



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

THIAGO NOBRE GOMES

**PREVALÊNCIA E INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS -308 G/A (rs1800629) E
-238 G/A (rs361525) DO GENE *TNF- α* EM PACIENTES COM DENGUE, EM UMA
POPULAÇÃO DO NORDESTE DO BRASIL.**

**PARNAÍBA – PI
MARÇO – 2017**

THIAGO NOBRE GOMES

**PREVALÊNCIA E INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS -308 G/A (rs1800629) E
-238 G/A (rs361525) DO GENE *TNF- α* EM PACIENTES COM DENGUE, EM UMA
POPULAÇÃO DO NORDESTE DO BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Medicina Investigativa e Marcadores Epidemiológicos.

Linha de pesquisa: Marcadores Epidemiológicos em Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira.

PARNAÍBA – PI
MARÇO – 2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

G585p Gomes, Thiago Nobre.
Prevalência e influência dos polimorfismos -308 G/A (rs1800629) e -
238 G/A (rs361525) do gene TNF- α em pacientes com dengue, em uma
população do nordeste do Brasil [manuscrito] / Thiago Nobre Gomes. –
2017.
104 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade
Federal do Piauí, 2017.
Orientação: Prof.^a Dr.^a Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira.
Área de concentração: Medicina Investigativa e Marcadores
Epidemiológicos.

1. Dengue virus. 2. Citocina inflamatória. 3. Hospedeiro Humano. 4.
Variantes Polimórficas. I. Título.

CDD: 616.9

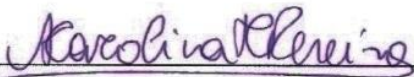
THIAGO NOBRE GOMES

**PREVALÊNCIA E INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS -308 G/A (rs1800629) E
-238 G/A (rs361525) DO GENE *TNF- α* EM PACIENTES COM DENGUE, EM UMA
POPULAÇÃO DO NORDESTE DO BRASIL.**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM: 31/03/2017.


BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a. Dr.^a. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira
Universidade Federal do Piauí – UFPI
(Orientadora – Membro Interno)



Prof.^a. Dr.^a. France Keiko Nascimento Yoshioka
Universidade Federal do Piauí – UFPI
(Avaliadora – Membro Interno)



Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto
Universidade Federal do Piauí – UFPI
(Avaliador – Membro Interno)

PARNAÍBA – PI
MARÇO – 2017

*“Você não sabe o quanto eu caminhei
Pra chegar até aqui
Percorri milhas e milhas antes de dormir
Eu não cochilei
Os mais belos montes escalei
Nas noites escuras de frio chorei...”*

(Da Guia/Toni Garrido – A estrada, Cidade Negra)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, aos amigos queridos, aos meus mestres e a todos que estiveram me apoiando com seu amor, carinho, cuidado e solidariedade, em todos os momentos bons e ruins vividos no decorrer desta longa jornada desafiadora, a qual foi de fundamental contribuição para meu amadurecimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por todas as bênçãos concedidas e por ter me oferecido paciência, resiliência, sabedoria e principalmente saúde para a execução de todas as etapas deste trabalho.

Aos meus pais (em especial minha mãe), por todo amor, carinho, cuidado, dedicação e renúncias ao longo da vida para me proporcionarem uma boa educação; pelos exemplos de força para superar as dificuldades do cotidiano; e por acreditarem no meu potencial. Mesmo sem entenderem o valor acadêmico deste trabalho, sei que vocês sabem o quanto ele significa para mim, e sei que também compartilham da minha imensa alegria por sua finalização. Devo tudo que sou a vocês, OBRIGADO ETERNAMENTE!

Aos órgãos de fomento à pesquisa. Obrigado à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI), pela concessão da bolsa de mestrado; Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à FAPEPI, e à Prefeitura Municipal de Parnaíba (PMP), pelos financiamentos concedidos aos projetos vinculados a esta pesquisa.

À Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde de Parnaíba, sob coordenação das enfermeiras Karliane Uchôa e Gerarlene Santos. Obrigado pela colaboração na viabilização inicial do acesso aos pacientes com suspeita clínica de dengue atendidos na cidade durante o período de realização do estudo.

À direção do Pronto Socorro Municipal de Parnaíba, pela colaboração no acesso aos pacientes com suspeita clínica de dengue atendidos durante o período de realização do estudo (conforme projeto de pesquisa aprovado pela Prefeitura). Obrigado a todos os funcionários da instituição pela atenção prestada, em especial à equipe do Laboratório, pela disponibilidade em nos receber e tornar nosso período de estadia menos laborioso: ao farmacêutico-bioquímico Roberto Régis (por ser um exemplo de humildade, sempre disposto a ensinar e tratar bem o próximo), à biomédica-estagiária Katiússia Caldas (pela atenção, carinho, e bom humor mesmo nos dias mais tensos), ao digitador Márcio (pela paciência na liberação das informações dos pacientes e resultados dos exames

laboratoriais), e aos técnicos de laboratório Adilson e César (pela colaboração na logística de coleta e processamento das amostras dos pacientes).

À direção do Laboratório TECLAB, na pessoa do farmacêutico-bioquímico Mário Abel, pela colaboração no acesso às amostras de sangue total e resultados dos hemogramas dos pacientes com suspeita clínica de dengue atendidos no Pronto Socorro Municipal, encaminhadas ao laboratório durante o período de realização do estudo. Obrigado especialmente à Karla, Conceição, Claudete, Cleyton e aos estagiários de Biomedicina e Análises Clínicas que por lá estiveram, pelo profissionalismo e bom acolhimento.

À direção do Hospital Estadual Dirceu Arcoverde (HEDA) e à equipe do Laboratório Dr. Raul Furtado Bacelar, este sob coordenação do farmacêutico-bioquímico Higino de Aguiar Segundo. Obrigado pela colaboração e acesso às amostras e dados dos pacientes com suspeita clínica de dengue atendidos em Parnaíba-PI durante o período de realização do estudo.

À médica pediatra do HEDA, Vânia Cristina Carvalho, pela colaboração e parceria na viabilização do acesso às amostras dos pacientes com suspeita clínica de dengue atendidos na cidade de Parnaíba-PI durante o período de realização do estudo. Obrigado por toda sua atenção, compartilhamento de experiências de vida (clínicas ou não) e pelos sábios conselhos, os quais sempre me trouxeram (e trazem) boas reflexões.

A todos os voluntários que participaram como sujeitos desta pesquisa: indivíduos recrutados para compor os grupos controle negativo e assintomático, e aos pacientes atendidos com suspeita clínica de dengue (especialmente os que compuseram o grupo de casos positivos), bem como seus familiares. Agradeço pela primordial colaboração de cada um, sem vocês a realização deste estudo não seria possível! Espero que, de forma direta ou indireta, esta pesquisa um dia lhes traga algum tipo de retorno (individual ou coletivo).

Agradeço aos meus poucos, verdadeiros e queridos amigos (sejam eles os “das antigas” no cotidiano de Parnaíba, os que pude conhecer durante os anos de vivência universitária nos ambientes UFPI-UESPI, e também os que precisaram “partir” e estão por aí Brasil a fora buscando seu lugar ao sol). Obrigado a todos pela amizade, amor, carinho,

solidariedade, respeito, paciência, compreensão em minhas ausências e outras tantas coisas boas demonstradas no dia-a-dia. Obrigado especialmente pela presença (física ou não) nos muitos momentos de solidão vividos durante a jornada do mestrado, pelas atenções nos meus desabafos, bem como pelas orações, palavras, ligações e mensagens com energias positivas para que eu não desistisse diante dos obstáculos (por maior que fosse a vontade).

A todos os amigos que conheci durante esses mais de 4 anos que convivi no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Microrganismos e Plantas (BIOMIC). Às minhas queridas mestrandas: Silveny, Emanuela, Julianna e Juana; obrigado por todo apoio prestado principalmente em dividirem comigo a responsabilidade de chefiar as atividades do laboratório, e por terem me mostrado que eu não precisava carregar tudo sozinho nas costas! Aos mais dedicados, competentes e inteligentes alunos de iniciação científica e voluntários: Naiany, Lorena, Felipe, Aline, Vinícius, Mariella e Dacylla; obrigado por poder compartilhar experiências de vida e conhecimentos (acadêmicos e/ou não), de ensinar um pouco do que eu sabia (mesmo nos meus dias de impaciência), mas também de poder aprender diariamente com cada um de vocês. À estimada colega e mestre Tereza, obrigado por toda sua atenção, disponibilidade e paciência em me ajudar a “ser chefe”, ensinando sobre cada detalhe que eu precisava saber para a condução das atividades do laboratório. Às técnicas do laboratório de Microbiologia, Juelina e Sansara; obrigado por toda assistência prestada, seja com vidrarias, reagentes, manuseio de equipamentos, coletas, bem como também com apoio de modo geral. Aos todos os demais que passaram pelo BIOMIC e que também deixaram sua contribuição para o meu aprendizado: Iara (obrigado por toda sua ajuda na condução deste trabalho, especialmente nos momentos de sufoco), Daniela, Mayck e Mariana (obrigado pelo apoio incondicional e presenças constantes), Luzeni e Rosa (obrigado pela atenção especial comigo nas primeiras lições que vocês me proporcionaram sobre a rotina do laboratório), Deuzair, Vanessa, Herlice e Rayssa (obrigado também pelos ensinamentos na fase inicial). Na vida ninguém faz nada sozinho, por isso SOMOS GRANDES! A todos o meu muito obrigado e eterna gratidão pelo ombro amigo, carinho, cumplicidade, respeito, união, aprendizado e principalmente por terem tornado os dias de trabalho menos solitários e mais divertidos, sem vocês eu não teria conseguido! Obrigado pela amizade, disponibilidade, dedicação e companheirismo que fazem de vocês essa “EQUIPE NOTA 1000”, estarei sempre torcendo pelo sucesso de vocês! Sentirei saudades de tudo que vivenciamos dentro e fora do laboratório!

À minha estimada orientadora, Prof^ª Dr^ª Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira. Obrigado pelo profissionalismo e dedicação em ensinar Microbiologia com tanto amor, pela confiança em me orientar durante esses mais de 4 anos (iniciação científica, TCC e mestrado), por todas as lições (acho que só não consegui aprender ainda a "ser chato") e oportunidades concedidas, como a de ter trabalhado com você e aprendido um pouco mais sobre Virologia! Obrigado pela amizade, carinho, respeito, compartilhamento de experiências de vida, "puxões de orelha" (conforme a necessidade em alguns dos meus momentos de teimosia), por todos os conselhos visando meu amadurecimento pessoal e profissional, e especialmente pela compreensão e paciência em me ajudar a lidar com os momentos de dificuldades e desestímulos que surgiram ao longo do caminho até esta reta final. Sou muito grato por ter sido orientado pela "má, muito má Tia Anna"! Obrigado por ser essa pessoa LINDA em todos os sentidos da palavra, SEJA SEMPRE MUITO FELIZ!

Ao Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira (qualificação), à Prof^ª Dra. France Keiko Nascimento Yoshioka (qualificação e dissertação) e ao Prof Dr Giovanni Rebouças Pinto (dissertação), pela disponibilidade em aceitarem participar da avaliação deste trabalho. É de grande satisfação poder contar com as considerações de vocês, as quais serão de muita relevância para a elaboração da versão final do trabalho. Obrigado especialmente por todas as lições e boas inspirações profissionais desde o curso de Biomedicina.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), obrigado especialmente pela disponibilidade e contribuição com todas as dicas e sugestões possíveis para a padronização da PCR em Tempo Real.

A todos os colegas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GEHMED) da Universidade Federal do Piauí: técnicos, iniciações científicas, voluntários e mestrandos. Obrigado ao Hygor e à Hianny, pela colaboração primordial ao longo destes dois anos de mestrado, seja com reagentes e outros insumos cedidos, com o manuseio dos equipamentos, por todas as dicas para extrações de DNA com boa qualidade, e especialmente pela paciência e disponibilidade para a padronização da PCR em Tempo Real e execução dos meus experimentos. Obrigado também ao Francisco Carlos (Carlinhos), por se disponibilizar a esclarecer minhas dúvidas (especialmente sobre as análises estatísticas) e sugerir melhorias para a escrita da discussão deste trabalho.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC), Laboratório de Físio-Farmacologia Experimental (LAFEX) e Laboratório de Processamento Histológico (LAPHIS) da Universidade Federal do Piauí. Obrigado pela colaboração com reagentes e outros insumos cedidos.

À Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso especialmente ao corpo docente e técnico do curso de Biomedicina (em especial ao coordenador do curso, Prof. Dr. Cláudio Ângelo Ventura), e também ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas (PPGCBM). Obrigado a todos pelas vivências e conhecimentos compartilhados ao longo desses 8 anos em que a UFPI foi minha “segunda casa”, me proporcionando uma das melhores experiências que tive na vida. Agradeço ao coordenador do PPGCBM, Prof. Dr. Giovanny, pelo profissionalismo, atenção e disponibilidade em sempre atender prontamente a todas as dúvidas.

Aos colegas dos mestrados em Ciências Biomédicas e Biotecnologia (especialmente das turmas 2015-2017). Obrigado por todo apoio e conhecimentos compartilhados durante o mestrado, seja em disciplinas, trabalhos em grupo, experimentos em laboratório e também fora da sala de aula. Desejo a todos muito sucesso!

À minha querida mestre e pesquisadora, Prof^a M.Sc. Izeneide Barros de Araujo (curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, UESPI-Parnaíba). Obrigado por me apresentar à pesquisa científica e me mostrar seu real valor, pela amizade, atenção, confiança e principalmente por todos os incentivos prestados durante minha vivência acadêmica e profissional, visando sempre meu crescimento. Sou eternamente grato a você!

E por fim, a todos os demais que direta ou indiretamente estiveram envolvidos e de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa, e para minha titulação como Mestre em Ciências Biomédicas pela UFPI, deixo minha sincera e eterna gratidão.

Para todo fim, um novo começo. EU VENCI!

MUITO OBRIGADO A TODOS!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 INTRODUÇÃO SOBRE ARBOVIROSES	3
2.2 BREVES ASPECTOS HISTÓRICOS SOBRE A DENGUE	3
2.3 EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE	6
2.3.1 Contexto mundial	6
2.3.2 Contexto brasileiro	8
2.3.3 Dados sobre a dengue no Brasil e no Piauí em 2016	11
2.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS SOBRE A BIOLOGIA DO <i>Dengue virus</i>	13
2.5 VETORES, CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO DA DENGUE	16
2.6 CICLO DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL	17
2.7 IMUNOPATOGÊNESE NA INFECÇÃO PELO DENV	19
2.8 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E CLASSIFICAÇÃO DA DENGUE	24
2.9 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DA DENGUE	27
2.9.1 Métodos Diretos	30
2.9.2 Métodos Indiretos	32
2.10 FATORES QUE INFLUENCIAM NA SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO PELO DENV E NA SEVERIDADE DA DENGUE	34
2.10.1 Fatores Relacionados ao Vírus	35
2.10.2 Fatores Relacionados ao Ambiente	36
2.10.3 Fatores Relacionados ao Hospedeiro Humano	37
2.11 INFLUÊNCIAS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA PATOGÊNESE DA DENGUE E NA MODULAÇÃO DOS SINTOMAS CLÍNICOS	39
2.11.1 TNF- α	41
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS	46
4.2 TIPO DE ESTUDO E LOCAL	46
4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO, DEFINIÇÃO DE CASOS E CONTROLES, E CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	47
4.4 COLETA DE AMOSTRAS E DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES	47
4.5 RISCOS E/OU BENEFÍCIOS	48
4.6 CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS CASOS DE DENGUE	49

4.6.1 Testes Rápidos Imunocromatográficos	49
4.6.1.1 Teste <i>OL Dengue IgG/IgM</i> ® (Orange Life).....	50
4.6.1.2 Teste <i>SD Bioline Dengue Duo</i> ® (Standard Diagnostics)	51
4.6.2 Diagnóstico Molecular	52
4.6.2.1 Extração do RNA Viral e Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)	52
4.6.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	53
4.7 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DO DNA	55
4.8 GENOTIPAGEM DOS SNPs DO GENE <i>TNF-α</i>	56
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	60
5 RESULTADOS	61
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.	102
APÊNDICE II – FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS	104

RESUMO

A dengue é uma arbovirose responsável por afetar milhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais no mundo, permanecendo como importante problema de saúde pública por suas crescentes taxas de incidência e morbimortalidade. Pesquisas têm demonstrado que os mecanismos de patogênese da doença são complexos, e que a interação entre fatores inerentes ao *Dengue virus* (DENV), ao ambiente e ao hospedeiro humano é determinante na susceptibilidade individual à dengue, bem como nas variações das suas manifestações clínicas e no risco de progressão para formas graves. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *TNF- α* são exemplos de fatores genéticos do hospedeiro implicados na modulação da resposta imune no combate à infecção causada pelo DENV, bem como nas variações entre indivíduos na dinâmica da patogênese da dengue. Considerando a heterogeneidade de resultados dos estudos genômicos de associação em diferentes populações, a presente pesquisa objetivou investigar a prevalência dos SNPs -308 G/A (rs1800629) e -238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* em pacientes sintomáticos e assintomáticos infectados pelo DENV, e em indivíduos controles oriundos da população da cidade de Parnaíba-PI. Avaliou-se ainda a influência destes SNPs no delineamento das manifestações clínicas dos pacientes com dengue, e seus possíveis papéis na proteção, susceptibilidade e/ou risco de progressão para formas graves da doença. Os SNPs foram investigados por PCR em Tempo Real, com amostras de DNA de 158 pacientes do grupo de casos positivos (DEN), 123 indivíduos do grupo controle, e 83 indivíduos do grupo assintomático (ASS). As análises estatísticas incluíram o Teste de Qui-quadrado (χ^2) e o Teste Exato de Fisher para verificar o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* na distribuição das frequências genotípicas, alélicas e haplotípicas, *Odds Ratio*, e o Teste de Wilcoxon Pareado para comparar as distribuições das frequências das manifestações clínicas, sendo considerado $p < 0,05$ como nível de significância. Nas análises das frequências alélicas em ambos os SNPs, a presença do alelo A foi maior no grupo DEN quando comparado ao grupo controle, porém sem diferenças estatisticamente significativas, e quando tais frequências foram comparadas ao grupo ASS, a presença do alelo A foi maior no grupo DEN, porém sem diferenças estatisticamente significativas. Nas análises das frequências genotípicas isoladas em ambos os SNPs, a presença do genótipo G/A + A/A foi maior no grupo DEN quando comparado ao grupo controle, porém sem diferenças estatisticamente significativas, e quando tais frequências foram comparadas ao grupo ASS, a presença destes genótipos foi maior no grupo DEN, porém sem diferenças estatisticamente significativas. Todas as frequências genotípicas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. As frequências haplotípicas dos SNPs do gene *TNF- α* não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados, e apresentaram baixo desequilíbrio de ligação entre si. Na investigação da prevalência das manifestações clínicas nos indivíduos do grupo DEN, para ambos os SNPs foi observada maior ocorrência em portadores do alelo A do que em portadores não-A, porém sem diferença estatisticamente significativa. As frequências do alelo A de ambos os SNPs deste estudo não diferiram significativamente das distribuições encontradas na maioria das populações do mundo. Em resumo, não foram identificadas associações significativas entre os SNPs -308 G/A e -238 G/A do gene *TNF- α* e sua influência no delineamento das manifestações clínicas dos pacientes com dengue, bem como seus possíveis papéis na proteção, susceptibilidade e/ou risco de desenvolvimento de formas graves da doença na população norte-piauiense.

Palavras-chave: Citocina inflamatória, *Dengue virus*, Hospedeiro humano, Parnaíba, Variantes polimórficas.

ABSTRACT

Dengue is an arboviral disease which affects millions of people in tropical and subtropical regions around the world, and it has been an important public health problem due to its increasing incidence of morbidity and mortality rates. Research has demonstrated that the pathogenesis mechanisms of this disease are complex, and interaction between inherent factors in the *Dengue virus* (DENV), the environment and the human host is determinant in individual susceptibility to Dengue, as well as, in the variations of its clinical manifestations and in the risk of progression to severe forms. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *TNF- α* gene are examples of host genetic factors involved in the modulation of the immune response against infection caused by DENV, as well as, in the variations among patients in terms of dengue pathogenesis. Considering the heterogeneity of results from genomic association studies in different populations, the present study aimed to investigate the prevalence of SNPs -308 G/A (rs1800629) and -238 G/A (rs361525) from *TNF- α* gene in symptomatic and asymptomatic patients infected by DENV and in control individuals from Parnaíba, Piauí State. The influence of these SNPs on clinical manifestations of dengue patients and their possible roles in the protection, susceptibility and/or risk of progression to severe forms of the disease were also evaluated. SNPs were investigated by Real-Time PCR, with DNA samples from 158 patients from the positive cases group (DEN), 123 from the control group, and 83 from the asymptomatic group (ASS). Statistical analyzes were carried out by using Chi-square Test (χ^2) and Fisher's Exact Test to verify the *Hardy-Weinberg* equilibrium in the distribution of genotypic, allelic and haplotype frequencies; moreover, *Odds Ratio* and Pareto Wilcoxon Test were used to compare the distributions of frequencies of the clinical manifestations, considering $p < 0.05$ as level of significance. In the allelic frequency analyses, the presence of the A allele was higher in the DEN group compared to the control group for both SNPs, but statistic differences were not significant; furthermore, the presence of the A allele was higher in the DEN group when such frequencies were compared to the ASS group, but there were no statistically significant differences. In the analyzes of the genotype frequencies isolated from both SNPs, the presence of the G/A + A/A genotype was higher in the DEN group compared to the control group, but statistic differences were not significant, and when these frequencies were compared to the ASS group, the presence of these genotypes was higher in the DEN group, but there were no statistically significant differences. All genotypic frequencies were in *Hardy-Weinberg* equilibrium. The haplotype frequencies of the SNPs of the *TNF- α* gene did not show statistically significant differences between the studied groups, and showed low linkage disequilibrium with each other. In the investigation of the prevalence of clinical manifestations in the individuals of the DEN group, occurrence of A allele carriers was higher than non-A allele carriers for both SNPs, but there were no statistically significant difference. In this study, A allele frequencies for both SNPs did not differ significantly from the distributions found in most of the world's populations. In summary, no significant associations were identified between the SNPs -308 G/A and -238 G/A of *TNF- α* gene and their influence on the clinical manifestations of dengue patients, as well as, their possible roles in the protection, susceptibility and/or risk of developing severe forms of the disease in the North Piauí population.

Keywords: Inflammatory cytokine, *Dengue virus*, Human host, Parnaíba, Polymorphic variants.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE – Do inglês *Antibody-dependent Enhancement*, traduz-se Potencialização Mediada por Anticorpo

AFM – Do inglês *Atomic Force Microscopy*, traduz-se Microscopia de Força Atômica

ALT – Alanina aminotransferase

ASS – Grupo de pacientes com infecção assintomática

AST – Aspartato aminotransferase

BIOMIC – Laboratório de Bioquímica e Biologia de Microrganismos e Plantas

cDNA – DNA complementar

CD4 – Do inglês *Cluster of Differentiation*, traduz-se Grupamento de Diferenciação 4

CD8 – Do inglês *Cluster of Differentiation*, traduz-se Grupamento de Diferenciação 8

CF – Do inglês *Complement Fixation*, traduz-se Fixação do Complemento

CHIKV – *Chikungunya virus*

DC – Do inglês *Dendritic Cells*, traduz-se Célula Dendrítica

DC-SIGN – Do inglês *Dendritic-Cell-Specific ICAM3-Grabbing No-integrin*, traduz-se molécula de adesão intracelular 3 específica de células dendríticas

DCSA – Dengue com sinais de alarme

DEN – Grupo de pacientes positivos para dengue

DENV – *Dengue virus*

DNA – Do inglês *Deoxyribonucleic Acid*, traduz-se Ácido Desoxirribonucleico

DS – Dengue severa

DSSA – Dengue sem sinais de alarme

EDTA – Do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*, traduz-se ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, traduz-se Ensaio de Imunoabsorvência Ligado à Enzima

ER – Do inglês *Endoplasmic Reticulum*, traduz-se Retículo Endoplasmático

FD – Febre da dengue

GWAS – Do inglês *Genome-wide Association Study*, traduz-se Estudos Genômicos de Associação

FHD – Febre hemorrágica da dengue

HEDA – Hospital Estadual Dirceu Arcoverde

HI – Do inglês *Haemagglutination Inhibition*, traduz-se Inibição da Hemaglutinação

HLA – Do inglês *Human Leukocyte Antigen*, traduz-se Antígeno Leucocitário Humano

IFN- α – Interferon-alfa

IFN- γ – Interferon-gama

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL – Interleucina

JEV – Do inglês *Japanese Encephalitis virus*, traduz-se Vírus da Encefalite Japonesa

LC – Do inglês *Langerhans Cells*, traduz-se Célula de Langerhans

MAC-ELISA – Do inglês *M Antibody Capture ELISA*, traduz-se ELISA de captura de IgM

MAYV – *Mayaro virus*

MHC – Do inglês *Major Histocompatibility Complex*, traduz-se Complexo Principal de Histocompatibilidade

MMLV-RT – Do inglês *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, traduz-se Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murina de Moloney

NS1 – Do inglês, *Nonstructural Protein 1*, traduz-se proteína/antígeno NS1

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

OR – *Odds ratio*

ORF – Do inglês *Open Reading Frame*, traduz-se matriz de leitura aberta

OROV – *Oropouche virus*

PAF – Do inglês *Platelet-activating Factor*, traduz-se Fator de Ativação Plaquetário

PAIgG – Do inglês *Platelet-associated IgG*, traduz-se IgG Associado a Plaquetas

PAIgM – Do inglês *Platelet-associated IgM*, traduz-se IgM Associado a Plaquetas

PAMP – Do inglês *Pathogen-associated Molecular Pattern*, traduz-se Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBMC – Do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, traduz-se Células Mononucleares do Sangue Periférico

PCR – Do inglês *Polymerase Chain Reaction*, traduz-se Reação em Cadeia da Polimerase

PCR – Proteína C reativa

PRNT – Do inglês *Plaque Reduction Neutralization Technique*, traduz-se Técnica de Neutralização por Redução em Placa

PRR – Do inglês *Pattern Recognition Receptors*, traduz-se Receptores de Reconhecimento Padrão

PSM – Pronto Socorro Municipal

RNA – Do inglês *Ribonucleic Acid*, traduz-se Ácido Ribonucleico

RT-PCR – Do inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, traduz-se Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa

SAME – Serviço de Arquivo Médico e Estatístico

SCD – Síndrome de Choque da Dengue

SE – Semana Epidemiológica

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SLEV – Do inglês *Saint Louis encephalitis virus*, traduz-se Vírus da Encefalite de Saint Louis

SNP – Do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*, traduz-se Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SUS – Sistema Único de Saúde

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGN – Do inglês *Trans-Golgi Network*, traduz-se Rede Trans-Golgi

TNF- α – Do inglês *Tumoral Necrosis Factor-Alpha*, traduz-se Fator de Necrose Tumoral Alfa

TP – Tempo de protrombina

TTP – Tempo de tromboplastina parcial

UTR – Do inglês *Untranslated Region*, traduz-se Região Não Codificante

VHS – Velocidade de hemossedimentação

WNV – Do inglês *West Nile virus*, traduz-se Vírus do Oeste do Nilo

YFV – Do inglês *Yellow Fever virus*, traduz-se Vírus da Febre Amarela

ZIKV – *Zika virus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estimativa de distribuição mundial de países ou áreas de risco para a Dengue, no ano de 2014	7
Figura 2 – Linha do tempo de introdução dos sorotipos de Dengue no Brasil	9
Figura 3 – Número de casos de dengue registrados pelo Ministério da Saúde no ano de 2015 no Brasil, distribuídos por região	10
Figura 4 – Estrutura da partícula viral do DENV	13
Figura 5 – Genoma do DENV e organização da poliproteína	14
Figura 6 – Ciclo de transmissão do DENV	17
Figura 7 – Ciclo de multiplicação do DENV	18
Figura 8 – Imunopatogênese causada pelo DENV, com ênfase nos mecanismos de progressão para a dengue severa	20
Figura 9 – Resumo sobre o espectro de manifestações clínicas da dengue	24
Figura 10 – Principais marcadores da infecção pelo DENV	29
Figura 11 – Métodos laboratoriais diretos e indiretos para o diagnóstico laboratorial da dengue	30
Figura 12 – Interação entre os fatores que influenciam na susceptibilidade e severidade da dengue	35
Figura 13 – Fenômeno de potencialização mediada por anticorpos (ADE) na infecção pelo DENV	38
Figura 14 – Moléculas da resposta imune do hospedeiro em que <i>locus</i> de polimorfismos têm sido associados com a patogênese causada pelo DENV	40
Figura 15 – Representação esquemática dos genes <i>TNF</i> , <i>LTA</i> e <i>LTB</i>	42
Figura 16 – Componentes do teste imunocromatográfico de fluxo lateral	49
Figura 17 – Dispositivo <i>OL Dengue IgG/IgM</i> ®, para identificação de anticorpos anti-DENV	51
Figura 18 – Dispositivo <i>SD Bioline Dengue Duo</i> ®, para identificação de anticorpos anti-DENV	52
Figura 19 – Esquema do ensaio de genotipagem <i>TaqMan</i> ®	58
Figura 20 – Exemplo de <i>plot</i> de discriminação alélica do SNP -308 G/A (rs1800629) para o gene <i>TNF-α</i> gerado por PCR em Tempo Real	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos genômicos de associação de polimorfismos no gene <i>TNF-α</i> relacionados à patogênese da dengue	43
Tabela 2 – Iniciadores para amplificação da região do gene <i>C/prM</i> descritos por Lanciotti e colaboradores (1992), suas respectivas sequências e produtos	53
Tabela 3 – Iniciadores para amplificação da região do gene <i>E</i> descritos por Figueiredo e colaboradores (2014) e Rocha e colaboradores (2013), suas respectivas sequências e produtos	54
Tabela 4 – Iniciadores para amplificação da região do gene <i>NS5</i> descritos por Chao, Davis & Chang (2007), suas respectivas sequências e produtos	54
Tabela 5 – Iniciadores para amplificação da região do gene <i>NS5</i> descritos por Bronzoni e colaboradores (2005), suas respectivas sequências e produtos	55
Tabela 6 – Gene, dbSNP e suas respectivas sondas (VIC/FAM) para PCR em Tempo Real (<i>TaqMan® SNP Genotyping Assays</i>)	57
Tabela 7 – Componentes utilizados nas reações de PCR em Tempo Real para genotipagem dos SNPs do gene <i>TNF-α</i> , de acordo com o protocolo utilizado	57
Tabela 8 – Distribuições e comparações das frequências genotípicas do SNP -308 G/A (rs1800629) do gene <i>TNF-α</i> nos grupos de casos (DENV, DSSA e DCSA) e controle	62
Tabela 9 – Distribuições e comparações das frequências genotípicas do SNP -308 G/A (rs1800629) do gene <i>TNF-α</i> nos grupos de casos (DENV, DSSA e DCSA), controle e assintomático	63
Tabela 10 – Distribuições e comparações das frequências genotípicas do SNP -238 G/A (rs361525) do gene <i>TNF-α</i> entre os grupos de casos (DENV, DSSA e DCA) e controle	63
Tabela 11 – Distribuições e comparações das frequências genotípicas do SNP -238 G/A (rs361525) do gene <i>TNF-α</i> entre os grupos de casos (DENV, DSSA e DCA), controle e assintomático (ASS)	64
Tabela 12 – Distribuições e comparações das frequências alélicas do SNP -308 G/A (rs1800629) do gene <i>TNF-α</i> nos grupos de casos (DENV, DSSA, DCSA) e controle	65
Tabela 13 – Distribuições e comparações das frequências alélicas do SNP -308 G/A (rs1800629) do gene <i>TNF-α</i> nos grupos de casos (DENV, DSSA, DCSA), controle e assintomático (ASS)	65
Tabela 14 – Distribuições e comparações das frequências alélicas do SNP -238 G/A (rs361525) do gene <i>TNF-α</i> nos grupos de casos (DENV, DSSA e DCSA) e controle	66
Tabela 15 – Distribuições e comparações das frequências alélicas do SNP -238 G/A (rs361525) do gene <i>TNF-α</i> nos grupos de casos (DENV, DSSA e DCSA), controle e assintomático (ASS)	67
Tabela 16 – Distribuição das frequências haplotípicas dos SNPs -308 G/A (rs1800629) e -238 G/A (rs361525) do gene <i>TNF-α</i> , comparadas entre os grupos controle, DEN, DSSA e DCSA	68

Tabela 17 – Distribuição das frequências haplotípicas dos SNPs -308 G/A (rs1800629) e -238 G/A (rs361525) do gene <i>TNF-α</i> , comparadas entre os grupos assintomático, DEN, DSSA, DCSA e controle	68
Tabela 18 – SNP -308 G/A (rs1800629) do gene <i>TNF-α</i> e as 20 manifestações clínicas da dengue mais presentes em pacientes do grupo DENV	69
Tabela 19 – SNP -238 G/A (rs361525) do gene <i>TNF-α</i> e as 20 manifestações clínicas da dengue mais presentes em pacientes do grupo DENV	70
Tabela 20 – Comparação das frequências alélicas do SNP -308 G/A (rs1800629) do gene <i>TNF-α</i>	71
Tabela 21 – Comparação das frequências alélicas do SNP -238 G/A (rs361525) do gene <i>TNF-α</i>	72

1 INTRODUÇÃO

O *Dengue virus* (DENV), membro da família *Flaviviridae* e do gênero *Flavivirus*, é um vírus de simetria icosaédrica, envelopado, de fita simples de RNA, senso positivo, classificado em 4 sorotipos antígenicamente distintos capazes de causar doença pela transmissão por fêmeas de mosquito do gênero *Aedes*. Nas últimas 3 décadas a dengue emergiu como importante arbovirose e se tornou um grave problema de saúde pública, por suas taxas de incidência e morbimortalidade em diversas populações residentes em áreas tropicais e subtropicais do mundo (CHATUVERDI, NAGAR, SHRIVASTAVA, 2006; FANG et al., 2012). Estima-se que cerca de 400 milhões de infecções ocorrem anualmente no mundo, 3,6 bilhões de pessoas vivem em regiões endêmicas, e 2/5 da população mundial correm risco de infecção (HARAPAN et al., 2013b).

