A genotype of *IFNG* (+874 A/T) polymorphism was statistically associated with protection when compared DF group with healthy controls for dengue infection ($p = 0.02$, $OR = 0.46$, $CI = 0.24 - 0.89$) and when compared DHF group with healthy controls ($p = 0.034$, $OR = 0.43$, $CI = 0.19 - 0.95$) in an over dominant model (Table 1). There were no observed differences in allelic and genotypic frequencies between DF and DHF (Tables 1 and 2).

Table 3 shows the haplotype distribution of the analyzed polymorphisms. *TNFA/IL-10/IFNG* GTA was associated with the susceptibility for dengue infection ($p = 0.022$, $OR = 2.95$, $CI = 1.18 - 7.41$) and *TNFA/IL-10/IFNG* GCT ($p = 0.035$, $OR = 0.28$, $CI = 0.08 - 0.90$) was significantly associated with protection for DHF. The post hoc power analyses in this paper were 68% (*TNFA* -308G/A), 99% (*IL-10* -819 C/T) and 99% (*IFNG* +874 A/T).

4. Discussion

We investigated the potential association of the *TNFA* (-308G/A), *IFNG* (+874 A/T) and *IL-10* (-819 C/T) polymorphism with the development of dengue in a Brazilian sample. Individual genetic variations may affect the host response to infectious, in this context several studies have investigated the role of cytokine gene polymorphisms in susceptibility to diseases included dengue [22]. In infection dengue, the polymorphisms genetics could mediate the production of cytokines and hence susceptibility or progression to infection. Here, our findings suggested a role of genetic polymorphisms of the *TNFA* (-308G/A), *IL-10* (-819) and *IFNG* (+874 A/T) on dengue infection in a sample from the Brazilian population.

The significant role of TNF- α in DENV immunopathogenesis has been reported [23]. In this study we identified that the dominant model GA+AA was linked with protection to dengue, additionally to our results, in a case control study on Malaysia, the G/A+A/A *TNFA* (-308G/A) genotype was associated with reduced risk for DHF[24]. The presence of A allele polymorphism has been related to a higher *TNFA* gene expression level [25]. Therefore, our findings suggest a possible correlation between the presence of high-expressing *TNFA* -308A allele and protection against DF. The TNF- α cytokine in high and medium concentrations may inhibit the DENV replication in human dendritic cells [23] and this inhibition may decrease the dengue infection.

Interestingly, the Brazilian studies that investigated the role of several cytokines polymorphisms concluded that *TNFA* (-308G/A) were not related with predisposition to dengue [26,27]. Studies conducted in population Thai [28] and Mexican[29] did not identify association of the polymorphism of this cytokine with dengue. Some studies have shown the association of the A allele of *TNFA* (-308G/A) polymorphism with severity of dengue in Cuban population with

secondary infection with DENV-2[30]. In a study conducted with Thai children, the same allele was associated with the risk of bleeding[31]. Another study performed in Brazil identified a significant association of *TNFA* allele A with no persistence of the symptoms of dengue in convalescence[32]. In Sri Lanka, the G/G genotype was identified as a risk factor for the development of dengue hemorrhagic fever[10]. In our study, the G/G genotype had a high frequency in the case group compared with the control group but there was no significantly statistical difference.

IL-10 is antiinflammatory cytokine has been considered as key in the control of host immune response by regulate the production of several pro inflammatory cytokines [33]. Likely the IL-10 is regulated at transcriptional level by several polymorphisms in the promotor region in this gene, among them the polymorphism -819 [15,33]. In our study, the T/T genotype of the SNP *IL-10* (-819 C/T) was significantly associated with susceptibility to dengue fever infection, whereas the C/T genotype was linked with the progression for DHF differently from other studies performed which did not identify association in the populations Brazilian [26], Sinhalese [10] and Cuban [30]. Nevertheless, the heterozygous genotype was previously associated with protection for DF in India [34]. In this study, we found an association between C allele and protection against the development for the DHF. Other studies, including one performed in a sample from the Brazilian population, did not find any allelic association [24,26,34].

Interferons are cytokines that play a complex role in host resistance because of the action of pathogens, the IFN- γ is able to upregulate the expression of Fc γ receptors on monocytes and macrophages, thus, may facilitate viral replication [35]. The presence of +874 A/T polymorphism in IFN- γ gene has been shown to influence gene transcriptional level. Genotypes TT, T/A and AA were associated with high, intermediate and low production of *IFNG*, respectively, wherein the T allele was associated high levels [36]. Our findings suggest a possible association between heterozygosity for *IFNG* (+874 A/T) polymorphism and a protector effect against DF and DHF. The A allele previously showed a possible association with the non-persistence of symptoms during thirty days, in primary dengue and persistence of symptoms in secondary dengue[32], in a Brazilian patients cohort. Yet in population Brazilian, the genotype heterozygosity in comparison of group control and dengue was linked with protection [27]. However, earlier studies did not find associations between this SNP and dengue severity [30,34]. The T allele have been associated with increased indoleamine-pyrole 2,3-dioxygenase (IDO) activity[37], the growth this enzyme activity promotes a high conversion of tryptophan to kynurenine, a molecule involved in DHF, for present increased significantly in patients with DHF [38]. The intermediate expression A/T genotype may non-increased IDO activity, accordingly causing a low level of kynurenine that may act in effect protector against DHF.

We also performed a haplotype analysis to investigate the combinatory effect among the cytokines polymorphism. Our findings showed an association between *TNFA/IL-10/IFNG* GTA haplotype and the susceptibility for dengue infection. While the *TNFA/IL-10/IFNG* GCT haplotype was associated with a protector effect against DHF. The diversity genetic between

populations and miscegenation of population Brazilian may explain the different results presented in this study.

We identified associations between polymorphisms in *TNFA* (-308G/A), *IFNG* (+874 A/T) and *IL-10* (-819) genes with dengue infection and clinical category for the disease. This outcome provides evidence that genetic polymorphisms in immune system affect susceptibility or protect to clinical phenotypes of dengue and may be considered as good prognostic markers. Yet is important that further studies investigated asymptomatic individuals and linked with factors clinical and laboratorial, genetics, immunological are needed. In addition, gene expression of cytokines in patients with dengue associated with polymorphisms may be an opportunity to observe the synchronized biological relevance and interaction of genes in susceptibility, progression or protection a disease.

Acknowledgements

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) by supported scholarship the ACMS. This work was financed by Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL), nº protocol: 20110906-011-0025-0080. The authors acknowledge the help rendered by Laboratory Municipal de Arapiraca - AL in sample collection and performing IgM ELISA. The authors thank Laboratory de Analysis Clinics Dr. Edler Lins (LACEL) by performing IgM ELISA in control group.

Disclosure statement

None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript.

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL) - Programa Primeiros Projetos (PPP/2011) .

References

- [1] O.J. Brady, P.W. Gething, S. Bhatt, J.P. Messina, J.S. Brownstein, A.G. Hoen, C.L. Moyes, A.W. Farlow, T.W. Scott, S.I. Hay, Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012). doi:10.1371/journal.pntd.0001760.
- [2] L. Grange, E. Simon-Loriere, A. Sakuntabhai, L. Gresh, R. Paul, E. Harris, Epidemiological risk factors associated with high global frequency of inapparent dengue virus infections., *Front. Immunol.* 5 (2014) 280. doi:10.3389/fimmu.2014.00280.
- [3] W.H. Organization, WHO | Dengue and severe dengue, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. (2013). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/> (accessed February 15, 2016).
- [4] S. Bhatt, P.W. Gething, O.J. Brady, J.P. Messina, A.W. Farlow, C.L. Moyes, J.M. Drake, J.S. Brownstein, A.G. Hoen, O. Sankoh, M.F. Myers, D.B. George, T. Jaenisch, G.R.W.

- Wint, C.P. Simmons, T.W. Scott, J.J. Farrar, S.I. Hay, The global distribution and burden of dengue., *Nature*. 496 (2013) 504–507. doi:10.1038/nature12060.
- [5] PAHO WHO | Dengue | Annual Cases Reported of Dengue | PAHO/WHO Data, Maps and Statistics, (n.d.).
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=6290&Itemid=40734 (accessed February 15, 2016).
- [6] World Health Organization, *Dengue hemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control*, 2nd ed, Geneva: World Health Organization, 1997.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41988/1/9241545003_eng.pdf.
- [7] Who, *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control*, 2009.
 doi:WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1.
- [8] D. Normile, Surprising New Dengue Virus Throws A Spanner in Disease Control Efforts, *Science* (80-.). 342 (2013) 2013. doi:10.1126/science.342.6157.415.
- [9] L.J. Herrero, A. Zakhary, M.E. Gahan, M.A. Nelson, B.L. Herring, A.J. Hapel, P.A. Keller, M. Obeysekera, W. Chen, K.C. Sheng, A. Taylor, S. Wolf, J. Bettadapura, S. Broor, L. Dar, S. Mahalingam, Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis, *Pharmacol. Ther.* 137 (2013) 266–282. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.10.007.
- [10] A.N. Fernando, G.N. Malavige, K.L.N. Perera, S. Premawansa, G.S. Ogg, A.D. De Silva, Polymorphisms of Transporter Associated with Antigen Presentation, Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 and their Implications for Protection and Susceptibility to Severe Forms of Dengue Fever in Patients in Sri Lanka., *J. Glob. Infect. Dis.* 7 (2015) 157–64. doi:10.4103/0974-777X.170501.
- [11] S.N. Mohsin, S. Mahmood, A. Amar, F. Ghafoor, S.M. Raza, M. Saleem, Association of Fc γ RIIa Polymorphism with Clinical Outcome of Dengue Infection: First Insight from Pakistan., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93 (2015) 691–6. doi:10.4269/ajtmh.15-0199.
- [12] H. Harapan, J.K. Fajar, N. Wahyuniati, J.R. Anand, L. Nambaru, K.F. Jamil, Non-HLA gene polymorphisms and their implications on dengue virus infection, *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* 14 (2013) 1–11. doi:10.1016/j.ejmhg.2012.08.003.
- [13] G.D. Kalliolias, L.B. Ivashkiv, TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies, *Nat. Rev. Rheumatol.* 12 (2015) 49–62.
 doi:10.1038/nrrheum.2015.169.
- [14] M.M. Elahi, K. Asotra, B.M. Matata, S.S. Mastana, Tumor necrosis factor alpha –308 gene locus promoter polymorphism: An analysis of association with health and disease, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1792 (2009) 163–172.
 doi:10.1016/j.bbadis.2009.01.007.

- [15] T.-T. Tsai, Y.-J. Chuang, Y.-S. Lin, S.-W. Wan, C.-L. Chen, C.-F. Lin, An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection., *J. Biomed. Sci.* 20 (2013) 40. doi:10.1186/1423-0127-20-40.
- [16] J.H. Bream, A. Ping, X. Zhang, C. Winkler, H.A. Young, A single nucleotide polymorphism in the proximal IFN-gamma promoter alters control of gene transcription., *Genes Immun.* 3 (2002) 165–9. doi:10.1038/sj.gene.6363870.
- [17] L.C. Conti-Freitas, M.C. Foss-Freitas, R.C.M. Mamede, N.T. Foss, Interferon-gamma and interleukin-10 production by mononuclear cells from patients with advanced head and neck cancer., *Clin. (São Paulo, Brazil).* 67 (2012) 587–90.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3370309&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed April 10, 2016).
- [18] L.K. Teixeira, B.P.F. Fonseca, B.A. Barboza, J.P.B. Viola, The role of interferon-gamma on immune and allergic responses., *Memórias Do Inst. Oswaldo Cruz.* 100 Suppl (2005) 137–44. doi:/S0074-02762005000900024.
- [19] M.G. Abrão, A.E.C. Billerbeck, M.Y. Nishi, S. Marui, B.B. De Mendonça, [Standardization of DNA extraction with NaCl from oral mucosa cells: application in PROP1 gene study]., *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 49 (2005) 978–82. doi:/S0004-27302005000600019.
- [20] C. Perrey, V. Pravica, P.J. Sinnott, I. V Hutchinson, Genotyping for polymorphisms in interferon- γ , interleukin-10, transforming growth factor- β 1 and tumour necrosis factor- α genes: a technical report, *Transpl. Immunol.* 6 (1998) 193–197. doi:10.1016/S0966-3274(98)80045-2.
- [21] A.C.M. dos Santos, E.L. de Moura, J.M. Ferreira, B.R.C. dos Santos, V. de M. Alves, K.F. de Farias, E.V.M. de Souza Figueiredo, Meta-Analysis of the Relationship between TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) Gene Polymorphisms and Susceptibility to Dengue, *Immunol. Invest.* 46 (2016) 201–220. doi:10.1080/08820139.2016.1248560.
- [22] S.J. Chapman, A.V.S. Hill, Human genetic susceptibility to infectious disease., *Nat. Rev. Genet.* 13 (2012) 175–88. doi:10.1038/nrg3114.
- [23] Y. Shi, Z. Jiang, K. Zeng, [Effect of IL-6 and TNF-alpha on Dengue virus infection of human dendritic cells]., *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 22 (2006) 469–71.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806011> (accessed February 15, 2016).
- [24] S.-S. Sam, B.-T. Teoh, K. Chinna, S. AbuBakar, High producing tumor necrosis factor alpha gene alleles in protection against severe manifestations of dengue., *Int. J. Med. Sci.* 12 (2015) 177–86. doi:10.7150/ijms.8988.
- [25] L.J. Abraham, K.M. Kroeger, Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease., *J. Leukoc. Biol.* 66 (1999) 562–566.

- [26] C. Xavier-Carvalho, G. Gibson, P. Brasil, R.X. Ferreira, R. De Souza Santos, O. Gonçalves Cruz, S.A. De Oliveira, M. De Sá Carvalho, A.G. Pacheco, C.F. Kubelka, M.O. Moraes, Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: A case-control, functional and meta-analysis study, *Infect. Genet. Evol.* 20 (2013) 197–205. doi:10.1016/j.meegid.2013.08.017.
- [27] R.N.M. Feitosa, A.C.R. Vallinoto, P.F. da C. Vasconcelos, R. do S. da S. Azevedo, V.N. Azevedo, L.F.A. Machado, S.S. Lima, M. de O.G. Ishak, R. Ishak, Gene Polymorphisms and Serum Levels of Pro- and Anti-Inflammatory Markers in Dengue Viral Infections, *Viral Immunol.* 0 (2016) vim.2016.0026. doi:10.1089/vim.2016.0026.
- [28] S. Vejbaesya, P. Luangtrakool, K. Luangtrakool, S. Kalayanaroj, D.W. Vaughn, T.P. Endy, M.P. Mammen, S. Green, D.H. Libraty, F.A. Ennis, A.L. Rothman, H.A.F. Stephens, TNF and LTA gene, allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais., *J. Infect. Dis.* 199 (2009) 1442–8. doi:10.1086/597422.
- [29] A.R. García-Trejo, J.A. Falcón-Lezama, L. Juárez-Palma, J. Granados, J. Zúñiga-Ramos, H. Rangel, R. Barquera, G. Vargas-Alarcón, C. Ramos, Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with dengue fever., *Acta Trop.* 120 (2011) 67–71. doi:10.1016/j.actatropica.2011.06.002.
- [30] A.B. Perez, B. Sierra, G. Garcia, E. Aguirre, N. Babel, M. Alvarez, L. Sanchez, L. Valdes, H.D. Volk, M.G. Guzman, Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever., *Hum. Immunol.* 71 (2010) 1135–40. doi:10.1016/j.humimm.2010.08.004.
- [31] A. Chuansumrit, N. Anantasit, W. Sasanakul, W. Chaiyaratana, K. Tangnararatchakit, P. Butthep, S. Chunhakan, S. Yoksan, Tumour necrosis factor gene polymorphism in dengue infection: association with risk of bleeding., *Paediatr. Int. Child Health.* 33 (2013) 97–101. doi:10.1179/2046905512Y.0000000049.
- [32] R.S. Dettogni, R. Tristão-Sá, M. Dos Santos, F.F. da Silva, I.D. Louro, Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons., *Hum. Immunol.* 76 (2015) 717–23. doi:10.1016/j.humimm.2015.09.026.
- [33] D. Perovic, V. Perovic, V. Pravica, B. Bonaci-Nikolic, R. Mijanovic, V. Bunjevacki, Evaluation of cytokine genetic polymorphisms in adult patients with common variable immunodeficiency: A single-center study., *Immunol. Lett.* (2016). doi:10.1016/j.imlet.2016.05.005.
- [34] K. Alagarasu, R. V. Bachal, H. Tillu, A.P. Mulay, M.B. Kakade, P.S. Shah, D. Cecilia, Association of combinations of interleukin-10 and pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms with dengue hemorrhagic fever, *Cytokine.* 74 (2015) 130–136.

doi:10.1016/j.cyto.2015.03.021.