O espectro de manifestações clínicas em indivíduos infectados pelo DENV pode variar desde uma infecção assintomática, autolimitada e não letal, até a dengue sem sinais de alarme (DSSA), que pode evoluir para formas graves com risco de vida, como a dengue com sinais de alarme (DCSA) e a dengue severa (DS). Estudos recentes têm descoberto que a imunidade do hospedeiro humano desempenha papel relevante na modulação da resposta à infecção pelo DENV, e a heterogeneidade de mecanismos envolvidos neste processo é um determinante crítico na susceptibilidade individual para ocorrência de infecções, bem como também nas variações das manifestações clínicas e na progressão da dengue (HARAPAN et al., 2013b; FANG et al., 2012; HERRERO et al., 2013).

A evolução da doença é determinada pelas interações entre diversos fatores relacionados ao vírus (sorotipos e infecções sequenciais por diferentes deles), genótipos e linhagens, eventos relacionados à virulência e à carga viral), ao ambiente (distribuição do vetor, variações climáticas, capacidade vetorial), e também ao hospedeiro humano (patogênese mediada pela resposta imune inata e adaptativa, fatores genéticos) (COFFEY et al., 2009; HERRERO et al., 2013; LAN; HIRAYAMA, 2011). Contudo, sabe-se que os mecanismos de patogênese da dengue são complexos e ainda não são totalmente esclarecidos, e que a interação entre tais fatores descritos têm parcela relevante na modulação dos sintomas. Dessa maneira, novas pesquisas são necessárias a fim de avaliar e validar as possíveis influências de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) em genes do hospedeiro relacionados ao processo de resposta imune no combate à infecção pelo DENV.

Os SNPs -308 G/A (rs1800629) e -238 G/A (rs361525) do gene que codifica a citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são alguns exemplos de fatores do hospedeiro abordados em estudos genômicos de associação entre casos e controles descritos na literatura. Tais polimorfismos e muitos outros identificados em diferentes populações estão implicados com a modulação da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro humano, bem como também nas variações interindividuais na dinâmica da patogênese de diversas doenças infecciosas, incluindo a dengue.

Por meio de associações estatisticamente significativas, alguns destes estudos relatam que em algumas populações os polimorfismos podem representar um risco maior de predisposição e/ou severidade de formas clínicas da dengue; no entanto, outras investigações demonstram que em outras populações tais variantes podem acarretar em proteção contra a doença. Contudo, vale ressaltar que em alguns estudos descritos na literatura não foi possível se estabelecer qualquer tipo de associação estatisticamente significativa entre a presença dos polimorfismos e sua influência na susceptibilidade, na proteção ou no risco de evolução para formas clínicas mais graves da dengue.

Apesar dos importantes avanços alcançados na prevenção e controle das doenças infecciosas, a dengue ainda representa um grave problema de saúde pública no Brasil, em estados da região Nordeste, e em alguns municípios do Piauí. Associado aos fatores do hospedeiro, o contexto de gravidade da doença é muitas vezes decorrente de outros fatores associados, como as precárias condições socioeconômicas da população, a deficiência nas medidas pessoais de higiene, medidas de saneamento ambiental, e medidas de prevenção e controle desta doença, e principalmente a dificuldade de acesso a serviços públicos de saúde de qualidade, muitas vezes fazendo com que o paciente não busque por atendimento médico, diagnóstico clínico-laboratorial e tratamento adequado para a dengue.

Diante do cenário atual da dengue no mundo, no Brasil, na região Nordeste, e no estado do Piauí, o presente estudo visou compreender melhor a relação existente entre os efeitos que os polimorfismos -308 G/A (rs1800629) e -238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* podem causar na patogênese e modulação das manifestações clínicas desta doença. Os resultados desta pesquisa poderão auxiliar no entendimento dos mecanismos da patogênese ainda desconhecidos e na relação do hospedeiro com a doença, cooperando futuramente para que as políticas públicas de saúde sejam direcionadas para um melhor manejo clínico dos casos de dengue, com a adoção de medidas mais efetivas de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle, considerando os impactos causados pela doença na população.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Introdução sobre Arboviroses

As arboviroses são um grande grupo de viroses zoonóticas, que têm parte de seus complexos ciclos de multiplicação desenvolvidos em artrópodes hematófagos e são veiculadas por tais insetos (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; MORELI; COSTA, 2013). Tais doenças são clinicamente importantes e representam grande desafio à saúde pública devido às mudanças climáticas e ambientais que favorecem sua dispersão, muitas vezes causando surtos epidêmicos nas populações humanas que acarretam em graves impactos sociais e econômicos (BRONZONI et al., 2005; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Até 2015, pelo menos 9 diferentes arbovírus patogênicos ao homem têm circulado ao longo do território brasileiro (FIGUEIREDO, 2015).

A maioria das arboviroses humanas de ocorrência no Brasil é composta por vírus de RNA (do inglês *Ribonucleic Acid*), com genoma segmentado ou não, pertencentes a 5 famílias: *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Bunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus*), *Rhabdoviridae* e *Reoviridae* (FIGUEIREDO, 2007; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; MORELI; COSTA, 2013). Alguns dos principais arbovírus de caráter re-emergente e emergente no Brasil são: vírus da Febre Amarela (YFV), *Dengue virus* (DENV), *Zika virus* (ZIKV), vírus do Oeste do Nilo (WNV), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), vírus da Encefalite Japonesa (JEV), *Mayaro virus* (MAYV), *Chikungunya virus* (CHIKV) e *Oropouche virus* (OROV) (CASSEB et al., 2013; FIGUEIREDO, 2015; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; MORELI; COSTA, 2013).

2.2 Breves Aspectos Históricos Sobre a Dengue

Conforme relatos históricos e filológicos, “dengue” é uma palavra de origem espanhola e que possui diferentes acepções nesta língua, sendo sua associação como nome de doença datada do século XIX (considerando o comportamento de “dengo ou manha” apresentado pelos indivíduos acometidos), passando posteriormente para a língua portuguesa e universalizando-se ao passar para as línguas inglesa e francesa (REZENDE, 1997; XAVIER et al., 2014). Contudo, uma série de outros relatos julgam diferentes

origens da palavra dengue, a qual poderia ser ameríndia (presente no Peru), africana (sendo levada para o Caribe por escravos), de Ilhas do Oceano Índico que nos dias atuais integram a Tanzânia, ou mesmo árabe (REZENDE, 1997; SANTOS, 2007; XAVIER et al., 2014).

Enquanto doença, a dengue já era conhecida de longas datas por apresentar caráter epidêmico, recebendo variados nomes populares de acordo com a região de ocorrência: “febre da China” na Ásia, “bounhou” na Oceania, “febre quebra-ossos” nos Estados Unidos, “colorado” nas colônias espanholas, “*dandy fever*” nas colônias inglesas, “dengue” nas Antilhas, “polca” no Rio de Janeiro, “patuleia” na Bahia, dentre outras denominações (REZENDE, 1997; SANTOS, 2003). O termo “dengue” como doença tornou-se consagrado e foi incorporado à nomenclatura internacional de doenças da Organização Mundial de Saúde (OMS) e ao vocabulário médico na língua portuguesa, porém os conhecimentos sobre a doença só evoluíram ao longo do século XX (REZENDE, 1997).

Apesar das primeiras grandes epidemias de doença febril (possivelmente compatíveis com a dengue) terem ocorrido nos continentes asiático, africano e americano no século XVIII (entre 1779 e 1780), relatos datam que tal manifestação ocorreu mais previamente entre 610 d.C e 992 d.C, segundo registros de enciclopédias de dinastias chinesas (GUBLER, 1998; GUBLER, 2006; GUZMAN; ISTÚRIS, 2010; MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013). Alguns surtos de doenças nas Índias Ocidentais em 1635, e no Panamá em 1699, podem também ter sido dengue (GUBLER, 2006). Contudo, o padrão de doença febril conhecido como febre da dengue (FD) ocorrido entre 1780 e 1940 foi caracterizado por epidemias relativamente pouco frequentes, porém muitas vezes de grandes proporções (GUBLER, 1998).

Sobre a origem geográfica do *Dengue virus* (DENV), estudos indicam que o vírus seja oriundo da África e daí se difundiu para as Américas e o restante do mundo, através do tráfico de escravos pelo comércio marítimo do sul do Atlântico; contudo, outros relatos apontam que o vírus seja oriundo da Ásia, mais precisamente de onde se localiza a Malásia atualmente (CATÃO, 2012). Provavelmente o DENV se tornou endêmico em muitos centros urbanos tropicais, porque durante os períodos interepidêmicos e sem transmissão da doença aparente, visitantes não imunes contraíram uma doença febril semelhante à dengue com poucos meses após sua chegada aos novos territórios (GUBLER, 1998).

Porém, há relatos que independentemente do local de origem, o ancestral do vírus tenha surgido há cerca de 1000 anos atrás evoluindo a partir de um ciclo infeccioso envolvendo primatas não humanos e mosquitos, por adaptação biológica deste artrópode ao

DENV, consistindo na sua manutenção no ambiente por transmissão transovariana em ciclos enzoóticos florestais em alguns mosquitos do gênero *Aedes* (CATÃO, 2012). Na escala temporal de evolução do vírus, sua transmissão para os seres humanos provavelmente ocorreu de forma independente para todos os quatro sorotipos há pelo menos algumas centenas de anos atrás, tornando-os atualmente o seu principal hospedeiro vertebrado (CATÃO, 2012; MESSINA et al., 2014).

Em algum momento no passado, a partir do desmatamento e o desenvolvimento de assentamentos humanos, o DENV migrou das selvas para ambientes rurais, onde eles foram (e ainda são) transmitidos aos seres humanos por mosquitos peridomésticos como o *Aedes albopictus* (GUBLER, 2006). Nos últimos anos, a dispersão geográfica destes mosquitos como vetores secundários dramaticamente tem se expandido (SIMMONS et al., 2012). Já o comércio de escravos entre a África Ocidental e as Américas foi responsável pela introdução e ampla distribuição geográfica de mosquitos *Aedes aegypti* em latitudes tropicais e subtropicais do Novo Mundo (Ásia e Américas), durante os séculos XVII, XVIII e XIX, o qual se tornou altamente adaptado tanto aos ambientes urbanos quanto aos próprios hospedeiros humanos (GUBLER, 2006; SIMMONS et al., 2012).

Antes da Segunda Guerra Mundial o DENV apresentava uma distribuição global mais limitada às regiões tropicais, as populações urbanas eram relativamente pequenas, e tanto o vírus quanto os mosquitos vetores dependiam principalmente do transporte naval entre as regiões, fazendo com que as epidemias ocorressem mais esporadicamente com longos intervalos entre si (GUBLER, 2011). Porém, após a Segunda Guerra Mundial, a ocorrência de significativas mudanças ecológicas e demográficas facilitaram a transmissão e dispersão do vírus na região Ásia-Pacífico, incluindo a mobilidade de civis e soldados e o aumento do número de indivíduos susceptíveis em áreas endêmicas (GUBLER, 2002; GUBLER; ISTÚRIZ, 2010). O processo de globalização do comércio (especialmente o de pneus de veículos usados) é pensado como justificativa para a dispersão de ovos e formas imaturas desses vetores de arbovírus por novas áreas geográficas (SIMMONS et al., 2012).

Além disso, outros fatores como o uso do avião a jato, o transporte de mercadorias, a expansão econômica, o aumento na produção de resíduos não orgânicos, o rápido crescimento demográfico, o processo contínuo de urbanização, a inadequada infraestrutura urbana e a falta de medidas de controle efetivo dos mosquitos facilitaram o deslocamento e a reprodução dos vetores adultos, e a conseqüente propagação do vírus para novas regiões geográficas (GUBLER, 2011; GUBLER; ISTÚRIZ, 2010; GUZMAN;

KOURI, 2004; GUZMAN et al., 2016; MENDONÇA; VEIGA E SOUZA; DUTRA, 2009; SIMMONS et al., 2012). Logo, a dispersão geográfica de vetores e do vírus nos últimos 40 anos acarretou na ressurgência global da FD epidêmica e na emergência das formas graves da doença como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome do choque da dengue (SCD), com desenvolvimento da hiperendemicidade em centros urbanos dos trópicos e subtropicais, especialmente na Ásia e nas Américas (CAFFERATA et al., 2013; GUZMAN; HARRIS, 2015; MENDONÇA; VEIGA E SOUZA; DUTRA, 2009).

2.3 Epidemiologia da Dengue

O conhecimento sobre a distribuição geográfica dos casos de dengue é fundamental para o melhor entendimento sobre seus índices de morbimortalidade e os encargos globais decorrentes, já que tais informações são relevantes para determinar uma melhor distribuição de recursos financeiros para o controle da doença (BHATT et al., 2013). As estimativas de distribuição das infecções (sintomáticas e assintomáticas) e o registro da propagação de sorotipos específicos têm implicações relevantes na compreensão dos padrões de hiperendemicidade e gravidade da dengue, na avaliação da vigilância clínica da doença e na definição de estratégias futuras para a produção de vacinas e seu uso seguro pelas populações (BHATT et al., 2013; MESSINA et al., 2014).

2.3.1 Contexto Mundial

A pandemia de dengue provavelmente se iniciou na Ásia e no Pacífico, onde a primeira epidemia da doença foi relatada (GUBLER; CLARK, 1995). Segundo a OMS, a dengue é uma doença endêmica em mais de 110 países do Sudeste Asiático, das Américas, do Pacífico Ocidental, da África e em regiões do Oriente Médio e da Europa (Figura 1), onde se estima que 3,6 bilhões de pessoas vivam em regiões endêmicas e que recebem cerca de 120 milhões de viajantes por ano, 400 milhões de infecções ocorram anualmente, e que sua incidência tenha aumentando 30 vezes nos últimos 50 anos (BHATT et al., 2013; CAFFERATA et al., 2013; GUBLER, 2011; GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN; ISTÚRIS, 2010; GUZMAN et al., 2016; SIM; HIBBERD, 2016; WILDER-SMITH et al., 2010; WHO, 2009). Também foi verificado que os números de casos de FD e de FHD aumentaram anualmente, se estimando que tenham ocorrido 550 mil internações e 25 mil óbitos anuais (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; VIANA; IGNOTTI, 2013).

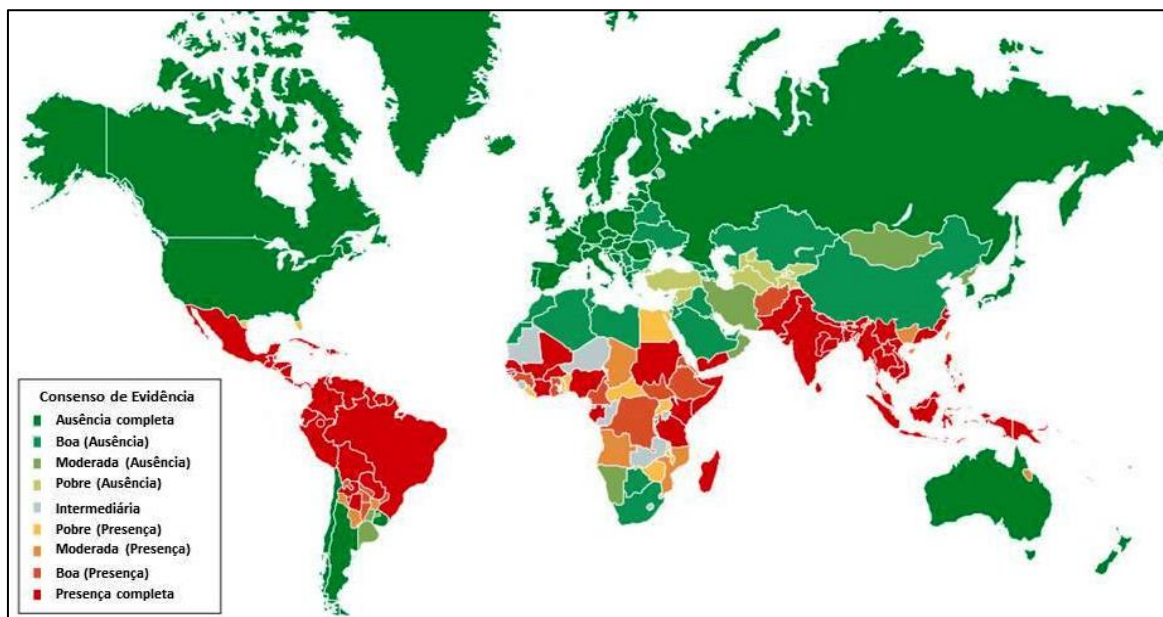


Figura 1 – Adequação de diferentes regiões para a transmissão do DENV. Consenso de evidência global, risco e impactos decorrentes da dengue são mostrados, variando desde ausência completa (verde escuro) até presença completa (vermelho escuro). (Fonte: GUZMAN et al., 2016 – Adaptado).

Os casos de dengue têm acarretado em ônus econômico, tanto individualmente quanto para os governos, onde nas Américas a doença tem custo médio de cerca de 2,1 bilhões de dólares por ano (com programas de controle de vetores), e na Ásia tem custo médio de 950 milhões de dólares por ano (GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2016; SHEPARD et al., 2011; SHEPARD; UNDURRAGA; HALASA, 2013; WILDER-SMITH et al., 2010). Porém, o verdadeiro retrato sobre o impacto da doença ainda não é totalmente conhecido, principalmente nos países em desenvolvimento como Índia, Indonésia, Brasil, China, e países do continente Africano, em que os casos de dengue muitas vezes são subnotificados, tanto em decorrência de mudanças na epidemiologia da doença, quanto por conta de falhas dos sistemas nacionais de vigilância (GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2016).

A partir de relatos dos casos na literatura disponíveis em bases de dados sobre a propagação mundial dos sorotipos do DENV no período de 1943 a 2013, foram documentadas em publicações 1.956 ocorrências de DENV-1, 1.931 ocorrências de DENV-2, 1.631 ocorrências de DENV-3, e 1.000 ocorrências de DENV-4, além de 1.811 ocorrências de DENV sem determinação do sorotipo, devido à falta de diagnóstico específico e/ou de registros dos casos (MESSINA et al., 2014). Embora não haja associação definitiva entre os sorotipos e o curso clínico da doença, sugere-se que DENV-2 e DENV-3 causam doença grave com mais frequência do que os outros sorotipos, e que

DENV-4 causa doença mais branda (BALMASEDA et al., 2006; FARES et al., 2015; SIERRA ; KOURI; GUZMAN, 2007). O sorotipo DENV-2 foi mais prevalente em vários surtos nas Américas, sendo epidemiologicamente classificado como o mais importante devido sua associação com a maioria dos casos de dengue, seguido pelos sorotipos DENV-3, DENV-1 e DENV-4 (COSTA; VOLOCH; SCHRAGO, 2012; FARES et al., 2015).

2.3.2 Contexto Brasileiro

No Brasil, o mosquito vetor *A. aegypti* e provavelmente o DENV chegaram ainda durante o período colonial, provavelmente trazidos da África através do tráfico de escravos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Os primeiros relatos de surtos e epidemias de dengue no país datam de 1845, nas cidades de Rio de Janeiro e São Paulo, sendo que outros importantes surtos da doença também foram registrados entre os anos de 1851-1853, e 1916-1923 (FARES et al., 2015). No entanto, as primeiras citações na literatura científica só datam de fato dos anos de 1916, na cidade de São Paulo, e de 1923, na cidade de Niterói, estado do Rio de Janeiro (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

No ano de 1920, o programa de controle da propagação da febre amarela proposto pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) ganhou apoio de várias entidades brasileiras e na América do Sul, resultando na bem sucedida eliminação do mosquito *A. aegypti* em vários países do continente, incluindo o Brasil no ano de 1955, onde não houve mais registros de casos da doença até o ano de 1976 (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; SIQUEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al.; 2013b). Contudo, alguns indícios sugerem que a reinfestação pelos mosquitos *A. aegypti* no país tenha provavelmente ocorrido no ano de 1967, cidade de Belém, estado do Pará, assim como também no ano de 1977, no estado do Rio de Janeiro, uma vez que em alguns países vizinhos como Venezuela, as Guianas e outros do continente sul-americano, além de Cuba, Estados Unidos e outros países centro-americanos não obtiveram sucesso em sua erradicação, trazendo-o de volta ao cenário da saúde pública nacional (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

No ano de 1981 foi registrada a primeira evidência de epidemia de dengue no país, no Estado de Roraima, decorrente da reinfestação de áreas urbanas pelo *A. aegypti* (CÂMARA et al., 2007; OSANAI et al., 1983; SIQUEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al.; 2013b). A introdução sequencial dos diferentes sorotipos do DENV no território nacional ao longo do tempo (Figura 2) foi um fator determinante que contribuiu para o aumento da incidência da dengue no país, acarretando em seu caráter hiperendêmico em várias regiões

(CÂMARA et al., 2007; FARES et al., 2015). Recentemente foi demonstrado que o Brasil apresentou a 5ª maior incidência de FD entre os países da América Latina e do Caribe durante os anos de 1995 e 2009, e em 2015, teve a maior incidência (507,09 casos/100 mil habitantes) entre os países do cone Sul (composto também por Argentina, Chile, Paraguai e Uruguai), contribuindo com 85% do número total de casos (CAFFERATA et al., 2013; FARES et al., 2015; PAHO, 2016).

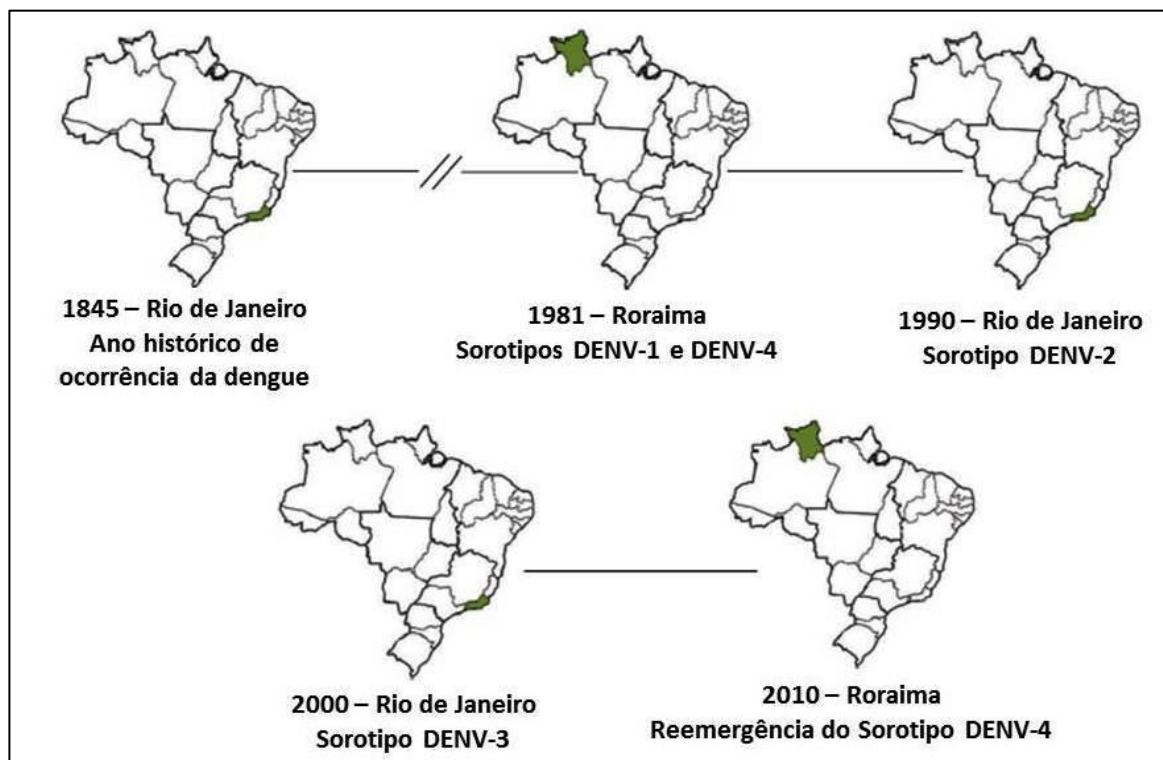


Figura 2 – Linha do tempo de introdução dos sorotipos de Dengue no Brasil. Os Estados onde os sorotipos foram inicialmente identificados estão identificados com coloração verde. (Fonte: FARES et al., 2015 – Adaptado).

De acordo com os dados presentes no Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde, obtidos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Online (SINAN Online) e atualizados em Setembro de 2016 (BRASIL, 2017), no ano de 2015 foram registrados 1.688.688 casos prováveis de dengue no Brasil. A região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (1.047.279 casos) (Figura 3), e no estado do Piauí foram registrados 7.646 casos prováveis. As regiões Centro-Oeste (1.496,6 casos/100 mil habitantes) e Sudeste (1.221,4 casos/100 mil habitantes) apresentam as maiores taxas de incidência no país em 2015. Em relação à classificação dos casos, em 2015 foram confirmados no Estado do Piauí 19 casos de dengue grave, 44 casos de dengue com sinais de alarme, e 2 óbitos por dengue.

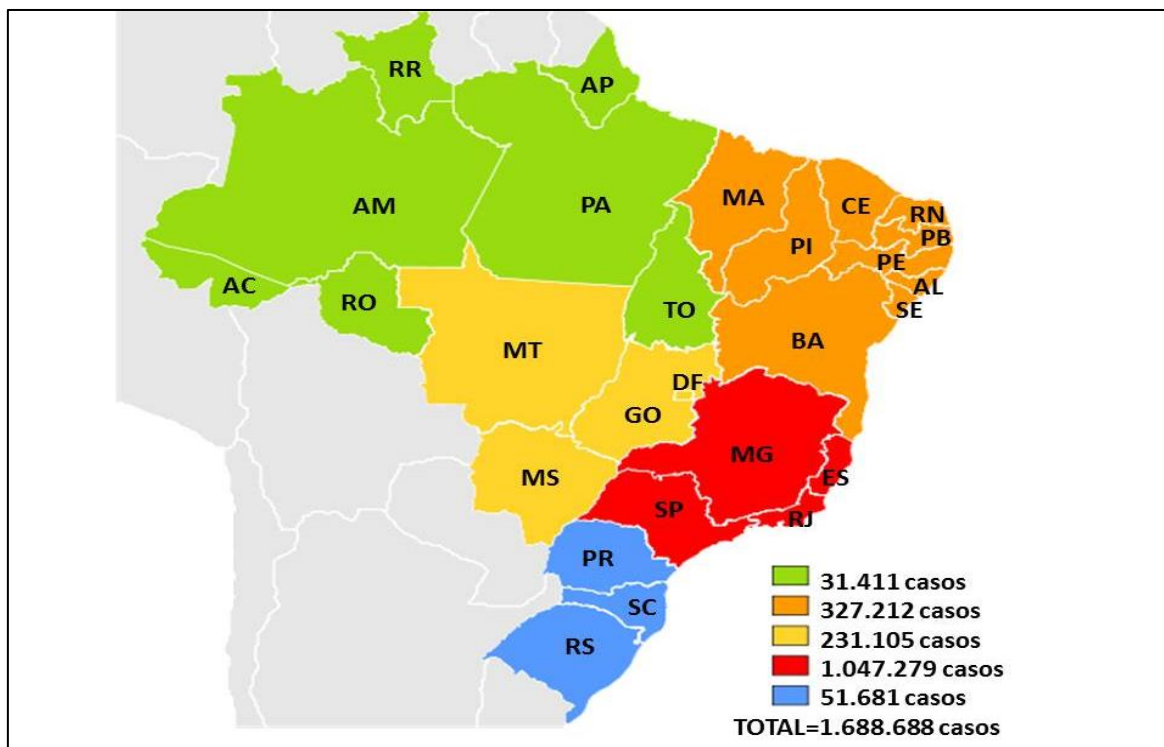


Figura 3 – Número de casos prováveis de dengue registrados pelo Ministério da Saúde no ano de 2015 no Brasil, distribuídos por região. Dados atualizados em 27 de Setembro de 2016.

No Estado do Piauí, a presença do *A. aegypti* foi confirmada em 1986, e em 1994, levantamentos epidemiológicos confirmaram a presença do mosquito em Teresina, sendo no mesmo ano notificados os primeiros casos autóctones de dengue, e em 1996 foi confirmada a primeira epidemia, possivelmente associada à sua localização geográfica, próxima a outros estados que relataram casos da doença (CASTRO et al., 2003; MONTEIRO et al., 2009). A partir de 2000 foram realizados os primeiros testes de isolamento viral, onde se confirmou a circulação do sorotipo DENV-1 (MONTEIRO et al., 2009). Sobre a análise da atividade do DENV no Piauí, investigações laboratoriais entre 2000 e 2002 revelaram a presença do sorotipo DENV-3 circulando em maio de 2002, quando se registrou um número elevado de casos de dengue decorrentes de infecção pelos sorotipos DENV-1 e DENV-2 (CASTRO et al., 2003).

A partir de análises moleculares e filogenéticas com base no gene *E*, o sorotipo DENV-2 foi isolado de pacientes com FD durante um surto ocorrido no Piauí entre 2006 e 2007 (FIGUEIREDO et al., 2014). Os resultados deste estudo indicaram alta similaridade entre o vírus isolado com outros DENV-2 do Brasil, da América Central e do Sul, o qual foi agrupado em 2 linhagens distintas de genótipos americano-asiático. Além disso, também foi revelado que estas 2 linhagens de DENV-2 foram detectadas no Piauí antes de

serem disseminadas para outros estados brasileiros e países da América do Sul, sugerindo a existência de uma nova rota de disseminação do DENV ainda não relatada anteriormente.

Com base em levantamento epidemiológico de casos suspeitos de dengue notificados entre 2006 e 2011 no Piauí, disponíveis no SINAN, Santos (2013) observou que até 2010 houve a co-circulação dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 com diferentes padrões de predominância e de coinfeções na população, sendo o sorotipo DENV-4 isolado pela primeira vez em 2011. Analisando experimentalmente amostras de casos suspeitos de dengue obtidas no período de 2011 a 2015, Santos (2013), Vale (2015) e Garcês (2016) também identificaram a co-circulação dos 4 sorotipos de DENV, refletindo seu caráter de hiperendemicidade no estado.

Após sequenciamento e alinhamento a partir da junção dos genes *C/prM* das amostras locais positivas para o sorotipo DENV-4 circulantes no ano de 2012 (VALE, 2015), verificou-se que as mesmas correspondem ao genótipo II, semelhante ao descrito em outras regiões do Brasil. Tais amostras se encontraram filogeneticamente próximas (100% de homologia) às sequências que correspondem às primeiras identificações do DENV-4 no Brasil (reintroduzido em 2010, no estado de Roraima), sugerindo a dispersão deste sorotipo para as demais regiões do país e que o DENV-4 no Piauí seja oriundo de tal região (SANTOS, 2013; VALE, 2015).

A partir de análises filogenéticas do DENV-1 (GARCÊS, 2016), confirmou-se a circulação do genótipo V no Piauí (o único descrito no Brasil até o momento e que encontra-se distribuído nas Américas, África Ocidental e Ásia), sendo identificadas 2 linhagens: linhagem 1 (correspondente a isolados da Venezuela, Colômbia e Brasil) e linhagem 6 (que inclui isolados das Ilhas Virgens e a maioria das amostras brasileiras). Vale (2015) e Garcês (2016) sugerem que tal relação com países da América Latina reforça a hipótese que os sorotipos do DENV foram introduzidos no Brasil a partir de Roraima através da rota Caribenha, uma importante via de entrada de novos vírus na América do Sul (ARAÚJO et al., 2012; DRUMOND et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2014).

2.3.3 Dados sobre a Dengue no Brasil e no Piauí em 2016

Segundo dados do Boletim Epidemiológico da SVS do Ministério da Saúde obtidos do SINAN Online e atualizados em Janeiro de 2017 (BRASIL, 2017), até a Semana Epidemiológica (SE) 52 (que vai de 03 de Janeiro a 31 de Dezembro de 2016) foram registrados 1.500.535 casos prováveis de dengue no Brasil, com incidência de 733,4

casos/100 mil habitantes. No decorrer deste período, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (858.2733 casos, 57,2%), seguida das regiões Nordeste (324.815 casos, 21,6%), Centro-Oeste (205.786 casos, 13,7%), Sul (72.650 casos, 4,8%) e Norte (39.011 casos; 2,6%), e foram descartados 726.560 casos suspeitos da doença, enquanto a região Centro-Oeste (1.322,0 casos/100 mil habitantes) e Sudeste (1.001,2 casos/100 mil habitantes) apresentam as maiores taxas de incidência no país em 2016.

Com relação à classificação dos casos, de acordo com o referido boletim (BRASIL, 2017), até a SE 52 foram confirmados 861 casos de dengue grave, e 8.402 casos de dengue com sinais de alarme, destacando-se a região Sudeste com os maiores números de casos confirmados de dengue grave (449) e dengue com sinais de alarme (3.826). Foram confirmados 642 óbitos por dengue no país em 2016, representando uma proporção de 6,9% dos casos graves ou com sinais de alarme, sendo que os Estados de Pernambuco (37,1%) e Alagoas (31,8%) apresentaram as maiores proporções de óbitos em relação ao total de casos. Além disso, ainda existem 401 casos de dengue grave ou dengue com sinais de alarme e 567 óbitos em investigação, que podem ser confirmados ou descartados.

Ainda conforme o citado boletim (BRASIL, 2017), no Piauí foram registrados 5.242 casos prováveis de dengue até a SE 52, enquanto a taxa de incidência de casos prováveis da doença foi de 162,9 casos/100 mil habitantes. Até a referida SE foram confirmados 5 casos de dengue grave, 6 casos de dengue com sinais de alarme, e 1 óbito por dengue. Em 2016, até a SE 37 foram processadas 12.622 amostras em todo o país para isolamento do DENV, sendo 3.003 positivas, das quais 86,3% corresponderam ao sorotipo DENV-1, mantendo-se o predomínio observado no ano anterior (BRASIL, 2016a).

Em sua totalidade, o Brasil é considerado um país de clima tropical, quente e úmido, com diferenças em suas zonas climáticas e nas dinâmicas pluviais na faixa costeira, que proporcionam condições favoráveis para a proliferação do vetor da dengue, o *A. aegypti* (FARES et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2013). A atividade dos sorotipos do DENV ocorre durante todo o ano, mas a maioria dos surtos e os mais altos níveis de infestação pelo vetor mostram que a dengue apresenta padrão sazonal marcante, com maior ocorrência durante o período mais chuvoso e quente no Brasil, entre os meses de Outubro e Maio (BRASIL, 2015; CÂMARA et al., 2007; FARES et al., 2015; SIQUEIRA et al., 2005). Assim, se faz necessário o monitoramento de indicadores epidemiológicos, entomológicos e operacionais, para a detecção precoce da vulnerabilidade de ocorrência da doença em uma determinada área (BRASIL, 2015).

2.4 Características Gerais Sobre a Biologia do *Dengue virus*

O agente etiológico da dengue é o DENV (Figura 4), um vírus de RNA classificado em 4 diferentes sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) com base em suas propriedades antigênicas, com capacidade de causar doença aos humanos após sua transmissão por meio de picadas de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* (DINU et al., 2015; FANG et al., 2012; HERRERO et al., 2013; ROTHMAN, 2011; SALAZAR et al., 2014). No ano de 2007 foi anunciada a existência de um possível quinto sorotipo (DENV-5) detectado na Malásia, onde se observou que o vírus isolado e sequenciado era distinto filogeneticamente de outras formas silváticas de DENV-4 (DINU et al., 2015; MAMANI, 2014; MUSTAFA et al., 2015; NORMILE, 2013; SIM; HIBBERD, 2016). Contudo, pesquisas adicionais são necessárias para melhor esclarecer a evolução deste provável quinto sorotipo do DENV (MUSTAFA et al., 2015).

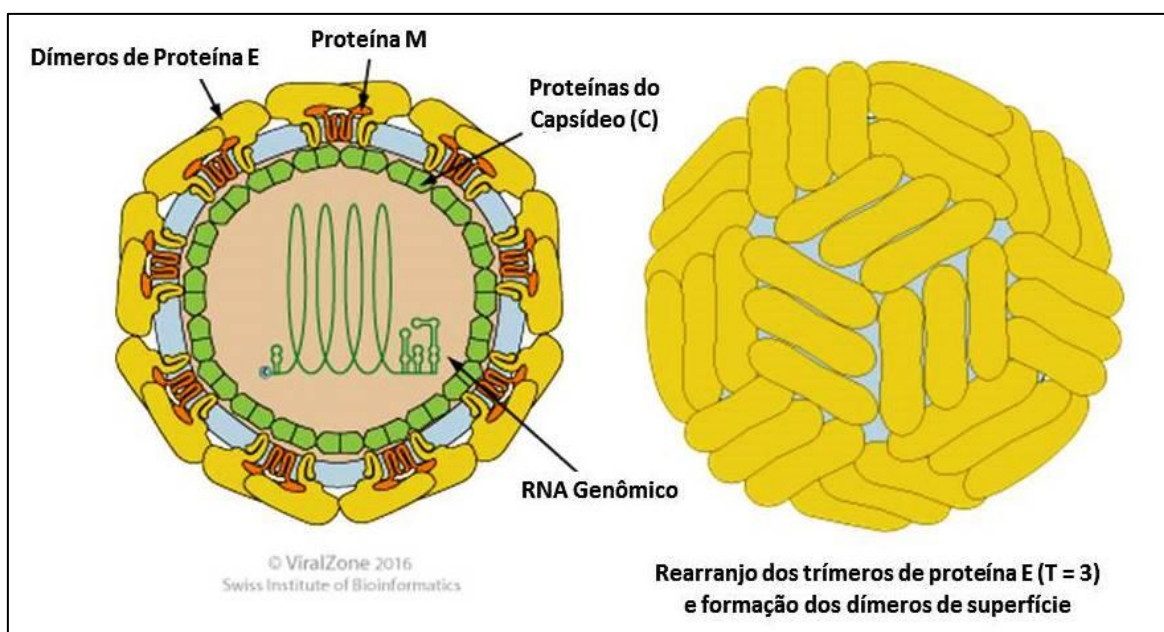


Figura 4 – Estrutura da partícula viral do DENV. (Fonte: VIRALZONE, 2016 - Adaptado).

A partícula viral do DENV (Figura 4) mede cerca de 500 Å ou 40-60 nm de diâmetro, segundo análises por microscopia eletrônica e microscopia de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) (FERREIRA et al., 2008; GUZMAN et al., 2016; KUHN et al., 2002; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). O vírion é constituído por um capsídeo proteico (C) de simetria icosaédrica, envolvido por um envelope lipídico onde estão inseridas as espículas glicoproteicas (E) e proteínas de membrana (M) (GUZMAN et al., 2016; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). A superfície de vírions imaturos apresenta aparência irregular, pois a proteína precursora de membrana (prM) e a

proteína E estão dispostas em trímeros (estrutura $T = 3$) que se projetam para longe do envelope; durante a maturação viral, os trímeros sofrem rearranjo e formam dímeros que conferem uma superfície relativamente lisa observada em vírions maduros, desempenhando papéis distintos nas diferentes fases da infecção (RODENHIUS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010; WAHALA et al., 2011).

Assim como nos demais *Flavivirus*, o genoma do DENV (Figura 5) se constitui de uma fita simples de RNA, de polaridade positiva e tamanho de aproximadamente 11 kb, com uma matriz de leitura aberta (ORF, do inglês *Open Reading Frame*) que codifica proteínas estruturais e não estruturais, e é flanqueada por 2 regiões não codificantes (5' UTR / 3' UTR, do inglês *Untranslated Region*) (CHAMBERS et al., 1990; GUZMAN et al., 2010; GUZMAN et al., 2016; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; PASTORINO et al., 2010; SANTOS; ROMANOS, WIGG, 2008). As UTRs desempenham papel biologicamente significativo na síntese do RNA viral e na tradução, porém seu papel na dengue ainda permanece incerto e sem correlação definitiva entre a sequência ou estrutura secundária e gravidade da doença (HERRERO et al., 2013; PASTORINO et al., 2010).

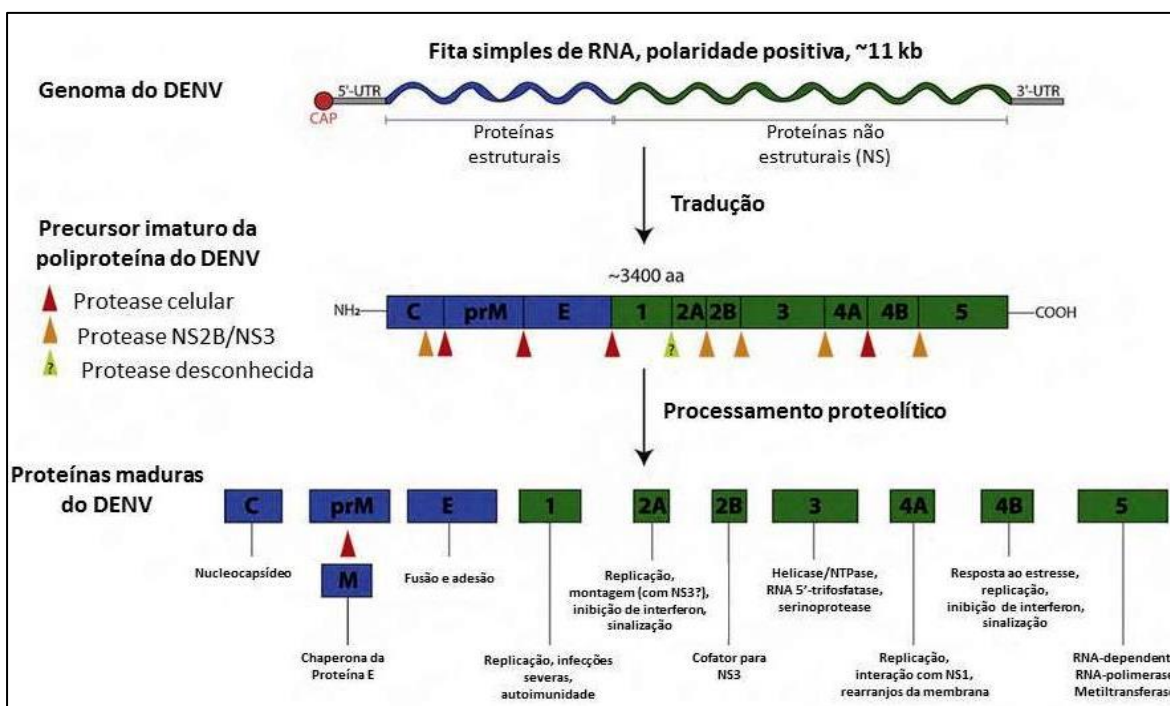


Figura 5 – Genoma do DENV e organização da poliproteína. A ORF (~11kb) é representada com as regiões codificantes de proteínas estruturais e não estruturais (coloridas de azul e verde, respectivamente), o CAP-5' e as UTR's 5' e 3'. A ORF codifica um precursor imaturo da poliproteína que é clivado co- e pós-traducionalmente em 3 proteínas estruturais (em azul) e 7 proteínas não estruturais (em verde). Os sítios de clivagem para proteases celulares, proteases NS2B/NS3 e proteases desconhecidas são indicados. As respectivas funções das proteínas maduras são descritas. (Fonte: PASTORINO et al., 2010 – Adaptado).

Considerando a extremidade 5' UTR, o genoma do DENV (Figura 5) inicia a codificação de 3 proteínas estruturais envolvidas na montagem e entrada do vírus: C, do capsídeo; M, que é produzida durante a maturação das partículas virais nascentes, a partir de um pequeno fragmento proteolítico da proteína precursora de membrana (prM); e glicoproteína E de envelope, responsável por importantes propriedades biológicas: ligação a receptores, hemaglutinação de eritrócitos, e indução de anticorpos neutralizantes e imunidade protetora, dentre outras (GUZMAN et al., 2010; LINDEBACH; THIEL; RICE, 2007; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; PASTORINO et al., 2010; SANTOS; ROMANOS, WIGG, 2008). Além destas, outras 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) também são codificadas, desempenhando diversas funções regulatórias de replicação, virulência e patogenicidade (GUZMAN et al., 2010; GUZMAN et al., 2016; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; PASTORINO et al., 2010; SANTOS; ROMANOS, WIGG, 2008).

Conforme destacado, o DENV possui 4 sorotipos antigenica e filogeneticamente distintos entre si, mas que são geneticamente relacionados e agrupados geograficamente, considerando que cada um dos sorotipos compartilham entre si e com outros *Flavivirus* cerca de 65-70% de similaridade na sequência de aminoácidos, enquanto os genótipos podem variar entre 6-8% de similaridade na sequência de nucleótidos, e em torno de 3% de similaridade na sequência de aminoácidos (GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2010; GUZMAN et al., 2016; SIM; HIBBERD, 2016). Certos genótipos dentro de cada um dos sorotipos do DENV e certos subtipos dentro dos genótipos foram frequentemente associados com a evolução para formas mais graves da dengue (OHAINLE et al., 2011; RICO-HESSE et al., 2007).

A amplificação e o sequenciamento do genoma do DENV têm se destacado na identificação de grande número de sequências do vírus, tornando-as disponíveis para estudos de filogenia e evolução viral para a determinação da sua variedade de genótipos (SIM; HIBBERD, 2016). Com base em análises das regiões dos genes *M*, *E* e *NS1*, atualmente são reconhecidos 5 genótipos de DENV-1, 5 genótipos de DENV-2, 4 genótipos de DENV-3, e 3 genótipos de DENV-4 (RICO-HESSE et al., 2003; SIM; HIBBERD, 2016). Estudos sobre a evolução do DENV têm acarretado em grandes impactos mundiais, na compreensão da sua virulência em seres humanos e na epidemiologia da dengue no mundo (RICO-HESSE et al., 2007).

2.5 Vetores, Ciclo Biológico e Transmissão da Dengue

Mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes* (subgênero *Stegomyia*), como o *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e outros membros pertencentes ao grupo do *Aedes scutellaris*, desempenham papel relevante no ciclo de transmissão da dengue, dependendo da área geográfica de sua ocorrência (GUBLER, 1998; MALAVIGE et al., 2004; WILDER-SMITH et al., 2010). O *A. aegypti* se destaca no mundo por ser o principal mosquito vetor da doença, altamente domesticado às áreas tropicais e subtropicais, com hábitos diurnos (principalmente no início da manhã e no final da tarde), que se alimenta de sangue humano e com preferência por ambientes urbanos e intradomiciliares (DIAS et al., 2010; GUBLER, 1998; MALAVIGE et al., 2004; RIGAU-PÉREZ et al., 1998).

O DENV é um arbovírus incomum por não exigir um ciclo enzoótico/silvestre para manter sua transmissão epidêmica aos seres humanos (WHITEHEAD et al., 2007). Tal ciclo é observado em florestas do Sudeste Asiático e da África Ocidental entre primatas não humanos e mosquitos *Aedes*, porém acredita-se que sua contribuição para a transmissão da epidemia urbana seja mínima, pois evidências sugerem que o vírus não se move regularmente das florestas para as áreas urbanas (GUBLER, 1998; GUZMAN et al., 2016; WHITEHEAD et al., 2007). Logo, o DENV é mantido em transmissão epidêmica periódica em ciclos urbanos entre humanos e mosquitos, sendo este o mais importante para a saúde pública pelo fato dos seus sorotipos co-circular em na mesma cidade e causarem hiperendemicidade (GUBLER, 1998; RIGAU-PEREZ et al., 1998; GUZMAN et al., 2016; WHITEHEAD et al., 2007).

Conforme esquematizado na Figura 6, tais artrópodes causam infecções a partir de picadas de fêmeas infectadas com o DENV, durante o repasto sanguíneo (GUBLER, 1998; GUZMAN et al., 2016; MALAVIGE et al., 2004). Os mosquitos adquirem o vírus ao se alimentarem do sangue de indivíduos infectados que estejam na fase de viremia da doença e se tornam infectantes por toda sua vida (DIAS et al., 2010; GUZMAN et al., 2016). Ao entrar em contato com o mosquito, o DENV se replica inicialmente nas células do trato intestinal e é transportado para as glândulas salivares após um período de incubação extrínseca (de 8-10 dias) dependente da cepa do mosquito, do genótipo viral infectante e de fatores ambientais como umidade e temperatura, permanecendo por lá até ser inoculado durante novo repasto sanguíneo (DIAS et al., 2010; GUZMAN et al., 2010; GUZMAN et al., 2016; SALAZAR et al., 2014).

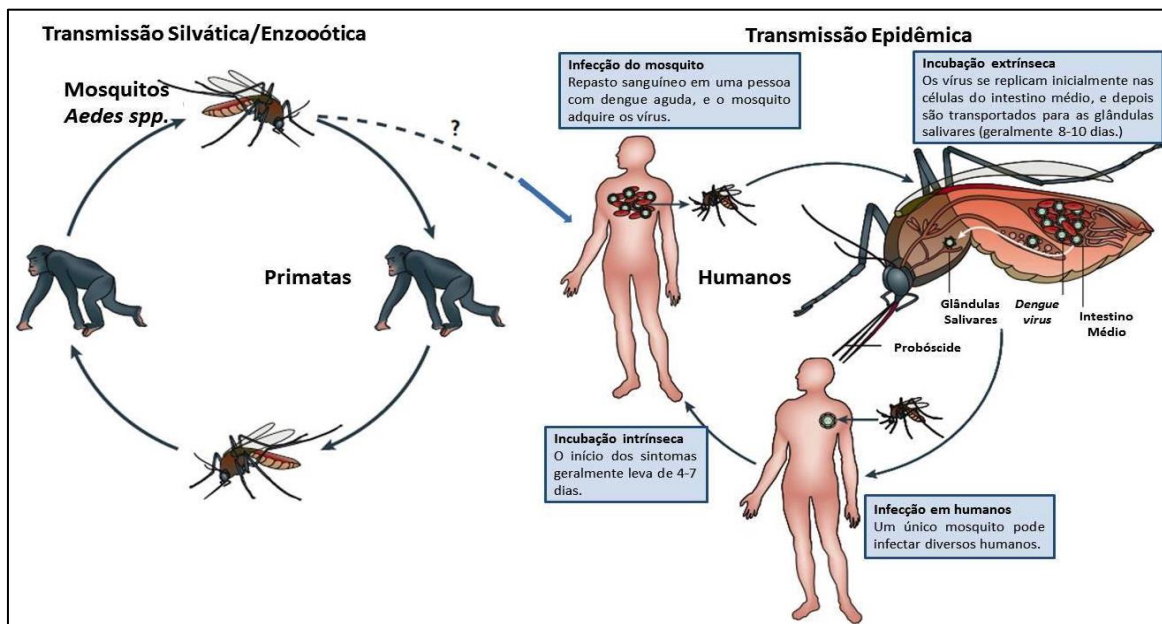


Figura 6 – Ciclo de transmissão do DENV. Por causa do alto nível de viremia resultante da infecção de seres humanos, o DENV é eficientemente transmitido entre humanos e mosquitos sem a necessidade de um hospedeiro de amplificação enzoótica. O vírus é transmitido principalmente por fêmeas de *Aedes aegypti*, que se reproduzem e põem ovos em recipientes de água em ambientes domiciliares e peridomiciliares, aumentando a frequência de contato entre mosquitos e humanos. (Fonte: GUZMAN et al., 2016; WHITEHEAD et al., 2007 – Adaptado).

No Brasil, o *A. aegypti* é o único vetor associado com a transmissão do DENV e está presente em 4.318 municípios, enquanto o *A. albopictus* é um importante vetor do vírus na Ásia e está presente em 2.126 municípios brasileiros, porém seu envolvimento na transmissão da doença no país ainda não foi comprovado (BRASIL, 2015). A proliferação de mosquitos aliada à co-circulação dos 4 sorotipos do DENV permitiu que a dengue, inicialmente restrita a grandes centros urbanos, passasse a ocorrer em municípios de todos os portes populacionais, e em todas as faixas etárias (BRASIL, 2015). Além disso, estudos também já comprovaram que populações brasileiras de *A. aegypti* e *A. albopictus* apresentam elevada competência vetorial para a transmissão de outras arboviroses de caráter emergente e com grande destaque no território nacional nos últimos 4 anos, como o ZIKV e o CHIKV (FIGUEIREDO, 2015; LIMA-CÂMARA, 2016).

2.6 Ciclo de Multiplicação Viral

Após a inoculação do DENV, o ciclo de multiplicação viral (Figura 7) inicia com a ligação do vírus a diversas células de defesa do hospedeiro, como células de Langerhans (LCs, do inglês *Langerhans Cells*), células dendríticas (DCs, do inglês *Dendritic Cells*),

macrófagos, células T, monócitos, mastócitos, e possivelmente hepatócitos e células endoteliais, sendo tal processo mediado pela proteína E (DIAS et al., 2010; DIAMOND; PIERSON, 2015; GUZMAN et al., 2016; IVORY; BIRCHALL; PIGUET, 2015; PASTORINO et al., 2010). Com base em interações moleculares complexas entre o vírus e a célula hospedeira, o DENV e outros *Flavivirus* dispõem de mecanismos de espoliação do maquinário celular e evasão à resposta imune antiviral, que irão facilitar o seu processo de multiplicação (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; GUZMAN; HARRIS; 2015; JAIN; CHATURVEDI; JAIN, 2014).

Através de uma variedade de receptores de superfície celular, em especial a molécula não integrina, captora da molécula de adesão intracelular 3 específica de células dendríticas (DC-SIGN, do inglês *Dendritic-Cell-Especific ICAM3-Grabbing No-integrin*), o vírus é internalizado por endocitose mediada por receptores e por ação da clatrina, seguido por tráfico de partículas virais para o endossomo tardiamente acidificado, onde rearranjos estruturais da proteína E promovem a fusão entre as membranas do vírus e da célula hospedeira (DIAMOND; PIERSON, 2015; FLIPSE; WISCHUT; SMIT, 2013; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMAN, 2005; PASTORINO et al., 2010).

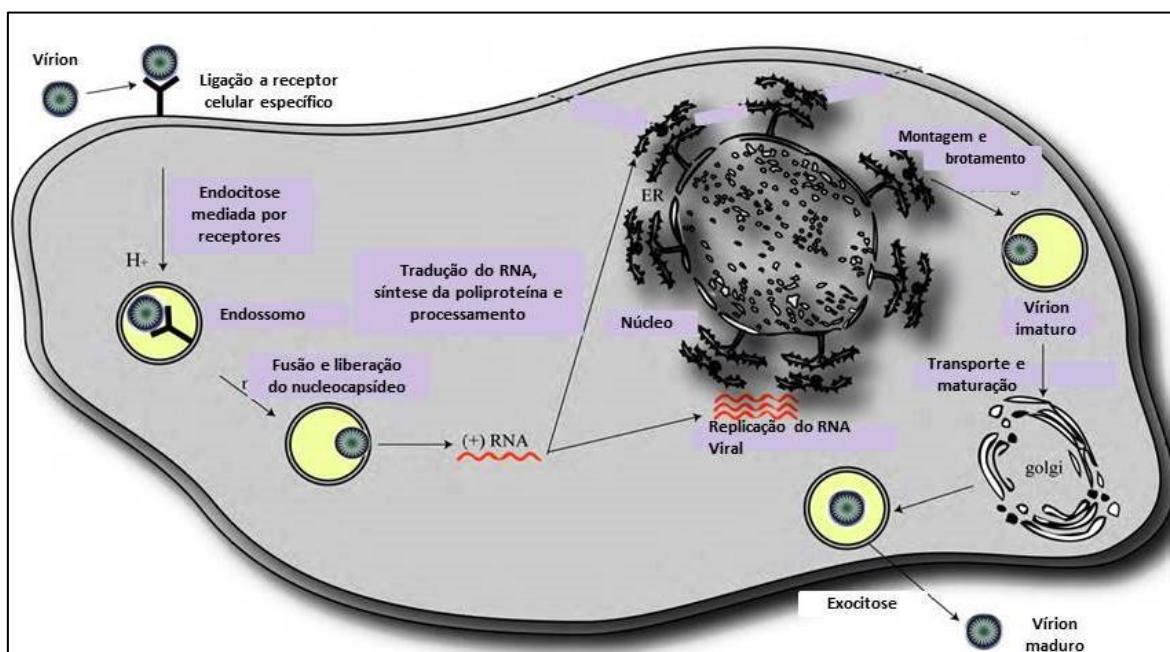


Figura 7 – Ciclo de multiplicação do DENV. (Fonte: PASTORINO et al., 2010 – Adaptado).

Com a penetração do capsídeo no citoplasma da célula, o RNA viral é traduzido em uma poliproteína que posteriormente é clivada em 3 proteínas estruturais e 7 proteínas não estruturais (DIAMOND; PIERSON, 2015; PASTORINO et al., 2010). A síntese do

RNA viral de cadeia positiva é dirigida a partir de um RNA viral de cadeia negativa, para em seguida ser empacotado por progenitores virais que brotam para o retículo endoplasmático (ER, do inglês *Endoplasmic Reticulum*) e formar vírions imaturos envelopados (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMAN, 2005; PASTORINO et al., 2010). A conformação e organização das proteínas E nestes vírions muda consideravelmente durante a montagem e a libertação, a maturação ocorre por ações de proteases furinas na rede trans-Golgi (TGN, do inglês *Trans-Golgi Network*), e a secreção das partículas virais maduras dentro do espaço extracelular ocorre por exocitose (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMAN, 2005; PASTORINO et al., 2010).