- [35] U. Boehm, T. Klamp, M. Groot, J.C. Howard, Cellular Responses to Interferon-g, *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 749–795. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.749.
- [36] V. Pravica, C. Perrey, A. Stevens, J.H. Lee, I. V Hutchinson, A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production., *Hum. Immunol.* 61 (2000) 863–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11053629> (accessed April 3, 2016).
- [37] A. Raitala, M. Pertovaara, J. Karjalainen, S.S. Oja, M. Hurme, Association of interferon-gamma +874(T/A) single nucleotide polymorphism with the rate of tryptophan catabolism in healthy individuals., *Scand. J. Immunol.* 61 (2005) 387–90. doi:10.1111/j.1365-3083.2005.01586.x.
- [38] L. Cui, Y.H. Lee, T.L. Thein, J. Fang, J. Pang, E.E. Ooi, Y.S. Leo, C.N. Ong, S.R. Tannenbaum, Serum Metabolomics Reveals Serotonin as a Predictor of Severe Dengue in the Early Phase of Dengue Fever., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (2016) e0004607. doi:10.1371/journal.pntd.0004607.

Table 1 - Percent genotype distributions of TNFA, IL10 and IFNG in healthy controls and dengue patient groups.

SNP	Genotype	N (Frequencies)				Model	Genotype	Control vs DEN		Control vs DF		Control vs DHF		DF vs DHF	
		Control	DEN	DF	DHF			OR* with 95% CI	p	OR with 95% CI	p	OR with 95% CI	p	OR with 95% CI	p
<i>TNFA</i> -308	G/G	99(73.3)	102(80.3)	63(80.8)	39(79.6)	Codominant	GG GA AA	0.52 (0.26-1.05)	0.12	0.45 (0.20-1.03)	0.13	0.49(0.19-1.27)	0.17	1.21(0.48-3.02)	0.54
	G/A	33(24.4)	24(18.9)	14(17.9)	10(20.4)	Dominant	GA+AA vs GG	0.51 (0.26-0.99)	0.04	0.51 (0.26-0.99)	0.043	0.46(0.18-1.18)	0.092	1.12 (0.45-2.77)	0.8
	A/A	3(2.2)	1(0.8)	1 (1.3)	0 (0)	Recessive	GG+GA vs AA	0.36 (0.03-3.92)	0.38	0.58 (0.05-6.32)	0.64	0.00 (0.00-NA)	0.26	0.00 (0.00-NA)	0.31
						Overdominant	GG+AA vs GA	0.54 (0.27-1.07)	0.072	0.46(0.20-1.04)	0.054	0.50 (0.19-1.30)	0.14	1.23(0.49-3.07)	0.66
						Log additive	--	0.53 (0.29-0.98)	0.03	0.50 (0.24-1.04)	0.052	0.45 (0.18-1.13)	0.073	1.03 (0.44-2.41)	0.95
<i>IL10</i> -819	C/C	72(53.3)	54(42.5)	37 (47.4)	17 (34.7)	Codominant	CC CT TT	4.07(1.52-10.85)	0.01	4.21 (1.45-12.25)	0.027	3.37 (0.89-12.82)	0.17	1.05 (0.34-3.2)	0.14
	C/T	55(40.7)	54(42.5)	28 (35.9)	26 (53.1)	Dominant	C/C vs CT+TT	1.78 (1.02-3.11)	0.04	1.62 (0.86-3.08)	0.13	1.83 (0.84-3.97)	0.12	1.78 (0.84-3.77)	0.13
	T/T	8(5.9)	19(15)	13 (16.7)	6 (12.2)	Recessive	T/T vs CC +CT	3.41 (1.33-8.72)	0.008	3.82 (1.38-10.59)	0.0089	2.66 (0.75-9.43)	0.14	0.71 (0.25-2.01)	0.51
						Overdominant	T/C vs CC+CT	1.13 (0.65-1.97)	0.67	0.95 (0.50-1.83)	0.89	1.32 (0.61-2.83)	0.48	2.10 (1.01-4.38)	0.047
						Log additive	--	1.79 (1.18-2.73)	0.0058	1.75 (1.09-2.82)	0.02	1.75 (0.97-3.18)	0.064	1.21 (0.3-2.02)	0.46
<i>IFNG</i> +874	A/A	43(35.2)	54(42.5)	35 (44.9)	19 (38.8)	Codominant	AA TA TT	0.45 (0.24-0.83)	0.02	0.45(0.22-0.92)	0.066	0.45(0.19-1.07)	0.1	1.15 (0.50-2.61)	0.79
	A/T	64(52.5)	46(36.2)	28 (35.9)	18 (36.7)	Dominant	AA vs TA+TT	0.54 (0.30-0.96)	0.03	0.53(0.27-1.03)	0.061	0.58(0.26-1.29)	0.18	1.23 (0.58-2.60)	0.59
	T/T	15(12.3)	27(21.3)	15 (19.2)	12 (24.5)	Recessive	TT vs AA+TA	1.39 (0.64-3.05)	0.4	1.39 (0.56-3.44)	0.48	1.81 (0.66-5.00)	0.26	1.31 (0.54-3.23)	0.55
						Overdominant	TA vs AA+TT	0.46 (0.26-0.82)	0.007	0.46 (0.24-0.89)	0.02	0.43(0.19-0.95)	0.034	1.02 (0.48-2.15)	0.96
						Log additive	--	0.80 (0.54-1.20)	0.29	0.79 (0.49-1.27)	0.33	0.91 (0.51-1.60)	0.73	1.18 (0.3-1.92)	0.5

For *IFNG* it was used 122 controls due to used of PCR-ARMS did not getting amplification of some samples. *OR (Odds ratio) with CI (confidence interval) 95% adjusted for sex and age. SNP: single nucleotides polymorphism; DEN (group DEN= DF+DHF); DF: dengue fever; DHF: dengue hemorrhagic fever.

Table 2 - Percent allelic distributions of TNFA, IL10 and IFNG in healthy controls and dengue patient groups.

SNP	Allele	N(Frequencies)				Control vs DEN		Control vs DF		Control vs DHF		DF vs DHF	
		Control	DEN	DF	DHF	OR* with 95% CI	<i>p</i>	OR with 95% CI	<i>p</i>	OR with 95% CI	<i>p</i>	OR with 95% CI	<i>p</i>
<i>TNFA</i> -308	G	231 (85.6)	228 (86.3)	140 (89.7)	88 (89.7)	1.06 (0.65-1.74)	0.88	1.47 (0.79 - 2.74)	0.27	1.48 (0.71 - 3.10)	0.37	1.00 (0.43 – 2.31)	0.84
	A	39 (14.4)	36 (13.7)	16 (10.3)	10 (10.3)								
<i>IL10</i> -819	C	199 (73.7)	162 (63.7)	102 (65.4)	60 (61.2)	0.62 (0.43-0.91)	0.018	0.67 (0.43 - 1.03)	0.088	0.56 (0.34 - 0.91)	0.028	0.83 (0.49 - 1.41)	0.59
	T	71 (26.3)	92 (36.3)	54 (34.6)	38 (38.8)								
<i>IFNG</i> +874	T	58 (37.2)	136 (39.7)	94 (38.5)	42 (42.8)	1.11(0.75-1.64)	0.65	0.94 (0.62-1.42)	0.86	1.19 (0.74-1.92)	0.53	1.26 (0.75-2.12)	0.44
	A	98 (62.8)	206 (60.3)	150 (61.5)	56 (57.2)								

*OR (Odds ratio) with CI (confidence interval) 95% adjusted for sex and age. SNP: single nucleotides polymorphism; DEN (group DEN= DF+DHF); DF: dengue fever; DHF: dengue hemorrhagic fever.

Table 3 - Combinations distributions of *TNFA*, *IL10* and *IFNG* in healthy controls and dengue patient groups.

Combinations			Frequencies				Controls vs DEN		Controls vs DF		Controls vs DHF		DF vs DHF	
<i>TNFA</i>	<i>IL10</i>	<i>IFNG</i>	Control	DEN	DF	DHF	OR* with 95% CI	<i>p</i>	OR with 95% CI	<i>p</i>	OR with 95% CI	<i>p</i>	OR with 95% CI	<i>p</i>
G	C	A	0.4148	0.3886	0.3543	0.4061	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-
G	C	T	0.2109	0.1975	0.2165	0.1653	0.60 (0.28 - 1.26)	0.18	0.89 (0.38 - 2.10)	0.79	0.28 (0.08 - 0.90)	0.035	0.42 (0.17 - 1.05)	0.066
G	T	A	0.111	0.1455	0.2024	0.1245	1.28 (0.68 - 2.42)	0.45	2.95 (1.18 - 7.41)	0.022	0.79 (0.23 - 2.71)	0.71	0.59 (0.24 - 1.46)	0.25
G	T	T	0.124	0.1479	0.1243	0.2019	2.22 (0.97 - 5.08)	0.06	1.04 (0.48 - 2.23)	0.92	1.14 (0.48 - 2.67)	0.77	1.94 (0.92 - 4.10)	0.086
A	C	A	0.0494	0.0505	0.0521	0.0408	0.82 (0.22 - 2.98)	0.76	0.72 (0.15 - 3.38)	0.68	0.48 (0.09 - 2.72)	0.41	1.06 (0.31 - 3.57)	0.93
A	C	T	0.0504	0.0442	0.031	0	1.04 (0.30 - 3.66)	0.95	0.86 (0.17 - 4.40)	0.86	0.08 (0.00 - 4.91)	0.23	0.83 (0.13 - 5.23)	0.84
A	T	A	0.0396	0.0259	0.0195	NA	0.22 (0.03 - 1.41)	0.11	0.29 (0.04 - 2.00)	0.21	-	-	-	-

For combinations it was used 122 controls due to used of PCR-ARMS did not getting amplification of some samples. *OR (Odds ratio) with CI (confidence interval) 95% adjusted for sex and age. SNP: single nucleotides polymorphism; DEN (group DEN= DF+DHF); DF: dengue fever; DHF: dengue hemorrhagic fever.

APÊNDICE B – Artigo original 1

- Artigo publicado no periódico “*Immunological investigations*” com fator de impacto: 1,82 e qualis CAPES na classificação medicina II: B1.

IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS
<http://dx.doi.org/10.1080/08820139.2016.1248560>



Meta-analysis of the Relationship between TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) Gene Polymorphisms and Susceptibility to Dengue

Ana Caroline Melo dos Santos^{a,b}, Edilson Leite de Moura^b, Jean Moisés Ferreira^b,
Barbara Rayssa Correia dos Santos^b, Verônica de Medeiros Alves^c,
Karol Fireman de Farias^b and Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo^{a,b}

^aInstitute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas, Maceio, Brazil; ^bLaboratory of Molecular Biology and Gene Expression, Federal University of Alagoas, Maceio, Brazil; ^cNursing Department, Federal University of Alagoas, Maceio, Brazil

ABSTRACT

Objective: This study determined whether tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and Interleukin-10 (IL-10) polymorphisms are associated with susceptibility to dengue.

Methods: a systematic review with meta-analysis was conducted of the associations between the TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) polymorphisms and dengue.

Results: A total of eight case-controls studies involving 384 individuals with symptomatic dengue, 571 individuals with dengue hemorrhagic fever, and 995 healthy controls were considered in the meta-analysis. There was no significant association between TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) polymorphism and dengue in overall population. However, stratifying meta-analysis by groups, the meta-analysis revealed association between the TNF- α -308 G/G (OR: 1.62, CI: 1.02–2.57, $p = 0.04$) genotype and allele G (OR: 1.62, CI: 1.04–2.55, $p = 0.03$) that confers susceptibility to symptomatic dengue, while the TNF- α -308 G/A genotype (OR: 0.69, CI = 0.39–0.99, $p = 0.04$) and allele A (OR: 0.64, CI: 0.41–1.00, $p = 0.05$) confers protection to symptomatic dengue. No difference was observed for the TNF- α (-308) and IL-10 (-819C/T) polymorphisms in the comparisons of hemorrhagic dengue versus control and hemorrhagic dengue versus symptomatic dengue.

Conclusion: This meta-analysis showed that TNF- α (-308) polymorphism is associated with dengue symptomatic susceptibility.

KEYWORDS

Dengue; interleukin-10; TNF-alpha; meta-analysis; polymorphism

Introduction

Dengue is the most common arboviral diseases in humans; it is mainly transmitted through the bite of mosquitoes of the genus *Aedes* (*Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus*) in regions tropical and subtropical. Dengue virus (DENV), member of the genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae*, has four infectious serotypes: DENV 1–4, and there are reports of a fifth serotype (DENV 5) that was located in the forests of South East Asia (Mustafa et al., 2015; Guabiraba and Ryffel, 2014; Pozzetto et al., 2015). It is estimated that over 50 million people are infected with DENV each year worldwide and about 2.5 million people live in endemic

countries (WHO, 2009) and a cartographic search estimated that about 390 million dengue cases per year around of the world (Bhatt et al., 2013).

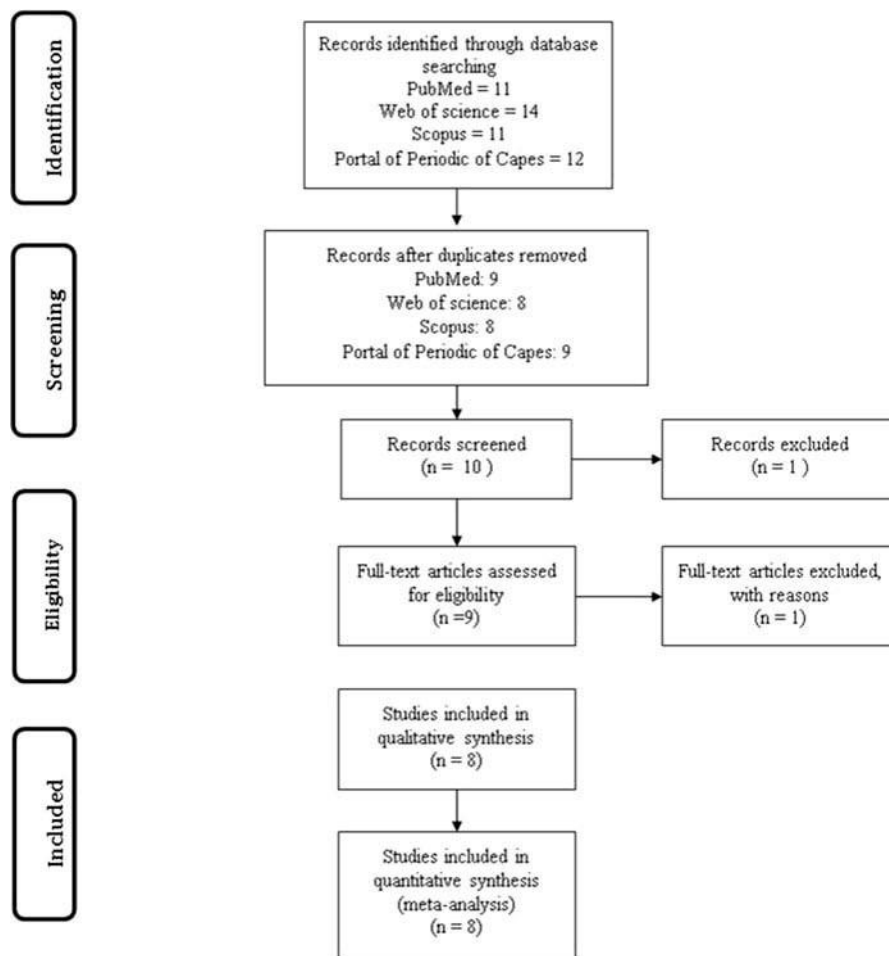


Figure 1. The flow chart of literature screening.

The disease can cause infections asymptomatic in most of cases. Symptomatic cases may develop a milder form or progress to a more severe form, when patients may develop increased vascular permeability. The progression to severe forms for DENV infection is multifactorial, involving immunological/genetic factors of the host, genotype/serotype of the virus, and environmental. Evidences epidemiological indicate that host immunity has important role in the predisposing to severity of dengue and in the induction of clinical characteristics (Gurugama et al., 2010; Herrero et al., 2013; Grange et al., 2015; Simmons et al., 2015). Immune response is involved in the pathogenesis of infectious diseases and the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines are associated with the disease severity (Acioli-Santos et al., 2008; Ennis; et al., 2009; Doeschl-Wilson et al., 2011; Costa et al., 2013; Fang et al., 2012; Rothman, 2011; Rathakrishnan et al., 2012; Vejbaesya et al., 2009). The tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) have been associated with progression of severe dengue, which are proinflammatory cytokines and anti-inflammatory, respectively.

Hence, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes that are potentially involved in the immune response may help on the comprehension of pathophysiology of infectious diseases, as dengue. SNPs are small genetic variations that may influence in the genic expression (Nardin, 2009; Lan, 2011). To better explain the association between these reported polymorphisms and dengue, we conducted a review systematic with meta-analysis about previously published studies. In the present study, we assess relationship of the polymorphism TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) with the dengue infection and progression of the illness.

Material and methods

Search strategy

The study consisted in a systematic review and meta-analysis of according with the guidelines PRISMA statement (Moher et al., 2009). The databases PubMed, Web of Science, Scopus, and Portal of Periodic of Capes were searched with unbounded period. The keys words were used as follows: dengue, polymorphism genetic, TNF- α , IL-10, and cytokines. Studies duplicated were excluded this review. The titles and abstract of the articles were assessed for two authors (ACMS and BRCS) to determine inclusion independently and selected about the association between polymorphisms of interest and dengue (Figure 1). The discrepancies were resolved by consensus.