2.7 Imunopatogênese na Infecção pelo DENV

Considerando que o DENV é transmitido a partir da picada do mosquito, a pele humana é o principal sítio de infecção pelo fato de conter uma variedade de células imunológicas na epiderme, como as células de Langerhans e queratinócitos, e na derme, como subconjuntos de células dendríticas, as quais serão as primeiras a entrarem em contato com o vírus (CEDILLO-BARRÓN et al., 2014; IVORY; BIRCHALL; PIGUET, 2015; JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009). Em seguida, as células infectadas irão migrar do local da infecção para os gânglios linfáticos, onde monócitos e macrófagos serão recrutados e irão se tornar alvos da infecção, e o vírus irá se disseminar através do sistema linfático, resultando na viremia primária (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

Conforme esquematizado na Figura 8, a imunidade inata do hospedeiro é a primeira linha de defesa contra o processo de multiplicação do DENV, e acredita-se que ela é responsável por orquestrar toda a evolução da infecção causada pelo vírus (HERRERO et al., 2013). Potencialmente existem variações fenotípicas entre as células-alvo para infecção na pele (infecção primária), nos órgãos linfoides (durante a disseminação do vírus) e em vários tecidos quando a infecção sistêmica tem se estabelecido (JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013). Nas células infectadas, a imunidade inata é iniciada após receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) identificarem proteínas virais ou o ácido nucleico, acarretando na produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios pelas DCs e pelas células *natural killer* (NK), bem como também promove o

recrutamento de leucócitos (COSTA et al., 2013; GUZMAN; HARRIS, 2015; HERRERO et al., 2013; JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

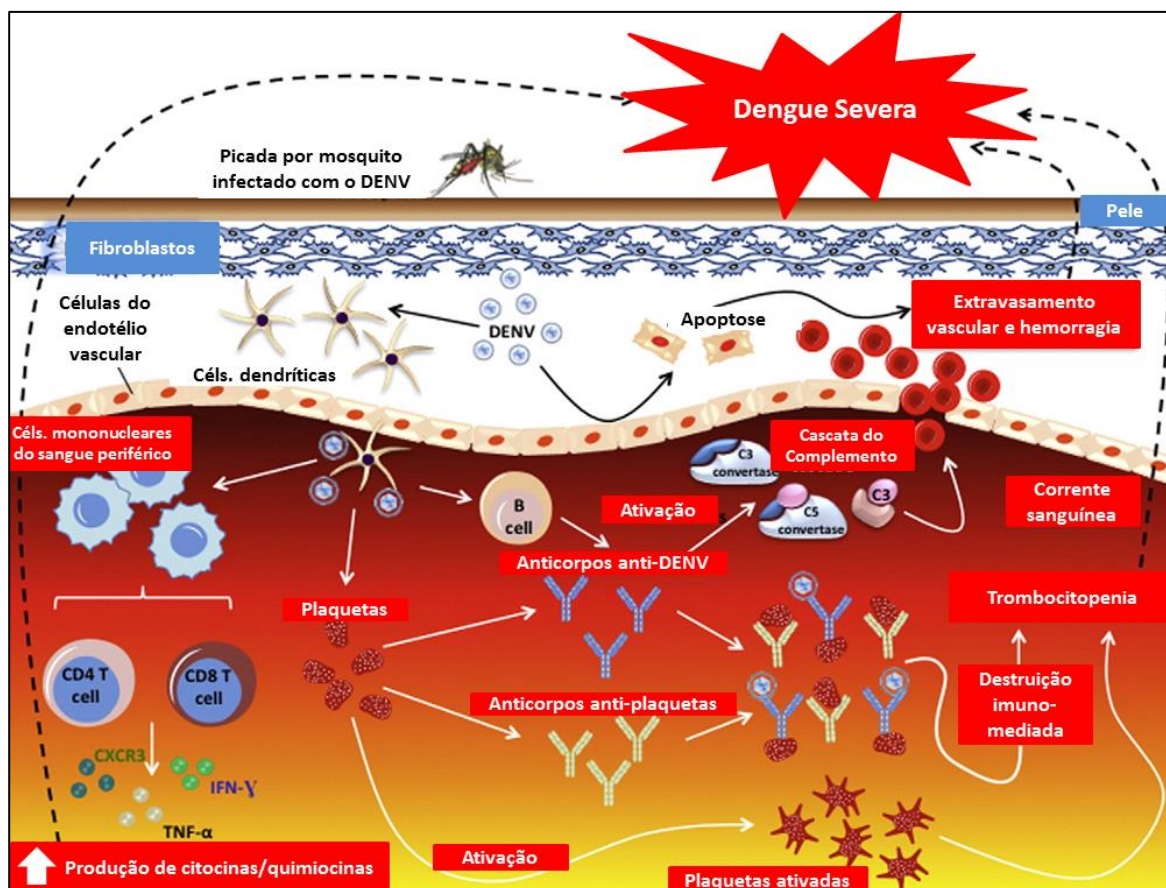


Figura 8 – Imunopatogênese causada pelo DENV, com ênfase nos mecanismos de progressão para a dengue severa. Foi demonstrado que a ativação da resposta imune da célula hospedeira envolve três vias possíveis. 1) Os anticorpos anti-DENV causam extravasamento vascular através da ativação da cascata de proteínas do sistema complemento, enquanto a infecção de células endoteliais vasculares pelo DENV causa apoptose e contribuindo para a extravasamento vascular. 2) a infecção de células mononucleares do sangue periférico leva ao aumento da produção de citocina e quimiocinas pró-inflamatória, pela proliferação de populações de células T. 3) A trombocitopenia causada é vista como o resultado de duas vias: infecção direta e ativação das plaquetas pelo DENV; e destruição de plaquetas imunomediada por anticorpos anti-DENV ou por anticorpos anti-plaquetas. (Fonte: HERRERO et al., 2013 – Adaptado).

Nos hospedeiros, sintomas gerais da dengue como febre e mal estar surgem após o período de incubação (2-7 dias) e coincidem com o período de viremia, com o vírus podendo ser isolado do soro a partir de 24-48 horas antes do início dos sintomas, e no decorrer da fase aguda da doença (FIGUEIREDO, 1999; JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013). Tais sintomas estão associados com elevação dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias liberadas por macrófagos ao interagirem com linfócitos T *helper* ativados, como: interleucina-2 (IL-2) e seu receptor solúvel, CD4 solúvel, interferon-gama (IFN- γ),

interferon-alfa (IFN- α), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), e fator de ativação plaquetário (PAF, do inglês *platelet-activating factor*) (FIGUEIREDO, 1999; KURANE; ENNIS, 1992; MONATH; HEINZE, 1996).

Outros sintomas gerais que ocorrem na fase aguda da dengue são as mialgias, decorrentes do processo de multiplicação viral no próprio tecido muscular, onde também são acometidos os músculos oculomotores, sendo responsáveis pela cefaleia e dor retroorbitária que os pacientes apresentam (FIGUEIREDO, 1999; KURANE; ENNIS, 1992; MONATH; HEINZE, 1996). Durante esta fase também ocorrem algumas alterações substanciais à celularidade do sistema hematopoiético relacionadas aos altos teores de citocinas macrofágicas, como leucopenia, neutropenia, trombocitopenia e, ocasionalmente, eosinofilia e depressão medular discreta ou transitória (FIGUEIREDO, 1999; JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013; KURANE; ENNIS, 1992; MONATH; HEINZE, 1996).

A imunidade adaptativa do hospedeiro também é responsável por desempenhar papel fundamental no combate ao DENV, fornecendo proteção mediada por anticorpos contra a proteína E do vírus, bem como também por depuração viral aguda mediada por linfócitos T (CEDILLO-BARRON et al., 2014; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; HERRERO et al., 2013). Ironicamente, esta resposta imune é muito complexa e imprevisível em alguns casos, podendo contribuir na evolução para a forma mais grave da doença, por meio do fenômeno de potencialização mediada por anticorpos (ADE, do inglês *Antibody-dependent Enhancement*) ou também pela produção de citocinas por células T *helper* (Th1 e Th2) (CEDILLO-BARRON et al., 2014; HERRERO et al., 2013; WHITEHORN; SIMMONS, 2011).

A resposta imune humoral produzida por plasmócitos resultantes da ativação de linfócitos B costuma ser vigorosa, com rápida produção de anticorpos IgM e IgG (FIGUEIREDO, 1999). Estes têm papel crucial para a proteção contra a infecção causada pelo DENV, pois atuam bloqueando a interação entre vírus e células-alvo e interferindo com o mecanismo de fusão de vírus envelopados, ou em adição à neutralização, atuam recrutando ou complementando células efectoras que conduzem as células infectadas pelo DENV à morte (CEDILLO-BARRON et al., 2014). As respostas de anticorpos no soro são diferentes após infecções primárias e secundárias pelo DENV, em que os anticorpos produzidos durante uma segunda infecção surgem a partir de células B *naive* e células B de memória geradas a partir da infecção primária, que ao serem estimuladas, levam a um aumento rápido nos níveis de IgG específica anti-DENV (WAHALA et al., 2011).

A imunidade celular citotóxica por linfócitos T ocorre sob estímulo das proteínas virais NS1, NS3 e E, onde células T *helpers* atuam na presença de células infectadas com o vírus que expressam receptores HLA (do inglês *Human Leukocyte Antigen*) do tipo II, levando à produção de IFN- γ , IL-2 e fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (FIGUEIREDO et al., 1999; KURANE; ENNIS, 1992; CHAMBERS, 1990). Os linfócitos T citotóxicos atuam agredindo diretamente as células infectadas pelo DENV que expressam receptores HLA do tipo I, lisando-as, reduzindo seu número, e conferindo proteção contra reinfecções após infecção primária (FIGUEIREDO, 1999; GUZMAN; HARRIS, 2015; MONATH; HEINZE, 1996). A expressão de epítomos virais em células infectadas durante infecção secundária pelo DENV ativa a produção de células T de memória de reatividade cruzada entre sorotipos, além de citocinas pró-inflamatórias, levando ao extravasamento de plasma no endotélio vascular (GUZMAN; HARRIS, 2015).

O sistema complemento é um dos principais componentes humorais da imunidade inata, fornecendo a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o DENV e outros patógenos, ao interagir com o sistema hemostático (GUZMAN et al., 2016; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; NIELSEN et al., 2009). Em pacientes com dengue grave, foram observados níveis plasmáticos elevados de produtos da ativação de C3a e C5a concomitantes com a aparente perda de plasma durante o período de defervescência, seguido de consumo acelerado e acentuada redução dos componentes do complemento (CHURDBOONCHART; BHAMARAPRAVATI; FUTRAKUL, 1983; COFFEY et al., 2009; HALSTEAD, 2015; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; NISHIOKA, 1974; SHAI; CHANG; HOU, 1992; WHITEHORN; SIMMONS, 2011). Foi também proposto que o antígeno NS1 liberado a partir de células infectadas é um importante ativador de fatores do complemento presentes na fase fluida (AVIRUTNAN et al., 2006; COFFEY et al., 2009; KUROSU et al., 2007; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; WHITEHORN; SIMMONS, 2011).

O extravasamento vascular é uma característica da manifestação da dengue severa em pacientes infectados pelo DENV (GUZMAN et al., 2016), onde efusões, ascite e edema da parede da vesícula são encontrados durante o período de defervescência, e correlacionados com a gravidade da doença (COSTA et al., 2013; TRUNG; WILLS, 2010). O endotélio é a barreira primária do fluido vascular, e as respostas induzidas pelo DENV (como produção de citocinas e quimiocinas, e o recrutamento de leucócitos) vão resultar em edema e hemorragia, podendo provocar alterações na permeabilidade da

barreira de células endoteliais (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; COSTA et al., 2013; HALSTEAD, 2015; HERRERO et al., 2013). A permeabilidade endotelial induzida pelo DENV pode também ser afetada pelo estado de maturação de NS4B, que vai modular a resposta de citocinas em linhagens de células monocíticas, ou ainda, pela secreção do antígeno NS1, de anticorpos anti-NS1 e pela ativação do complemento (AVIRUTNAN et al., 2006; GUZMAN; HARRIS, 2015; KELLEY; KAUFUSI; NERURKAR, 2012).

A trombocitopenia é um sintoma bem conhecido na infecção causada pelo DENV (GUZMAN et al., 2016), onde antígenos do vírus e anticorpos anti-DENV são conhecidos por se ligarem às plaquetas humanas, porém os mecanismos patológicos exatos que a provoca não são completamente compreendidos (BOONPUCKNAVIG et al., 1979; HERRERO et al., 2013). Sugere-se que exista uma relação inversa entre maiores níveis de IgG Associados a Plaquetas (PAIgG, do inglês *Platelet-associated IgG*) e baixa contagem de plaquetas na fase aguda, com o perfil se invertendo na fase de convalescença (HERRERO et al., 2013, OISHI et al., 2003). Esta relação inversa também foi sugerida ao verificarem níveis de IgM Associados a Plaquetas (PAIgM, do inglês *Platelet-associated IgM*) e PAIgG, sendo estes mais elevados em pacientes com dengue grave (HERRERO et al., 2013; SAITO et al., 2004).

Além de trombocitopenia, anticorpos dirigidos contra o antígeno NS1 também têm sido envolvidos na ativação inflamatória das células endoteliais *in vitro* e na adesão de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) às células endoteliais (HERRERO et al., 2013; LIN et al., 2005). Na presença de anticorpos sub-neutralizantes, o complemento é ativado na superfície de células infectadas pelo DENV e contribui para a permeabilidade vascular observada na dengue severa na forma de hemorragia (AVIRUTNAN et al., 1998; AVIRUTNAN et al., 2006; COFFEY et al., 2009; MAIRUHU et al., 2003; HERRERO et al., 2013). Além disso, células endoteliais infectadas diretamente pelo DENV podem entrar em apoptose e contribuir para o aumento da permeabilidade vascular associado com a dengue grave (AVIRUTNAN et al., 1998; HERRERO et al., 2013). O conhecimento sobre os mecanismos que causam a hemorragia na dengue grave é relevante para o desenvolvimento de fármacos que limitem sua progressão, minimizando os atuais níveis elevados de mortalidade causados pelo DENV (HERRERO et al., 2013).

2.8 Manifestações Clínicas e Classificação da Dengue

Diversos grupos de especialistas têm sugerido que a dengue é uma entidade única e com diferentes apresentações clínicas (Figura 9), sendo que os pacientes infectados pelo DENV apresentam uma série de sintomas clínicos variando de acordo com a gravidade da doença e a idade do paciente (HADINEGORO, 2012; JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013). Após um período de incubação de 4-8 dias (variando de 2-15 dias), a infecção por algum dos 4 sorotipos do DENV pode ocorrer de forma assintomática em boa parte dos casos, ou então, pode produzir uma doença sistêmica e dinâmica de amplo espectro clínico, onde a maioria dos pacientes se recupera depois de uma doença auto-limitada (embora debilitante), enquanto uma minoria dos casos progride para formas mais graves, podendo evoluir para o óbito (BRASIL, 2016b; GUZMAN; HARRIS, 2015; SIMMONS, 2012).

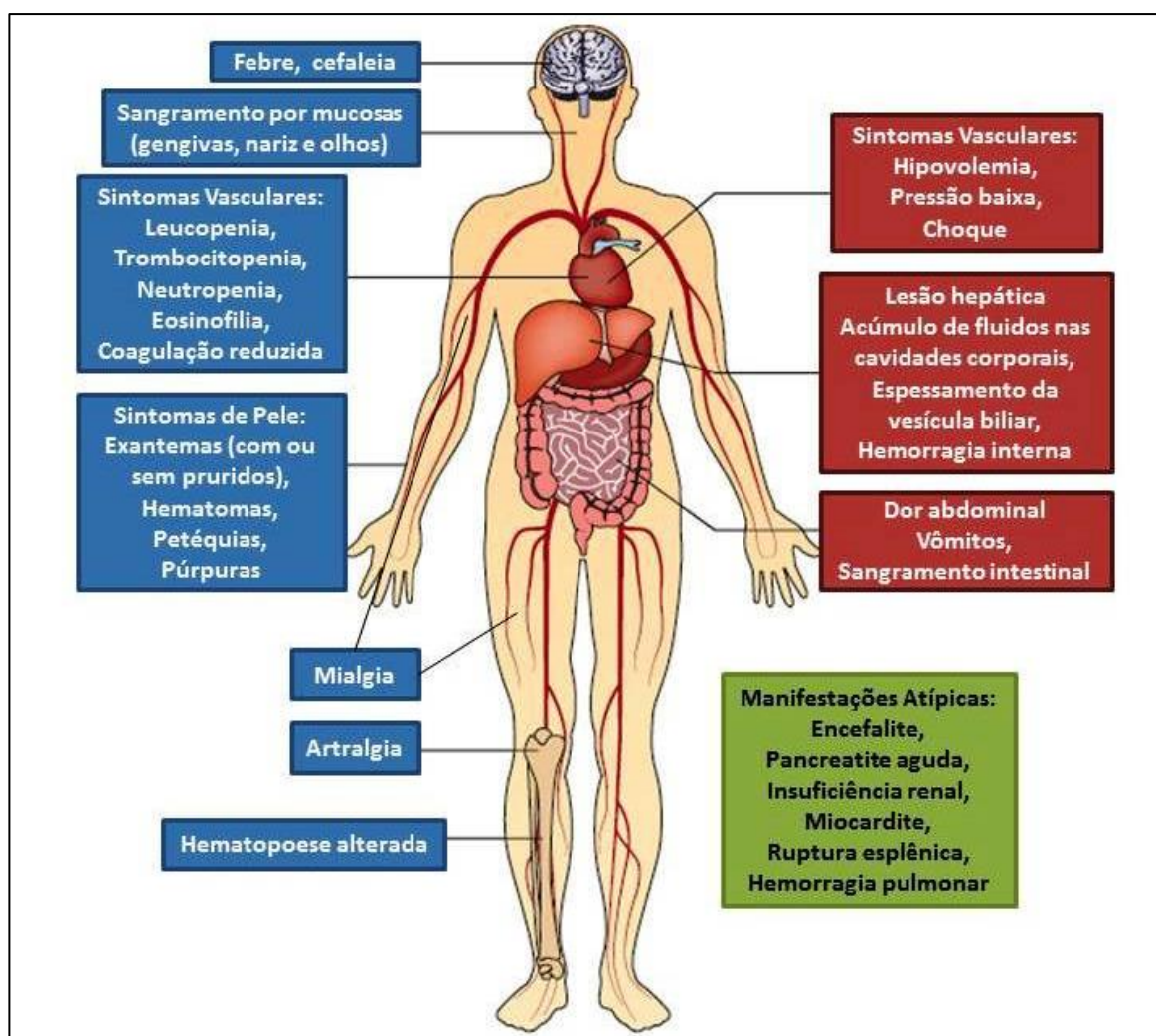


Figura 9 – Resumo sobre o espectro de manifestações clínicas da dengue. Observa-se que a infecção sistêmica causada pelo DENV afeta múltiplos sistemas orgânicos. Considerando a classificação antiga proposta pela OMS (1997), as caixas azuis representam as manifestações clássicas da FD, as caixas vermelhas representam as manifestações da FHD, e as caixas verdes representam complicações raras. (Fonte: JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013 – Adaptado).

Após o período de incubação, a dengue pode ocorrer em três fases clínicas (BRASIL, 2016b; GUZMAN et al., 2016; SIMMONS, 2012; WHO, 2009):

- a) Fase Febril – Com febre geralmente alta (39-40°C), de início abrupto e duração de 2-7 dias, associada à cefaleia, mialgia, artralgia e dor retroorbitária. Exantemas máculo-papulares atingindo face, tronco e membros estão presentes em 50% dos casos (podendo apresentar-se com ou sem prurido) frequentemente no desaparecimento da febre. Anorexias, náuseas e vômitos também podem estar presentes, e diarreia com baixo volume e frequência de evacuação e está presente em percentual significativos dos casos. Após a fase febril, a maioria dos pacientes tem recuperação gradativa, com melhora do estado geral e retorno do apetite.
- b) Fase Crítica – Período crítico que pode estar presente em alguns pacientes e pode evoluir para formas graves. Tem seu início com a defervescência da febre, entre 3-7 dias de início da doença, acompanhada do surgimento de sinais de alarme.
- c) Fase de Recuperação – Após a fase crítica haverá reabsorção gradual do conteúdo extravasado e progressiva melhora clínica. O débito urinário se normaliza ou aumenta, e alguns pacientes pode apresentar *rash* cutâneo acompanhado ou não de prurido generalizado.

Em 1997, a classificação da dengue proposta pela OMS subdividia a doença em FD, FHD e SCD, sendo que para ser considerado um caso de FHD, o paciente deveria apresentar 4 sinais e sintomas: febre, manifestações hemorrágicas, trombocitopenia (diminuição no número de plaquetas) e evidências de derrames cavitários, hemoconcentração ou hipoproteinemia (BANDYOPADHYA; LUM; KROEGER, 2006; BARNIOL et al., 2011; LIMA et al., 2013; NARVAEZ et al., 2011). Alterações na epidemiologia da dengue, com um número crescente de casos em adultos (com ou sem comorbidades) e a expansão da doença em outras regiões do mundo foram algumas das principais limitações que surgiram para a aplicabilidade prática desta classificação, especialmente na vigilância dos casos graves (BANDYOPADHYA; LUM; KROEGER, 2006; DEEN et al., 2006; CAVALCANTI et al., 2013; LIMA et al., 2013; WHO, 2012).

Em 2006, o Grupo de Trabalho Científico sobre a Dengue da OMS recomendou o reforço da otimização da gestão clínica, em especial no desenvolvimento e validação de métodos de diagnóstico da dengue, e na análise de novos métodos e diretrizes para triagem

e tratamento dos pacientes com a doença (BARNIOL et al., 2011). O reconhecimento das limitações da antiga classificação da dengue levou o ramo *Tropical Disease Reseach* da OMS a patrocinar um estudo multicêntrico conduzido em países da Ásia e América Latina, fornecendo uma lista de sinais clínicos sugestivos de resposta à dengue severa (BARNIOL et al., 2011; LIMA et al., 2013; NARVAEZ et al., 2011). Em 2008, a OMS propôs um novo sistema de classificação da doença que passou a vigorar a partir de 2009 (BRASIL, 2016b; GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2016; HADINEGORO, 2012; WHO, 2009; WHO, 2012), categorizando a doença em:

- a) Dengue sem sinais de alarme (DSSA) – Qualquer indivíduo suspeito, que more onde são registrados casos de dengue, ou que nos últimos 14 dias tenha viajado para áreas endêmicas da doença, que apresente febre (2-7 dias) e tenha 2 ou mais dos seguintes sintomas: náuseas, vômitos, exantema, mialgia, artralgia, cefaleia, dor retroorbitária, petéquias ou prova do laço positiva, e leucopenia.
- b) Dengue com sinais de alarme (DCSA) – Qualquer indivíduo que apresente os sintomas anteriores e, no período de defervescência da febre, apresente um ou mais destes sinais de alarme: dor abdominal intensa e contínua, vômitos, acúmulo de líquidos (ascites, derrame pleural, derrame pericárdico), sangramento de mucosas, irritabilidade, hipotensão postural e/ou lipotimia, hepatomegalia, e aumento progressivo do hematócrito com rápida trombocitopenia. A maioria dos sinais de alarme resulta do aumento da permeabilidade vascular, marcando o início do deterioramento clínico do paciente e sua possível evolução para quadro de dengue severa.
- c) Dengue severa (DS) ou grave – Qualquer indivíduo que apresente as seguintes manifestações: choque devido ao extravasamento de plasma grave evidenciado por taquicardia, extremidades frias e tempo de enchimento capilar ≥ 3 segundos, pulso fraco ou indetectável, pressão diferencial convergente < 20 mmHg que pode acarretar em acúmulo de líquidos com insuficiência respiratória; hemorragias graves segundo avaliação médica; ou sinais de comprometimento grave de órgãos, como: dano hepático importante (AST/ALT > 1000), sistema nervoso central (alteração de consciência), coração (miocardite) ou outros órgãos.

Nacionalmente, a nova classificação da dengue passou a ser adotada a partir de 2014 (BRASIL, 2016b). Enquanto a antiga se destinava a estratificar os pacientes de acordo com o nível de progressão da dengue (especialmente associada ao extravasamento de plasma), a mais recente passou a estratificar os pacientes considerando seus sinais e sintomas clínicos, de acordo com a gravidade da doença (BARNIOL et al., 2011; LIMA et al., 2013; NARVAEZ et al., 2011; WHO, 2009; WHO, 2012). As orientações revistas visam melhorar a triagem e o tratamento adequado dos pacientes, pois a identificação precoce dos sinais de alerta deve alertar os médicos quanto ao prognóstico, permitindo a tomada de decisões corretas para o manejo dos casos (GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2016). Alguns estudos já demonstraram o aumento na sensibilidade para a identificação de casos graves de dengue a partir da revisão da classificação (CAVALCANTI et al., 2013; GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2016; LIMA et al., 2013; NARVAEZ et al., 2011).

2.9 Diagnóstico Clínico e Laboratorial da Dengue

O diagnóstico da dengue envolve critérios clínicos e laboratoriais, onde também são avaliadas as informações epidemiológicas sobre a região/cidade de origem dos pacientes com suspeita clínica da doença, ou algum relato de histórico de viagem para regiões endêmicas de dengue (BACK; LUNDKVIST, 2013; TANG; OOI, 2012; XAVIER et al., 2014). Considerando que a doença se caracteriza por apresentar amplo espectro de manifestações clínicas muitas vezes inespecíficas, a anamnese e o exame físico inicial do paciente são pontos relevantes para o diagnóstico diferencial da dengue nas seguintes síndromes clínicas (BRASIL, 2016b; DIAS et al., 2010; WHO, 2009; WHO, 2012):

- a) Síndrome Febril: Enterovirose, *influenza* e outras viroses respiratórias, hepatites virais, malária, febre tifoide, chikungunya e outras arboviroses (oropouche, zika).
- b) Síndrome Exantemática Febril: Rubéola, sarampo, escarlatina, eritema infeccioso, exantema súbito, enterovirose, mononucleose infecciosa, parvovirose, citomegalovirose, outras arboviroses (mayaro), farmacodermias, doença de Kawasaki, doença de Henoch-Schonlein, chikungunya, zika etc.
- c) Síndrome Hemorrágica Febril: hantavirose, febre amarela, leptospirose, malária grave, riquetsioses e púrpuras.

- d) Síndrome Dolorosa Abdominal: apendicite, obstrução intestinal, abscesso hepático, abdome agudo, pneumonia, infecção urinária, colecistite aguda etc.
- e) Síndrome do Choque: meningococemia, septicemia, meningite por influenza tipo B, febre purpúrica brasileira, síndrome do choque tóxico e choque cardiogênico (miocardites).
- f) Síndrome Meníngea: meningites virais, meningite bacteriana e encefalite.

Para o diagnóstico clínico da dengue, a presença de outros agravos pode ser considerada conforme a situação epidemiológica da região (DIAS et al., 2010). Por exemplo, com a confirmação de casos autóctones de chikungunya (desde 2014) e de zika (desde 2015), os profissionais de saúde devem se atentar a algumas particularidades sobre o diagnóstico diferencial e precoce entre a dengue e estas outras arboviroses, a fim de sejam adotadas medidas adequadas de manejo clínico dos casos, já que a doença apresenta elevado potencial de complicações e morte em relação à chikungunya e zika (BRASIL, 2016b). Com base nas evidências clínicas associadas às informações epidemiológicas e os achados laboratoriais, os casos de dengue deverão ser categorizados conforme a nova classificação proposta pela OMS a partir de 2009, que passou a ser adotada nacionalmente pelo Ministério da Saúde a partir de 2014 (BRASIL, 2016b; TANG; OOI, 2012).

Avaliando que a infecção pelo DENV pode produzir manifestações clínicas inespecíficas e muitas vezes o diagnóstico clínico carece de especificidade, os exames laboratoriais são uma ferramenta confiável de assistência ao médico para confirmação dos casos de dengue, em associação com os dados colhidos inicialmente na consulta médica (TANG; OOI, 2012; XAVIER et al., 2014). O diagnóstico laboratorial não é necessário para o manejo clínico do paciente em algumas situações excepcionais de indisponibilidade de testes, fazendo com que os casos suspeitos de dengue identificados durante período epidêmico sejam confirmados somente com base nos critérios clínico-epidemiológicos (BACK; LUNDKVIST, 2013; DIAS et al., 2010; TANG; OOI, 2012; WHO, 2012).

As características para que um teste laboratorial confirmatório da dengue seja considerado “ideal” são dependentes de sua finalidade, já que podem ser empregados no diagnóstico precoce da doença, na investigação de surtos e vigilância epidemiológica, ou ainda em ensaios de eficácia de vacinas (GUZMAN; HARRIS, 2015; PEELING et al., 2010). Há de se considerar também em alguns contextos a necessidade de realização de testes de diagnóstico baratos e específicos e o uso de novas técnicas para detecção precoce

da doença grave com base em biomarcadores, que possam ser utilizados na vigilância e gestão clínica dos casos, permitindo a intervenção precoce e o desenvolvimento de medidas de prevenção e controle de epidemias, para redução da morbimortalidade causada pela dengue (GUZMAN; KOURI, 2004; PEELING et al., 2010).

A janela ideal para o diagnóstico laboratorial da dengue se dá a partir do início da febre, até por volta de 10 dias após estabelecimento da doença, mas considerando que nem todos os pacientes são diagnosticados dentro deste período, um teste de diagnóstico ideal deve ser sensível, independentemente da fase de infecção (PEELING et al., 2010). Algumas condições principais devem ser consideradas para que o diagnóstico da dengue seja adequado (Figura 10): presença de marcadores virológicos e sorológicos em relação ao tempo de infecção pelo vírus; tipo de método de diagnóstico em relação à doença clínica; e características das amostras (WHO, 2012).

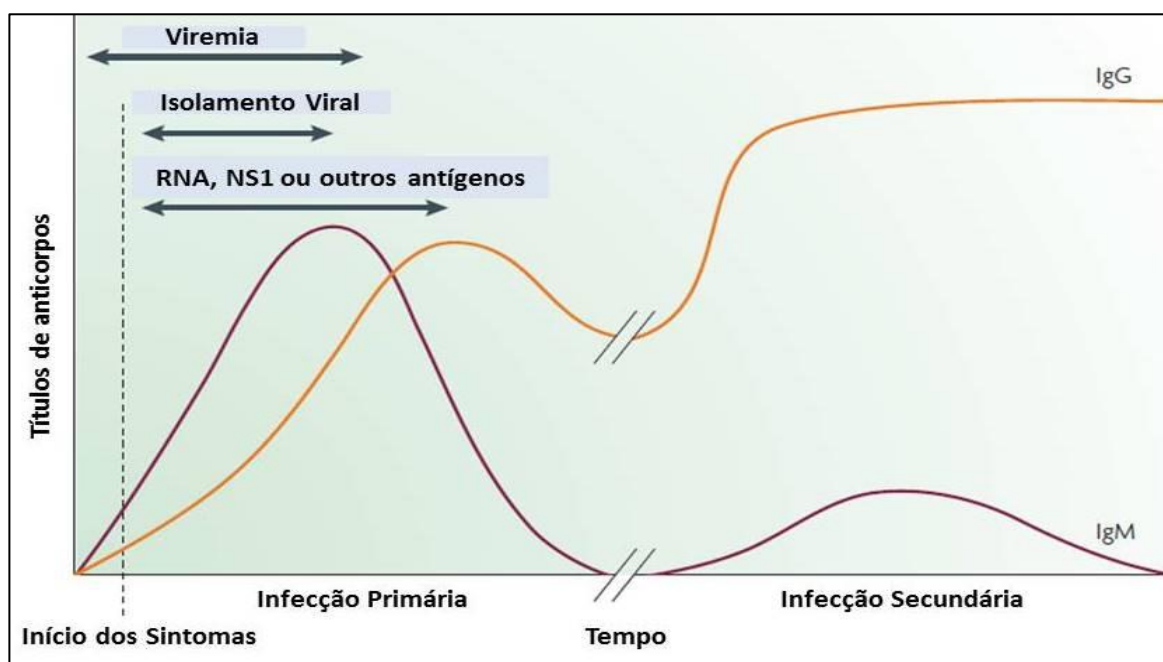


Figura 10 – Principais marcadores da infecção pelo DENV. Os títulos de resposta de IgM e IgG variam, dependendo se a infecção é primária ou secundária. (Fonte: PEELING et al., 2010).

O soro é a amostra de escolha para o diagnóstico da dengue, tanto por métodos diretos quanto indiretos, embora o plasma, o sangue total e os tecidos (como fígado, baço, nódulos linfáticos, pulmões, e cérebro coletadas de casos fatais) também sejam amostras úteis para realização do diagnóstico (GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2016; PEELING et al., 2010; RIGAU-PÉREZ, 1998). Um número considerável de diferentes estratégias está disponível para a realização do diagnóstico laboratorial da dengue (TANG;

OOI, 2012), sendo que as alterações causadas pela doença são apresentadas sob dois aspectos: testes específicos e testes inespecíficos (XAVIER et al., 2014)

Nos testes específicos (Figura 11), a confirmação laboratorial da dengue pode variar entre métodos diretos (para isolamento viral em cultura de células, identificação do ácido nucleico ou de antígenos virais), e métodos indiretos (para detecção de anticorpos específicos produzidos contra o vírus) (GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2016; PEELING et al., 2010; WHO, 2012). Por sua vez, os testes inespecíficos e realizados como complemento no diagnóstico da laboratorial da dengue são: hemograma, velocidade de hemossedimentação (VHS), dosagem de fibrinogênio, tempo de tromboplastina parcial (TTP), tempo de protrombina (TP), dosagem do complemento C3, dosagem de proteínas totais e frações, ureia, creatinina, eletrólitos (sódio, potássio e cloro), transaminases (ALT e AST), proteína C-reativa (PCR) e gasometria (XAVIER et al., 2014).

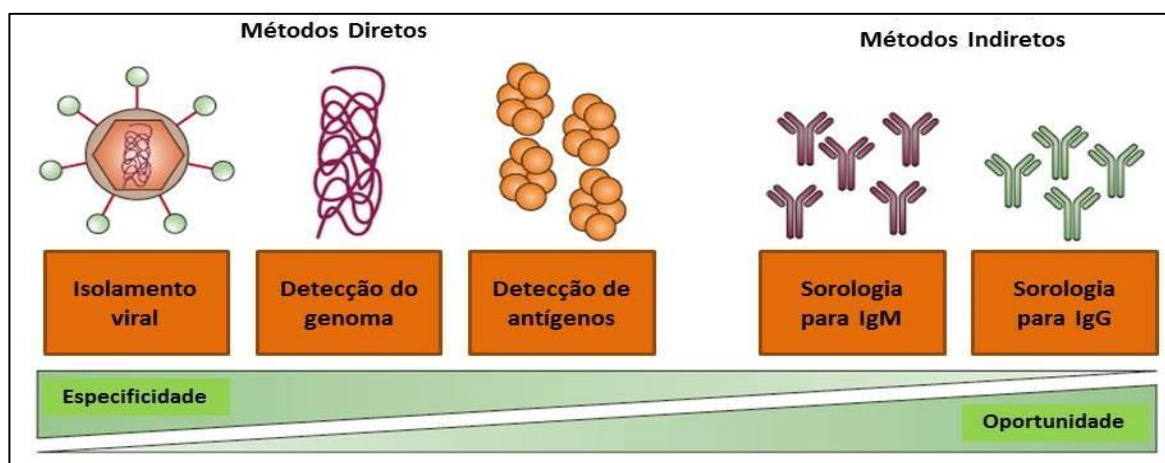


Figura 11 – Métodos laboratoriais diretos e indiretos para o diagnóstico laboratorial da dengue. Oportunidade refere-se ao fato de que o teste para detecção de anticorpos é geralmente a opção de diagnóstico mais prático disponível. (Fonte: PEELING et al., 2010 – Adaptado).

2.9.1 Métodos Diretos

A detecção direta do DENV pode potencialmente ser usada para identificação precoce, definitiva e específica dos sorotipos virais durante a fase aguda da doença, desde que vírus vivos ou seus componentes (RNA ou antígenos) geralmente são detectados em amostras de pacientes entre 0 e 7 dias após início dos sintomas, sendo o período de viremia do DENV correlacionado ao período de duração da febre (GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2016; PEELING et al., 2010). O vírus permanece viável para ser identificado em amostras armazenadas a 4°C por até 5 dias, porém caso o diagnóstico não seja realizado dentro deste prazo, as amostras devem ser armazenadas por -60°C ou

temperatura menor (RIGAU-PÉREZ et al., 1998). Em geral, alguns métodos diretos não são rotineiramente realizados na rotina laboratorial, embora alguns kits comerciais sejam validados e estejam disponíveis para o diagnóstico da dengue (PEELING et al., 2010).

O isolamento viral é realizado a partir de amostras de soro, que podem ser inoculadas via intratorácica em mosquitos adultos (sendo *A. aegypti*, *A. albopictus*, *Toxorhynchites amboinensis*, e *T. splendens* as 4 principais espécies), em cultura de células (sendo este o padrão ouro, usando linhagens celulares C6/36 de *A. albopictus* e APC1 de *A. pseudocutelaris*, ou linhagens de células Vero, LLC-MK2 e BHK21 de mamíferos), ou por inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos, para posteriormente serem purificadas (GUBLER, 1998; GUZMAN et al., 2010; TANG; OOI, 2012; XAVIER et al., 2014; YAMADA et al., 2002). Após o período de incubação para a multiplicação viral (1-2 semanas), podem-se observar as alterações morfológicas decorrentes do efeito citopático das células, como lise, formação de vacúolos, sincícios e corpúsculos de inclusão (YAMADA et al., 2002). Mesmo não sendo uma técnica empregada no diagnóstico laboratorial de rotina, ela é útil em contexto de pesquisa para a identificação dos sorotipos do DENV, por ensaios de imunofluorescência com anticorpos monoclonais sorotipo-específicos, ou por técnica de RT-PCR (do inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) (GUBLER, 1998; GUZMAN et al., 2010; PEELING et al., 2010; TANG; OOI, 2012; XAVIER et al., 2014).

O RNA viral pode ser detectado após ser extraído de amostras de soro, tecidos, sangue total, urina, saliva, líquido ou sobrenadante de cultura de células, utilizando-se vários protocolos de RT-PCR desenvolvidos para sua identificação rápida e sensível a partir de iniciadores direcionados para regiões sorotipo-específicas do genoma (GUZMAN et al., 2010; PEELING et al., 2010; XAVIER et al., 2014), como por exemplo, os genes *C/prM*, *E* e *NS5* (BRONZONI et al., 2005; CHAO; DAVIS; CHANG; 2007; FIGUEIREDO et al., 2014; LANCIOTTI et al., 1992; ROCHA et al., 2013). Técnicas de *Nested* PCR melhoram a sensibilidade de detecção, pois o produto da amplificação inicial é utilizado como alvo para uma segunda rodada de amplificação (GUZMAN et al., 2010; PEELING et al., 2010). Mais recentemente, ensaios de única etapa de RT-PCR em tempo real foram desenvolvidos permitindo a rápida quantificação dos títulos de DENV e a identificação dos sorotipos (*multiplex*), por meio de sondas oligonucleotídicas fluorescentes (GUZMAN et al., 2010; PEELING et al., 2010; TANG; OOI, 2012).

Um dos métodos para detecção de antígenos virais consiste em ensaios direcionados para NS1, uma glicoproteína solúvel altamente conservada sintetizada por todos os *Flavivirus* e essencial para a replicação viral, que está presente em altas concentrações nas amostras de soro, plasma ou sangue total fresco, entre 1-9 dias após o início dos sintomas, persistindo por até 18 dias após a fase febril (GUZMAN et al., 2010; PEELING et al., 2010; TANG; OOI; 2012; XAVIER et al., 2014). O NS1 pode ser identificado por meio de ensaios sensíveis e específicos, como: ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), um ensaio quantitativo; ou por testes rápidos imunocromatográficos comerciais de fluxo lateral, que são qualitativos (GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2010; PEELING et al., 2010; XAVIER et al., 2014).

Outro método para o diagnóstico de antígenos virais em amostras de tecidos (como fígado, baço, pulmões e linfonodos) é a imunohistoquímica, em que são utilizadas enzimas e substratos colorimétricos contendo anticorpos monoclonais sorotipo-específicos (DIAS et al., 2010; GUBLER, 1998; GUZMAN; KOURI, 2004; GUZMAN et al., 2010; PEELING et al., 2010). Entretanto, como a biópsia desses órgãos é raramente indicada em pacientes com suspeita de infecção pelo DENV, este método é geralmente empregado somente para diagnóstico *post mortem* e confirmação dos casos fatais (DIAS et al., 2010; KAO et al., 2005).

2.9.2 Métodos Indiretos

A detecção indireta do DENV ocorre baseada nas diferenças de padrões de respostas de anticorpos observados quando os pacientes experimentam uma infecção primária ou secundária pelo vírus, conforme já observado na Figura 10 (GUZMAN et al., 2016; PEELING et al., 2010). Os testes sorológicos são mais frequentemente utilizados na rotina laboratorial para o diagnóstico da dengue, em virtude de sua facilidade de execução quando comparados a técnicas como a cultura de células ou a detecção de RNA viral (GUZMAN et al., 2010; GUZMAN et al., 2016; PEELING et al., 2010; TANG; OOI, 2012). Porém, a principal limitação para o uso destes testes consiste na alta reatividade cruzada observada, tanto entre os 4 sorotipos do DENV, assim como também com outros diferentes *Flavivirus* circulantes (GUZMAN; KOURI, 1996; GUZMAN et al., 2016; PEELING et al., 2010; XAVIER et al., 2014), sendo que os mesmos possuem maior importância epidemiológica do que propriamente clínica (DIAS et al., 2010).

Com relação ao exposto na Figura 10, nas infecções primárias a imunoglobulina M (IgM) é detectada de 3-5 dias ou mais após o início das manifestações clínicas na maioria dos indivíduos infectados, sendo que seus níveis podem se elevar por até 2 semanas, e a imunoglobulina G (IgG) é detectada a partir de 10-15 dias (GUZMAN; HARRIS, 2015; PEELING et al., 2010; TANG; OOI, 2012; XAVIER et al., 2014). Nas infecções secundárias, IgM aparece mais cedo ou no mesmo intervalo de tempo, porém em títulos mais baixos do que na infecção primária ou podem até ser indetectáveis em alguns casos, enquanto IgG está presente desde a infecção anterior, e seus títulos se elevam rapidamente pela estimulação de células B de memória (GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2010; PEELING et al., 2010; TANG; OOI, 2012; XAVIER et al., 2014).

O MAC-ELISA (do inglês *M antibody capture ELISA*) é um teste baseado na detecção de IgM no soro utilizando IgM humano específico humano ligado à fase sólida, sendo que o ensaio emprega uma mistura de quatro antígenos do DENV (geralmente derivados de vírus presentes em sobrenadantes de cultura de células ou preparações de cérebros de camundongos recém-nascidos) (GUZMAN et al., 2010). Frequentemente é executado como um teste de diluição única e não quantitativo, sendo que sua sensibilidade e especificidade são fortemente influenciadas pela qualidade do antígeno usado (GUZMAN; KOURI, 2004; GUZMAN et al., 2010; PEELING et al., 2010). O MAC-ELISA tornou-se o teste sorológico mais amplamente utilizado para o diagnóstico da dengue nos últimos anos por sua fácil execução, sendo uma ferramenta valiosa para a vigilância da doença (DIAS et al., 2010; GUBLER, 1998; PEELING et al., 2010).

O ELISA baseado na detecção de IgG no soro pode ser usado para diagnosticar infecções passadas e recentes pelo DENV, se amostras pareadas (da fase aguda e da fase convalescente) forem colhidas dentro de um intervalo de tempo correto para demonstrar a soroconversão (GUZMAN et al., 2010; PEELING et al., 2010). O ensaio emprega os mesmos antígenos utilizados no MAC-ELISA, e alguns protocolos usam diluições de soro para títulos de IgG, enquanto outros consideram a proporção de IgM para IgG (GUZMAN et al., 2010). O teste é simples, de fácil execução e útil para ensaios em grandes quantidades, porém é limitado por não possuir especificidade e apresentar ampla reatividade cruzada com os 4 sorotipos do DENV e com outros *Flavivirus*, não sendo útil para sua diferenciação (GUBLER, 1998; GUZMAN et al., 2010; PEELING et al., 2010).

Historicamente, outros testes também são empregados na rotina laboratorial para a detecção da soroconversão a partir da diferenciação de anticorpos IgG de infecções

passadas e recentes pelo DENV (DIAS et al., 2010; GUBLER, 1998; GUZMAN; KOURI, 2004; GUZMAN et al., 2010; GUZMAN; HARRIS, 2015; MALAVIGE et al., 2004; TANG; OOI, 2012; XAVIER et al., 2014), como por exemplo: inibição da hemaglutinação (HI, do inglês *Haemagglutination Inhibition*), fixação do complemento (CF, do inglês *Complement Fixation*), e testes de neutralização, como a técnica de neutralização por redução em placa (PRNT, do inglês *Plaque Reduction Neutralization Technique*), e o ensaio de microneutralização. Assim como o ELISA para captura de IgG, estas técnicas também têm como limitação a reatividade cruzada com os 4 sorotipos do DENV e com outros *Flavivirus* (TEIXEIRA et al., 2014).

Atualmente, a detecção indireta do DENV baseada na resposta de anticorpos em amostras de soro, plasma ou sangue total também é realizada na rotina laboratorial por meio de diversos kits de testes rápidos imunocromatográficos de fluxo lateral em fase sólida, para demonstração simultânea da presença de IgM e IgG (GUZMAN et al., 2016; TANG; OOI, 2012; XAVIER et al., 2014). Tais testes têm caráter qualitativo para detecção dos 4 sorotipos do DENV (pois há conjunto de proteínas recombinantes do envelope viral) e são empregados como exames de triagem pelo fato dos resultados serem disponibilizados de forma mais rápida, porém seus resultados necessitam de confirmação posterior por meio de técnicas mais sensíveis (DIAS et al., 2010).

2.10 Fatores que Influenciam na Susceptibilidade à Infecção pelo DENV e Severidade da Dengue

Em humanos, a infecção pelo DENV resulta em um espectro de evolução clínica, variando de uma doença febril não complicada e autolimitada para formas mais severas, caracterizadas pelo aumento de manifestações hemorrágicas (aumento da permeabilidade vascular, trombocitopenia e hemorragias) que podem levar ao choque hipovolêmico potencialmente fatal (COFFEY et al., 2009; FANG et al., 2012; HARAPAN et al., 2013b; SIM; HIBBERD, 2016). Nos últimos 50 anos, apesar de investigações intensivas e extensivas sobre a patogenia da dengue severa, os mecanismos pelos quais as respostas imunes inata e adaptativa ao DENV protegem contra ou contribuem para a ocorrência da doença grave permanecem ainda controversos (DIAMOND; PIERSON, 2015; JAIN; CHATUVERDI; JAIN, 2014; ROTHMAN et al., 2014). Dessa forma, é provável que a base fisiopatológica da dengue e de sua progressão para gravidade seja de origem biológica

multifatorial que incluem fatores virais, do ambiente e do hospedeiro (Figura 12) (BACK; LUNDKVIST, 2013; COFFEY et al., 2009; GUZMAN; KOURI, 2004; GUZMAN et al., 2016; HERRERO et al., 2013; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

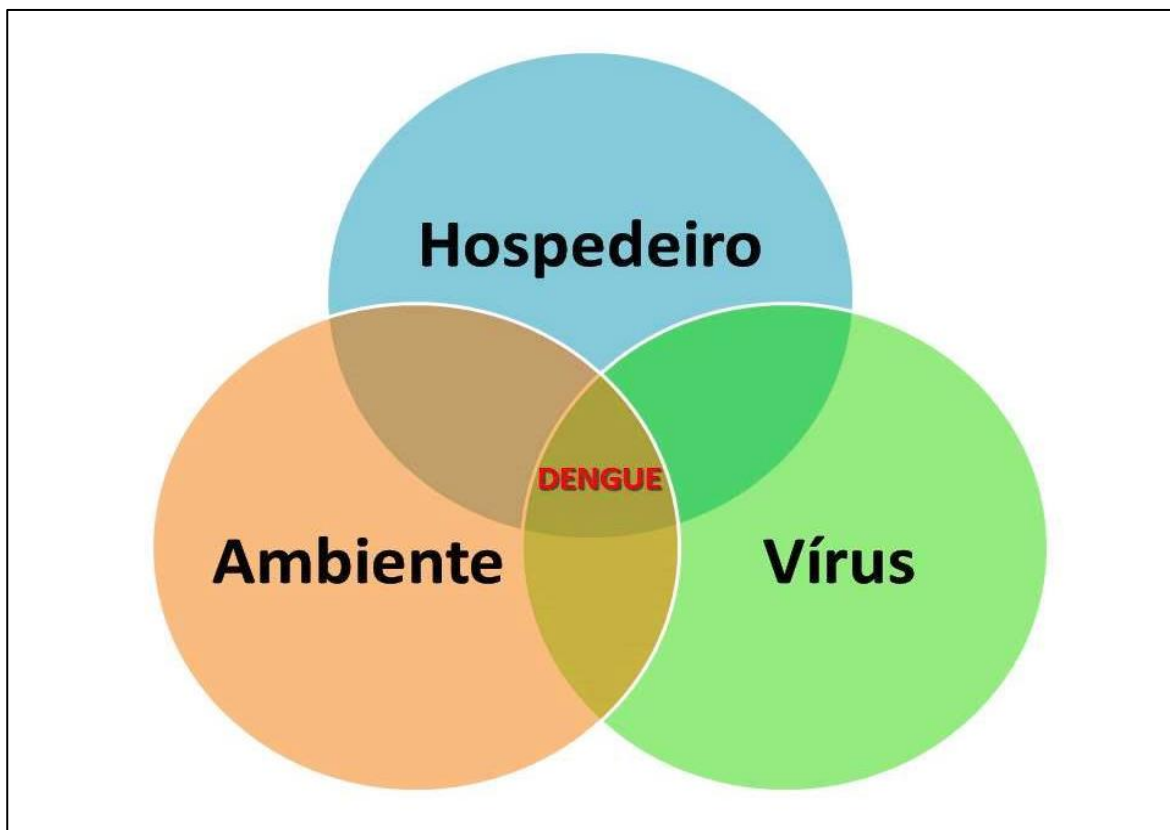


Figura 12 – Interação entre os fatores que influenciam na susceptibilidade e severidade da dengue. Este modelo proposto relaciona fatores inerentes ao vírus, ao ambiente e ao hospedeiro. A exata contribuição de cada um deles não é totalmente esclarecida e pode variar em cada caso.

2.10.1 Fatores Relacionados ao Vírus

Um dos principais elementos relacionados ao vírus que determina o potencial do DENV em causar doença resulta do papel das proteínas estruturais e não estruturais na indução da resposta de anticorpos durante a infecção (CEDILLO-BARRÓN et al., 2014; HERRERO et al., 2013; ROTHMAN et al., 2011). Recentes estudos também têm focado no papel de eventos intracelulares na patogênese da dengue, em que a entrada do DENV na célula hospedeira é seguida por rápida sucessão de acontecimentos como respostas às proteínas desdobradas, presença de corpos lipídicos e lipofagia, estresse do retículo endoplasmático e recente demonstração de autofagia, e a turbulência causada por tais eventos pode resultar na depuração viral/aumento da multiplicação, e sobrevivência da célula hospedeira/apoptose (JAIN; CHATUVERDI; JAIN, 2014).

Outro fator de grande impacto sobre os efeitos patológicos na infecção causada pelo DENV refere-se às diferentes células e tecidos pelos quais o vírus apresenta tropismo e habilidade de multiplicação (COFFEY et al., 2009; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; WHITEHORN; SIMMONS, 2011). Após sua inoculação pela picada do mosquito, o vírus inicialmente se multiplica nas células de Langerhans (DCs da epiderme), que serão ativadas, migrar para os linfonodos, infectar linhagens de fagócitos mononucleares e induzir uma robusta resposta pró-inflamatória para conter a disseminação viral (BACK; LUNDKVIST, 2013; JOHNSTON; HALLIDAY; KING, 2000; LIBRATY et al., 2001). A infecção é amplificada dentro dos linfonodos e a viremia pode ser detectada na circulação após o vírus entrar via sistema linfático, acarretando na infecção de monócitos circulantes e a propagação do DENV para macrófagos presentes em órgãos secundários, como baço, fígado e medula óssea (BACK; LUNDKVIST, 2013).

Um mecanismo que também pode justificar o amplo espectro de manifestações clínicas na dengue entre as populações é que determinadas estirpes do DENV exibem variáveis graus de virulência, quando certos sorotipos, genótipos e/ou linhagens do vírus acarretam em maior gravidade da doença, conforme já investigado em estudos clínicos e epidemiológicos (BACK; LUNDKVIST, 2013; BALMASEDA et al., 2006; COFFEY et al., 2009; GUBLER, 1998; GUZMAN et al., 2016; KURANE, 2007; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; RICO-HESSE et al., 1997; WHITEHORN; SIMMONS, 2011). Dados epidemiológicos têm sugerido que certos genótipos podem diferir em sua habilidade de causar doença severa, mediante condições adequadas que acarretem no aumento do nível de anticorpos produzidos (SIM; HIBBERD, 2016). Outros estudos também têm indicado que a dengue grave ocorre principalmente durante a infecção secundária por múltiplos sorotipos do DENV, resultando em síndrome aguda de permeabilidade vascular (GUZMAN et al., 2010; GUZMAN; HARRIS, 2015).

2.10.2 Fatores Relacionados ao Ambiente

A virulência do DENV é reforçada pela sua magnitude de replicação nos hospedeiros humanos, acarretando no aumento de sua transmissão para os mosquitos a partir de um perfil diferencial de infecção por diferentes genótipos (BACK; LUNDKVIST, 2013; COFFEY et al., 2009; COLOGNA; ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2005). A transmissão do DENV também é um processo dependente da presença de mosquitos do gênero *Aedes* (vetores de ampla disseminação geográfica), e fatores como densidade dos

vetores, chuva, temperatura, variações climáticas sazonais e capacidade vetorial são importantes parâmetros a serem avaliados na compreensão das epidemias de dengue (BACK; LUNDKVIST, 2013; COFFEY et al., 2009; HALSTEAD, 2008; WHO, 2009). Fêmeas de *A. aegypti* se tornaram vetores altamente competitivos e adaptados ao ambiente urbano, devido sua natureza antropofílica e estreita proximidade com os hospedeiros humanos, implicando em elevada frequência de contato durante os ciclos de repasto sanguíneo (BACK; LUNDKVIST, 2013).

2.10.3 Fatores Relacionados ao Hospedeiro Humano

Diversas pesquisas têm focado em revelar o papel de mecanismos imunopatológicos do hospedeiro humano na severidade da dengue (FANG et al., 2012; GUZMAN et al., 2016; LAN; HIRAYAMA et al., 2011). Infecções primárias por um sorotipo particular do DENV resultam em imunidade sorotipo-específica por toda a vida, bem como em imunidade de curto prazo contra outros sorotipos heterólogos, seja pela produção de anticorpos neutralizantes ou linfócitos T de memória específicos (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; GUZMAN; HARRIS, 2015; HERRERO et al., 2013; JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013). Evidências demonstram que alguns eventos críticos da resposta imune apresentam efeitos controversos em pacientes com infecções secundárias a partir de um sorotipo heterólogo, variando entre a recuperação da infecção ou o agravamento da patogênese (COFFEY et al., 2009; FANG et al., 2012; GUZMAN et al., 2016; KURANE, 2007).

Na década de 1970, Halstead e colaboradores inicialmente elucidaram o fenômeno denominado ADE (Figura 13), no qual anticorpos sub-neutralizantes (produzidos após a infecção primária ou adquiridos na fase infantil via infecção materna) presentes para um sorotipo de DENV se ligam às partículas virais durante uma infecção secundária por outro sorotipo e não conseguem neutralizá-lo, levando ao aumento da viremia por ligação do complexo antígeno-anticorpo às células do hospedeiro via receptores gama para fragmento cristalizável (Fc γ R) (HALSTEAD, 1970; HALSTEAD; O'ROURKE, 1977; HALSTEAD; NIMMANNITYA; COHEN, 1970). Outras possíveis teorias imunopatológicas como a indução de apoptose das células infectadas pelo DENV, a produção exacerbada de citocinas e de células T de reação cruzada também foram elucidadas para justificar o desenvolvimento da severidade da dengue (GAGNON et al., 2002; GREEN; ROTHMAN, 2006; FANG et al., 2012; MATHEW; ROTHMAN, 2008).

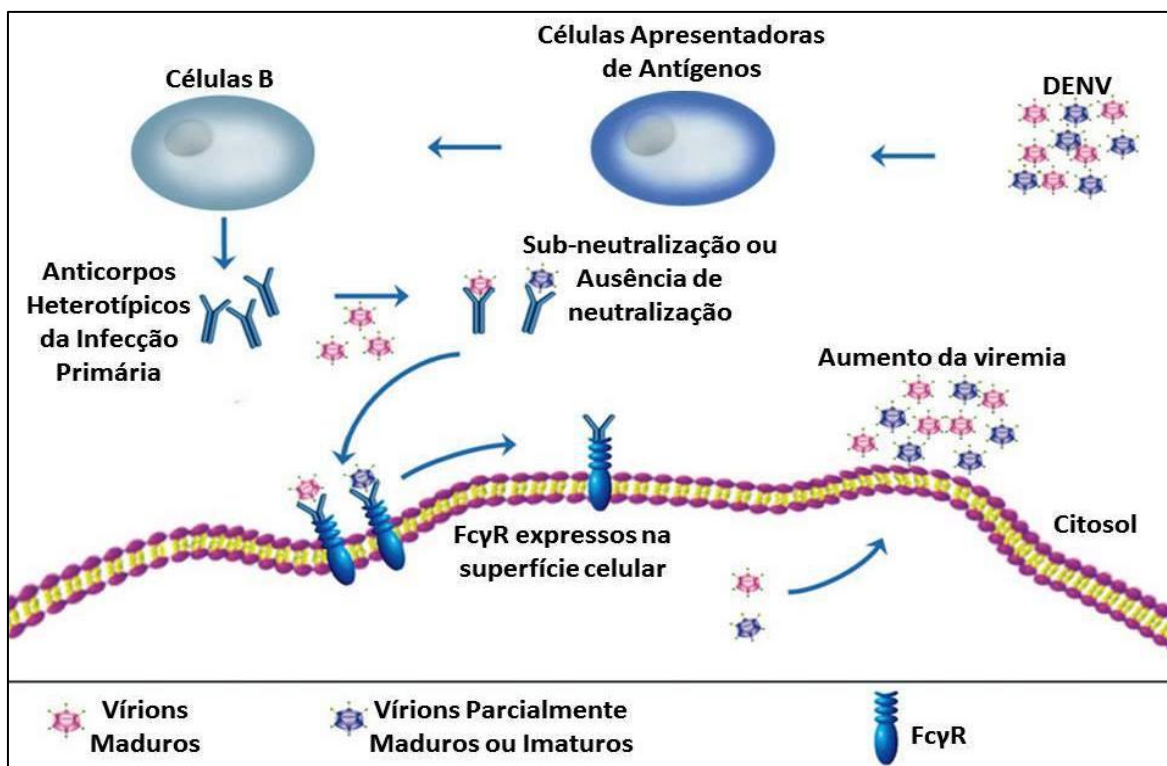


Figura 13 - Fenômeno de potencialização mediada por anticorpos (ADE) na infecção pelo DENV. (Fonte: FANG et al., 2012 – Adaptado).

A severidade da dengue também pode ser modulada por outros fatores de risco inerentes aos hospedeiros humanos que já foram anteriormente investigados. Dentre eles destacam-se: doenças crônicas pré-existentes como asma, diabetes, anemia falciforme e outras (FANG et al., 2012; GUZMAN; HARRIS, 2015); tipo sanguíneo (COFFEY et al., 2009; KALAYANAROOJ et al., 2007; SILVA, 2013); idade (BACK; LUNDKVIST, 2013; COFFEY et al., 2009; FANG et al., 2012; GUBLER, 1998; GUZMAN; KOURI, 2002; GUZMAN et al., 2016; NGUYEN et al., 2005); sexo (GUZMAN; KOURI, 2002; GUZMAN et al., 2016); estado nutricional (COFFEY et al., 2009; NGUYEN et al., 2005); e etnicidade (CHACÓN-DUQUE et al., 2014; COFFEY et al., 2009; FEITOSA et al., 2016; GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2016; SIERRA et al., 2017).

Diversos estudos genômicos de associação (GWAS, do inglês *Genome-wide Association Study*) entre casos e controles foram realizados pelo mundo no intuito de identificar fatores genéticos do hospedeiro que estejam associados com a patogênese de algumas das mais conhecidas doenças infecciosas, incluindo a dengue e outras arboviroses (CHAAITHANYA et al., 2016; CHAPMAN; HILL, 2012; GUZMAN et al., 2016; JAEGER et al., 2015; KRISHNAN; GARCIA-BLANCO, 2013; LOEB, 2013; PRADA-

ARISMENDY; CASTELLANOS, 2006; SIM; HIBBERD, 2016). Tais estudos têm mostrado a presença de SNPs como importantes fatores do hospedeiro que atuam na regulação da variação de expressão em genes humanos, com fortes evidências de associação com proteção, susceptibilidade e/ou progressão para formas clínicas mais graves da dengue (BACK; LUNDKVIST, 2013; COFFEY et al., 2009; FANG et al., 2012; HARAPAN et al., 2013a; HARAPAN et al., 2013b; HERRERO et al., 2013; LAN; HIRAYAMA, 2011; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

2.11 Influências de Polimorfismos Genéticos na Patogênese da Dengue e na Modulação dos Sintomas Clínicos

Importantes evidências da relação entre fatores genéticos do hospedeiro e a variação de resultados nestas associações com os casos de dengue têm sido extensivamente estudadas por meio de metodologias variadas, como estudos de caso-controle, rastreamento de genes candidatos e estudos genômicos de associação, porém, em muitos casos apresentam resultados controversos em todo o mundo (COFFEY et al., 2009; FANG et al., 2012; GUZMAN et al., 2016; HARAPAN et al., 2013a; HARAPAN et al., 2013b; LAN; HIRAYAMA, 2011). Diferentes populações exibem variáveis associações relacionadas à proteção, susceptibilidade ou risco de severidade para a dengue, decorrentes das variações nas sequências de DNA tanto no hospedeiro quanto no próprio patógeno (CHATURVEDI; NAGAR; SHRIVASTAVA, 2006; COFFEY et al., 2009; FANG et al., 2012).

Conforme observado na Figura 14, alguns genes candidatos estão relacionados principalmente com a heterogeneidade de moléculas envolvidas na resposta imune do hospedeiro perante a infecção pelo DENV (FANG et al., 2012). Dentre estes marcadores genéticos que modulam a infectividade, severidade ou resistência à doença, estudos iniciais destacaram genes relacionados ao HLA, que compõem o complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), em que as moléculas de classe I apresentam peptídeos patogênicos para células T CD8+, enquanto as moléculas de classe II os apresentam para células T CD4+ (CHATURVEDI; NAGAR; SHRIVASTAVA, 2006; COFFEY et al., 2009; HARAPAN et al., 2013a, STEPHENS, 2010).