The approach PICOS (Pregunta, 2007) was used for definition of descriptors for assess eligibility. In which participants were patients (P) with dengue and fever hemorrhagic dengue; the intervention (I): TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) polymorphism identification; compared to control groups (C): absence of dengue in the control group; outcome (O): presence or absence of the TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) polymorphism in the group of patients with dengue; Study design (S): genetic association study.

Studies included in the systematic review were (1) articles that investigated polymorphisms of TNF- α and IL-10 associated with dengue, (2) original data, and (3) studies in English language. Exclusion criteria were (1) duplicated articles; (2) case, review, or articles only with an abstract; (3) articles with other genetics polymorphisms and invitro experiments. The full text was read by all authors, because choosing of the studies could not be decided based on title and abstract. The studies selected were established by the descriptors for eligibility to this review. Disagreement on studies inclusions was resolved by consensus. All studies were in accordance with the ethical aspects of research.

Two authors (BRCS and JMF) independently assessed the quality of the searches based on the Newcastle–Ottawa Scale. Analysis was based on three broad dimensions: selection, comparability, and exposure in studies case-control. The score varies from 0 up to 9, as

described follow: high-quality study: more than 7; medium-quality study: between 4 and 6; poor-quality study: less than 4. Inconsistencies between the investigators were elucidated by debates to reevaluate the methodological quality.

The data extraction were composed for information about authors, gene, country of study, type of study, size sample, mean age of cases and controls, genotype and allelic distribution, Hardy–Weinberg equilibrium (HWE), and association.

Statistical analysis

The metafor package (<http://cran.r-project.org/web/packages/metaphor/index.html>) (Nicodemus, 2008) in R (version 3.2.4; <http://www.r-project.org/>) and RevMan (version 5.3; <http://tech.cochrane.org/revman>) software were utilized for statistical analysis. Sensitivity analysis was also performed to evaluate the impact of each individual study on the pooled OR. Allele and genotypes frequencies of the TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) polymorphism in studies were determined using the direct counting method. For each study was estimated point of risks, OR, and 95% confidence interval (CI). Pooled OR with 95% CI was used to measure the association between the TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) polymorphisms in the susceptibility and progression dengue. Pooled ORs were tested by Z test ($p < 0.05$ was considered significant). The test χ^2 was used to evaluate HWE considering p value / 0.05. Heterogeneity was examined by Q^2 (Higgins et al., 2003) and I^2 statistic (Higgins and Thompson, 2002). The fixed effect and random model were used. When the genetic factor has a similar outcome in susceptibility to disease in the studies included in a meta-analysis is used the fixed effect model, however, when there is a variation due to sampling errors is used the model of random effects (DerSimonian and Laird, 1986). When the groups investigated are uniform, the two models are analogous. However, when there is the presence of significant heterogeneity is used the random model. (DerSimonian and Laird, 1986). For investigating potential risk of bias in the studies was conducted by Egger's funnel plot and Egger's regression test, $p < 0.05$ was considered statistically significant (Egger et al., 1997).

Results

Study inclusion and characteristics

The databases show 58 possible relevant articles. Articles in duplicate were excluded; thus, 34 potentially articles were included (Figure 1). In this review, after carefully reading the abstracts and titles, eight papers (Fernandez-Mestre et al., 2004; Perez et al., 2010; García-Trejo et al., 2011; Xavier-Carvalho et al., 2013; Alagarasu et al., 2013; Alagarasu et al., 2015; Sam et al., 2015; Fernando et al., 2015) were relevant to the key words and search strategy in the electronic databases. The period of publication was 2004–2015 in populations from different countries, thus distributed: two from India, one from Malaysia, one in Brazil, one from Mexico, one of Cuba, one of Sri Lanka, and one in Venezuela. The meta-analysis was performed with 384 individuals with symptomatic dengue individuals, 578 hemorrhagic

dengue individuals, and 988 healthy controls (Fernandez-Mestre et al., 2004; Perez et al., 2010; García-Trejo et al., 2011; Alagarasu et al., 2013; Xavier-Carvalho et al., 2013; Alagarasu et al., 2015; Fernando et al., 2015). Because the number of frequency genotype/allelic of the TNF- α (-308G/A) and/or IL-10 (-819C/T) gene was not in accordance with the sample size referred by authors (Perez et al., 2010; García-Trejo et al., 2011; Sam et al., 2015), we revised it according to the percentage genotype described in the table of each study.

The classification of individuals was defined by criteria of the World Health Organization (World Health Organization, 1997). The methods for detecting polymorphisms included PCR-SSP (polymerase chain reaction-sequence specific of primers), RFLP for restriction enzyme (Restriction Fragment Length Polymorphism), qPCR (real-time PCR), and Amplification-refractory mutation system (ARMS-PCR). Information about authors, gene, country of study, type of study, size sample, mean age cases and controls, genotype and allelic distribution, HWE, and association were shown in [Table 1](#).

The comparisons were conducted considering the genotypes and allelic frequencies and stratified into the following groups: DEN (symptomatic dengue + hemorrhagic dengue) versus control (seven studies by TNF- α and five studies by IL-10), symptomatic dengue versus control (with four studies by TNF- α and two studies by IL-10), hemorrhagic dengue versus control (with seven studies by TNF- α and two studies by IL-10), and hemorrhagic dengue versus symptomatic dengue (with five studies by TNF- α and three studies by IL-10).

Table 1. Characteristics of the individual studies included in this meta-analysis.

Author	Country	Method	Cases (clinical forms) and controls	TNF alpha -308G → A						IL-10 -819T/C						Hardy-Weinberg equilibrium	Score NOS
				N	GG	GA	AA	G	A	N	TT	TC	CC	T	C		
Fernandez-Mestre et al. (2004)	Venezuela	PCR-SSP	Symptomatic dengue	41	39	2	0	80	2	41	8	16	17	32	50	Y	7
Perez et al. (2010)	Cuba	PCR-SSP	Hemorrhagic	25	18	7	0	43	7	25	4	8	13	16	34	Y	8
			Hemorrhagic Controls	43	23	11	9	57	29	43	5	26	12	36	50		
García Trejo et al. (2011)	Mexico	PCR-RFLP	Symptomatic dengue	85	78	7	0	163	7	-	-	-	-	-	-	Y	8
			Hemorrhagic Controls	45	41	4	0	86	4	-	-	-	-	-	-		
Alagarasu et al. (2013)	India	PCR-SSP PCR-RFLP	Symptomatic dengue	163	148	14	1	310	16	-	-	-	-	-	-	Y	8
			Hemorrhagic Controls	85	80	5	0	165	5	-	-	-	-	-	-		
Carvalho et al. (2013)	Brazil	qPCR	Symptomatic dengue	109	96	13	0	205	13	-	-	-	-	-	-	Y	8
			Hemorrhagic Controls	82	64	16	2	144	20	86	11	33	42	55	117		
Sam et al. (2015)	Malaysia	PCR-RFLP	Symptomatic dengue	343	271	66	6	608	78	325	44	149	132	237	413	Y	8
			Hemorrhagic Controls	86	74	11	1	159	12	86	38	35	13	111	61		
Alagarasu et al. (2015)	India	ARMS-PCR-PCR-RFLP	Symptomatic dengue	195	178	17	0	373	17	193	87	80	26	254	132	Y	8
			Hemorrhagic Controls	120	97	22	1	216	24	119	58	48	13	164	74		
Fernando et al. (2015)	Sri Lanka	ARMS-PCR	Symptomatic dengue	87	82	5	0	169	5	86	47	34	5	128	44	Y	8
			Hemorrhagic Controls	45	39	6	0	84	6	45	31	9	5	71	19		
Fernando et al. (2015)	Sri Lanka	ARMS-PCR	Symptomatic dengue	108	95	13	0	203	13	107	63	37	7	163	51	Y	8
			Hemorrhagic Controls	107	95	10	2	200	12	107	23	60	24	106	108		
			Controls	62	47	13	2	107	17	62	15	33	14	63	61		

N: Sample large; NOS: Newcastle Ottawa Scale; Y: yes.

Table 2. Meta-analysis of associations between the TNF- α (-308G/A) polymorphisms and DEN.

Polymorphism	TNF- α (-308G \rightarrow A -rs1800629)		Test of association			Test of heterogeneity			Egger's test		
	Frequencies	DEN/controls	OR (95% CI)	z	p Value	Q	p Value	I ² (%)	z	p Value	
DEN (hemorrhagic + symptomatic dengue) vs. controls (n = 7)											
Genotypes											
GG	778/823		1.18 (0.74-1.88)	0.69	0.49	R	16.80	0.01	64	1.25	0.20
GA	97/148		0.83 (0.51-1.34)	0.77	0.44	R	15.69	0.02	62	-0.33	0.73
AA	14/24		1.10 (0.54-2.22)	0.25	0.80	F	1.63	0.80	0.0	-0.22	0.82
Alleles											
G	1653/1794		1.25 (0.79-1.96)	0.96	0.34	R	18.53	0.005	68	0.08	0.93
A	122/196		0.80 (0.51-1.26)	0.96	0.25	R	18.53	0.005	68	0.02	0.97
Dominant model											
GA + AA vs. GG	111/172		0.88 (0.44-1.73)	0.38	0.70	R	30.06	<0.0001	80	0.20	0.83
IL-10 (-819C \rightarrow T -rs1800871)											
DEN (hemorrhagic + symptomatic dengue) vs. controls (n = 5)											
Genotypes											
TT	252/191		0.97 (0.74-1.27)	0.23	0.82	F	0.17	1.00	0.0	1.75	0.07
CT	277/294		1.19 (0.56-2.51)	0.45	0.65	R	4.48	0.00001	88	2.96	0.003
CC	127/199		1.15 (0.86-1.56)	0.94	0.35	F	2.76	0.60	0	0.01	0.98
Alleles											
T	761/695		0.92 (0.77-1.09)	0.97	0.33	F	1.64	0.80	0.0	1.22	0.21
C	531/711		1.09 (0.91-1.30)	0.97	0.33	F	1.64	0.80	0.0	1.22	0.22
Dominant model											
TC + TT vs. CC	429/455		1.22 (0.44-3.37)	0.39	0.70	R	23.47	0.0001	83	-0.52	0.59

R: Random effects model; F: fixed effects model; NA: not available.

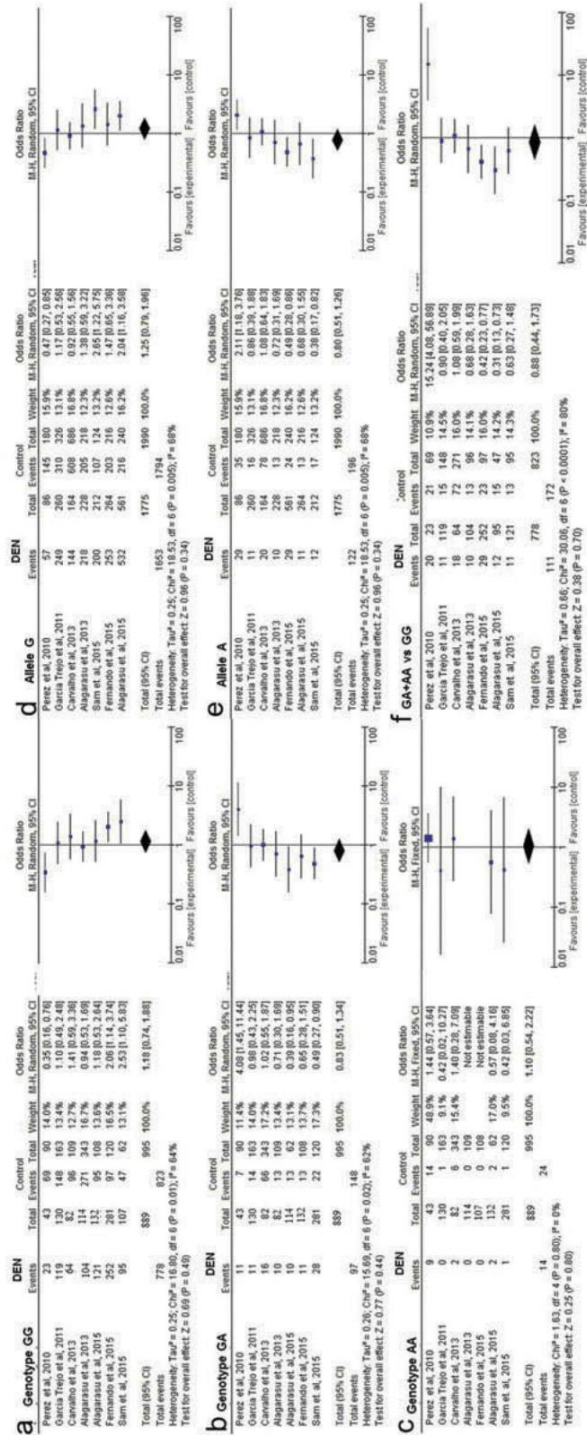


Figure 2. Forest plot of TNF- α (-308G/A) polymorphisms in the group DEN and control.

Quantitative data synthesis

In [Table 2](#), the group DEN (symptomatic dengue + hemorrhagic dengue) versus control group showed seven studies to TNF- α (-308G/A) with a total of 1887 participants (889 cases and 995 controls) and there was no significant association under genetic model dominant ([Figure 2](#)). When compared the group symptomatic dengue versus control, the analysis of TNF- α (-308G/A) showed four studies (García-Trejo et al., [2011](#); Alagarasu et al., [2013](#); Sam et al., [2015](#); Alagarasu et al., [2015](#)), with 314 symptomatic dengue cases and 436 controls. In [Table 3](#), the meta-analysis of the TNF- α (-308G/A) polymorphism showed an association between the genotype GG (OR: 1.62, CI: 1.02–2.57, $p = 0.04$) and the allele G (OR: 1.62, CI: 1.04–2.55, $p = 0.03$) in the development of infection dengue. Furthermore, the genotype GA (OR: 0.69, CI = 0.39–0.99, $p = 0.04$) and the allele A (OR: 0.64, CI: 0.41–1.00, $p = 0.05$) were associated with protection to symptomatic dengue ([Figure 3](#)). For comparison between hemorrhagic dengue versus group control were used 7 studies (Perez et al., [2010](#); García-Trejo et al., [2011](#); Alagarasu et al., [2013](#); Xavier-Carvalho et al., [2013](#); Sam et al., [2015](#); Alagarasu et al., [2015](#); Fernando et al., [2015](#)) with 546 hemorrhagic patients and 995 controls. No association was found among the genotype GG (OR = 0.70, CI = 0.42–1.15, $p = 0.15$), genotype GA (OR = 1.49, CI = 0.45–1.07, $p = 0.76$), AA (OR = 0.15, CI = 0.01–3.60, $p = 0.24$), allele G (OR = 1.08, CI: 0.65–1.80, $p = 0.25$), and allele A (OR = 0.92, CI = 0.56–1.54, $p = 0.76$).

In [Table 2](#) which showed the group DEN (symptomatic dengue + hemorrhagic dengue) versus control group with 5 studies for IL-10 with 646 dengue cases and 703 controls (Perez et al., [2010](#); Xavier-Carvalho et al., [2013](#); Sam et al., [2015](#); Alagarasu et al., [2015](#); Fernando et al., [2015](#)), meta-analysis identified that any association was found between genotypes and alleles ([Figure 4](#)). The analysis of IL-10 (-819C/T) between symptomatic dengue and group control showed 2 studies (Sam et al., [2015](#); Alagarasu et al., [2015](#)) with 172 patients dengue and 227 controls and no association among the genotypes as also the alleles. The hemorrhagic dengue versus group control was used 5 studies (Perez et al., [2010](#); Xavier-Carvalho et al., [2013](#); Sam et al., [2015](#); Alagarasu et al., [2015](#); Fernando et al., [2015](#)) with 631 hemorrhagic patients and 703 controls without association for the genotypes and alleles ([Table 3](#)).

In [Table 3](#), we have a comparison between hemorrhagic dengue versus symptomatic dengue; 5 studies (Fernandez-Mestre et al., [2004](#); García-Trejo et al., [2011](#); Alagarasu et al., [2013](#); Sam et al., [2015](#); Alagarasu et al., [2015](#)) were analyzed, with 384 dengue patients and 339 hemorrhagic for TNF- α (-308G/A) and 3 studies (Fernandez-Mestre et al., [2004](#); Alagarasu et al., [2015](#); Sam et al., [2015](#)) with 213 dengue patients and 263 hemorrhagic for IL-10 (-819C/T). No difference was observed for the polymorphisms of TNF- α - 308 and IL-10 (-819C/T).