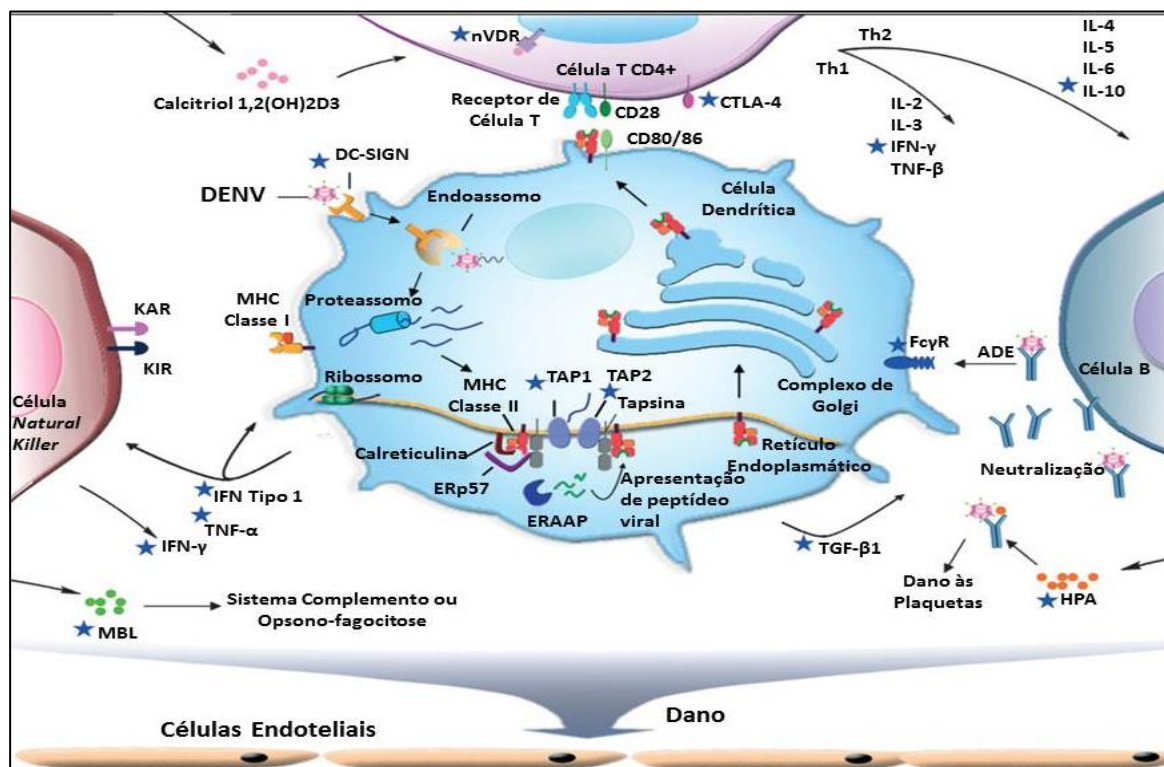


Figura 14 – Moléculas da resposta imune do hospedeiro em que *locus* de polimorfismos têm sido associados com a patogênese causada pelo DENV (Estrelas Azuis). (Fonte: FANG et al., 2012 – Adaptado).

Outros estudos desenvolvidos recentemente também passaram a apontar outros genes não relacionados ao HLA que estão associados com proteção, susceptibilidade ou severidade de formas clínicas da dengue (Figura 14). Tais marcadores podem variar desde aqueles relacionados à produção de citocinas (pró e anti-inflamatórias) e quimiocinas, assim como diversas classes de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated Molecular Pattern*), presentes na superfície de células de defesa e responsáveis pelo reconhecimento padrão de estruturas virais que iniciarão a resposta imune contra o DENV, dentre outros mais (FANG et al., 2012; HARAPAN et al., 2013a; HARAPAN et al., 2013b; LAN; HIRAYAMA, 2011; STEPHENS, 2010).

Citocinas são glicoproteínas de sinalização celular, secretadas por numerosas células da imunidade natural e adquirida, que trabalham ativamente na comunicação intracelular e apresentam funções biológicas que podem variar entre efeitos de sinergismo ou de antagonismo, em resposta a muitos tipos de microrganismos e outros antígenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010; FANG et al., 2012). Segundo a teoria mediada por citocinas que ocorre na dengue, a permeabilidade vascular aumentada é decorrente de interações entre citocinas, fazendo

com que o DENV infecte macrófagos e ative células T CD8+/CD4+, que por sua vez irão acarretar no extravasamento de plasma (COFFEY et al., 2009; LAN; HIRAYAMA, 2011; ROTHMAN, 2003; ROTHMAN, 2010).

Muitos polimorfismos prevalentes em genes de citocinas podem ser correlacionados com a resposta à dengue, justificando o seu envolvimento na patogênese da doença (FANG et al., 2012; HARAPAN et al., 2013a; HARAPAN et al., 2013b; LAN; HIRAYAMA, 2011). Conforme observado em outras pesquisas, pacientes que apresentaram variações nas manifestações clínicas da dengue (CHUANSUMRIT et al., 2013; FANG et al., 2012; FEITOSA et al., 2016; XAVIER-CARVALHO et al., 2013; WANG et al., 2011) ou no tipo de infecção pelo DENV (HERNÁNDEZ et al., 2016) possuíam diferenças significativas nos níveis séricos de citocinas circulantes. Ou seja, a produção destas moléculas é modulada por polimorfismos que podem ser associados com susceptibilidade ou proteção contra a dengue (FERNANDEZ-MESTRE et al., 2004; LAN; HIRAYAMA, 2011, HARAPAN et al., 2013a, HARAPAN et al., 2013b).

2.11.1 TNF- α

O gene *TNF- α* está localizado no cromossomo 6 (6p21.3), entre uma região de genes altamente polimórfica do HLA-B e do HLA de classe III dentro do MHC, sendo flanqueado pelos genes das linfoxinas α e β (*LTA* e *LTB*), conforme observado na Figura 15 (ELAHI et al., 2009; HAJEER; HUTCHINSON, 2001; KHALILULLAH et al., 2014; KROEGER; CARVILLE, ABRAHAM, 1997; QIDWAY; KHAN, 2011; QIDWAY; JAMAL; KHAN, 2012; WILSON et al., 1997; ZHU et al., 2012). A produção da citocina TNF- α ocorre por meio de elementos regulatórios transcricionais e pós-transcricionais (SILVA et al., 2015).

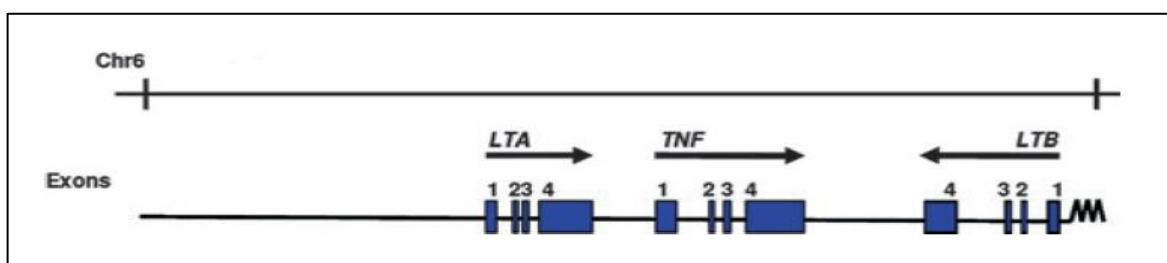


Figura 15 – Representação esquemática dos genes *TNF*, *LTA* e *LTB*. (Fonte: QIDWAY; KHAN, 2011).

Estudos têm descrito a importância de eventos epigenéticos na regulação e expressão de muitas citocinas, onde o padrão de metilação influencia a expressão de

diversos genes, incluindo o *TNF- α* (COHEN et al., 2011; GOMES et al., 2016; SANDERS, 2006; SCHÜBELER, 2015). Alguns polimorfismos (incluindo microssatélites e SNPs) podem afetar o sítio de ligação para fatores transcricionais na região promotora no seu gene, alterando seu processo de transcrição e se associando a diferentes condições inflamatórias (ELAHI et al., 2009; HAJEER; HUTCHINSON, 2001; KHALILULLAH et al., 2014; KROEGER; CARVILLE, ABRAHAM, 1997; QIDWAY; KHAN, 2011; QIDWAY; JAMAL; KHAN, 2012; WILSON et al., 1997; ZHU et al., 2012).

Cerca de 19 isoformas de citocinas têm sido identificadas na superfamília do TNF, em que o *TNF- α* é uma importante citocina pró-inflamatória pleiotrópica produzida por monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T (AZAD; SADEE; SCHLESINGER, 2012; CHATUVERDI, 2006; HAJEER; HUTCHINSON, 2001; YIM; SELVARAJ, 2010), desempenhando papel fundamental na regulação da diferenciação, proliferação e morte celular, assim como na inflamação e nas respostas imunes inata e adaptativa, estando também implicada em uma variedade de doenças infecciosas e autoimunes (CHATUVERDI, 2006; ELAHI et al., 2009; HAJEER; HUTCHINSON, 2001; HARAPAN et al., 2013b; QIDWAY; KHAN, 2011). Esta citocina possui propriedades imunoregulatórias e efeitos sinérgicos com *IFN- γ* na ativação de macrófagos, porém, níveis excessivos de *TNF- α* podem ser responsáveis por efeitos inflamatórios indesejados como febre e mal estar (KHALILULLAH et al., 2014; QIDWAY; JAMAL; KHAN, 2012).

A localização do gene *TNF- α* dentro do MHC e suas atividades biológicas levantaram a hipótese de que polimorfismos nesta região podem contribuir para a patogênese de uma grande variedade de doenças autoimunes e infecciosas (CHATUVERDI, 2006; ELAHI et al., 2009; HAJEER; HUTCHINSON, 2001). Estudos de polimorfismos neste gene em diversas regiões têm mostrado uma variedade de resultados entre populações do mundo, associados estatisticamente com proteção, susceptibilidade ou severidade da dengue, ou ainda sem nenhuma associação definida com os casos ocorridos. Conforme observado na literatura (Tabela 1), os SNPs -1031 C/T (rs1799964), -863C/T (rs1800630), -376 G/A (rs1800750), -308 G/A (rs1800629) e -238 G/A (rs361525) na região promotora do gene *TNF- α* se destacam como as principais variantes polimórficas pesquisadas até então (ELAHI et al., 2009; QIDWAY; KHAN, 2011; KROEGER; CARVILLE, ABRAHAM, 1997; WILSON et al., 1997).

Tabela 1 – Estudos genômicos de associação dos polimorfismos -308 G/A e -238 G/A no gene *TNF- α* relacionados com a patogênese da dengue.

Referências (Autor/Ano)	Populações	Grupos Amostrais Estudados	SNPs Avaliados	Resultados
LOKE et al., 2001	Vietnã	Casos FHD (n = 352) Controles (n = 251) Total = 603	-308 G/A -238 G/A	Sem associação
FERNANDEZ-MESTRE et al., 2004	Venezuela	Casos FD (n = 41) Casos FHD (n = 25) Controles (n = 46) Total = 112	-308 G/A	Susceptibilidade
MOREIRA et al., 2008	Brasil	Casos FD (n = 200) Controles (n = 313) Total = 513	-308 G/A	Sem associação
VEJBAESYA et al., 2009	Tailândia	Casos FD (n = 228) Casos FHD (n = 142) Controles (n = 143) Assintomáticos (n = 65) Total = 578	-308 G/A -238 G/A	Sem associação Susceptibilidade
PEREZ et al., 2010	Cuba	Casos FHD com infecção secundária (n = 43) Controles (n = 99) Total = 142	-308 G/A	Susceptibilidade e Proteção
SILVA, 2010	Brasil	Casos FHD (n = 100) Controles (n = 85) Total = 185	-308 G/A	Sem associação
GARCÍA-TREJO et al., 2011	México	Casos FD (n = 85) Casos FHD (n = 45) Controles (n = 169) Total = 299	-308 G/A -238 G/A	Sem associação Proteção
ALAGARASU et al., 2013	Índia	Casos FD (n = 85) Casos FHD (n = 29) Controles (n = 110) Total = 224	-308 G/A	Sem associação
CHUANSUMRIT et al., 2013	Tailândia	Casos FD (n = 19) Casos FHD (n = 82) Casos outra doença febril associada (n = 11) Controles (n = 106) Total = 218	-308 G/A	Susceptibilidade
XAVIER-CARVALHO et al., 2013	Brasil	Casos severos de crianças com Dengue (n = 88) Controles (n = 335) Total = 423	-308 G/A	Sem associação
ALAGARASU et al., 2015	Índia	Casos FD (n = 87) Casos FHD (n = 45) Controles (n = 108) Total = 240	-308 G/A	Sem associação
DETTOGNI et al., 2015	Brasil	Casos suspeitos de Dengue (n = 96)	-308 G/A	Susceptibilidade
FERNANDO et al., 2015	Sri Lanka	Casos FHD (n = 81) Casos SCD (n = 26) Assintomáticos (n = 62) Total = 169	-308 G/A	Susceptibilidade
SAM et al., 2015	Malásia	Casos FD (n = 86) Casos FHD/SCD (n = 196) Controles (n = 120) Total = 404	-308 G/A -238 G/A	Proteção Susceptibilidade
CANSANÇÃO et al., 2016	Brasil	Casos Dengue (n = 111) Controles (n = 85) Total = 196	-308 G/A	Susceptibilidade
FEITOSA et al., 2016	Brasil	Casos Dengue (n = 80) Casos de outra doença febril não dengue (n = 100) Controles (n = 99) Total = 279	-308 G/A	Sem associação

Conforme discutido na literatura, é possível que tais SNPs dentro da região promotora do gene *TNF- α* tenham influência no nível de produção da citocina, acarretando em diferentes padrões de respostas inflamatórias (HAJEER; HUTCHINSON, 2000). A troca do alelo G pelo alelo A na posição 308 da região promotora do gene é principalmente associada com aumento da produção espontânea ou estimulada de *TNF- α* (ELAHI et al., 2009; HAJEER; HUTCHINSON, 2001; KROEGER; CARVILLE; ABRAHAM, 1997; WILSON et al., 1997). Por sua vez, a troca do alelo G pelo alelo A na posição 238 da região promotora do gene foi associada com diminuição da produção desta citocina (KALUZA et al., 2000). Contudo, outros estudos afirmam que os níveis circulantes da citocina parecem não corresponder somente aos polimorfismos -308 e -238 do gene *TNF- α* (BAYLEY; OTTENHOFF; VERWEIJ, 2004; HAJEER; HUTCHINSON, 2001).

Em resumo, discute-se que o *TNF- α* está associado ao desenvolvimento de formas severas da dengue por diferentes vias (HARAPAN et al., 2013a; HARAPAN et al., 2013b; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; YEN et al., 2008): I) É um potente ativador de células endoteliais, aumentando a permeabilidade capilar; II) Regula positivamente a expressão de fatores teciduais em monócitos e células endoteliais; III) Regula negativamente a expressão da trombosmodulina nas células endoteliais; IV) Tem efeito direto sobre a produção de IL-6, e assim, um efeito indireto sobre a coagulação e a fibrinólise; V) Medeia a morte induzida por ativação de células T, sendo implicado na supressão de células-T periféricas; VI) Induz que as células endoteliais produzam espécies reativas de nitrogênio e oxigênio; VII) Induz a morte celular por apoptose.

Deste modo, é visto que a dengue é uma doença de ocorrência e preocupação mundial. Conhecer sua patogênese e todos os mecanismos envolvidos leva a um melhor entendimento da evolução das suas manifestações clínicas, considerando que a interação entre fatores inerentes ao vírus, ao ambiente e também aos hospedeiros humanos podem ser responsáveis pela dinâmica da resposta imune, acarretando conseqüentemente nas variações de suas apresentações fenotípicas em diversas populações. Investigar se os polimorfismos no gene *TNF- α* podem estar relacionados com esta doença é de grande contribuição para o entendimento de sua patogênese. Além disso, integrar as evidências já descritas na literatura juntamente com as que serão adquiridas a partir de futuros estudos trará importantes perspectivas sobre futuras opções de tratamento e adoção de medidas preventivas para tal agravo de grande importância para a saúde pública mundial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a prevalência dos polimorfismos -308 G/A (rs1800629) e -238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* em pacientes com sintomatologia sugestiva para dengue, atendidos nos serviços públicos e privados de saúde da cidade litorânea de Parnaíba, norte do estado do Piauí, no período de 2015 a 2017, avaliando a influência destas variantes na delimitação da sintomatologia da referida doença, associando-as como fatores que podem predispor à proteção, susceptibilidade ou ao risco de progressão para formas clínicas mais graves.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos -308 G/A e -238 G/A do gene *TNF- α* , em pacientes sintomáticos e assintomáticos infectados pelo *Dengue virus*, e em indivíduos do grupo controle, a fim de avaliar os possíveis efeitos destes SNPs;
- Realizar análise comparativa da frequência haplotípicas e do desequilíbrio de ligação dos SNPs do gene *TNF- α* entre os grupos controle, DEN, DSSA, DCSA e ASS;
- Correlacionar os polimorfismos do gene *TNF- α* com as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes sintomáticos;
- Comparar as frequências do alelo A de ambos os polimorfismos do gene *TNF- α* observadas neste estudo com os resultados obtidos em outras pesquisas descritas na literatura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos e Legais

Atendendo as diretrizes da Resolução 466/2012 da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa do Ministério da Saúde, a presente pesquisa foi apreciada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí, e aprovada sob o parecer nº 1197622 (CAAE: 46111615.0.0000.5214). Os indivíduos recrutados voluntariamente para a composição dos grupos controle negativo e assintomático, assim como também os indivíduos do grupo de casos positivos (composto por pacientes atendidos nos serviços de saúde com sintomatologia sugestiva para a infecção pelo *Dengue virus*) foram verbalmente esclarecidos pelos pesquisadores sobre os propósitos da referida pesquisa e sua forma de participação, que se deu de forma livre. A recusa em participar não lhe causaria nenhuma restrição quanto ao seu atendimento pelos serviços de saúde.

Todas as informações pessoais e de exames laboratoriais dos pacientes obtidas por revisão de prontuários (ou eventualmente relatada de forma verbal pelos mesmos ou seus familiares) ficaram em sigilo absoluto e com garantia de anonimato de identidade, sendo utilizadas somente pelos pesquisadores, pela equipe participante e por representantes do Comitê de Ética em Pesquisa, para fins exclusivos do referido estudo. Havendo a concordância, foi solicitado o consentimento para participação na pesquisa, mediante leitura e posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I) em duas vias de igual teor, tanto pelos pesquisadores quanto pelos sujeitos participantes do estudo ou seus devidos representantes legais.

4.2 Tipo de Estudo e Local

Tratou-se de um estudo do tipo caso-controle, de caráter qualitativo e com abordagem exploratória. A pesquisa foi realizada no pólo de saúde do município de Parnaíba-PI, norte do estado e próximo ao litoral, com clima tropical e vegetação adaptada as condições locais. Segundo dados de 2016, o município possui área de 435.573 km² e uma população total estimada em 150.201 habitantes (IBGE, 2017). Vale salientar que os serviços de saúde da cidade atendem pacientes vindos tanto dos demais municípios do norte do Estado, bem como também de cidades dos estados vizinhos do Ceará e Maranhão.

4.3 População de Estudo, Definição de Casos e Controles, e Critérios de Exclusão

O grupo controle foi composto por indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos e residentes na área de realização do estudo, sendo recrutados voluntariamente e de forma aleatória na população, sem distinção por sexo, idade, raça ou nível socioeconômico, que nunca tenham apresentado histórico de sintomatologia clínica ou diagnóstico laboratorial confirmado para infecção por DENV e/ou outras arboviroses.

O grupo assintomático (ASS) foi composto por indivíduos que inicialmente foram recrutados para compor o grupo controle, mas que posteriormente foi detectada a presença de anticorpos IgM ou IgG anti-DENV por meio de teste rápido imunocromatográfico. Ou seja, tais indivíduos tiveram infecção pelo vírus em algum momento de suas vidas, porém não manifestaram sintomatologia referente à dengue.

O grupo de casos positivos (DEN) foi composto por pacientes em qualquer faixa etária, recrutados voluntariamente sem distinção por sexo, idade, raça ou nível socioeconômico, que apresentaram manifestações clínicas sugestivas e diagnóstico clínico/laboratorial confirmados para dengue, atendidos ambulatorialmente ou internados nos serviços de saúde de Parnaíba. Por sua vez, tais pacientes foram classificados nos seguintes subgrupos: dengue sem sinais de alarme (DSSA), e dengue com sinais de alarme (DCSA), ambos definidos mediante critérios clínicos e laboratoriais. Foram utilizados como critérios de exclusão de participação na pesquisa: ser portador de incapacidade mental, e não atender a nenhum dos critérios de inclusão no estudo.

4.4 Coleta de Amostras e Dados Clínicos dos Pacientes

Após a autorização inicial dos diretores/responsáveis pelos serviços públicos e privados de saúde para a realização do estudo, bem como após o consentimento dos pacientes atendidos com sintomatologia clínica sugestiva de dengue (ou de seus responsáveis) e dos indivíduos recrutados para compor o grupo controle e assintomático, através da assinatura do TCLE, foi realizada uma punção venosa para coleta de amostras de sangue periférico (aproximadamente 10 ml), utilizando seringas descartáveis e/ou tubos de coleta à vácuo contendo EDTA (do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) para obtenção de sangue total, e microtubos de 1,5 mL para obtenção do soro. Posteriormente, tais amostras foram transportadas para a Universidade Federal do Piauí, *Campus Ministro*

Reis Velloso, Parnaíba-PI, e devidamente processadas no Laboratório de Biologia e Bioquímica de Microrganismos e Plantas (BIOMIC).

De Janeiro de 2015 a Dezembro de 2016, as coletas de amostras foram realizadas diariamente com pacientes atendidos em duas instituições públicas de saúde da cidade de Parnaíba, Piauí (Pronto Socorro Municipal – PSM, e Hospital Estadual Dirceu Arcoverde – HEDA), os quais apresentassem sintomatologia sugestiva para dengue. Amostras de sangue total coletadas dos pacientes atendidos no PSM com requisição de hemograma foram obtidas junto ao laboratório privado TecLab Medicina Laboratorial, já que a realização do referido exame laboratorial ocorreu de forma terceirizada, por meio de convênio do SUS (Sistema Único de Saúde).

A obtenção dos dados clínicos dos pacientes atendidos ocorreu de três formas. No PSM, foi realizada por meio de entrevista e aplicação de formulário semi-estruturado (Anexo II) abrangendo informações sobre variáveis demográficas e clínicas do paciente. Já no HEDA, foi realizada por análise de prontuários dos pacientes atendidos, disponíveis no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do hospital. E no laboratório TecLab, foram obtidos os resultados dos hemogramas dos pacientes atendidos no PSM.

4.5 Riscos e/ou Benefícios

O procedimento de punção venosa utilizando seringas descartáveis e/ou tubos de coleta à vácuo contendo EDTA pode trazer algum desconforto aos participantes, como o aparecimento de hematoma causado por um acúmulo de sangue saindo da veia durante ou após a coleta sob a pele. Porém os técnicos disponíveis para a coleta possuem experiência, fazendo com que o processo ocorresse de forma segura e sem causar riscos à saúde dos indivíduos, utilizando corretamente materiais estéreis e descartáveis, e garantindo que o local de coleta esteja devidamente limpo e minimamente livre de contaminações.

Os benefícios esperados com esta pesquisa são no sentido de fornecer informações que permitam a implantação de medidas de prevenção e controle mais efetivas nas políticas públicas de saúde relacionadas à dengue no norte do estado do Piauí. Por se tratar de um estudo populacional, os benefícios não serão diretamente pessoais, mas sim coletivos, que de alguma forma poderão futuramente ser revertidos aos próprios participantes. Dessa forma, somente ao final da pesquisa poder-se-á concluir a participação

de alguns fatores genéticos que possivelmente estejam associados com risco de proteção, susceptibilidade ou risco de progressão para formas clínicas mais graves da doença.

4.6 Confirmação Diagnóstica dos Casos de Dengue

O diagnóstico inicial dos casos suspeitos de dengue ocorreu mediante avaliação de critérios clínicos dos pacientes atendidos nos serviços públicos de saúde. Para serem classificados nos subgrupos DSSA ou DCSA, os pacientes deviam apresentar pelo menos alguns dos sintomas característicos, segundo a classificação da dengue preconizada pela OMS e que passou a ser adotada pelo Ministério da Saúde desde 2014.

Para a confirmação laboratorial dos casos suspeitos de dengue, foram empregadas duas metodologias de diagnóstico: testes rápidos imunocromatográficos para identificação de anticorpos IgM/IgG anti-DENV e do antígeno NS1, e testes moleculares por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR) para detecção do RNA viral, variando de acordo com a região alvo do genoma a ser detectada.

4.6.1 Testes Rápidos Imunocromatográficos

Atualmente os testes imunocromatográficos de fluxo lateral tem se tornado uma importante alternativa para o diagnóstico rápido de diversas doenças infecciosas, por serem dispositivos de fácil execução, com custo de fabricação relativamente baixo, facilidade de produção em escala, e vida de prateleira longa, permitindo o monitoramento qualitativo, e em alguns casos quantitativo, de anticorpos ou antígenos (JAPOLLA et al., 2015). Conforme a Figura 16, tais testes são constituídos de:

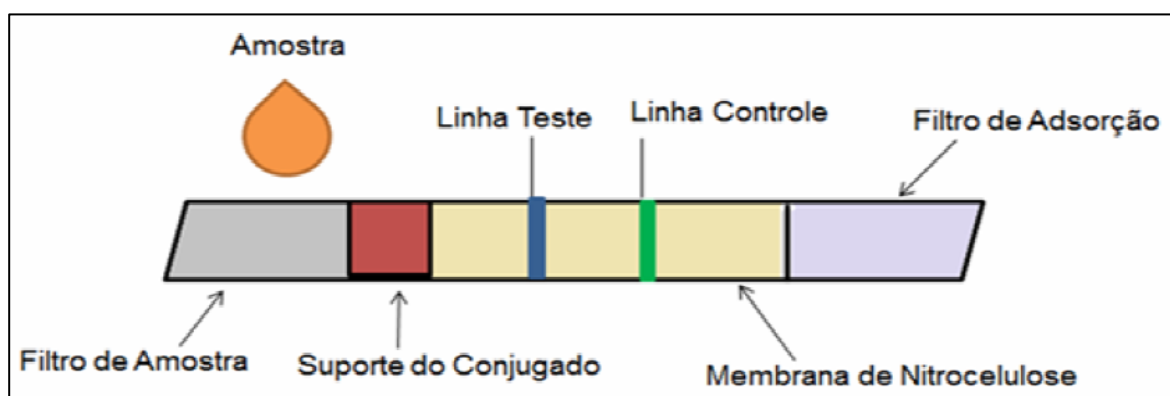


Figura 16 – Componentes do teste imunocromatográfico de fluxo lateral. As partes se sobrepõem uma sobre a outra e são montadas sobre uma placa suporte (Fonte: JAPOLLA et al., 2015).

- Filtro de amostra – Responsável por promover a distribuição uniforme e controlada da amostra a ser analisada para o suporte do conjugado.
- Suporte do conjugado – O conjugado é resultado da conjugação de anticorpos ou antígenos com nanopartículas de ouro coloidal ou outras moléculas, que deve ser fixado ao suporte para transferir a amostra de maneira uniforme sobre a membrana do teste.
- Membrana de nitrocelulose – É posicionada na região analítica e deve conter reagentes de captura nas linhas teste e controle. A capilaridade da membrana é de extrema importância, podendo influenciar na sensibilidade do teste.
- Filtro de adsorção – É posicionado na extremidade distal da membrana de nitrocelulose e atua puxando todo o fluido adicionado no teste, assegurando que não ocorra a volta do material e não ocorra resultados falso-positivos.

Estes testes têm por princípio a identificação do antígeno NS1 e dos anticorpos IgM/IgG anti-DENV, variando de acordo com a marca e o modelo do dispositivo usado. Geralmente, NS1 é encontrado a partir do 1º dia de início dos sintomas, permanecendo por até 9 dias após o estabelecimento da febre. Por sua vez, IgM é detectado na fase aguda da doença (em torno de 7 a 10 dias após início dos sintomas), enquanto IgG é detectado a partir do 14º dia após início dos sintomas, persistindo por toda a vida. Para a realização destes testes, foram utilizados 2 modelos de marcas comerciais distintas.

4.6.1.1 Teste *OL Dengue IgG/IgM*® (Orange Life Comércio e Indústria LTDA, Rio de Janeiro, Brasil)

No dispositivo para identificação de anticorpos anti-DENV (Figura 17), foram adicionados 10 µL de soro do paciente com suspeita de dengue no poço redondo (“S”) indicado pelo fabricante, e em seguida, foram adicionadas de 3 a 4 gotas de uma solução tampão (fornecida com o kit) no mesmo poço da amostra, e espera-se de 15 a 20 minutos para a leitura e interpretação dos resultados, não se excedendo este tempo.

Em todos os testes, uma linha de controle interno (“C”) deverá ser exibida para indicar que o procedimento foi realizado corretamente e os reagentes foram reativos. A presença de 2 linhas coloridas (“2” e “C”) no dispositivo representa um resultado positivo para anticorpos IgM e indica uma infecção primária pelo DENV. Já a presença de 2 linhas coloridas (“1” e “C”) no dispositivo representa um resultado positivo para anticorpos IgG,

podendo indicar uma infecção passada pelo DENV. E a presença de 3 linhas coloridas no dispositivo (“1”, “2” e “C”) no dispositivo indica um resultado positivo para ambos.

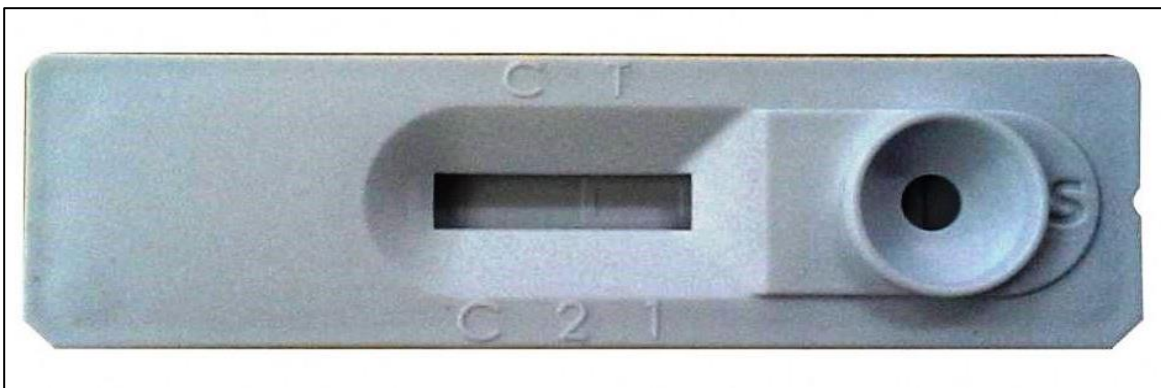


Figura 17 – Dispositivo *OL Dengue IgG/IgM*®, para identificação de anticorpos anti-DENV.
(Fonte: PRIME CIRÚRGICA, 2016a).

4.6.1.2 Teste *SD Bioline Dengue Duo*® (Standard Diagnostics Inc, Republic of Korea)

O teste é composto por dois dispositivos (Figura 18). O dispositivo superior corresponde ao teste para identificação de anticorpos anti-DENV, onde foram adicionados 10 µL de soro do paciente com suspeita de dengue no poço quadrado (“S”) indicado pelo fabricante, e em seguida, foram adicionadas de 3 a 4 gotas (cerca de 90 a 120 µL) de um diluente de amostra (fornecido com o kit) no poço de formato circular, e espera-se de 15 a 20 minutos para a leitura e interpretação dos resultados, não se excedendo este tempo.