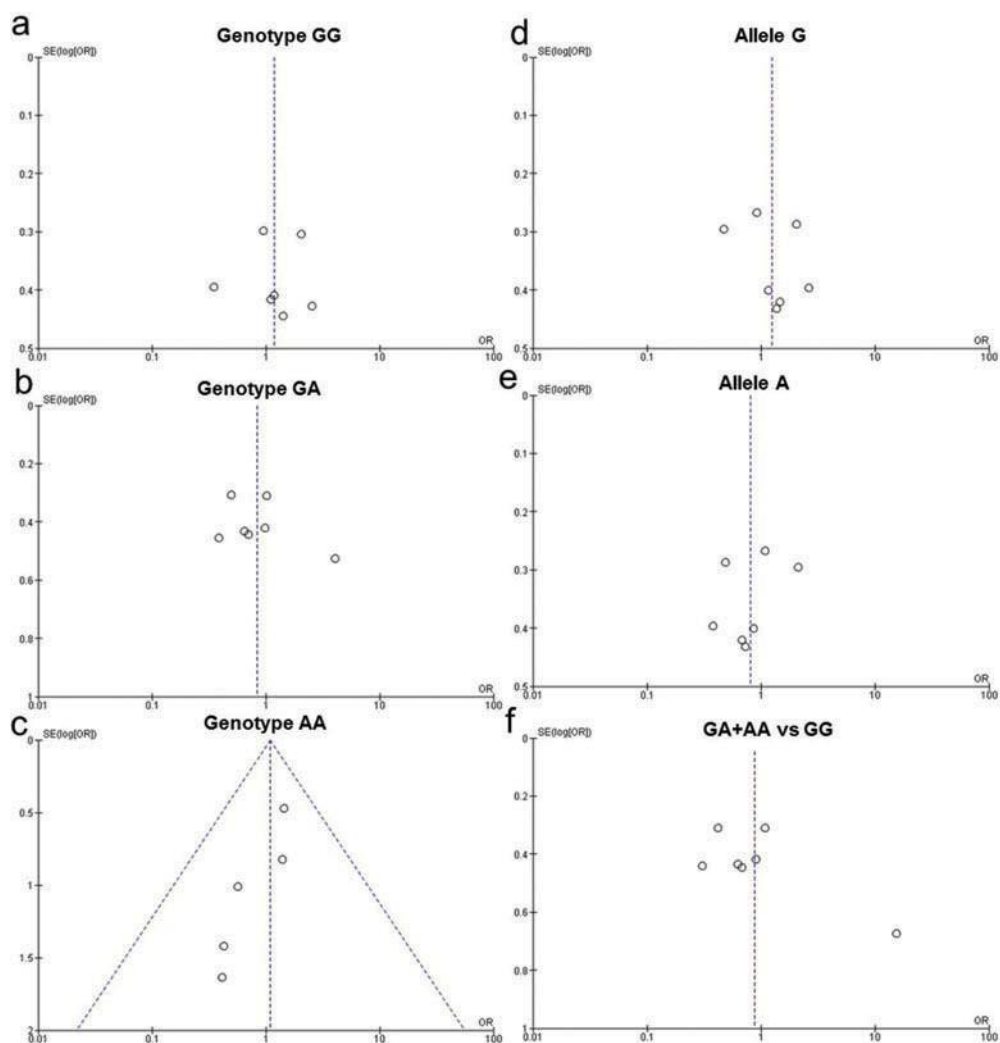


Figure 3. Forest plot of TNF- α (-308G/A) polymorphisms in the group symptomatic dengue versus control.

Publication bias and heterogeneity

The DEN group versus control group for analyses of the TNF- α (-308G/A) obtained heterogeneity in the codominant model for genotype GG ($p = 0.01$), GA ($p = 0.02$), allele G ($p = 0.005$), allele A ($p = 0.005$) and dominant model (<0.0001). In the analysis of IL-10 (-819C/T) for the DEN group versus control group for the genotype TC ($p = 0.00001$) and dominant model (0.0001) there was large heterogeneity (Table 2). The TNF- α (-308G/A) showed significant heterogeneity in the codominant model for genotype GG ($p = 0.004$), GA ($p = 0.007$), allele G ($p = 0.004$), A ($p = 0.004$) and in the dominant model (0.005) when compared hemorrhagic dengue versus control group (Table 3). The genotype GG, GA, G allele, A allele and IL-10 (-819C/T), TT genotype and the dominant model showed heterogeneity in the groups of hemorrhagic dengue and symptomatic dengue for TNF- α . The genotype GG ($p =$

0.03), GA ($p = 0.04$), allele G ($p = 0.02$), allele A ($p = 0.02$) and for IL-10 (-819C/T) the genotype TT ($p = 0.04$) and the dominant model (0.002) demonstrated heterogeneity in the groups of hemorrhagic dengue and symptomatic dengue for TNF- α (-308G/A) (Table 3). The symptomatic dengue versus control for IL10 (-819C / T) obtained heterogeneity for dominant model (0.002). These variations might be due to clinical or genetic heterogeneity.

Egger's funnel plot was used to identify potential risks bias. In comparison of the group DEN (hemorrhagic + symptomatic dengue) versus controls was indicated publication bias for genotype CT ($z = 2.96$, $p = 0.003$) (Figure 5) and any to TNF- α (-308G/A) (Figure 6). The results indicated no significant evidence for publication bias in comparison symptomatic dengue versus group control to TNF- α (-308G/A) (Figure 7). In comparison of the group hemorrhagic dengue versus controls, no significant evidence for publication bias was meet, except CT ($z = 2.55$, $p = 0.01$). In relation to the category hemorrhagic dengue and symptomatic dengue was identified significant evidence for publication bias in the allele G ($z = 4.25$, $p = <.0001$) for TNF- α (-308G/A) and for IL-10 (-819C/T) the genotype CT ($z = -1.98$, $p = 0.04$).

Comparing the forest plot of the TNF- α (-308G/A) gene from dengue and hemorrhagic dengue versus control observed that these latter studies showed less variability in genotypes and alleles. In addition, the hemorrhagic versus control was higher heterogeneity than others were. This suggests that in DHF, genotypes and alleles of the TNF- α (-308G/A) gene have distinct characteristics of classical dengue and control. The same was identified with the IL-10 (-819C/T) polymorphism gene.

Discussion

Polymorphisms of cytokines has been highlight by role in the pathogenesis of several diseases as brucellosis in Iranian (Kazemi et al., 2016), chronic immune thrombocytopenic purpura in Egyptians (El Ghannam et al., 2015), metabolic syndrome in asthmatics on China (Yang et al., 2015), tuberculosis susceptibility in Europeans and Asians (Ke et al., 2015), risk of visceral leishmaniosis in Iran (Ahmadi et al., 2015), chronic obstructive pulmonary disease (Gane et al., 2015), susceptibility to celiac disease in Italian (Maranhão et al., 2015), and infection disease as dengue (Chaturvedi et al., 2006). The study of SNPs is proving a powerful tool in disease association studies.

TNF- α is a pro-inflammatory cytokine immunomodulatory significant. It has an important role in regulation of cell proliferation and death as well as inflammation and immune response involving various infectious diseases, autoimmune diseases, neurodegenerative diseases among others (Elahi et al., 2009; Qidwai and Khan, 2011). In the pathogenesis of dengue, the TNF- α induces the fever, enhances vascular permeability, and induces apoptosis in endothelial cells (Alagarasu et al., 2015). The TNF- α (-308G/A) polymorphism has been associated with the dengue, and presence of allele A has been related with high expressing of gene; due to the presence, this allele increases the transcriptional activity (Wilson et al., 1997).

We performed a meta-analysis with aim to investigate the association between the polymorphisms (TNF- α -308 and IL-10 -819) and the infection and progression of dengue. The results showed that TNF- α -308G allele and -308GG genotype were associated with symptoms of dengue fever in relation the control. While TNF- α -308A allele and -308GA genotype were correlated with protect against dengue fever. These findings suggest that the presence of TNF- α -308A allele was associated with protect effect. This association did not show bias and it demonstrated significant statistical heterogeneity.

However, the -308A allele in the Cuban (Perez et al., [2010](#)) and Thailand (Chuansumrit et al., [2013](#)) population has reported the association with the severity of the dengue (dengue hemorrhagic fever) (Dettogni et al., [2015](#)). Although the TNF- α -308A allele was not statistically significant, the frequency of this allele was elevated in children with dengue hemorrhagic fever of India (Alagarasu et al., [2013](#)). Thailand's children showed association between polymorphism -308A and significant bleeding manifestations (Chuansumrit et al., [2013](#)).

Table 3. Meta-analysis of associations between the TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) polymorphisms in the group symptomatic dengue versus control.

Polymorphism	Frequencies case/control	Test of association			Test of heterogeneity			Egger's test		
		OR (95% CI)	z	p Value	Q	p Value	I ² (%)	z	p Value	
TNF alpha (-308G → A -rs1800629)										
Symptomatic dengue vs. controls (n = 4)										
Genotypes										
GG	314/436	1.62 (1.02-2.57)	2.02	0.04	F	1.27	0.74	0.0	-1.77	0.07
GA	28/62	0.69 (0.39-0.99)	2.01	0.04	F	1.47	0.69	0.0	-0.52	0.60
AA	1/2	0.98 (0.13-7.60)	0.02	0.98	F	0.19	0.65	0.0	-0.02	0.97
Alleles										
G	656/934	1.62 (1.04-2.55)	2.11	0.03	F	0.85	0.84	0.0	-1.68	0.09
A	30/66	0.64 (0.41-1.00)	1.96	0.05	F	1.15	0.76	0.0	-0.42	0.66
Dominant model	29/64	0.58 (0.36-0.92)	2.30	0.02	F	1.48	0.69	0.0	-0.68	0.49
GA + AA vs. GG										
Hemorrhagic dengue vs controls (n = 7)										
Genotypes										
GG	464/823	1.10 (0.81-1.49)	0.61	0.54	F	19.1	0.004	69	0.67	0.49
GA	69/148	0.89 (0.64-1.22)	0.75	0.46	F	17.56	0.007	66	0.93	0.34
AA	13/24	1.11 (0.55-2.26)	0.30	0.77	F	1.88	0.76	0.0	-0.11	0.90
Alleles										
G	997/1794	1.08 (0.65-1.80)	0.31	0.76	R	18.9	0.004	68	0.15	0.87
A	95/196	0.92 (0.56-1.54)	0.31	0.76	R	18.9	0.004	68	0.42	0.67
Dominant model	82/172	0.94 (0.68-1.28)	0.42	0.67	R	33.38	<0.00001	82	0.42	0.67
GA + AA vs. GG										
Hemorrhagic vs. symptomatic dengue (n = 5) Frequencies hemorrhagic/symptomatic dengue										
Genotypes										
GG	300/353	0.54 (0.22-1.32)	1.38	0.18	R	10.76	0.03	63	1.01	0.31
GA	39/30	1.86 (0.78-4.45)	1.40	0.16	R	10.12	0.04	60	0.58	0.55
AA	1/0	0.15 (0.01-3.60)	1.18	0.24	R	NA	NA	NA	0.06	0.94
Alleles										
G	639/736	0.58 (0.23-1.42)	1.20	0.23	R	11.67	0.02	60	4.25	<0.0001
A	39/32	1.73 (0.71-4.26)	1.20	0.23	R	11.67	0.02	66	0.41	0.67
Dominant model	40/30	0.67 (0.41-1.12)	1.53	0.12	R	14.97	0.005	73	-0.28	0.77
GA + AA vs. GG										
IL-10 (-819 C → T -rs1800871)										
Symptomatic dengue vs. controls (n = 2)										
Genotypes										
TT	85/121	0.84 (0.57-1.26)	0.83	0.41	F	0.0	0.99	0.0	-0.29	0.76
CT	69/85	1.12 (0.75-1.69)	0.56	0.57	F	0.20	0.66	0.0	-0.09	0.92
CC	18/20	1.24 (0.63-2.63)	0.62	0.53	F	0.48	0.49	0.0	-0.64	0.51

(Continued)

Table 3. (Continued).

Polymorphism	Frequencies case/control	Test of association			Test of heterogeneity			Egger's test	
		OR (95% CI)	z	p Value	Q	p Value	I ² (%)	z	p Value
TNF alpha (-308G → A -rs1800629)									
Alleles									
T	239/327	0.86 (0.63-1.17)	0.96	0.34	F	0.10	0.75	0.0	-0.16
C	105/125	1.16 (0.85-1.59)	0.96	0.33	F	0.10	0.75	0.0	-0.97
Dominant model									
TC + TT vs. CC	18/20	1.41 (0.16-12.61)	0.31	0.76	R	9.35	0.002	89	NA
Hemorrhagic dengue vs. controls (n = 5)									
Genotypes									
TT	157/191	0.97 (0.72-1.31)	0.19	0.85	F	1.90	0.76	0.0	0.84
CT	208/313	0.92 (0.71-1.19)	0.66	0.51	F	5.47	0.24	27	2.55
CC	109/199	1.17 (0.86-1.59)	0.99	0.32	F	3.15	0.53	0.0	0.10
Alleles									
T	522/695	0.93 (0.77-1.13)	0.73	0.47	F	2.04	0.73	0.0	0.61
C	426/711	1.07 (0.89-1.30)	0.73	0.47	F	2.04	0.73	0.0	1.10
Dominant model									
TC + TT vs. CC	109/199	1.44 (0.64-3.22)	0.89	0.37	R	14.16	0.007	72	-0.23
Hemorrhagic vs. symptomatic dengue (n = 3) Frequencies hemorrhagic/symptomatic dengue									
Genotypes									
TT	122/215	1.08 (0.79-1.48)	0.46	0.65	R	4.43	0.04	77	0.75
CT	97/182	0.88 (0.64-1.21)	0.80	0.43	F	2.11	0.35	5	-1.98
CC	44/79	1.09 (0.71-1.66)	0.38	0.71	F	0.72	0.70	0	-0.82
Alleles									
T	341/612	1.02 (0.81-1.28)	0.15	0.88	F	0.62	0.73	0	0.33
C	185/340	0.98 (0.78-1.24)	0.15	0.88	F	0.62	0.73	0	-1.23
Dominant model									
TC + TT vs. CC	219/397	0.92 (0.35-2.44)	0.16	0.87	R	3.52	0.17	43	1.03

R: Random effects model; F: fixed effects model; NA: not available.

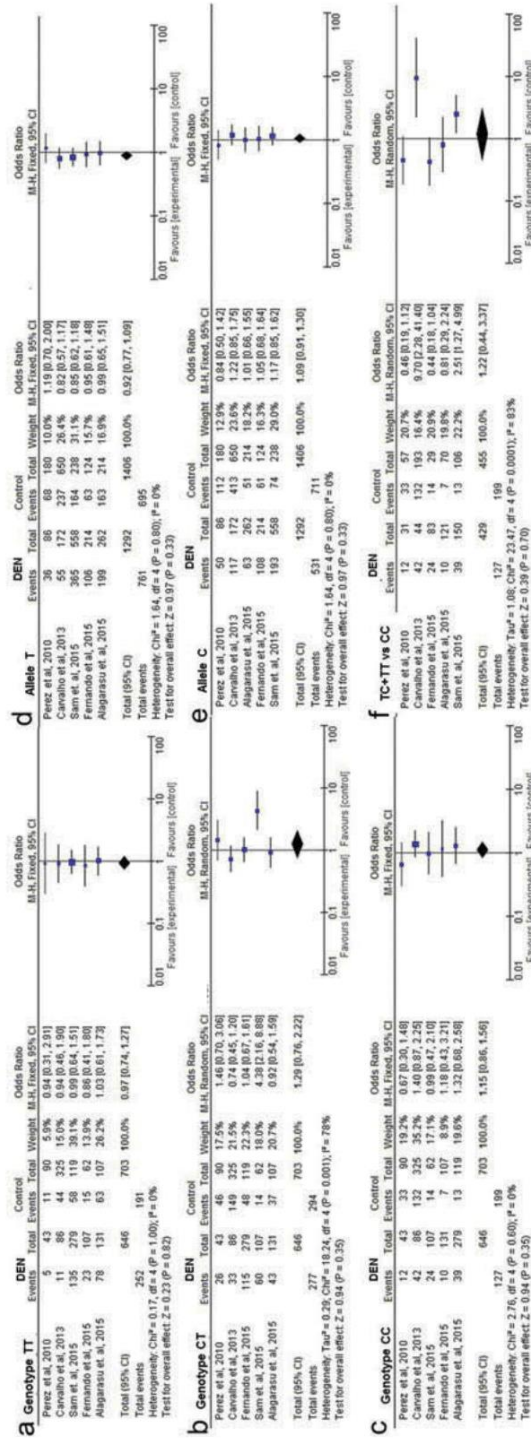


Figure 4. Forest plot of IL-10 (-819) polymorphisms in the group DEN versus control.