Quando os pacientes apresentam apenas anticorpos IgM, são visualizadas a formação de 2 linhas coloridas, uma correspondente ao controle (“C”), e outra correspondente ao anticorpo (“M”), indicando infecção recente. Quando pacientes apresentam apenas IgG, são visualizadas a formação de duas linhas coloridas, uma correspondente ao controle (“C”), e outra ao anticorpo (“G”), indicando infecção passada. E quando o indivíduo apresenta ambos os anticorpos, as 3 linhas coloridas são observadas no teste.

O dispositivo inferior corresponde ao teste para detecção do antígeno NS1. Utilizando um conta-gotas descartável (fornecido com o kit), são adicionadas 3 gotas (cerca de 100 µL) da amostra no poço de formato circular, e espera-se de 15 a 20 minutos para a leitura e interpretação dos resultados, não se excedendo este tempo. A presença de 2 linhas coloridas, uma correspondente ao controle (“C”) e outra correspondente ao antígeno NS1 (“T”), indica um resultado positivo.

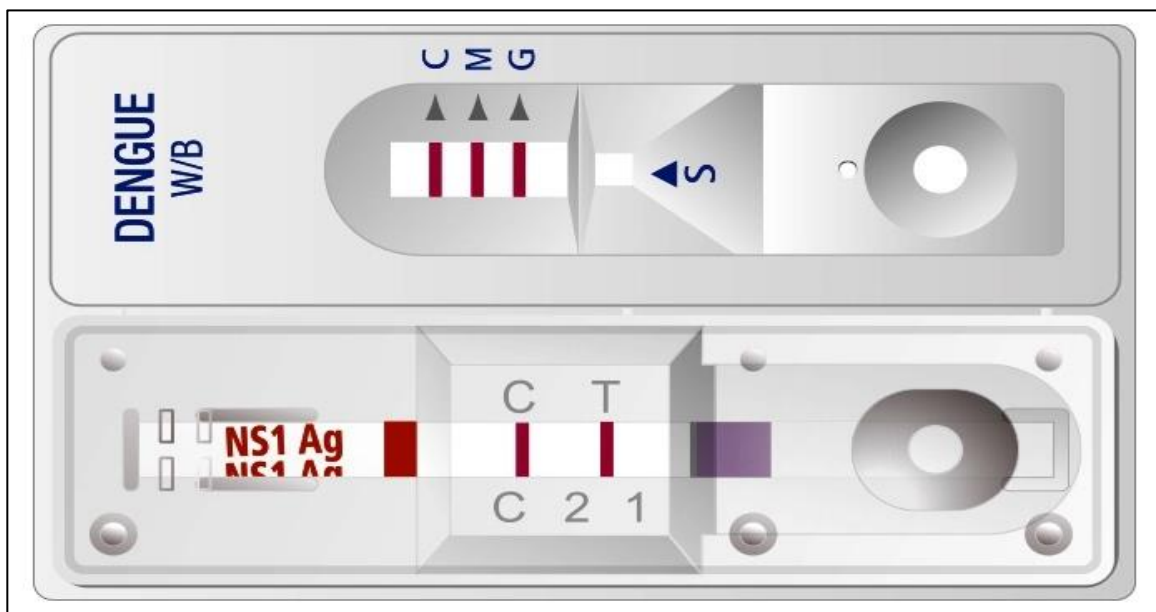


Figura 18 – Dispositivo *SD Bioline Dengue Duo*®, para identificação de anticorpos anti-DENV (cassete superior) e do antígeno NS1 (cassete inferior). (Fonte: PRIME CIRÚRGICA, 2016b).

4.6.2 Diagnóstico Molecular

4.6.2.1 Extração do RNA Viral e Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR)

Inicialmente foi realizada a extração do RNA viral das amostras de soro (cerca de 150µL) dos pacientes suspeitos de dengue, utilizando-se 2 kits comerciais de marcas distintas: *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen Inc., Hilden, Germany), e *NucleoSpin® RNA Virus* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany), de acordo com as especificações descritas pelos protocolos dos fabricantes.

Após a extração foi realizada a técnica de RT-PCR, a qual foi subdivida em 2 etapas. A primeira etapa correspondeu à Transcrição Reversa (RT) para que ocorresse a conversão do RNA viral em DNA complementar (cDNA), pela ação da enzima *MMLV-RT* (do inglês *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*). A segunda etapa correspondeu à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para que ocorresse a amplificação dos fragmentos de interesse, pela ação da enzima *Taq DNA polimerase*. Ambas as reações foram realizadas em termociclador *AmpliTherm® Thermal Cycler* (Madison, WI, USA).

Para a detecção do DENV nas amostras suspeitas, foram utilizados 2 protocolos de RT-PCR. O primeiro protocolo foi desenvolvido por Lanciotti e colaboradores (1992), em que o RNA viral foi submetido à ação da enzima *MMLV-RT* (Promega Inc., USA), e foi utilizado o iniciador D2 (*primer reverse*) para que houvesse sua conversão em cDNA.

Já no segundo protocolo foram utilizados os oligodesoxirribonucleotídeos de sequências curtas e aleatórias *Random Hexamers*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), os quais se ligam a qualquer região do RNA e permitem a síntese do cDNA.

4.6.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a realização da técnica de PCR foram utilizados 4 diferentes protocolos visando a amplificação dos fragmentos de interesse por ação da enzima *Taq DNA polimerase* (Ludwig Biotecnologia, Alvorada, Brasil), após incubação dos reagentes em termociclador *AmpliTherm*® *Thermal Cycler* (Madison, WI, USA). O primeiro foi descrito por Lanciotti e colaboradores (1992), objetivando amplificar a região dos genes *C/prM* do genoma do DENV, que se apresenta conservada entre os 4 sorotipos.

Após a realização da RT-PCR, as amostras de cDNA foram submetidas a uma primeira reação de amplificação, possibilitando a identificação do DENV a partir da utilização dos iniciadores D1 e D2 específicos para a região do gene *C/prM*, e quando positivas, as amostras amplificaram a um padrão de 511 pb, independente qual seja o sorotipo do vírus. Em seguida, os produtos da primeira reação foram submetidos a uma segunda reação de amplificação que possibilitou a identificação dos sorotipos do DENV, a partir da utilização dos iniciadores sorotipo-específicos. Na Tabela 2 a seguir estão descritos os respectivos iniciadores utilizados e os tamanhos de seus produtos após a amplificação.

Tabela 2 – Iniciadores para amplificação da região do gene *C/prM* descritos por Lanciotti e colaboradores (1992), suas respectivas sequências e produtos.

GENES	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTOS
<i>C/prM</i>	<i>Forward</i> D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	511 pb (DENV)
	<i>Reverse</i> D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	
	TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	482 pb (DENV-1)
	TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	119 pb (DENV-2)
	TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	290 pb (DENV-3)
	TS4	CTCTGTGTCTTAAACAAGAGA	392 pb (DENV-4)

O segundo protocolo foi realizado com base em iniciadores sorotipo-específicos descritos por Figueiredo e colaboradores (2014) e Rocha e colaboradores (2013), objetivando amplificar a região do gene *E* do genoma do DENV, que apresenta alta taxa de

mutação entre os *Flavivirus*. Este protocolo permitiu a identificação dos 4 sorotipos do DENV em uma única reação. Na Tabela 3 a seguir estão descritos os respectivos iniciadores sorotipo-específicos utilizados e os tamanhos de seus produtos após a amplificação.

Tabela 3 – Iniciadores para amplificação da região do gene *E* descritos por Figueiredo e colaboradores (2014) e Rocha e colaboradores (2013), suas respectivas sequências e produtos.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTOS
<i>E</i>	D13F	AGCCAAAATATCAAACACCAC	972 pb
	D14R	AAAGGTGGTTCTGTCTCAATG	(DENV-1)
	DEN2 3EF	G TTCACGGGACATCTCAA	651 pb
	DEN2 4ER	G TTCTTTATTTTCCAGC	(DENV-2)
	DEN3 1EF	CAATGAGATGTGTGGGAG	1012 pb
	DEN3 2ER	CTTCTTTCTTCAACACAA	(DENV-3)
	DEN4 EF	TATAGGATCCCGATGCGTAGGAGTAGGAAAC	1212 pb
	DEN4 ER	AGCAAGCTTTTATGTGGACTCAAACATCTTGCC	(DENV-4)

O terceiro protocolo foi realizado com base em iniciadores descritos por Chao, Davis & Chang (2007), objetivando amplificar a região do gene *NS5*, que é considerada a mais conservada do genoma dos *Flavivirus*. Este protocolo permitiu a identificação inicial geral para *Flavivirus* circulantes, que posteriormente podem ser diferenciados por outros protocolos mais específicos. Na Tabela 4 a seguir estão descritos os respectivos iniciadores utilizados e os tamanhos de seus produtos após a amplificação por PCR.

Tabela 4 – Iniciadores para amplificação da região do gene *NS5* descritos por Chao, Davis & Chang (2007), suas respectivas sequências e produtos.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTOS
<i>NS5</i>	mFU1	TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAAA	270 pb
	CFD2	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC	(<i>Flavivirus</i>)

Um quarto protocolo de PCR passou a ser empregado mais recentemente com base nos iniciadores descritos por Bronzoni e colaboradores (2005), objetivando amplificar a região do gene *NS5*. Após a realização da RT-PCR, as amostras de cDNA foram submetidas a uma primeira reação de amplificação, que possibilitou a identificação de *Flavivirus* a partir da utilização dos iniciadores FG1 e FG2 para a região do gene *NS5*, e

quando positivas, as amostras deverão amplificar a um padrão de 958 pb. Em seguida, os produtos da primeira reação foram submetidos a uma segunda reação de amplificação que possibilitou a identificação individual dos sorotipos do DENV, a partir da utilização dos iniciadores sorotipo-específicos. Esta segunda reação foi subdividida de 2 formas distintas: uma para detecção simultânea dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, e outra para a detecção individual de DENV-4. Na Tabela 5 a seguir estão descritos os respectivos iniciadores e os tamanhos de seus produtos após a amplificação.

Tabela 5 – Iniciadores para amplificação da região do gene *NS5* descritos por Bronzoni e colaboradores (2005), suas respectivas sequências e produtos.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTOS
NS5	FG1	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	958 pb
	FG2	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA	(<i>Flavivirus</i>)
	nDEN1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	472 pb (DENV-1)
	nDEN2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	316 pb (DENV-2)
	nDEN3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	659 pb (DENV-3)
	nDEN4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	222 pb (DENV-4)

Ao final das reações de PCR, foram realizadas as corridas dos produtos das amplificações por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, os quais são corados com o agente intercalante *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium Corporate Place, Hayward, CA, USA), e posteriormente foram visualizados sob a luz ultravioleta em transluminador L-PIX (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil).

4.7 Extração, Quantificação e Armazenamento do DNA

O DNA genômico dos indivíduos participantes foi extraído a partir de alíquotas de sangue total (300µL) coletado com EDTA, utilizando 2 kits comerciais de marcas distintas: *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (Qiagen Inc., Hilden, Germany) e *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Inc., USA), de acordo com as especificações descritas pelos protocolos dos fabricantes.

Em seguida, a concentração e a pureza do material genético foram determinadas por meio do espectrofotômetro de luz ultravioleta visível *BioSpec-Nano* (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), utilizando-se um comprimento de onda de 260 a 280nm. Utilizando 1µL de cada amostra de DNA extraído, as leituras no equipamento foram realizadas em duplicata, mas caso a diferença entre a primeira e a segunda medição fosse > 10 ng/µL (ou seja, presente um valor discrepante), se realizou uma terceira medição (triplicata).

Ao final das extrações e quantificações, as amostras de DNA também foram submetidas a corridas por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, coradas com o agente intercalante *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium Corporate Place, Hayward, CA, USA), e posteriormente foram visualizadas sob a luz ultravioleta em transluminador L-PIX (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil), a fim de se confirmar a qualidade do material genético extraído. Uma vez sendo confirmada a qualidade, as amostras foram armazenadas em freezer (-20°C) até o momento de realização do procedimento de genotipagem.

4.8 Genotipagem dos SNPs do Gene *TNF-α*

A genotipagem para os polimorfismos -308 G/A (rs1800629) e -238 G/A (rs361525) do gene *TNF-α* foi realizada em amostras de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial confirmado para infecção pelo DENV, assim como também para amostras dos indivíduos dos grupos controle e assintomático, por meio de PCR em Tempo Real. Esta técnica possibilita a quantificação do material genético de forma precisa e com maior grau de reprodutibilidade, determinando valores durante a fase exponencial da reação baseados na emissão de compostos fluorescentes, os quais geram sinais que aumentam de maneira diretamente proporcional à quantidade do produto final amplificado da PCR (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Nos experimentos foram utilizados ensaios validados *SNP TaqMan® Genotyping Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para as referidas variantes no gene *TNF-α*, juntamente com *Master Mix 2x TaqMan®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que corresponde a um conjunto dos componentes otimizados necessários para a realização da PCR (enzima *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase* ultra pura, desoxirribonucleótidos trifosfatados – dNTPs, referência passiva *ROX®* e componentes de tampão), permitindo uma discriminação alélica reprodutível para a genotipagem de SNPs.

Por sua vez, cada ensaio de genotipagem validado é composto por dois iniciadores (um senso e outro anti-senso) para a amplificação das regiões de interesse de cada polimorfismo (Tabela 6), e duas sondas (fragmentos de DNA marcados para hibridizar outra molécula de DNA) responsáveis pela detecção de alelos (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; SIQUEIRA et al., 2015; THERMOFISCHER SCIENTIFIC, 2016). As sondas possuem:

- Fluoróforos (corantes fluorescentes) na extremidade 5', sendo o corante VIC para um alelo, e o corante FAM para o outro alelo;
- *Minor Groove Binder* (MGB), que aumenta a temperatura do pareamento da sonda sem aumentar seu comprimento e permite uma discriminação mais precisa;
- *Quencher* não fluorescente (Q) na extremidade 3', uma molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor.

Tabela 6 - Gene, dbSNP e suas respectivas sondas (VIC/FAM) para PCR em Tempo Real (*TaqMan*® *SNP Genotyping Assays*).

GENE	dbSNP	SEQUÊNCIA [VIC/FAM]
<i>TNF-α</i>	rs1800629 (-308G/A)	GAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATG[A/G]GGACGGGGTTCAGCCTC CAGGGTCC
	rs361525 (-238 G/A)	GGCCCAGAAGACCCCCCTCGGAATC[A/G]GAGCAGGGAGGATGGG GAGTGTGAG

As reações de amplificação e genotipagem por PCR em Tempo Real deste estudo foram executadas para um volume final de 5 μ L, sendo padronizados dois protocolos otimizados, ambos adaptados a partir do protocolo padrão sugerido pela empresa fabricante dos ensaios (para um volume final de 10 μ L) (Tabela 7). Para a utilização de cada protocolo otimizado foram consideradas a concentração e pureza do material genético das amostras determinadas por espectrofotometria, e a qualidade do DNA nas corridas por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Para as amostras com boa qualidade (em torno de 20 ng/ μ L e presença evidente de banda no gel) foi utilizado o Protocolo Otimizado 1 (adicionando-se 1 μ L de DNA), enquanto que para as amostras com baixa qualidade foi utilizado o Protocolo Otimizado 2 (adicionando-se 2,38 μ L de DNA). Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços, sendo também incluídos dois controles negativos para confirmar a ausência de contaminação da reação.

Tabela 7 – Componentes utilizados nas reações de PCR em Tempo Real para genotipagem dos SNPs do gene *TNF- α* , de acordo com o protocolo utilizado.

Componentes	Protocolo Padrão	Protocolo Otimizado 1	Protocolo Otimizado 2
Master Mix 2x TaqMan®	5 μ L	2,5 μ L	2,5 μ L
TaqMan® SNP Genotyping Assays (diluída para 20x)	0,5 μ L	0,12 μ L	0,12 μ L
H ₂ O <i>miliQ</i> autoclavada	3,5 μ L	1,38 μ L	-
Amostra de DNA	1 μ L	1 μ L	2,38 μ L
Volume Final	10 μ L	5 μ L	5 μ L

Nas reações de PCR em Tempo Real com ensaios de genotipagem *TaqMan*® (Figura 19), cada sonda se hibridiza entre os sítios dos iniciadores de forma específica à sequência complementar. Quando a sonda está intacta, a proximidade do corante com o *quencher* resulta na ausência da fluorescência. A clivagem da sonda pela atividade exonuclease 5'-3' da enzima *AmpliTaq Gold*® DNA Polymerase (que cliva somente as sondas que estejam hibridizadas) separa o corante do *quencher* durante a extensão e resulta na sua fluorescência, que ocorre somente se a sequência-alvo for complementar à sonda. Deste modo, o sinal gerado pela PCR indica a presença do alelo na amostra (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; SIQUEIRA, 2015; THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2016).

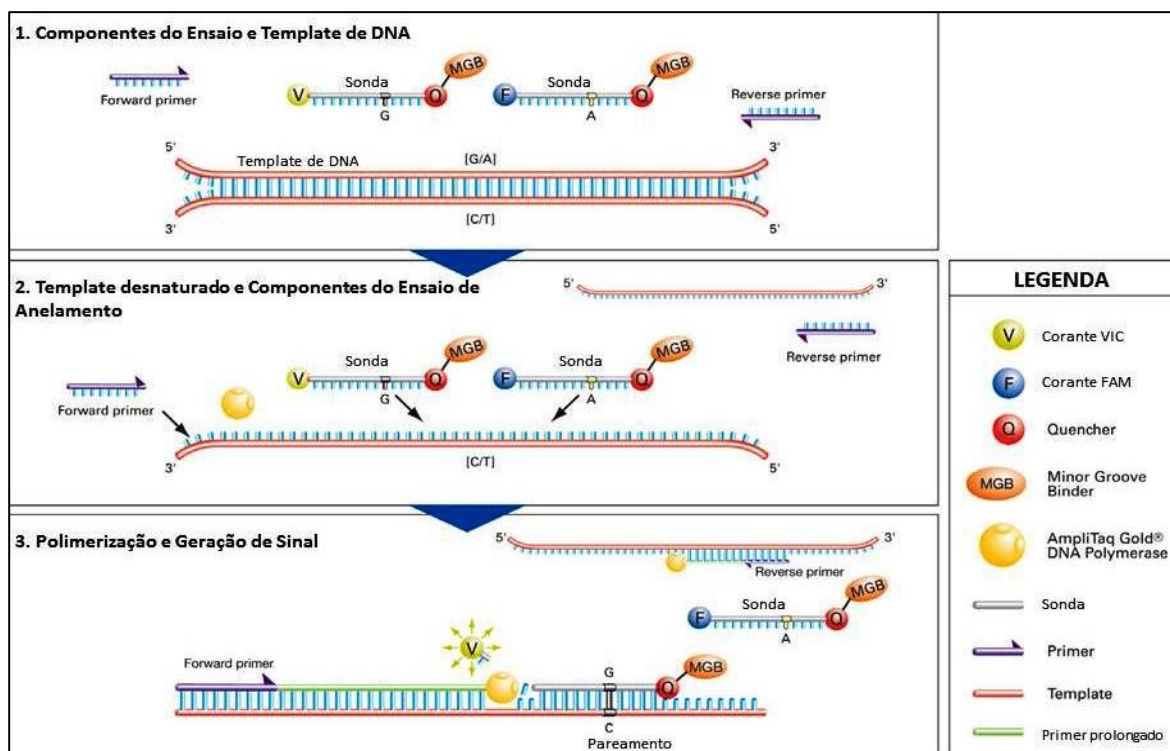


Figura 19 – Esquema exemplificando o princípio de funcionamento do ensaio de genotipagem *TaqMan*®. (Fonte: THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2016 - Adaptado).

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no termociclador *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), adotando as seguintes condições de ciclagem sugeridas pelo fabricante para ambos os protocolos com volume final de 5 μ L: pré-incubação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida por 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, e consecutivamente o anelamento e extensão a 60 °C durante 1 minuto e 30 segundos.

Após a realização da PCR, o genótipo de cada amostra foi interpretado e determinado utilizando o software *1.1 SDS* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), e os aplicativos *Design and Analysis Application qPCR* e *Genotyping qPCR* disponíveis na ferramenta *online Thermo FisherCloud* (THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2017), os quais possibilitaram a visualização dos *plots* de discriminação alélica-específica gerados (Figura 20), bem como também as curvas de amplificação do material genético das amostras.

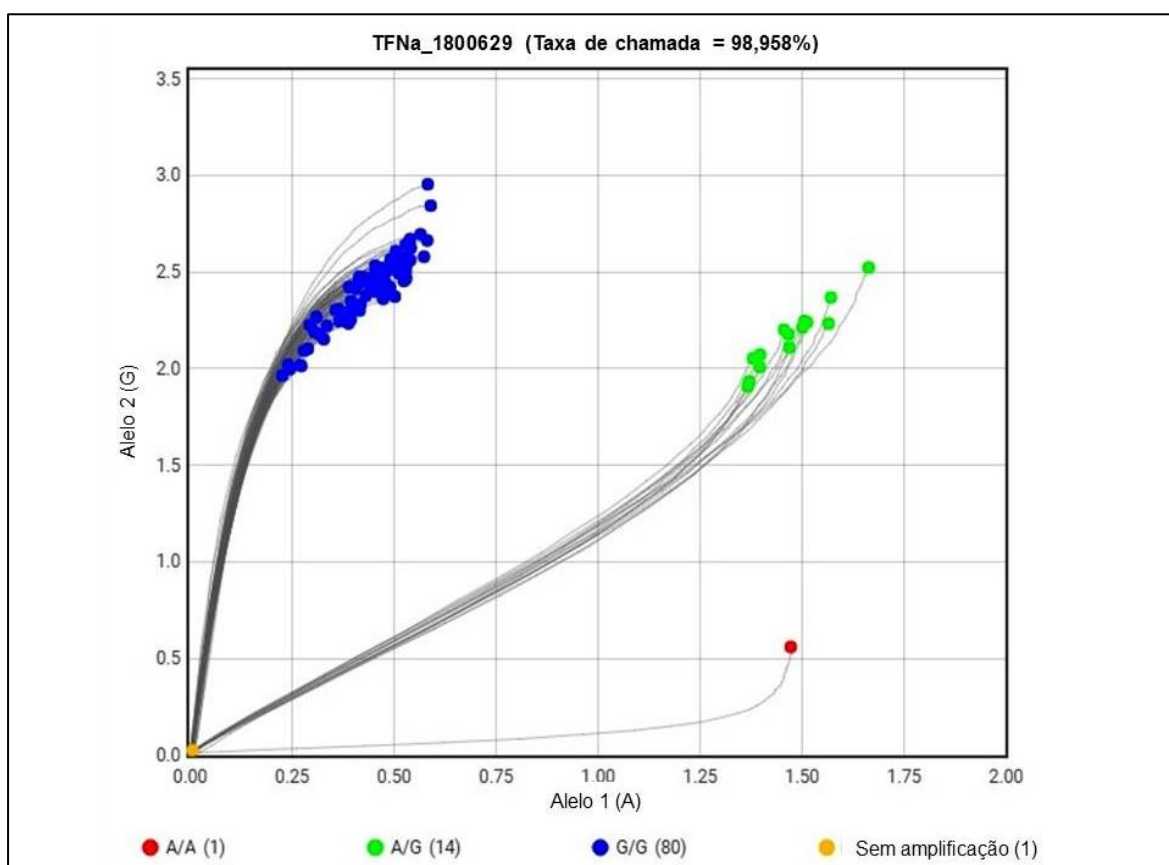


Figura 20 – Exemplo de *plot* de discriminação alélica do SNP -308 G/A (rs1800629) para o gene *TNF- α* gerado por PCR em Tempo Real. Na figura pode-se verificar: indivíduos com presença do alelo selvagem (homozigotos) representando o genótipo G/G (cor azul); um único indivíduo com presença do alelo mutante (homozigoto) representando o genótipo A/A (cor vermelha); indivíduos com presença de ambos os alelos (heterozigotos) representando o genótipo A/G (cor verde); e um indivíduo em que o material genético não foi amplificado (cor amarela). (Fonte: THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2017 – Adaptado).

4.9 Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados através do programa estatístico *BioEstat 5.0* (Instituto Mamirauá, Tefé, Brasil). As frequências genotípicas e alélicas das mutações estudadas foram determinadas por contagem simples. Para testar o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, as distribuições das frequências genotípicas observadas e esperadas foram comparadas entre pacientes com dengue (DEN, DSSA e DCSA), indivíduos do grupo controle, e indivíduos do grupo assintomático (ASS), tendo sua significância estimada pelo Teste do Qui-quadrado (χ^2). Quando um valor na tabela de contingência foi menor que 5, utilizou-se o Teste Exato de Fisher.

Para cada comparação foi calculada uma força de associação ou razão de chances (OR, do inglês *Odds Ratio*). Valores de OR >1 indicam presença de um fator de risco, OR <1 um fator protetor e OR=1, um equilíbrio entre risco e proteção, indicando que não houve associação. As distribuições das frequências dos sintomas foram comparadas pelo teste de Wilcoxon pareado (*Signed-rank Test*). O Teste Exato de Fisher também foi utilizado para a comparação das frequências alélicas obtidas neste estudo com as de outras pesquisas descritas na literatura. Para avaliar o desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *TNF- α* , as análises das frequências haplotípicas e a correção para múltiplos testes por 1.000 permutações aleatórias foram realizadas por meio do programa *Haploview 4.2* (Whitehead Institute for Biomedical Research, EUA). Para todas as análises realizadas, foi adotado um nível de significância de $p < 0,05$ para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

5 RESULTADOS

No período de Janeiro de 2015 a Dezembro de 2016, foram coletadas 1.131 amostras de pacientes com suspeita clínica de dengue (sendo 916 destas referentes ao ano de 2015, e 215 referentes ao ano de 2016), atendidos nos serviços públicos e privados de saúde da cidade de Parnaíba, Piauí. Para a complementação do número amostral pesquisado, foram também incluídas 119 amostras de pacientes com suspeita clínica de dengue coletadas durante o ano de 2014, o que totalizou no geral 1.250 amostras.

Por meio de testes rápidos imunocromatográficos e/ou testes moleculares, 158 pacientes foram positivos para infecção pelo DENV (26 destes referentes ao ano de 2014, 62 referentes ao ano de 2015 e 70 referentes ao ano de 2016). O grupo de casos positivos (DEN) apresentou média de idade de 33,7 anos, variando de 1 a 80 anos, em sua maioria do sexo feminino (68,4%). Com relação à classificação da dengue no grupo DEN, 108 pacientes (68,4%) foram categorizados como DSSA, e 50 pacientes (31,6%) foram categorizados como DCSA.

Para a composição do grupo controle, inicialmente foram recrutados de forma aleatória 206 indivíduos voluntários (sendo 105 destes referentes ao ano de 2014 e 101 referentes ao ano de 2015), os quais relataram nunca terem apresentado qualquer histórico clínico ou diagnóstico laboratorial confirmado para dengue. Porém após a realização de triagem por meio de testes rápidos imunocromatográficos, em 83 destes indivíduos (40,3%) foi observada a presença de anticorpos IgM/IgG anti-DENV (ou seja, em algum momento da vida os mesmos foram infectados pelo vírus, porém não apresentaram nenhuma manifestação de sintomatologia clínica da dengue), sendo os mesmos realocados para o grupo assintomático (ASS). Este grupo apresentou média de idade de 22,5 anos, variando de 17 a 34 anos, em sua maioria do sexo feminino (68,7%). O grupo controle passou a ser composto por 123 indivíduos (59,7%), apresentando média de idade de 21,8 anos, variando de 17 a 41 anos, em sua maioria do sexo feminino (71,5%).

Na genotipagem dos polimorfismos do gene *TNF- α* , inicialmente observou-se que: para o grupo de casos DEN, 153 amostras (96,8%) foram genotipadas para o SNP -308 G/A, e 157 amostras (99,4%) para o SNP -238 G/A; para o grupo controle, todas as 123 amostras (100%) foram genotipadas para o SNP -308 G/A, e 120 amostras (97,6%) para o SNP -238 G/A; e para o grupo ASS, 81 amostras (97,6%) foram genotipadas para o SNP -308 G/A, e todas as 83 amostras (100%) para o SNP -238 G/A.

Nas análises das frequências genóticas do SNP -308 G/A do gene *TNF- α* (Tabela 8), os genótipos G/A + A/A tiveram frequência de 21,1% no grupo controle quando comparado ao grupo DEN ($p= 0,652$; OR= 0,87; $p^*= 0,76$), porém não apresentou diferença estatisticamente significativa. Segundo o exposto na Tabela 8, as demais comparações das frequências dos referidos genótipos entre os grupos DSSA e controle ($p= 0,777$; OR= 0,91; $p^*= 0,90$), DCSA e controle ($p= 0,588$; OR= 0,78; $p^*= 0,74$), e DSSA e DCSA ($p= 0,746$, OR= 0,86, $p^*= 0,92$) também não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Todas as frequências genóticas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Tabela 8 – Distribuições e comparações das frequências genóticas do SNP -308 G/A (rs1800629) do gene *TNF- α* nos grupos de casos (DEN, DSSA e DCSA) e controle.

Grupos	G/G	G/A	A/A	Controles vs Casos			DSSA vs DCSA		
				P	OR (95% CI)	p^*	p	OR (95% CI)	p^*
Controle (n=123**)	97 (78,9)	25 (20,3)	1 (0,8)	-	-	-	-	-	-
DEN (n=153**)	124 (81,1)	29 (18,9)	0 (0,0)	0,652	0,87 (0,48-1,58)	0,76	-	-	-
DSSA (n=107**)	86 (80,4)	21 (19,6)	0 (0,0)	0,777	0,91 (0,48-1,73)	0,90	-	-	-
DCSA (n=46**)	38 (82,6)	8 (17,4)	0 (0,0)	0,588	0,78 (0,33-1,88)	0,74	0,746	0,86 (0,35-2,12)	0,92

Os valores são números (%) estudados. O valor de p foi determinado pelo χ^2 ou Teste Exato de Fisher baseado em G/A + A/A vs. G/G. OR, Razão de Chances. * p value do Odds Ratio. CI, Intervalo de Confiança. **Foram desconsiderados os pacientes com resultados indeterminados na genotipagem.

Ao se avaliar as frequências genóticas do SNP -308 G/A nos grupos de casos positivos (DEN, DSSA e DCSA) e controle, e compará-las ao grupo ASS (Tabela 9), os genótipos G/A + A/A apresentaram frequência de 18,9% no grupo DEN ($p= 0,428$, OR= 1,34, $p^*= 0,54$), porém não foi observada diferença estatisticamente significativa. Além disso, os referidos genótipos tiveram frequência de 21,1% no grupo controle ($p= 0,256$, OR= 0,65, $p^*= 0,34$), contudo não foi observada diferença estatisticamente significativa. As demais comparações das frequências dos genótipos entre os grupos ASS e DSSA ($p= 0,390$, OR= 1,40, $p^*= 0,51$), e ASS e DCSA ($p= 0,702$, OR= 1,21, $p^*= 0,90$) também não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Todas as frequências genóticas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Tabela 9 – Distribuições e comparações das frequências genotípicas do SNP -308 G/A (rs1800629) do gene *TNF- α* nos grupos de casos (DEN, DSSA e DCSA), controle e assintomático (ASS).