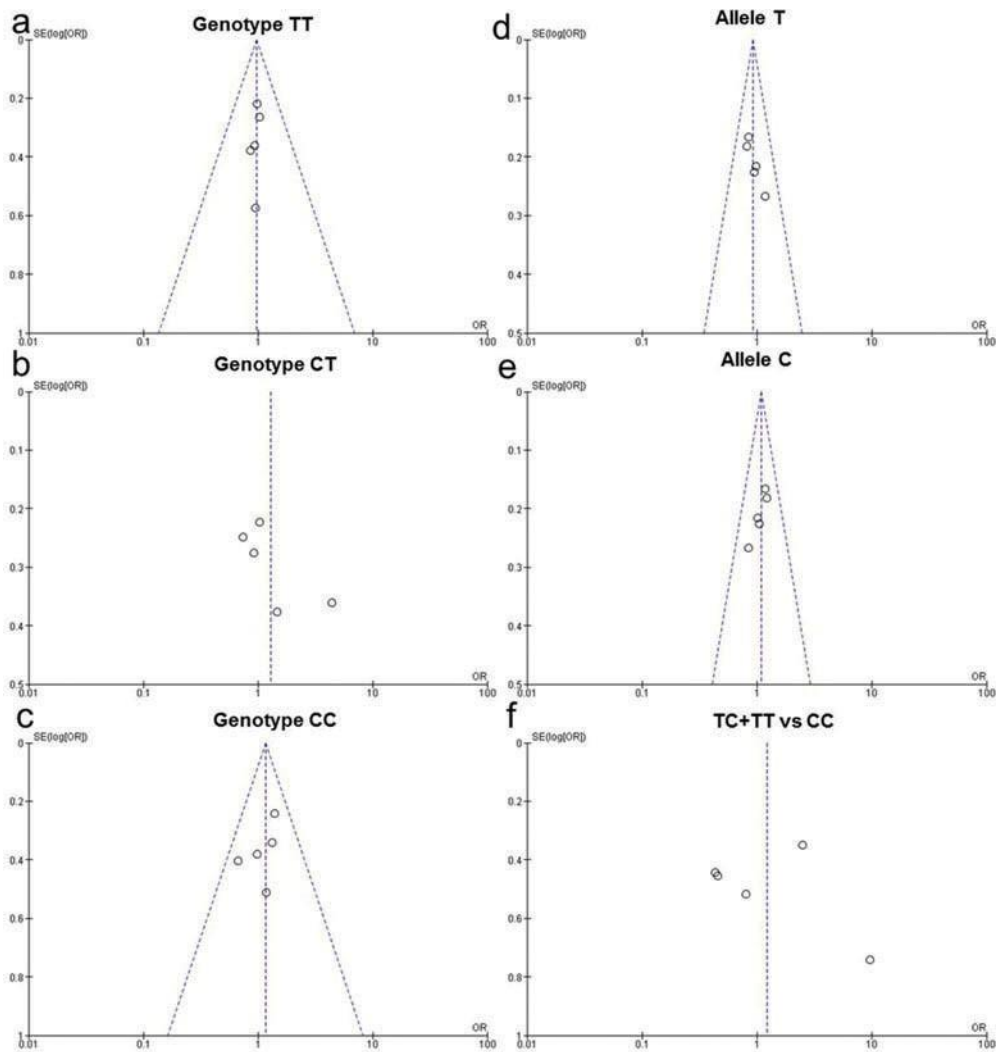


Figure 5. Funnel plot with 95% confidence limit on the IL-10 (-819) polymorphism of overall population.

Study realized in human dendritic cells reported that TNF- α cytokine in high and medium concentration in blood inhibits the DENV replication; this may suggest that the TNF- α -308A allele high expressing might be involved in the protection of the symptomatic dengue as visualized in the review (Shi et al., 2006).

In a study in the Brazilian population, TNF- α -308GG genotype was associated with persistence of neurological, psychological, and behavioral symptoms (Dettogni et al., 2015). Adults and children of Malaysia with GG genotype were associated with the development of dengue hemorrhagic fever compared to controls. In this same population, the G/A genotype was associated positively to protect against the evolution of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome (Sam et al., 2015); this genotype also showed a protective effect in the review to symptomatic dengue. Other study in Malaysia the TNF- α -308GA+AA displayed a protection role against dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome (Sam et al., 2015).

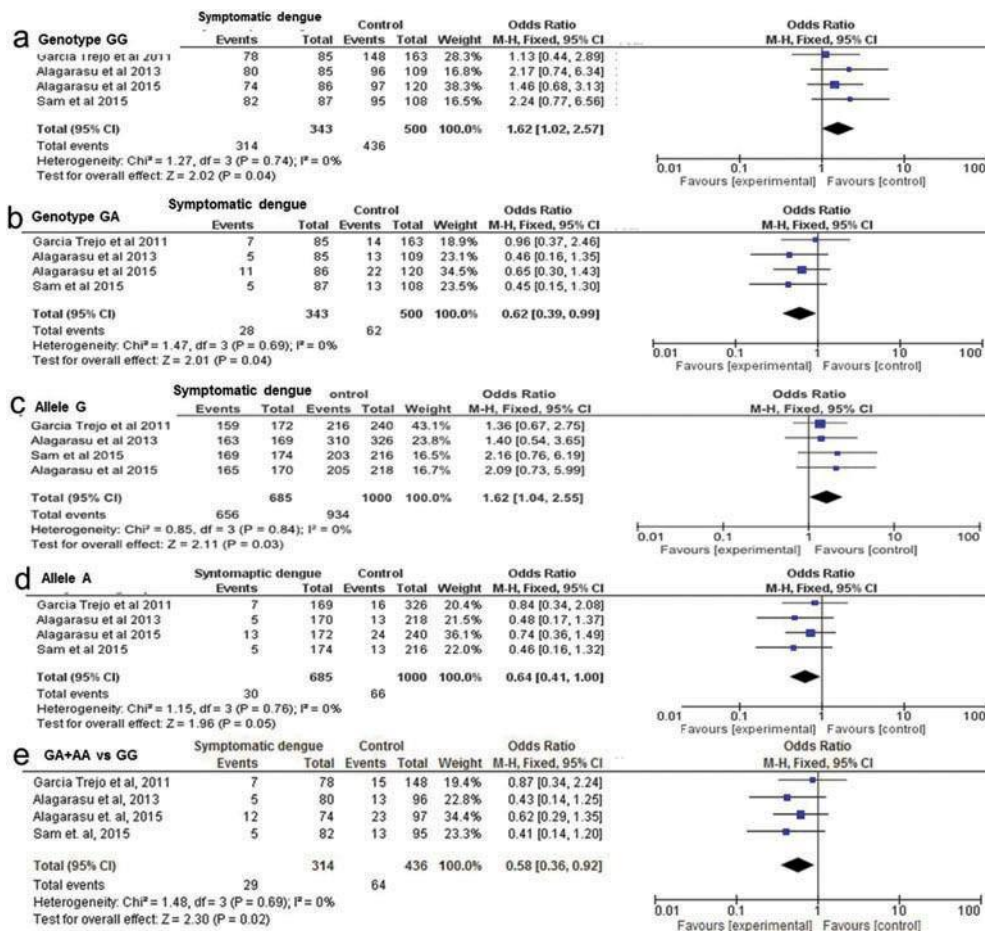


Figure 6. Funnel plot with 95% confidence limit on the TNF- α (-308G/A) polymorphism of overall population.

IL-10 is a cytokine with immunomodulatory effects and a powerful anti-inflammatory molecule (Tsai et al., 2013). Some studies have associated IL-10 cytokine levels with clinical status of dengue (Srikiatkachorn and Green, 2010; Malavige et al., 2013). Recently, a study of children in Rio de Janeiro showed strong relationship between thrombocytopenia and high levels IL-10 serum of patients (Ferreira et al., 2015). In vitro studies demonstrates a correlation between IL-10 levels and ADE (antibody-dependent enhancement) phenomenon (Chareonsirisuthigul et al., 2007).

The antibodies related to this phenomenon lead a cross reaction with heterologous serotypes infectious, favoring the development of dengue, infecting a large number of cells, which may leads severe disease forms. The IL-10 levels in ADE in vitro assay showed an positive association with polymorphisms in promoter region gene, suggesting that ADE effects are influenced by genetics of the host (Boonnak et al., 2011). The relevant studies involving ADE phenomenon has been recognized as an important event by World Health Organization (World Health, Organization, 2009). However, there are no reports in literature correlating in vivo ADE phenomenon and IL-10 serum levels (Tsai et al., 2013), and similarly, no correlation was established between allelic forms IL-10 promoter polymorphisms gene and disease progression, what is different to the TNF- α promoters polymorphisms gene. Only

the genotype C/T of IL-10 (-819C/T) has been associated with protection against the severity of dengue fever in the Indian population (Alagarasu et al., 2015).

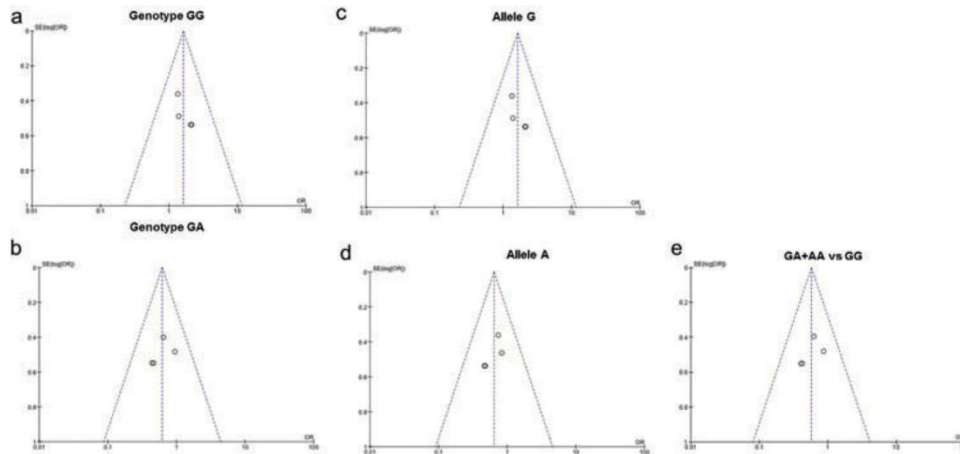


Figure 7. Funnel plot with 95% confidence limit on the TNF- α (-308G/A) polymorphism in the group symptomatic dengue versus control.

Allelic forms of IL-10 (-819 C \rightarrow T) genotypes have not been associated with disease severity. However, a study conducted with Cuban population, organizing polymorphisms promoter in haplotypes, showed significant relation between polymorphisms and DHF, when positions -1082/-819/-592 of IL-10 gene were coupled in ACC and ATA haplotypes (Perez et al., 2010). In the other hand, non-presence of GCC haplotype was reported as protective effects against DHF/DSS in Malaysian population (Sam et al., 2015).

Others studies obtained associative results with the dengue disease when combined different polymorphism in combinations, joining IL-10 (-819C/T) polymorphisms with polymorphisms of other genes that expressing pro-inflammatory molecules, obtaining configurations statistically significant, as on study conducted in Indian population (Alagarasu et al., 2015), heterozygous genotypes of IL-8 rs4973 and IL-10 rs1800871(-819) are associated with reduced risk of DHF.

Researches realized with pro- and anti-inflammatory cytokines, when find significant results, contribute to the hypothesis that dengue is a disease modulated by a complex response to infection, that is guided by these molecules. In this perspective, the description of SNPs in the human genome can be a powerful tool in studies of diseases such in as dengue associations (Vejbaesya et al., 2009).

This meta-analysis did not identify association of IL-10 (-819C/T) polymorphism with dengue. Few studies have analyzed the role of IL-10 polymorphism in dengue pathogenesis; so, there has been the need for further population studies that can identify the genetic profile of individuals with dengue. The association of IL-10 polymorphism with infection

progression was strongly correlated in studies that used the haplotype –1082/–819/–592 in the IL-10 gene promoter. In conclusion, this metaanalysis propose that the TNF- α –308 G/G genotype and allele G confer susceptibility to symptomatic dengue, while the TNF- α –308 G/A genotype and allele A confer protection. However, due to the number of studies of the studies included in the metaanalysis, the results should be deduced with attention. Sources similar genotyping analysis in several ethnic populations is necessary to validate the association between SNPs with susceptibility or progression in relation of dengue. Future studies should involve large sample sizes, homogeneous populations of dengue patients, investigating the genetic profile of patients with dengue compared to the viral serotype, clinical, and laboratory features. This is necessary to understand complete way of the paradigm of host genetics.

Declaration of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL), nº protocol: 20110906-0110025-0080. The authors acknowledge to Laboratory Municipal de Arapiraca – AL and Laboratory de Analysis Clinics Dr. Edler Lins (LACEL).

References

- Acioli-Santos B, Segat L, Dhalia R, et al. 2008. MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. *Hum immunol* 69:122–128.
- Ahmadi A, Hajilooi M, Solgi G, et al. 2015. Interleukin-4 receptor alpha T1432C and A1652G polymorphisms are associated with risk of visceral leishmaniasis. *Adv Biomed Res* 4:195.
- Alagarasu K, Bachal RV, Tillu H, et al. 2015. Association of combinations of interleukin-10 and proinflammatory cytokine gene polymorphisms with dengue hemorrhagic fever. *Cytokine* 74:130–136.
- Alagarasu K, Mulay AP, Singh R, et al. 2013. Association of HLA-DRB1 and TNF genotypes with dengue hemorrhagic fever. *Hum immunol*, 74, 610–617.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496:504–507.
- Boonnak K, Dambach KM, Donofrio GC, et al. 2011. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol* 85:1671–1683.

- Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. 2007. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol* 88:365–375.
- Chaturvedi UC, Nagar R, Shrivastava R. 2006. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Medical Microbiol* 47:155–166.
- Chuansumrit A, Anantasit N, Sasanakul W, et al. 2013. Tumour necrosis factor gene polymorphism in dengue infection: association with risk of bleeding. *Paediatr Int Child Health* 33:97–101.
- Costa VV, Fagundes CT, Souza DG, et al. 2013. Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction. *Am J Pathol* 182:1950–1961.
- DerSimonian R, Laird N. 1986. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 7:177–188.
- Dettogni RS, Tristão-Sá R, dos Santos M, et al. 2015. Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons. *Hum immunol* 76:717–723.
- Doeschl-Wilson AB, Davidson R, Conington J, et al. 2011. Implications of host genetic variation on the risk and prevalence of infectious diseases transmitted through the environment. *Genetics* 188:683–693.
- Egger M, Smith GD, Phillips AN. 1997. Meta-analysis: principles and procedures. *BMJ* 315:1533.
- El Ghannam D, Fawzy IM, Azmy E, et al. 2015. Relation of interleukin-10 Promoter Polymorphisms to Adult Chronic Immune Thrombocytopenic Purpura in a Cohort of Egyptian Population. *Immunol Invest* 44:616–626.
- Elahi MM, Asotra K, Matata B, et al. 2009. Tumor necrosis factor alpha– 308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. *BBA-Mol Basis Dis* 1792:163–172.
- Fang X, Hu Z, Shang W, et al. (2012). Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 66:134–146.
- Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, et al. 2004. TNF- α -308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens* 64:469–472.
- Fernando AN, Malavige GN, Perera KLN, et al. 2015. Polymorphisms of transporter associated with antigen presentation, tumor necrosis factor- α and interleukin-10 and their implications for protection and susceptibility to severe forms of dengue fever in patients in Sri Lanka. *J Global Infectious Dis* 7:157.

- Ferreira RAX, de Oliveira SA, Gandini M, et al. 2015. Circulating cytokines and chemokines associated with plasma leakage and hepatic dysfunction in Brazilian children with dengue fever. *Acta Trop* 149:138–147.
- Gane JM, Stockley RA, Sapey E. 2015. The rs361525 polymorphism does not increase production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from alpha-1 antitrypsin deficient subjects with chronic obstructive pulmonary disease—a pilot study. *J Negat Results BioMed* 14:1.
- García-Trejo AR, Falcón-Lezama JA, Juárez-Palma L, et al. 2011. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with dengue fever. *Acta Trop* 120:67–71.
- Grange L, Simon-Lorriere E, Sakuntabhai A, et al. 2015. Epidemiological risk factors associated with high global frequency of inapparent dengue virus infections. *Protective Immune Response to Dengue Virus Infection and Vaccines. Front Immunol* 14:1–4.
- Guabiraba R, Ryffel B. 2014. Dengue virus infection: Current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology* 141:143–156.
- Gurugama P, Garg P, Perera J, et al. 2010. Dengue viral infections. *Indian J Dermatol* 55:68.
- Herrero LJ, Zakhary A, Gahan ME, et al. 2013. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacol Ther* 137:266–282.
- Higgins J, Thompson SG. 2002. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat Med* 21:1539–1558.
- Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, et al. 2003. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 327:557–560.
- Kazemi S, Saidijam M, Hashemi SH, et al. 2016. Analysis of IL-10 and IL-6 Gene Polymorphisms and Their Serum Levels in Patients with Brucellosis: A Case Control Study. *Immunol Invest* 45:107–115.
- Ke Z, Yuan L, Ma J, et al. 2015. IL-10 Polymorphisms and Tuberculosis Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. *Yonsei Med J* 56:1274–1287.
- Lan, NTP, Hirayama K. 2011. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Trop Med Health* 39:73–81.
- Malavige GN, Gomes L, Alles L, et al. 2013. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. *BMC Infect Dis* 13:341.
- Maranhão RMA, Esteves FAM, Crovella S, Segat L, Souza PRE. 2015. Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6 gene polymorphism association with susceptibility to celiac disease in Italian patients. *Genet Mol Res* 14:16343–16352.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, et al. 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA Statement 151:264–269.

- Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, et al. 2015. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India* 71:67–70.
- Nardin, E. 2009. Genetic Polymorphisms and Immune Responses. *Immunol Invest* 38:198–202.
- Nicodemus KK. 2008. Catmap: Case-control and TDT meta-analysis package. *BMC Bioinf* 9:1.
- Perez AB, Sierra B, Garcia G, et al. 2010. Tumor necrosis factor–alpha, transforming growth factor– β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* 71:1135–1140.
- Pozzetto B, Memmi M, Garraud O. 2015. Is transfusion-transmitted dengue fever a potential public health threat? *World J Virol* 4:113.
- Pregunta, L. 2007. A estratégia PICO para a construção da pergunta de pesquisa e busca de evidências. *Rev Latino-am Enfermagem* 15(3).
- Qidwai T, Khan F. 2011. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol* 74:522–547.
- Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, et al. 2012. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PloS One* 7:e52215.
- Rothman AL. 2011. Immunity to dengue virus: A tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* 11:532–543.
- Sam SS, Teoh BT, Chinna K, et al. 2015. High producing tumor necrosis factor alpha gene alleles in protection against severe manifestations of dengue. *Int J Med Sci* 12:177.
- Shi YJ, Jiang ZY, Zeng K. 2006. Effect of IL-6 and TNF- α on dengue virus infection of human dendritic cells. *Chinese J Cell Molec Immunol* 22:469–471.
- Simmons CP, McPherson K, Chau NVV, et al. 2015. Recent advances in dengue pathogenesis and clinical management. *Vaccine* 33:7061–7068.
- Srikiatkhachorn A, Green S. 2010. Markers of dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol* 338:67–82.
- Tsai TT, Chuang Y J, Lin YS, et al. 2013. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. *J Biomed Sci* 20:1.
- Vejbaesya S, Luangtrakool P, Luangtrakool K, 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.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, et al. 1997. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3195–3199.

World Health Organization. 1997. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization. Accessed 27 February 2016. Available in:
<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>.

World Health Organization. 2009. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention, and Control. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Accessed 25 February 2016. Available:
<http://www.who.int/tdr/publications/documents/denguediagnosis.pdf>.

World Health Organization. 2013. "WHO|Dengue and Severe Dengue." Accessed 14 May 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.

Xavier-Carvalho C, Gibson G, Brasil P, et al. 2013. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: A case–control, functional and meta-analysis study. *Infect, Genet Evol* 20:197–205.

Yang YH, Liu YQ, Zhang L, et al. 2015. Genetic polymorphisms of the TNF- α -308G/A are associated with metabolic syndrome in asthmatic patients from Hebei province, China. *Int J Clin Exp Pathol* 8:13739.

APÊNDICE C – Artigo original 2

- Artigo submetido ao periódico “*Revista de enfermagem UFPE On Line*” com fator de impacto: 0,963 e qualis CAPES na classificação medicina II: B5.

ISSN: 1981-8963

DOI: 10.5205/revol.9199-80250-1-5M1006201606

Santos LLS, Moura EL de, Ferreira JM et al.

Análise epidemiológica da dengue...



ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DA DENGUE EM UMA POPULAÇÃO DO NORDESTE EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF DENGUE IN A BRAZILIAN NORTHEAST REGION POPULATION

ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DEL DENGUE EN UNA POBLACIÓN DEL NORDESTE

Leisiane Livia da Silva Santos¹, Edilson Leite de Moura², Jean Moises Ferreira³, Barbara Rayssa Correia dos Santos⁴, Ana Caroline Melo dos Santos⁵, Elaine Virginia Martins de Souza Figueiredo⁶

RESUMO

Objetivo: descrever a situação epidemiológica da dengue. **Método:** estudo descritivo e ecológico que utilizou dados secundários dos casos notificados de dengue obtidos no Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) durante o período de 2007 a 2013. As variáveis analisadas foram a nível temporal (ano/mês) e demográfico (sexo e faixa etária) e a taxa de infestação predial. A análise descritiva foi realizada pelo software Graphpad Prism 5.0. **Resultados:** dos 21.579 casos notificados, 19.686 foram classificados como dengue clássica, 98 como dengue com complicações, 44 como febre hemorrágica da dengue e 1 síndrome do choque de dengue. Predominância dos casos notificados foi do gênero feminino (12.180 casos) e dos indivíduos na faixa etária de 20-49 anos (9.978 casos). As crianças foram as mais acometidas pela febre da dengue hemorrágica (21 casos). **Conclusão:** estratégias de vigilância em saúde e entomológica são necessárias para o combate ao vetor da doença. **Descritores:** Dengue; Epidemiologia; Sistema de Informação de Agravos de Notificação.

ABSTRACT

Objective: to describe the epidemiological situation of dengue. **Method:** descriptive and ecological study using secondary data of dengue reported cases obtained in the National Notifiable Diseases Information System (SINAN) during the period from 2007 to 2013. The variables analyzed were time (year / month) and demography (gender and age) levels and the rate of infestation. The descriptive analysis was performed using Graphpad Prism 5.0 software. **Results:** of the 21,579 reported cases, 19,686 were classified as dengue fever, 98 as dengue with complications, 44 as dengue hemorrhagic fever and 1 as dengue shock syndrome. The prevalence of reported cases was female (12,180 cases) and individuals aged from 20 to 49 years old (9,978 cases). The children were the most affected by dengue hemorrhagic fever (21 cases). **Conclusion:** surveillance health and entomological strategies are needed to combat the vector of the disease. **Descriptors:** Dengue; Epidemiology; Information System for Notifiable Diseases.

RESUMEN

Objetivo: describir la situación epidemiológica del dengue. **Método:** estudio descriptivo y ecológico que utilizó datos secundarios de los casos notificados de dengue obtenidos en el Sistema Nacional de Problemas de Notificación (SINAN) durante el período de 2007 a 2013. Las variables analizadas fueron a nivel temporal (año/mes) y demográfico (sexo y edad) y la tasa de infestación predial. El análisis descriptivo fue realizado por el software Graphpad Prism 5.0. **Resultados:** de los 21.579 casos notificados, 19.686 fueron clasificados como dengue clásico, 98 como dengue con complicaciones, 44 como fiebre hemorrágica del dengue y 1 síndrome del choque del dengue. Predominancia de los casos notificados fue del género femenino (12.180 casos) y de los individuos en la edad entre 20-49 años (9.978 casos). Los niños fueron los más afectados por la fiebre del dengue hemorrágico (21 casos). **Conclusión:** estrategias de vigilancia en salud y entomológica son necesarias para el combate al vector de la enfermedad. **Descritores:** Dengue; Epidemiología; Sistema de Información de Problemas de Notificación.

¹Bióloga licenciada. Universidade Federal de Alagoas/UFAL. Arapiraca (AL), Brasil. E-mail: leisiane_leu@hotmail.com; ²Discente de graduação em Ciências Biológicas. Bolsista de Iniciação Científica, Universidade Federal de Alagoas/UFAL. Arapiraca (AL), Brasil. E-mail: edilsonleite17@hotmail.com; ³Discente de graduação em Ciências Biológicas. Bolsista de Iniciação Científica, Universidade Federal de Alagoas/UFAL. Arapiraca (AL), Brasil. E-mail: jean.moises@hotmail.com; ⁴Discente de graduação em Ciências Biológicas. Bolsista de Iniciação Científica, Universidade Federal de Alagoas/UFAL. Arapiraca (AL), Brasil. E-mail: brc.rayssa@gmail.com; ⁵Enfermeira. Mestranda, Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, Universidade Federal Alagoas/UFAL. Maceió (AL), Brasil. E-mail: anacaroline12305@gmail.com; ⁶Biomédica e Farmacêutica. Doutora em Biotecnologia em Saúde. Docente da Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, Universidade Federal de Alagoas/UFAL. Arapiraca (AL), Brasil. E-mail: elainevms@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Estima-se que a dengue seja responsável por cerca de 100 milhões de casos por ano, colocando em risco cerca de três bilhões de pessoas no mundo.¹ A dengue é a mais importante arbovirose de regiões tropicais e subtropicais, sendo um dos maiores problemas de saúde pública, causando preocupação em decorrência do seu caráter epidêmico. A doença apresenta uma alta proliferação em países tropicais em razão do clima quente/úmido e das condições socioambientais.^{2,3,4}

O Brasil apresenta condições ambientais e climáticas favoráveis para a proliferação do mosquito vetor da doença. Nos últimos anos, o país tem passado por modificações geográficas e sociais, como a urbanização acelerada que facilita o surgimento das epidemias no país, uma vez que o *Aedes aegypti* está amplamente associado às atividades antrópicas.⁵ A reinfestação pelo *Aedes aegypti* nas áreas urbanas do Brasil e a introdução do DENV em 1986 culminou no ressurgimento de focos de dengue e um risco aumentado para a urbanização da febre amarela no país.⁶

Em 1986, uma sequência de epidemias de dengue ocorreu no Rio de Janeiro e se espalhou em várias regiões do sudeste e nordeste do Brasil. Entre 1987 e 1991, o número de notificações de casos de dengue aumentou substancialmente, possivelmente, devido à introdução dos sorotipos DENV-1 e DENV-2. Os primeiros casos de dengue hemorrágica foram confirmados em 1990, após a introdução do DENV2 no Brasil. Durante a década seguida, 893 casos de FHD foram registrados com 44 óbitos. Durante 2001-2002, um aumento marcante no número de casos de FHD foi identificado, com taxas de incidência de 2,9/100.000 habitantes, no ano de 2001, e 12,9 /100.000 habitantes, no ano de 2002.⁷

A partir dos anos 2000, alguns estados brasileiros apresentaram caráter epidêmico: Rio de Janeiro, São Paulo, Bahia e Minas Gerais.⁸ Em 2010, foram documentados surtos de dengue em muitas regiões do país envolvendo os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3. No estado de Roraima (1981-1982), o sorotipo DENV-4 reapareceu e disseminou-se para outras regiões do país aumentando o risco para o desenvolvimento das formas graves da doença, uma vez que os hospedeiros não apresentavam imunidade ao DENV-4 e em virtude da ocorrência de epidemias prévias causadas pelos outros sorotipos culminando em novas epidemias, além do aumento do número de óbitos.^{9,10}

Em Alagoas, a dengue é um problema de saúde pública desde 1996, sendo considerada a endemia mais importante. Ao investigar a série histórica do Estado de Alagoas nos anos de 1996 a 2013, observou-se picos epidêmicos nos anos de 1998, 2002, 2003, 2007, 2008. O ano de 2010 destacou-se sendo o mais crítico, havendo a introdução do sorotipo DENV-3 e a recirculação do sorotipo DENV-1, e em 2012 a detecção do sorotipo DENV-4 que culminou na ocorrência de formas graves da doença.¹¹

O período de incubação pelo vírus da dengue varia de 3 a 15 dias; neste momento; a doença pode apresentar um espectro clínico que varia desde formas assintomáticas à doença grave e fatal. A infecção por qualquer um dos sorotipos apresenta um quadro epidemiológico que pode variar em gravidade, dependendo da presença de fatores de risco como o sorotipo do vírus infectante, virulência, estado imunitário do indivíduo, idade e padrão genético do hospedeiro humano.¹²

A adoção de métodos para levantamento epidemiológico é estimulado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização Pan-Americana da Saúde (Opas), pois é essencial a garantia de informações com qualidade e agilidade para que possam ser desenvolvidas medidas necessárias no combate ao mosquito vetor.¹⁷ Considerando esta perspectiva, as informações obtidas através de dados secundários podem refletir particularidades epidemiológicas sobre a dengue e assim fornecer informações que embasam medidas de combate vetorial. Dada a importância de se conhecer os aspectos epidemiológicos da dengue no estado de Alagoas, em razão da complexidade da doença, o presente estudo tem como objetivo analisar a situação epidemiológica da dengue no município de Arapiraca - Alagoas no período de 2007 a 2013.

MÉTODO

♦ Área de estudo

O município de Arapiraca está localizado no estado de Alagoas, na região Nordeste do Brasil. O município integra a região do agreste alagoano, com uma área total de 352 km², sendo a principal cidade do interior do estado com aproximadamente 214.006 habitantes segundo o censo de 2010. Destes, 101.884 habitantes são homens e 112.122 habitantes são mulheres.¹³ Apresenta uma altitude aproximada de 264 m e coordenadas geográficas de 9°45'09" de latitude sul e 36°39'40" de longitude oeste.¹⁴ De acordo com a classificação de Köppen, o município possui um clima tropical, apresentando

estações secas no verão e chuvosas no inverno.¹⁵

◆ Desenho do estudo

Trata-se de um estudo do tipo descritivo e ecológico que utilizou dados secundários, oriundos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Todos os casos notificados de dengue da população do agreste alagoano no período de 2007 a 2013 foram incluídos.

◆ Fonte de dados

Os resultados foram obtidos no banco de dados do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) através das fichas de notificação compulsória que se encontravam na Secretaria Municipal de Saúde de Arapiraca. As variáveis analisadas foram a nível temporal (ano/mês) e demográfico (sexo e faixa etária). Os dados populacionais utilizados para cálculo das taxas de incidência e do índice de infestação predial foram obtidos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), tendo como base o censo 2010.

◆ Classificação dos casos

A classificação dos casos foi de acordo com a categorização da Organização Mundial de Saúde¹⁶, na qual os casos notificados, após investigação epidemiológica, podem ser concluídos como casos confirmados, descartados, inconclusivos e ignorados. Os casos notificados/confirmados foram classificados como Dengue Clássica (DC), Febre Hemorrágica do Dengue (FHD), Dengue com Complicações (DCC), Síndrome do Choque do Dengue (SCD) e Descartado.

◆ Análises Estatísticas

Para a análise de incidência de dengue na cidade de Arapiraca foi considerado a base de 100.000 habitantes, enquanto para a

população específica por sexo a base utilizada foi 10.000 habitantes. O cálculo da taxa de incidência (TI) de dengue foi obtido pela fórmula: $TI = \text{casos notificados} \times 10n / \text{população exposta}$.¹⁷ O método utilizado para o cálculo das taxas de incidência foi o de população total e por fim estratificada de acordo com o sexo e a faixa etária obtidos do IBGE (2010).

Quanto aos aspectos vetoriais foram descritos o índice de infestação predial (IIP), calculado a partir da média anual em percentual segundo ciclo de atividades. A fonte de dados sobre o IIP de cada ciclo no período de estudo foi obtida na Secretaria Municipal de Saúde do município de Arapiraca. Para a análise dos dados foi utilizado o teste qui-quadrado (χ^2), em que os dados foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$, utilizando-se o programa Graphpad Prism 5.0.

RESULTADOS

No período de 2007 a 2013, o SINAN notificou um total de 21.579 casos de dengue no município de Arapiraca. Em relação à classificação, 19.686 foram classificados como Dengue Clássica (DC), 98 como Dengue com Complicações (DCC), 44 Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), 1 Síndrome do Choque da Dengue (SCD), 1.178 casos foram descartados, 508 inconclusivos e 64 casos em branco. A incidência e o número de casos de dengue segundo o ano pode ser visualizada na Fig. 1.

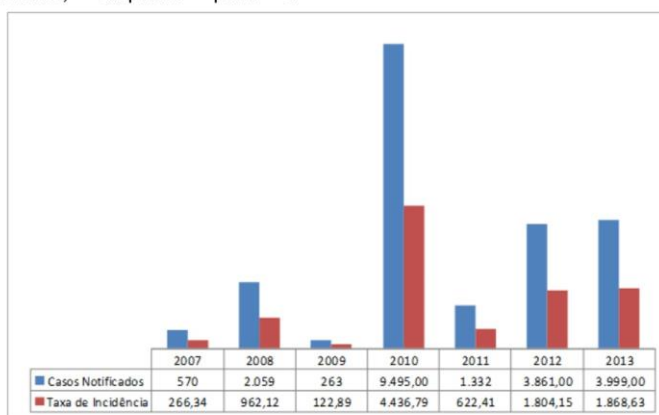


Figura 1. Casos notificados de dengue e incidência anual por 100.000 habitantes no município de Arapiraca, Alagoas, 2007-2013.

A distribuição por faixa etária demonstrou que a dengue e febre da dengue hemorrágica acometeram indivíduos de todas as idades. Entre os casos de febre da dengue hemorrágica, a faixa etária que apresentou o maior número de casos notificados encontra-se entre 5-9 anos de idade. As faixas subsequentes mais acometidas foram entre 20-34 anos e entre 1- 4 anos. Já na faixa etária representada com mais de 80 anos não foi registrado nenhuma notificação de casos de FHD (Tabela 1).

A maior frequência foi registrada em indivíduos do sexo feminino, representando 57% das notificações (12.289 casos), enquanto que o sexo masculino correspondeu a 43% (9.278 casos). O ano que expôs o maior número casos de FHD foi 2010, com 34 casos, no qual 19 casos foram registrados do sexo feminino e 15 do sexo masculino. A diferença foi estatisticamente significativa dos casos notificados no período estudado em ambos os sexos, em que o gênero mais acometido foi o feminino ($p < 0.0001$). Consequentemente, a taxa de incidência (TI) por sexo foi elevada nas mulheres (Fig.2).

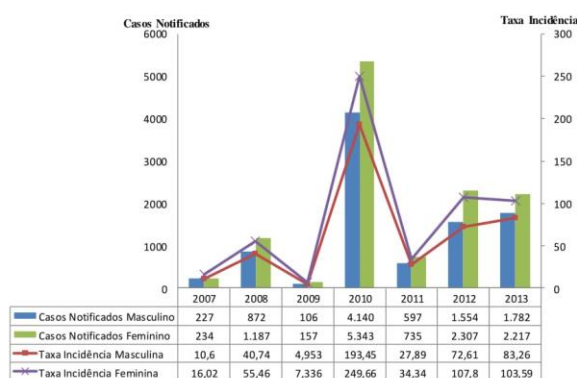


Figura 2. Casos notificados e taxa de incidência de dengue por ano, segundo sexo no município de Arapiraca, Alagoas, 2007-2013.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a taxa de incidência para dengue é classificada em controle ($TI < 100$ casos/ 100 mil habitantes), estado de alerta (TI entre 100 e 300/100.000 habitantes) e em situação epidêmica ($TI > 300$ casos/ 100 mil habitantes). Assim, o município em 2007 e 2009 encontrava-se em estado de alerta por apresentar uma incidência entre 100 e 300 casos por 100 mil habitantes.

Em 2008, 2010, 2011, 2012 e 2013, a situação era epidêmica, pois a taxa de incidência apresentou valores superiores a 300 casos por 100 mil habitantes. O ano de maior número de casos notificados foi em 2010, com 9.495 casos e com uma incidência anual que ultrapassou 4.000 casos por 100 mil habitantes.

Tabela 1. Distribuição de notificação de casos de dengue e febre da dengue hemorrágica de acordo com a faixa etária e com o SINAN no município de Arapiraca, Alagoas, 2007-2013.

Idades	2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013		Total
	FD	FHD	FD	FHD	FD	FHD	FD	FHD	FD	FHD	FD	FHD	FD	FHD	
<1 ano	18	0	68	0	12	0	142	1	20	0	61	0	57	0	379
1-4	33	1	228	2	25	0	711	2	36	2	199	0	148	0	1387
5-9	49	1	357	0	30	0	1.266	12	94	0	234	0	300	0	2343
10-14	63	0	305	0	29	0	1.347	3	92	0	330	1	369	0	2539
15-19	54	0	224	0	29	0	1.160	1	203	0	529	0	609	1	2810
20-34	200	0	512	1	78	1	2.565	7	441	0	1.465	0	1.419	0	6689
35-49	100	0	234	0	41	0	1.378	5	198	0	692	0	664	0	3312
50-64	44	0	98	0	12	0	652	2	94	0	266	0	290	0	1458
65-79	9	0	31	0	7	0	193	1	140	0	73	0	107	0	561
>80	*	0	*	0	*	0	30	0	4	0	8	0	28	0	70
Ignorada	-	-	2	-	*	-	51	-	10	-	4	-	8	-	75

Em 2007, observou-se em Arapiraca um período de 4 meses com uma taxa de incidência elevada que correspondeu de maio a agosto. Nos meses seguintes ocorreu um decréscimo nos casos de incidência, tornando-se crescente a partir de abril de 2008,

seguido pelo mês de maio (TI=413,07 casos/100.000 habitantes). A partir de julho de 2008 houve uma baixa na taxa de incidência, permanecendo assim em 2009, apresentando no mês de maio a maior taxa de incidência de 27,56 casos/100.000 habitantes (Fig.3).

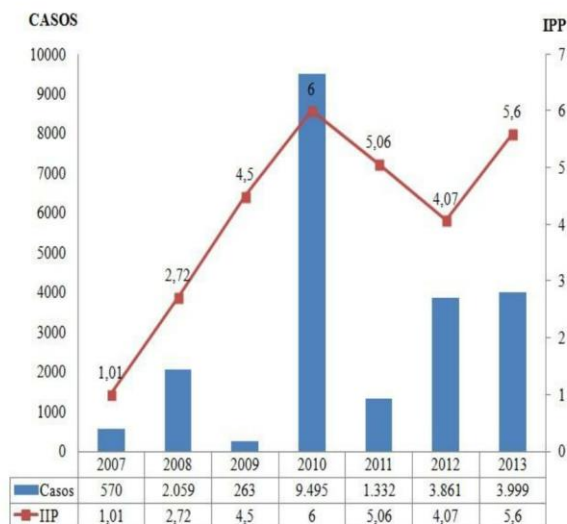


Figura 3. Taxa de incidência mensal e média do índice de infestação predial (IIP) de dengue no município de Arapiraca, Alagoas, 2007-2013.

Em 2010, destacaram-se os meses de março, abril e maio. O ponto mais crítico observado nesse ano foi no mês de abril que apresentou a maior taxa de incidência durante o período de estudo (1.284,54 casos/100.000 habitantes), seguido pelo mês de maio (1.242,02 casos/100.000 habitantes). Nos meses seguintes ocorreu um decréscimo na incidência, entretanto o ano de 2011 apresentou apenas no mês de março um aumento na taxa de incidência (107,94 casos/100.000 habitantes). Em 2012, destacam-se as incidências nos cinco primeiros meses, em que o mês de abril possuiu 438,77 casos/100.000 habitantes. A partir de junho as taxas de incidências de dengue se mantiveram baixas até os quatro primeiros meses do ano de 2013, voltando a se elevar nos meses de maio, junho e julho com taxas acima de 200 casos/100.000 habitantes.

Considerando a taxa de incidência da dengue no município de Arapiraca, todos os meses registraram ocorrências da doença (Tabela 2).

Tabela 2. Número de casos e taxa de incidência (TI) mensal de dengue no município de Arapiraca, Alagoas, 2007-2013.

Mês	2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013	
	casos	TI	casos	TI	casos	TI	casos	TI	casos	TI	casos	TI	casos	TI
Jan	4	1,8	11	5,1	4	1,8	60	28	33	15,4	658	307,46	48	22,42
Fev	3	1,4	10	4,6	12	5,6	243	113	183	85,5	437	204,19	27	12,61
Mar	11	5,1	42	19,6	26	12,1	2,1	1,019	231	107,9	585	273,35	52	24,29
Abr	16	7,4	815	380	21	9,8	27	1,284	133	62,1	939	438,77	346	161,67
Mai	74	34,5	884	413	59	27,5	2,658	1,242,02	133	62,1	521	243,45	555	259,33
Jun	100	46,7	237	110	49	22,8	867	405	108	50,4	216	100,93	600	280,36
Jul	135	63	35	16	24	11,2	391	182	53	24,7	173	80,83	617	288,30
Ago	138	64,4	8	3,7	20	9,3	154	71,9	58	27,1	89	41,58	338	157,93
Set	37	17,2	5	2,3	10	4,6	69	32,2	63	29,4	151	70,55	367	171,49
Out	21	9,8	4	1,8	6	2,8	36	16,8	38	17,7	40	18,69	380	177,56
Nov	20	9,3	3	1,4	12	5,6	46	21,4	105	49	23	10,74	408	190,64
Dez	11	5,1	5	2,33	20	9,3	40	18,6	194	90	29	13,55	261	121,95

Considerando o número total de casos notificados de dengue em cada mês no período do estudo é possível ver o aspecto sazonal da ocorrência de casos no município de Arapiraca. Foi possível observar também a ocorrência de dengue em todos os meses do ano, o que demonstra um quadro endêmico, evidenciando uma elevação considerável de notificações a partir de mês março, seguindo pelos meses de abril e maio, com desaceleração a partir de junho.

Os níveis de significância para o índice de infestação predial (IIP) podem ser considerados como: satisfatório (IIP < 1%), de alerta (entre 1% e 3,9%) e de risco (IIP > 3,9%)²³. Situações de alerta em relação ao índice de infestação predial foram identificadas no município de Arapiraca durante o período avaliado neste estudo. A partir de 2009 até

2013 o município exibiu características de risco de surto, sendo o ano de 2010 o mais crítico com a média anual de IIP de 6%. Já dentre os ciclos por ano, o maior (9,3%) e o menor (0,2%) foram encontrados no 2º ciclo de 2010 e no 1º ciclo de 2007, respectivamente.

Os anos de 2009 a 2013 (Tabela 3) apresentaram um IIP característico de risco de surto para dengue com TI para epidemias nos anos de 2010 a 2013. O ano de 2009, mesmo com um IIP de risco, não evidenciou uma TI de caráter epidêmico para dengue. Neste mesmo ano, um índice de alerta para dengue culminou no ano de 2010 com um IIP e TI mais elevado. No ano de 2011, obteve-se uma diminuição considerável na Taxa de Incidência quando comparada ao ano de 2010, porém a mesma diminuição não foi atribuída no IIP entre 2010 e 2011. Entre 2011 e 2012, obtivemos diminuição do IIP, porém com um aumento no TI no ano de 2012.

Tabela 3. Taxa de incidência mensal de dengue no município de Arapiraca, Alagoas, 2007-2013.

Meses do ano	Taxa de incidência mensal						
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Janeiro	1,86	5,14	1,86	28,03	15,42	307,46	22,42
Fevereiro	1,4	4,67	5,6	113,54	85,51	204,19	12,61
Março	5,14	19,62	12,14	1.019,59	107,94	273,35	24,29
Abril	7,47	380,83	9,81	1.284,54	62,14	438,77	161,67
Maio	34,57	413,07	27,56	1.242,02	62,14	243,45	259,33
Junho	46,72	110,74	22,89	405,12	50,46	100,93	280,36
Julho	63,08	16,35	11,21	182,7	24,76	80,83	288,3
Agosto	64,48	3,73	9,34	71,96	27,1	41,58	157,93
Setembro	17,28	2,33	4,67	32,24	29,43	70,55	171,49
Outubro	9,81	1,86	2,8	16,82	17,75	18,69	177,56
Novembro	9,34	1,4	5,6	21,49	49,06	10,74	190,64
Dezembro	5,14	2,33	9,34	18,69	90,65	13,55	121,95

DISCUSSÃO

Em 2008, 2010, 2011, 2012 e 2013, os registros mostraram o caráter epidêmico da dengue, em que as taxas de incidência apresentaram valores superiores a 300 casos por 100 mil habitantes. Esta característica temporal foi evidenciada na literatura correspondendo ao intervalo de 3 a 5 anos para o desencadeamento de um surto epidêmico¹⁸, entretanto o espaço entre os anos neste estudo é diferente do relatado. Em vista a esta particularidade no município analisado, faz-se necessário investigar outros aspectos que possam descrever quais as peculiaridades que estejam envolvidas nessa diferenciação de intervalos de surto.

O ano de maior número de casos notificados foi em 2010, com 9.495 casos e uma incidência anual que alcançou 4.436,79 casos por 100 mil habitantes. Foi identificado o risco epidemiológico de infecção por dengue para a população de Arapiraca com incidência e infestação predial da doença elevadas. Cenário semelhante foi constatado em outros

municípios do país: Uberaba em Minas Gerais.¹⁹

No ano de 2010, um modelo de transmissão hiperendêmica que implica no aumento das formas graves de dengue e, por conseguinte, um aumento da letalidade da doença devido à presença de anticorpos de infecções sequenciais. Os anticorpos da primeira infecção não neutralizam o segundo vírus e ainda ampliam a infecção, já que a imunidade conferida da primeira infecção é permanente, mas temporária para os outros sorotipos, acarretando em um aumento expressivo de infecções cruzadas.^{20,21}

O sexo feminino apresentou uma frequência maior para os casos de dengue clássica, dengue com complicações e febre da dengue hemorrágica. Essa diferença foi observada em outros estudos no Brasil.^{19, 22,23} A explicação para este fato seria a presença do vetor da doença próximo aos domicílios, ambiente favorável para a cadeia de transmissão, uma vez que são as mulheres que permanecem a maior parte do tempo em suas residências, aumentando assim o risco de transmissão.⁵

Indivíduos de todas as idades desenvolveram a infecção por dengue, entretanto a faixa etária mais acometida pela dengue clássica foi a de 20-49, totalizando 9.978 casos de dengue notificados no município. Outros estudos demonstraram maior incidência na faixa etária 20-49 anos.^{22,23} Já a faixa etária de 5-9 foi a que apresentou o maior registro de casos de febre hemorrágica da dengue (13 casos), seguida pelas idades entre 1-4 anos (7 casos) e entre 20-34 (9 casos). Esse resultado corrobora com outros estudos na literatura.^{22,23,25}

A literatura aborda que para o desenvolvimento da forma mais grave da dengue é necessário que o indivíduo tenha histórico de no mínimo duas infecções por sorotipos diferentes, portanto a infecção secundária seria um fator de risco para o desenvolvimento da febre da dengue hemorrágica.²⁶ Outras questões, por exemplo, as características do hospedeiro, tais como idade, etnia, presença de doenças crônicas e componentes genéticos, têm sido relatadas na literatura.^{27,28,29} Neste estudo foi demonstrado que a presença de infecção por mais de um dos sorotipos possivelmente não esteja relacionada com o agravamento do quadro clínico da dengue.

Em relação à análise da média anual de IIP no município, a menor média foi registrada em 2007 (1,01%) e a maior em 2010 (6,0%). Quando o IIP e casos de dengue foram relacionados, percebeu-se que este indicador (IIP) não afetou o curso da epidemia, já que nos anos em que os valores do IIP estiveram altos as notificações de casos foram baixas, com exceção do ano de 2010 em que ambos os valores se apresentaram elevados. A presença de focos do mosquito não foi correlacionada com o aumento da infecção.

Considerando o número total de casos notificados de dengue em cada mês no período do estudo foi possível identificar o aspecto sazonal em que houve a ocorrência dos casos de dengue em todos os meses do ano, o que demonstra um processo de endemia. Os meses de março a julho exibiram as maiores taxas de incidência da doença. O ano de 2010 foi o que apresentou os maiores índices (1.284,54 casos/ 100 mil habitantes) quando comparado com os outros anos. Os resultados apresentam uma elevação considerável de notificações a partir do mês março, seguido pelos meses de abril e maio, com desaceleração a partir de junho em todos os anos avaliados, corroborando com o estudo de Ribeiro.⁵

O perfil de elevadas notificações observadas nos meses de março a maio do

período de estudo (2007 a 2013) e diminuição progressiva a partir de junho pode ter relação com perfil de chuvas no município, uma vez que estas formam o panorama ideal para o desenvolvimento do mosquito vetor, propiciando a implantação de perfeitos criadouros para o *Aedes aegypti*. Xavier¹⁵ analisou o comportamento das chuvas no município de Arapiraca e identificou que a partir de março se inicia o período chuvoso de modo que os meses acima descritos são considerados com os maiores índices de precipitação. Vale ressaltar que existem outros fatores que favorecem a ocorrência da doença, como a umidade do ar, temperatura, más condições da infraestrutura das cidades, variáveis meteorológicas e pluviosidade.^{5, 28}

Observamos que no ano de 2009 o município apresentou um índice de alerta para dengue culminando no ano de 2010 com um IIP e TI mais alto no período do estudo. Os índices observados em 2010 podem estar relacionados com a introdução do sorotipo DENV-3 no estado de Alagoas. No ano de 2011, houve uma diminuição considerável na TI quando comparada ao ano de 2010, porém a mesma diminuição não foi característica no IIP entre 2010 e 2011. Entre 2011 e 2012 ocorreu uma diminuição do IIP, entretanto com um aumento no TI no ano de 2012, que pode ser explicado pela introdução do DENV-4.

Um estudo realizado no estado de Goiás correlacionou o IIP e índices pluviométricos aos casos da dengue, concluindo que nos meses de janeiro a abril a difusão da doença foi elevada, coincidindo com o período de chuvas, devido à densidade larvária do mosquito que oscilou com as variações climáticas, demonstrando densidade superior nos meses com índices pluviométricos altos, em razão da disponibilidade de criadouros para o desenvolvimento do vetor, culminando no aumento da incidência.³⁰

O presente estudo identificou que o município de Arapiraca apresentou estado de alerta em 2007 e 2009 e caráter epidêmico para os anos de 2008, 2010, 2011, 2012 e 2013. O risco epidemiológico de infecção por dengue para a população foi alto, com altos índices no ano de 2010. O sexo feminino apresentou uma frequência maior para os casos de dengue clássica e febre da dengue hemorrágica. Em relação à faixa etária, a de 1-9 anos foi a mais acometida com o quadro de febre da dengue hemorrágica.

A partir desta pesquisa, foi possível constatar que a situação epidemiológica da dengue no município de Arapiraca se configura como um problema de saúde pública. O desenvolvimento de medidas para o controle e

combate aos focos da doença, ao passo que a vigilância entomológica se torna crucial, pois, na ausência de vacina eficaz contra a doença, o controle de vetores e a eliminação de criadouros se configuram como a única forma possível de combater a proliferação da doença.

REFERÊNCIAS

- World Health Organization. Dengue and severe dengue: Fact Sheet N° 117 [Internet]. Geneva: World Health Organization (WHO); 2012. [cited 2015 Sep 12]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>.
- Oliveira EDS, Douhi N. Levantamento epidemiológico dos casos de dengue no município de Assis Chateaubriand, Paraná, e sistemas de prevenção e controle. Rev Bras Ciências da Saúde - USCS [Internet]. 2012 [cited 2015 Sep 14];10(32). Available from: http://seer.uscs.edu.br/index.php/revista_ciencias_saude/article/view/1471.
- Evangelista LS de M, Oliveira FLL de, Gonçalves LMF. Aspectos Epidemiológicos do Dengue no Município de Teresina, Piauí. BEPA Bol Epidemiológico Paul. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo [Internet]. 2012 [cited 2015 Sep 14]; 9(103):32-9. Available from: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-42722012000700004&lng=pt&nrm=iso=pt.
- Rocha GCM, Souza JLS, de Souza Santos C, de Oliveira FES, da Silva JA, Mendes MS, et al. Epidemiologia da dengue em Sergipe, entre 2009 e 2013. Cad Grad Biológicas e da Saúde-UNIT[Internet]. 2014 [cited 2015 Sep 14];2(1):103-9. Available from: https://periodicos.set.edu.br/index.php/cade_nobiologicas/article/view/1354.
- Ribeiro AF, Marques GRAM, Voltolini JC, Condino MLF. Association between dengue incidence and climatic factors. Rev Saude Publica [Internet]. 2006 [cited 2015 May 28];40(4):671-6. Available from: http://www.scielo.org/scielo.php?pid=S0034-89102006000500017&script=sci_arttext.
- Massad E, Coutinho FAB, Burattini MN, Lopez LF. The risk of yellow fever in a dengue-infested area. Trans R Soc Trop Med Hyg[Internet]. 2001 [cited 2015 May 28];95(4):370-4. Available from: <http://trstmh.oxfordjournals.org/content/95/4/370.short>.
- Siqueira Jr JB, Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. Emerg Infect Dis [Internet]. 2005 [cited 2015 Sept 28]; 11(1):48-53. Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.176.3805&rep=rep1&type=pdf>.
- Assis Mendonça F, de Almeida Dutra D. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. Soc Nat. [Internet]. 2009; [cited 2015 Sep 28] 21(3):257-69. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/sn/v21n3/a03v21n3>.
- Barbosa IR, Araújo L de F, Carlota FC, Araújo RS, Maciel IJ. Epidemiologia do dengue no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, 2000 a 2009. Epidemiol e Serviços Saúde [Internet]. 2012 [cited 2015 Sep 28];21(1):149-57. Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742012000100015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.
- Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovirus emergentes no Brasil. Rev Pan-Amaz Saude [Internet]. 2014 [citado 2015 Nov 25];5(3):55-64. Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300007&lng=pt.
- Secretaria do estado de Alagoas. Situação Atual da Dengue em Alagoas. Boletim Informativo Semanal [Internet]. 2013 [cited 2015 Aug 25] N°14. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/11955-boletins-epidemiologicos-arquivos>.
- Dias LBA, Almeida SCL, Haes TM, Mota LM, Roriz-Filho JS. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. Medicina (Ribeirao Preto. Online) [Internet]. 2010 [cited 2015 Sep 28]; p. 143-52. Available from: <http://www.revistas.usp.br/rmmp/article/view/171>.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [Internet]. Censo demográfico 2010. Arapiraca, Alagoas, 2010. [cited 2015 Aug 28]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/>.
- Mascarenhas JC, Beltrão BA, Junior LCS. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. Diagnóstico do município de Arapiraca, estado de Alagoas. Recife: CPRM/PRODEEM [Internet]. 2005 [cited 2015 Aug 28];13 p. Available from: http://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/bitstream/handle/doc/15239/rel_cadastros_arapiraca.pdf?sequence=1.
- Xavier RA, Dornellas P da C. Análise do comportamento das chuvas no município de Arapiraca, região Agreste de Alagoas. GEOGRAFIA (Londrina) [Internet]. 2010 [cited

2015 Aug 28]; p. 49-64. Available from: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/geografia/article/view/6685>.

16. World Health Organization. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. 2nd. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1997. Available from: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>.

17. Brasil. Ministério da Saúde. Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* para Vigilância Entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil: Metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e Tipo de Recipientes [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2013 [cited 2015 Nov 21]. Available from: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/levantamento_rapido_indices_aedes_aegypti.pdf.

18. Brasil. Ministério da Saúde. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2009 [cited 2015 Nov 25]. Available from: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf.

19. Pinto DP de SR, Gaetti-Jardim EC, Loureiro MDR, Cunha RV, Quintanilha ACF, Júnior MAF. Aspectos Epidemiológicos e clínicos dos casos de internação hospitalar durante epidemia de dengue. Rev enferm UFPE line [Internet]. 2014 [cited 2015 Sept 28];8(6):1568-76. Available from: <http://www.revista.ufpe.br/revistaenfermagem/index.php/revista/article/view/5787>.

20. Araújo RFS de, Carels N, Melo PRS De, Frias D. Investigação de polimorfismos no genoma do vírus da Dengue. Recis [Internet]. 2007 [cited 2015 May 28];1(2):317-21. Available from: <http://www.recis.cict.fiocruz.br/index.php/recis/article/view/102/115>.

21. Barreto ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. Est Avan [Internet]. 2008 [cited 2015 Jul 28];22(64):53-72. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142008000300005&lng=en&nrm=iso&tlng=pt.

22. Souza TBB, Dias JP. Perfil epidemiológico da dengue no município de Itabuna (BA). Rev Baiana de Saúde Pública [Internet]. 2010 [cited 2015 Jul 28];34(3):665-681. Available from:

<http://inseer.ibict.br/rbsp/index.php/rbsp/article/view/64>.

23. Monteiro ESC, Coelho ME, Cunha IS da, Cavalcante M do AS, Carvalho FA de A. Aspectos epidemiológicos e vetoriais da dengue na cidade de Teresina, Piauí - Brasil, 2002 a 2006. Epidemiol e Serviços Saúde [Internet]. 2009 [cited 2015 Oct 28];18(4):365-74. Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742009000400006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

24. Xavier-Carvalho C, Gibson G, Brasil P, Ferreira RX, De Souza Santos R, Gonçalves Cruz O, et al. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: A case-control, functional and meta-analysis study. Infect Genet Evol [Internet]. 2013 [cited 2015 Oct 28]; 20:197-205. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.017>.

25. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. Arch Virol [Internet]. 2013 [cited 2015 Sep 15];158(7):1445-59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23471635>.

26. Sam S-S, Teoh B-T, Chinna K, AbuBakar S. High producing tumor necrosis factor alpha gene alleles in protection against severe manifestations of dengue. Int J Med Sci [Internet]. 2015 [cited 2015 Oct 28];12(2):177-86. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4293183&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

27. Viana DV, Ignotti E. The occurrence of dengue and weather changes in Brazil: a systematic review. Rev Bras Epidemiol [Internet]. 2013 [cited 2015 Aug 28];16(2):240-56. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2013000200240&lng=en&nrm=iso&tlng=pt.

28. Naish S, Dale P, Mackenzie JS, McBride J, Mengersen K, Tong S. Climate change and dengue: a critical and systematic review of quantitative modelling approaches. BMC Infect Dis [Internet]. 2014 [cited 2015 Aug 17];14(1):167. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-14-167>.

29. Souza SS de, Silva IG da, Silva HHG da. Associação entre incidência de dengue, pluviosidade e densidade larvária de *Aedes*

Santos LLS, Moura EL de, Ferreira JM et al.

Análise epidemiológica da dengue...

aegypti, no Estado de Goiás. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2010 [cited 2015 Sept 28];43(2):152-5. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822010000200009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt

Submissão: 28/12/2015

Aceito: 26/02/2016

Publicado: 01/06/2016

Correspondência

Elaine Virginia Martins de Souza Figueiredo
Universidade Federal de Alagoas
Departamento de Enfermagem/Laboratório de
Biologia Molecular e Expressão Gênica
Av. Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso
CEP 57309-005 – Arapiraca (AL), Brasil

APÊNDICE D – Artigo original 3

Artigo construído em parceria com o programa de pós-graduação em biotecnologia –
RENORBIO – UFPE

Cad. Prospec., Salvador, v. 9, n. 4, p.493-502, out./dez.2016

D.O.I.: dx.doi.org/10.9771/S.CPROSP.2016.009.048

ESCOVA CITOLÓGICA NO RASTREAMENTO DE LESÕES PRÉ-CANCERÍGENAS E CANCERÍGENAS: PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

Karol Fireman de Farias¹, Tatiane Luciano Balliano^{2*}, Silvia Beatriz Beger Uchôa³, Denise Macêdo da Silva⁴, Edilson Martins de Souza⁵, Ana Caroline Melo dos Santos⁶, Adriely Ferreira da Silva⁷, Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo⁸, José Luiz Lima Filho⁹

^{1,2,3,4,5,6,7,8}Universidade Federal do Alagoas, Campus Arapiraca, AL, Brasil.

⁹Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Rec.: 23.09.2016 Ace.: 22.12.2016

RESUMO

Cerca de meio milhão de casos novos de câncer cervical são registrados anualmente no mundo, considerando limitações nos instrumentos de coleta e metodologias clínicas no rastreamento dessa patologia. Este trabalho objetivou a prospecção tecnológica sobre instrumentos na coleta de células cervicais, e avaliação do potencial tecnológico de um novo modelo de escova citológica. Foi realizada uma prospecção nos principais bancos de patentes e periódicos do mundo, utilizando os termos selecionados. Foram constatadas 47 patentes e 251 artigos, apresentando a maior parte do conhecimento na área através de artigos científicos. No Brasil, não foi encontrado registro de patentes, sugerindo um escasso investimento em tecnologia no país. Os Estados Unidos apresentou maior expressividade no número de patentes em relação à jurisdição. Foi observado um déficit no desenvolvimento de tecnologia nessa temática no Brasil, portanto, o presente estudo serve de alicerce para instigar o interesse no investimento tecnológico no país.

Palavras-chave: Escova citológica. Escova cervical. Vassoura Cervical.

ABSTRACT

About half a million new cases of cervical cancer are reported annually in the world, even in the limitations on collection instruments and clinical methodology tracking of this pathology. This study aimed to perform prospecting technological of equipment related to the collect of cervical cells, as well as to evaluate the technological potential of a new model of cytological brush. Technological prospecting was realized in the main banks of patents and periodicals of the world using the selected terms. 47 patents and 251 articles were found, presenting the most part of the knowledge in the area through scientific articles. In Brazil it was not found patent registration, suggesting a scarce investment in technology in the country. The United States presented major expressivity in the number of patents in relation to the jurisdiction. A deficit was observed in the development of technology in this theme in Brazil, therefore, this study serves as a foundation to instigate interest in technological investment in country.

Keywords: Cytology Brush. Cervical Brush. Cervical Broom.

Área tecnológica:

*Autor para correspondência: tlb@qui.ufal.br

ANEXO A - Protocolo de extração de DNA genômico por NaCl

1. Aos tubos contendo swab adicionar **600 μ l** (para tubos de 2ml) ou **400 μ l**(para tubos de 1,5ml) de TES (Tris HCL 10mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) e **7 μ l**(para 600 μ l) ou **10 μ l** (para 400 μ l) de proteinase K (10mg/ml);
2. Incubar por 2h a 42°C;
3. Após a incubação retirar o swab (este passo exige o máximo de cuidado para a retirada da escova que deve ser realizada com uma pinça pequena e exclusiva para o procedimento);
4. Adicionar **84 μ l** (para 600 μ l)ou **116 μ l** (para 400 μ l) de NaCl e agitar manualmente com vigor;
5. Centrifugar por 1 minuto a 15.000 \times g;
6. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e adicionar 2 vezes **(800 μ l)** o volume de etanol absoluto;
7. Agitar e centrifugar os tubos por 1 minuto a 15.000 \times g;
8. Descartar o etanol absoluto e adicionar **1ml** (1000 μ l) de etanol a 70%;
9. Inverter os tubos diversas vezes para lavar o pellet;
10. Centrifugar os tubos por 1 minuto a 15.000 \times g e desprezar o sobrenadante;
11. Deixar os tubos abertos por 30min invertidos em papel limpo, para evaporação do etanol residual;
12. Dissolver o DNA em **60 μ l** de TE 10:0,1 (Tris HCL 10mM pH 7,6; EDTA 1mM)
OBS: Passar no vortex;
13. A concentração de DNA obtida é em torno de **80ng/ μ l**.

ANEXO B - Parecer de aprovação da pesquisa pelo Comitê de ética e pesquisa.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismo genético dos pacientes com dengue no estado de Alagoas e a sua relação com a infecção e progressão da doença

Pesquisador: Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 1

CAAE: 18558913.1.0000.5013

Instituição Proponente: Universidade Federal de Alagoas

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE ALAGOAS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 405.940

Data da Relatoria: 04/10/2013

Apresentação do Projeto:

Infecções pelo vírus da dengue ocorrem em mais de 100 países. A infecção pode causar dengue clássica (DF), que se caracteriza por um estado febril, ou pode progredir para uma dengue hemorrágica (DHF) caracterizada por manifestações como a síndrome hemorrágica de choque na dengue (DSS). Esse é um estudo de casos e controles que busca demonstrar, a exemplo de outros já realizados, a relação entre os polimorfismos genéticos no sistema imune inato humano e respostas diferenciais à infecção ocasionada pelo Vírus da dengue, de forma que estejam associados com uma maior susceptibilidade a esta infecção, promovendo uma progressão mais grave para a doença. Os pacientes e casos controle do estudo serão do agreste alagoano. A genotipagem será realizada utilizando combinação entre reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise dos fragmentos gerado por enzimas de restrição (PCR-RFLP). O foco do estudo será os genes do Fator de necrose tumoral, IL-10 e complemento (C3 e C4). Todos os resultados serão analisados e publicados com o intuito de gerar e ampliar competência científica em grupo de pesquisa em polimorfismos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Campus A . C Simões Cidade Universitária

Bairro: Tabuleiro dos Martins

CEP: 57.072-900

UF: AL

Município: MACEIO

Telefone: (82)3214-1041

Fax: (82)3214-1700

E-mail: comitedeeticaufal@gmail.com

ANEXO C - Termo de consentimento livre e esclarecido

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe com consentimento livre e esclarecido dos participantes, indivíduos ou grupos que, por si e/ou por seus representantes legais, manifestem a sua anuência à participação na pesquisa. Entende-se por Processo de Consentimento Livre e Esclarecido todas as etapas a serem necessariamente observadas para que o convidado a participar de uma pesquisa possa se manifestar, de forma autônoma, consciente, livre e esclarecida”. Resolução Nº 466 de 12 de dezembro de 2012.

Eu, _____ tendo sido convidado (a) a participar como voluntário (a) do estudo: **POLIMORFISMO GENÉTICO DOS PACIENTES COM DENGUE NO ESTADO DE ALAGOAS E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO E PROGRESSÃO DA DENGUE**, recebi da Sr. Professora Adjunta Elaine Martins de Souza Figueiredo do Departamento de Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas – Campus Arapiraca, responsável por sua execução e da discente de mestrado Ana Caroline Melo dos Santos, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a investigar padrões genéticos na população geral relacionados a infecção e evolução da doença dengue;
- A importância deste estudo é entender estes aspectos correlacionados a doença da dengue e gerar conhecimento para poder determinar a predisposição das pessoas em relação com a dengue;
- Esse estudo começou em 2015 e terminará em 2016;
- O estudo será feito da seguinte maneira: Se você estiver com suspeita de dengue e for pedido a realização de exame sorológico pelo seu médico e você autorizar participar do estudo, será solicitada a coleta de sangue em um dos braços por punção venosa (retirada de sangue pela veia do braço com agulha) realizada com material descartável por profissional treinado. Será retirado no máximo 10 ml de sangue. Este volume de sangue é cerca de trinta vezes menor do que o volume de sangue normalmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Caso a punção realizada não obtiver sucesso, uma amostra de saliva será necessária através da coleta por uma escova (swab). Estas amostras serão submetidas à análise de laboratório para estudos genéticos. Solicitamos também a sua autorização para utilizar dados do seu prontuário como idade, sexo, idade que iniciou a doença, tempo de doença e os resultados dos últimos exames de rotina pedidos pelo seu médico;
- Que eu participarei das seguintes etapas: doação de material biológico (sangue ou saliva) e dessa forma encerra-se a minha participação neste estudo;
- Que os outros meios conhecidos para se obter o mesmo resultado são os seguintes: não existem outros meios para se obter os mesmos resultados;
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: o desconforto da coleta de sangue é dor leve e passageira;
- Os riscos à minha saúde física e mental são mínimos. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da veia. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte. O acesso ao meu prontuário pode conter informações pessoais e confidenciais, entretanto os pesquisadores envolvidos afirmam que os resultados da pesquisa não terão os entrevistados divulgados. Estou ciente de que será mantido o sigilo e a privacidade do meu nome na pesquisa;
- Que eu não terei nenhuma despesa na participação da pesquisa;
- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: a avaliação da predisposição da população estudada para a infecção e evolução da dengue;
- Que, sempre que eu desejar será fornecido esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo;

- Que eu poderei, a qualquer momento, recusar a continuar participando do estudo e também a que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga nenhuma penalidade ou prejuízo;
- Que a qualquer momento eu poderei recusar e continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;
- Que as informações conseguidas através da minha participação no estudo não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto pelos responsáveis, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto;
- Que eu receberei uma cópia deste termo devidamente assinado por mim e pelos responsáveis pela pesquisa;
- Que não haverá ressarcimento de despesas, caso eu apresente algum custo na realização desta pesquisa e de que eu não serei indenizado por qualquer dano que venha a sofrer com a participação na pesquisa.
- Que serei indenizado para alguma situação adversa decorrentes da minha participação no projeto de pesquisa;

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço do Comitê de Ética:

Instituição: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas

Endereço: Prédio da Reitoria, sala do C.O.C, Campus A. C. Simões

Bairro: Cidade Universitária Cidade: Maceió

Fone: 32141041

<p>_____</p> <p>Assinatura ou impressão datiloscópica do (a) voluntário ou responsável legal</p>	<p><i>Elaine Virginia f. de Souza Figueiredo</i></p> <hr/> <p>Elaine Virginia de Martins de Souza Figueiredo</p> <p><i>Ana Caroline Melo dos Santos</i></p> <hr/> <p>Ana Caroline Melo dos Santos Assinatura do(s) responsável (is) pela pesquisa.</p>
--	--