Grupos	G/G	G/A	A/A	ASS vs Casos			ASS vs Controle		
				<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *
ASS (n=81**)	69 (85,2)	12 (14,8)	0 (0,0)	-	-	-	-	-	-
DEN (n=153**)	124 (81,1)	29 (18,9)	0 (0,0)	0,428	1,34 (0,64-2,80)	0,54	-	-	-
DSSA (n=107**)	86 (80,4)	21 (19,6)	0 (0,0)	0,390	1,40 (0,64-3,05)	0,51	-	-	-
DCSA (n=46**)	38 (82,6)	8 (17,4)	0 (0,0)	0,702	1,21 (0,45-3,22)	0,90	-	-	-
Controle (n=123**)	97 (78,9)	25 (20,3)	1 (0,8)	-	-	-	0,256	0,65 (0,31-1,37)	0,34

Os valores são números (%) estudados. O valor de *p* foi determinado pelo χ^2 ou Teste Exato de Fisher baseado em G/A + A/A vs. G/G. OR, Razão de Chances. **p value* do *Odds Ratio*. CI, Intervalo de Confiança. **Foram desconsiderados os pacientes com resultados indeterminados na genotipagem.

Nas análises das frequências genotípicas do SNP -238 G/A do gene *TNF- α* (Tabela 10), os genótipos G/A + A/A tiveram frequência de 13,4% no grupo DEN quando comparado ao grupo controle (*p*= 0,829; OR= 1,08; *p**= 0,97), porém não apresentou diferença estatisticamente significativa. Segundo o exposto na Tabela 10, as demais comparações das frequências dos referidos genótipos entre os grupos DSSA e controle (*p*= 0,874; OR = 1,06; *p** = 0,97), DCSA e controle (*p*= 0,791; OR= 1,14; *p**= 0,99), e DSSA e DCSA (*p*= 0,875, OR= 1,08, *p**= 0,92) também não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Todas as frequências genotípicas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Tabela 10 – Distribuições e comparações das frequências genotípicas do SNP -238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* nos grupos de casos (DEN, DSSA e DCA) e controle.

Grupos	G/G	G/A	A/A	Controles vs Casos			DSSA vs DCSA		
				<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *
Controle (n=120**)	105 (87,5)	13 (10,8)	2 (1,7)	-	-	-	-	-	-
DEN (n=157**)	136 (86,6)	19 (12,1)	2 (1,3)	0,829	1,08 (0,53-2,20)	0,97	-	-	-
DSSA (n=107**)	93 (86,9)	12 (11,2)	2 (1,9)	0,874	1,06 (0,48-2,32)	0,97	-	-	-
DCSA (n=150**)	43 (86,0)	7 (14,0)	0 (0,0)	0,791	1,14 (0,43-2,99)	0,99	0,875	1,08 (0,41-2,87)	0,92

Os valores são números (%) estudados. O valor de *p* foi determinado pelo χ^2 ou Teste Exato de Fisher baseado em G/A + A/A vs. G/G. OR, Razão de Chances. **p value* do *Odds Ratio*. CI, Intervalo de Confiança. **Foram desconsiderados os pacientes com resultados indeterminados na genotipagem.

Ao se avaliar as frequências genótípicas do SNP -238 G/A nos grupos de casos positivos (DEN, DSSA e DCSA) e controle, e compará-las ao grupo ASS (Tabela 11), os genótipos G/A + A/A apresentaram frequência de 13,4% no grupo DEN ($p= 0,398$, OR= 1,45, $p^*= 0,52$), porém não foi observada diferença estatisticamente significativa. Além disso, os referidos genótipos tiveram frequência de 12,5% no grupo controle ($p= 0,527$, OR= 0,75, $p^*= 0,68$), contudo não foi observada diferença estatisticamente significativa. De acordo com a Tabela 11, as demais comparações das frequências dos genótipos entre os grupos ASS e DSSA ($p= 0,462$, OR= 1,41, $p^*= 0,61$), e ASS e DCSA ($p= 0,441$, OR= 1,53, $p^*= 0,63$) também não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Todas as frequências genótípicas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Tabela 11 – Distribuições e comparações das frequências genótípicas do SNP -238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* nos grupos de casos (DEN, DSSA e DCA), controle e assintomático (ASS).

Grupos	G/G	G/A	A/A	ASS vs Casos			ASS vs Controle		
				P	OR (95% CI)	p*	p	OR (95% CI)	p*
ASS (n=83**)	75 (90,4)	6 (7,2)	2 (2,4)	-	-	-	-	-	-
DEN (n=157**)	136 (86,6)	19 (12,1)	2 (1,3)	0,398	1,45 (0,61-3,43)	0,52	-	-	-
DSSA (n=107**)	93 (86,9)	12 (11,2)	2 (1,9)	0,462	1,41 (0,56-3,54)	0,61	-	-	-
DCSA (n=150**)	43 (86,0)	7 (14,0)	0 (0,0)	0,441	1,53 (0,52-4,50)	0,63	-	-	-
Controle (n=120**)	105 (87,5)	13 (10,8)	2 (1,7)	-	-	-	0,527	0,75 (0,30-1,85)	0,68

Os valores são números (%) estudados. O valor de p foi determinado pelo χ^2 ou Teste Exato de Fisher baseado em G/A e A/A vs. G/G. OR, Razão de Chances. * p value do Odds Ratio. CI, Intervalo de Confiança. **Foram desconsiderados os pacientes com resultados indeterminados na genotipagem.

As análises das frequências alélicas dos polimorfismos do gene *TNF- α* mostraram que no SNP -308 G/A (Tabela 12), o alelo A teve frequência de 11% no grupo controle quando comparado ao grupo DEN ($p= 0,562$; OR= 0,85; $p^*= 0,66$), porém não foi observada diferença estatisticamente significativa. Conforme apresentado na Tabela 12, nas demais comparações das frequências do alelo A entre os grupos DSSA e controle ($p= 0,684$, OR= 0,88, $p^*= 0,80$), DCSA e controle ($p= 0,540$, OR= 0,77, $p^*= 0,68$), e DSSA e DCSA ($p= 0,760$, OR= 0,87, $p^*= 0,92$), também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 12 – Distribuições e comparações das frequências alélicas do SNP -308 G/A (rs1800629) do gene *TNF- α* nos grupos de casos (DEN, DSSA, DCSA) e controle.

Grupos	G	A	Controle vs Casos			DSSA vs DCSA		
			<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *
Controle (n=246**)	219 (89,0)	27 (11,0)	-	-	-	-	-	-
DEN (n=306**)	277 (90,5)	29 (9,5)	0,562	0,85 (0,49-1,48)	0,66	-	-	-
DSSA (n=214**)	193 (90,2)	21 (9,8)	0,684	0,88 (0,48-1,62)	0,80	-	-	-
DCSA (n=92**)	84 (91,3)	8 (8,7)	0,540	0,77 (0,38-1,77)	0,68	0,760	0,87 (0,37-2,05)	0,92

Os valores são números (%) estudados. O valor de *p* foi determinado pelo χ^2 ou Teste Exato de Fisher. OR, Razão de Chances. **p value* do *Odds Ratio*. CI, Intervalo de Confiança. **Foram desconsiderados os pacientes com resultados indeterminados na genotipagem.

Quando avaliadas as frequências alélicas do SNP -308 G/A nos grupos de casos positivos (DEN, DSSA e DCSA) e controle, e as mesmas foram comparadas ao grupo ASS (Tabela 13), o alelo A apresentou frequência de 9,5% no grupo DEN ($p=0,451$, OR= 1,31, $p^*=0,56$), porém não foi observada diferença estatisticamente significativa. Além disso, o alelo A teve frequência de 11% no grupo controle ($p=0,230$, OR= 1,54, $p^*=0,30$), contudo não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa. Conforme observado na Tabela 13, nas demais comparações das frequências do alelo A entre os grupos ASS e DSSA ($p=0,414$, OR= 1,36, $p^*=0,53$), e ASS e DCSA ($p=0,714$, OR= 1,19, $p^*=0,90$), também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 13 – Distribuições e comparações das frequências alélicas do SNP -308 G/A (rs1800629) do gene *TNF- α* nos grupos de casos (DEN, DSSA, DCSA), controle e assintomático (ASS).

Grupos	G	A	ASS vs Casos			ASS vs Controle		
			<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *
ASS (n=162**)	150 (92,6)	12 (7,4)	-	-	-	-	-	-
DEN (n=306**)	277 (90,5)	29 (9,5)	0,451	1,31 (0,65-2,64)	0,56	-	-	-
DSSA (n=214**)	193 (90,2)	21 (9,8)	0,414	1,36 (0,65-2,85)	0,53	-	-	-
DCSA (n=92**)	84 (91,3)	8 (8,7)	0,714	1,19 (0,47-3,03)	0,90	-	-	-
Controle (n=246**)	219 (89,0)	27 (11,0)	-	-	-	0,230	1,54 (0,76-3,14)	0,30

Os valores são números (%) estudados. O valor de *p* foi determinado pelo χ^2 ou Teste Exato de Fisher. OR, Razão de Chances. **p value* do *Odds Ratio*. CI, Intervalo de Confiança. **Foram desconsiderados os pacientes com resultados indeterminados na genotipagem.

As análises das frequências alélicas dos polimorfismos do gene *TNF- α* mostraram que no SNP -238 G/A (Tabela 14), o alelo A teve frequência de 7,3% no grupo DEN quando comparado ao grupo controle ($p= 0,913$, OR= 1,04, $p^*= 0,95$), porém não foi observada diferença estatisticamente significativa. Conforme apresentado na Tabela 14, nas demais comparações das frequências do alelo A entre os grupos DSSA e controle ($p= 0,872$, OR= 1,06, $p^*= 0,98$), DCSA e controle ($p= 0,978$, OR= 0,99, $p^*= 0,84$), e DSSA e DCSA ($p= 0,880$, OR= 0,93, $p^*= 0,93$), também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 14 – Distribuições e comparações das frequências alélicas do SNP -238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* nos grupos de casos (DEN, DSSA e DCSA) e controle.

Grupos	G	A	Controle vs Casos			DSSA vs DCSA		
			<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *
Controle (n=240**)	223 (92,9)	17 (7,1)	-	-	-	-	-	-
DEN (n=314**)	291 (92,7)	23 (7,3)	0,913	1,04 (0,54-1,99)	0,95	-	-	-
DSSA (n=214**)	198 (92,5)	16 (7,5)	0,872	1,06 (0,52-2,15)	0,98	-	-	-
DCSA (n=100**)	93 (93,0)	7 (7,0)	0,978	0,99 (0,40-2,46)	0,84	0,880	0,93 (0,37-2,34)	0,93

Os valores são números (%) estudados. O valor de *p* foi determinado pelo χ^2 ou Teste Exato de Fisher. OR, Razão de Chances. **p value* do *Odds Ratio*. CI, Intervalo de Confiança. **Foram desconsiderados os pacientes com resultados indeterminados na genotipagem.

Quando avaliadas as frequências alélicas do SNP -238 G/A nos grupos de casos positivos (DEN, DSSA e DCSA) e controle, e as mesmas foram comparadas ao grupo ASS (Tabela 15), o alelo A apresentou frequência de 7,3% no grupo DENV ($p= 0,592$, OR= 1,23, $p^*= 0,73$), porém não foi observada diferença estatisticamente significativa. Além disso, o alelo A teve frequência de 7,1% no grupo controle ($p= 0,674$, OR= 1,19, $p^*= 0,83$), contudo não foi observada diferença estatisticamente significativa. Conforme observado na Tabela 15, nas demais comparações das frequências do alelo A entre os grupos ASS e DSSA ($p= 0,578$, OR= 1,26, $p^*= 0,72$), e ASS e DCSA ($p= 0,753$, OR= 1,17, $p^*= 0,95$) também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 15 – Distribuições e comparações das frequências alélicas do SNP -238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* nos grupos de casos (DEN, DSSA e DCSA), controle e assintomático (ASS).

Grupos	G	A	ASS vs Casos			ASS vs Controle		
			<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *
ASS (n=166**)	156 (94,0)	10 (6,0)	-	-	-	-	-	-
DEN (n=314**)	291 (92,7)	23 (7,3)	0,592	1,23 (0,57-2,66)	0,73	-	-	-
DSSA (n=214**)	198 (92,5)	16 (7,5)	0,578	1,26 (0,56-2,85)	0,72	-	-	-
DCSA (n=100**)	93 (93,0)	7 (7,0)	0,753	1,17 (0,43-3,19)	0,95	-	-	-
Controle (n=240**)	223 (92,9)	17 (7,1)	-	-	-	0,674	1,19 (0,53-2,67)	0,83

Os valores são números (%) estudados. O valor de *p* foi determinado pelo χ^2 ou Teste Exato de Fisher. OR, Razão de Chances. **p value* do *Odds Ratio*. CI, Intervalo de Confiança. **Foram desconsiderados os pacientes com resultados indeterminados na genotipagem.

A fim de avaliar o possível efeito combinado entre os SNPs -308 G/A (rs1800629) e -238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* , as frequências haplotípicas e o desequilíbrio de ligação foram analisados e comparados entre os grupos controle, DEN, DSSA, DCSA e ASS. De acordo com a Tabela 16, a presença do haplótipo duplo selvagem (G-G) foi maior nos grupos DEN, DSSA e DCSA quando comparados ao grupo controle, bem como foi maior no grupo DCSA quando comparado ao grupo DSSA, porém não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). As combinações de alelos mutantes (A-A) foram pouco frequentes, sendo verificada somente na comparação entre os grupos DSSA e DCSA. Ambos os SNPs do gene *TNF- α* investigados apresentaram baixo desequilíbrio de ligação entre si (Tabela 16).

Com intuito de avaliar o provável efeito combinado entre ambos os polimorfismos do gene *TNF- α* , as frequências haplotípicas e o desequilíbrio de ligação também foram analisados e comparados entre os grupos ASS, DEN, DSSA, DCSA e controle. De acordo com a Tabela 17, a presença do haplótipo duplo selvagem (G-G) foi maior no grupo ASS (87%) quando comparado aos grupos DEN, DSSA, DCSA e controle, porém não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). As combinações de ambos os alelos mutantes (A-A) foram pouco frequentes, sendo verificadas somente nas comparações entre os grupos ASS e DEN, e ASS e DSSA. Ambos os SNPs do gene *TNF- α* investigados apresentaram baixo desequilíbrio de ligação entre si (Tabela 17).

Tabela 16 – Distribuição das frequências haplotípicas dos SNPs -308 G/A (rs1800629) e-238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* , comparadas entre os grupos controle, DEN, DSSA e DCSA.

Haplótipos	Controle (%)	DEN (%)	χ^2	<i>p</i>	<i>p^a</i>
G-G	82,5	84,5	0,435	0,5094	0,8380
G-A	6,6	6,0	0,086	0,7695	0,9760
A-G	10,5	8,1	0,885	0,3467	0,6540
Desequilíbrio	D'= 0,039	r ² = 0,001			
Haplótipos	Controle (%)	DSSA (%)	χ^2	<i>p</i>	<i>p^a</i>
G-G	82,4	83,9	0,188	0,665	0,9300
G-A	6,6	6,3	0,024	0,8766	0,9960
A-G	10,5	8,6	0,476	0,4901	0,8140
Desequilíbrio	D'= 0,006	r ² = 0,0			
Haplótipos	Controle (%)	DCSA (%)	χ^2	<i>p</i>	<i>p^a</i>
G-G	82,3	85,0	0,375	0,5401	0,8410
G-A	6,8	6,2	0,036	0,849	0,9870
A-G	10,7	8,0	0,559	0,4545	0,7780
Desequilíbrio	D'= 0,378	r ² = 0,001			
Haplótipos	DSSA (%)	DCSA (%)	χ^2	<i>p</i>	<i>p^a</i>
G-G	84,6	86,0	0,111	0,7395	0,9910
G-A	5,6	7,0	0,028	0,8661	0,9990
A-G	8,0	5,2	0,091	0,7627	0,9910
A-A	1,8	1,8	0,0	0,9994	1,0000
Desequilíbrio	D' = 0,171	r ² = 0,022			

Os valores são números (%) estudados. ^aValor ajustado após 1.000 permutações aleatórias.

Tabela 17 – Distribuição das frequências haplotípicas dos SNP -308 G/A (rs1800629) e-238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* , comparadas entre os grupos assintomático, DEN, DSSA, DCSA e controle.

Haplótipos	ASS (%)	DEN (%)	χ^2	<i>p</i>	<i>p^a</i>
G-G	87,0	84,9	0,413	0,5206	0,8840
G-A	5,5	5,7	0,007	0,9343	1,0000
A-G	6,9	7,8	0,118	0,7313	0,9800
A-A	0,5	1,7	1,068	0,3014	0,6750
Desequilíbrio	D'= 0,108	r ² = 0,009			
Haplótipos	ASS (%)	DSSA (%)	χ^2	<i>p</i>	<i>p^a</i>
G-G	87,0	84,3	0,547	0,4597	0,8510
G-A	5,5	5,9	0,023	0,8788	0,1000
A-G	7,0	8,2	0,206	0,65	0,9490
A-A	0,5	1,6	0,981	0,322	0,7350
Desequilíbrio	D'= 0,084	r ² = 0,005			
Haplótipos	ASS (%)	DCSA (%)	χ^2	<i>p</i>	<i>p^a</i>
G-G	87,0	85,8	0,082	0,7742	0,9710
G-A	7,0	5,6	0,0	0,9931	1,0000
A-G	5,6	7,2	0,007	0,9352	1,0000
Desequilíbrio	D'= 0,054	r ² = 0,002			
Haplótipos	Controle (%)	ASS (%)	χ^2	<i>p</i>	<i>p^a</i>
G-G	82,0	86,6	1,545	0,2139	0,4800
G-A	7,1	6,0	0,171	0,6788	0,9280
A-G	11,0	7,4	1,457	0,2274	0,5090
Desequilíbrio	D' = 0,96	r ² = 0,007			

Os valores são números (%) estudados. ^aValor ajustado após 1.000 permutações aleatórias.

Para melhor investigar os efeitos da patogênese da dengue e a detecção de um possível efeito de susceptibilidade ou proteção do alelo A no desenvolvimento das manifestações clínicas, o grupo DEN foi dividido em dois subgrupos: portadores do alelo A (genótipos G/A ou A/A), e portadores não-A (genótipo G/G), para ambos os polimorfismos do gene *TNF- α* . Foram descritos 20 principais manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes do grupo DEN, em que as frequências de cada uma para os respectivos subgrupos foram comparadas pelo Teste Exato de Fisher. O teste de Wilcoxon pareado foi aplicado para avaliar qualquer tendência existente entre as frequências dos sintomas dos portadores do alelo mutante, quando comparadas com as dos não portadores do alelo mutante.

Quando investigada a prevalência das manifestações clínicas nos indivíduos do grupo DEN com o alelo A do SNP -308 G/A do gene *TNF- α* , foi observada maior ocorrência em portadores A (com 11 delas sendo mais prevalentes neste grupo) do que em portadores não-A, porém sem nenhuma diferença estatisticamente significativa (Tabela 18). Ao ser aplicado o teste de Wilcoxon pareado para comparar as frequências de todos os sintomas entre os grupos, não se identificou significância estatística ($Z= 0,69, p= 0,49$).

Tabela 18 - SNP -308 G/A (rs1800629) do gene *TNF- α* e as 20 manifestações clínicas da dengue mais presentes em pacientes do grupo DEN.

Manifestação Clínica	Frequência (n=153**) (%)	Frequências Genotípicas		p*
		Portadores A (n=29) (%)	Portadores Não-A (n=124) (%)	
Febre	131 (82,9)**	26 (89,6)	105 (84,7)	0,7064
Cefaleia	124 (78,5)**	22 (75,9)	102 (82,3)	0,4361
Artralgia	116 (73,4)**	22 (75,9)	94 (75,8)	1,0000
Mialgia	113 (71,5)**	20 (69,0)	93 (75,0)	1,0000
Exantema	77 (48,7)**	16 (55,2)	61 (49,0)	0,6807
Dor retro-orbitária	66 (41,8)**	15 (51,7)	51 (41,2)	0,4052
Fraqueza/Prostração	45 (28,5)**	8 (27,6)	37 (29,8)	1,0000
Prurido	36 (22,8)	8 (27,6)	28 (22,6)	0,6280
Náuseas	33 (20,9)**	6 (20,7)	27 (21,8)	1,0000
Dor abdominal	32 (20,2)**	8 (27,6)	24 (19,3)	0,4466
Vômitos	27 (17,1)**	5 (17,2)	22 (17,4)	1,0000
Irritação ocular	27 (17,1)	6 (20,7)	21 (16,9)	0,1439
Diarreia	22 (13,9)**	4 (13,8)	18 (14,5)	1,0000
Dores nas costas	19 (12,0)	1 (3,4)	18 (14,5)	0,1269
Falta de apetite	18 (11,4)**	5 (17,2)	13 (10,5)	0,3385
Edemas	17 (10,8)**	3 (10,3)	14 (10,8)	1,0000
Calafrios	15 (9,5)	4 (13,8)	11 (8,9)	0,4863
Fotofobia	14 (8,9)	4 (13,8)	10 (8,1)	0,4716
Manifestações hemorrágicas	13 (8,3)**	0 (0,0)	13 (10,5)	0,0756
Tontura	10 (6,3)	3 (10,3)	7 (5,6)	0,4012

*O valor de p foi determinado pelo teste exato de Fisher. **Foram desconsiderados os pacientes com resultados indeterminados na genotipagem.

Quando averiguada a prevalência das manifestações clínicas nos indivíduos do grupo DEN com o alelo A do SNP -238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* , foi observada maior ocorrência em portadores A (com 12 delas sendo mais prevalentes neste grupo) do que em portadores não-A, porém sem nenhuma diferença estatisticamente significativa (Tabela 19). Ao ser aplicado o teste de Wilcoxon pareado para comparar as frequências de todos os sintomas entre portadores do alelo A e portadores não-A, não se identificou significância estatística ($Z= 1,60$; $p= 0,11$).

Tabela 19 - SNP -238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* e as 20 manifestações clínicas da dengue mais presentes em pacientes do grupo DEN.

Manifestação Clínica	Frequência (n=157**) (%)	Frequências Genotípicas		p*
		Portadores A (n=21) (%)	Portadores Não-A (n=136) (%)	
Febre	135 (85,4)**	19 (90,5)	116 (85,3)	0,7462
Cefaleia	128 (81,0)**	19 (90,5)	109 (80,1)	0,3697
Artralgia	119 (75,3)	17 (80,9)	102 (75,0)	0,6026
Mialgia	118 (74,7)	17 (80,9)	101 (74,3)	0,4073
Exantema	78 (49,4)**	10 (47,6)	68 (50,0)	1,0000
Dor retro-orbitária	68 (43,0)**	9 (42,8)	59 (43,4)	1,0000
Fraqueza/Prostração	46 (29,1)	9 (42,8)	37 (27,2)	0,1961
Prurido	36 (22,8)	6 (28,6)	30 (22,1)	0,5776
Náuseas	35 (22,1)	4 (19,1)	31 (22,8)	0,7870
Dor abdominal	34 (21,5)	2 (9,5)	32 (23,5)	0,1695
Vômitos	30 (19,0)	3 (14,3)	27 (19,8)	0,7671
Irritação ocular	27 (17,1)	4 (19,1)	23 (16,9)	0,7470
Diarreia	23 (14,6)	2 (9,5)	21 (15,4)	0,7471
Dores nas costas	19 (12,0)	2 (9,5)	17 (12,5)	1,0000
Falta de apetite	19 (12,0)	5 (23,8)	14 (10,3)	0,1403
Edemas	18 (11,4)	5 (23,8)	13 (9,6)	0,1316
Calafrios	15 (9,5)	2 (9,5)	13 (9,6)	1,0000
Fotofobia	14 (8,9)	3 (14,3)	11 (8,1)	0,4033
Manifestações hemorrágicas	14 (8,9)	2 (9,5)	12 (8,8)	0,9763
Tontura	11 (7,0)	2 (9,5)	9 (6,6)	0,6358

*O valor de p foi determinado pelo Teste Exato de Fisher. **Foram desconsiderados os pacientes com resultados indeterminados na genotipagem.

Outro fator a ser destacado refere-se à distribuição heterogênea dos alelos A de ambos os polimorfismos do gene *TNF- α* nas populações do mundo, e sua importância para o entendimento de suas relações como possíveis fatores de susceptibilidade ou proteção para a dengue. Neste estudo, a frequência do alelo A para o SNP -308 G/A do gene *TNF- α* na população norte-piauiense foi de 11%, sendo semelhante às das populações brasileiras dos Estados do Ceará e do Rio de Janeiro, bem como também à da população africana do Zimbábue (Tabela 20). Pode-se observar ainda que as frequências do alelo polimórfico também não diferiram significativamente quando comparadas às populações das Américas,

da Europa e da Oceania, bem como da maioria das populações da Ásia e da África ($p > 0,05$). Contudo, as frequências do alelo A deste SNP encontradas nas populações africanas da Tunísia (22,5%, $p = 0,019$) e da África do Sul (24,2%, $p = 0,012$), bem como também na população asiática da Arábia Saudita (29,5%, $p < 0,001$) foram significativamente maiores quando comparadas à frequência deste alelo na população norte-piauiense.

Tabela 20 – Comparação das frequências alélicas do SNP -308 G/A (rs1800629) do gene *TNF- α* , com base em estudos genômicos de associação realizados na população mundial.

Continentes e População	N (Amostras Genotipadas)	Frequência (%)		p^*	Referência
		G	A		
América					
Brasil (Piauí)	123	89,0	11,0	-	Este estudo
Brasil (Paraná)	313	86,9	13,1	0,414	MOREIRA et al., 2008
Cuba	90	80,6	19,4	0,082	PEREZ et al., 2010
Brasil (Ceará)	85	88,8	11,2	0,589	SILVA, 2010
México	162	95,7	4,3	0,052	GARCÍA-TREJO et al., 2011
Brasil					
(Espírito Santo - Geral)	100	80	20	0,058	DETTOGNI et al., 2013
Brasil					
(Espírito Santo – Pomeranos)	59	82,2	17,8	0,147	DETTOGNI et al., 2013
Brasil					
(Rio de Janeiro)	329	89,0	11,0	0,589	XAVIER-CARVALHO et al., 2013
México	192	93,0	7,0	0,230	VÁZQUEZ-HUERTA et al., 2014
Brasil (Ceará)	80	85,0	15,0	0,264	CANSANÇÃO et al., 2016
Brasil (Pará)	99	84,3	15,7	0,204	FEITOSA et al., 2016
Europa					
Polônia	65	84,6	15,4	0,264	NEDOSZYTKO et al., 2007
Itália	356	87,1	12,9	0,414	TEDDE et al., 2008
Croácia	193	90,7	9,3	0,407	KOROLIJA et al., 2010
Portugal	152	82,9	17,1	0,154	SANTOS et al., 2012
Espanha	135	89,6	10,3	0,500	LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2014
Ásia					
Tailândia	105	92,9	7,1	0,230	CHUANSUMRIT et al., 2013
Índia	108	94,0	6,0	0,155	ALAGARASU et al., 2015
Malásia	120	90,0	10,0	0,500	SAM et al., 2015
Arábia Saudita	100	70,5	29,5	<0,001	HAMADIEN et al., 2016
China	100	95,0	5,0	0,096	LV et al., 2016
África					
África do Sul	120	75,8	24,2	0,012	CORBETT et al., 2002
Zimbábue	101	89,0	11,0	0,589	STANCZUK et al., 2003
Egito	200	91,7	8,3	0,315	FAWZI et al., 2015
Moçambique	456	86,0	14,0	0,335	MABUNDA et al., 2015
Tunísia	213	77,5	22,5	0,019	KHLIFI et al., 2016
Oceania					
Nova Zelândia	415	82,8	17,2	0,154	FERGUSON et al., 2008
Austrália	1.293	80,7	19,3	0,082	WHITEMAN et al., 2010

*O valor de p foi determinado pelo Teste Exato de Fisher.

Neste estudo, a frequência do alelo A para o SNP -238 G/A do gene *TNF- α* na população norte-piauiense foi de 7,1%, sendo próxima às das populações do México (6,8%) e do Egito (7,2%), bem como também à brasileira do Estado do Pará (7,4%) (Tabela 21). Pode-se verificar ainda que as frequências do alelo polimórfico também não diferiram significativamente quando comparadas às populações da América e da Oceania, bem como da maioria das populações da Europa, da Ásia e da África ($p > 0,05$). Porém, as frequências do alelo A deste SNP foram significativamente maiores nas populações de Portugal (18%, $p = 0,015$) e da Tunísia (24,4%, $p < 0,001$), enquanto que nas populações da Malásia (1,4%, $p = 0,032$) e da Índia (0,8%, $p = 0,032$) foram significativamente menores quando comparadas à frequência deste alelo na população norte-piauiense.

Tabela 21 – Comparação das frequências alélicas do SNP -238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* , com base em estudos genômicos de associação realizados na população mundial.

Continente e População	N (Amostras Genotipadas)	Frequência (%)		p^*	Referência
		G	A		
América					
Brasil (Piauí)	120	92,9	7,1	-	Este estudo
Colômbia	430	89,0	11,0	0,230	CORREA et al., 2005
Brasil (São Paulo)	250	96,6	3,4	0,166	HOUNIE et al, 2008
México	169	93,2	6,8	0,609	GARCÍA-TREJO et al., 2011
Argentina	122	93,8	6,2	0,500	BARBISAN et al., 2012
Brasil (Pará)	263	92,6	7,4	0,609	SORTICA et al., 2012
Brasil (São Paulo)	202	90,0	10,0	0,307	TEIXEIRA et al., 2013a
México	192	94,8	5,2	0,384	VÁZQUEZ-HUERTA et al., 2014
Brasil (Paraná)	123	93,9	6,1	0,500	MACEDO et al., 2016
Europa					
Polônia	65	96,9	3,1	0,166	NEDOSZYTKO et al., 2007
Itália	356	95,5	4,5	0,384	TEDDE et al., 2008
Portugal	117	82,0	18,0	0,015	SOUSA et al., 2009
Croácia	193	96,6	3,4	0,166	KOROLIJA et al., 2010
Espanha	135	90,4	9,6	0,307	LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2014
Ásia					
China	99	86,9	13,1	0,119	ZHAO et al., 2015
Malásia	120	99,2	0,8	0,032	SAM et al., 2015
Índia	185	98,6	1,4	0,032	SINGH et al., 2015
Arábia Saudita	100	98,0	2,0	0,085	HAMADIEN et al., 2016
China	100	88,5	11,5	0,167	LV et al., 2016
África					
África do Sul	120	96,2	3,8	0,269	CORBETT et al., 2002
Sudão	341	92,1	7,9	0,500	MOUKOKO et al., 2003
Egito	200	92,8	7,2	0,609	FAWZI et al., 2015
Marrocos	74	88,5	11,5	0,167	ESSADIK et al., 2015
Tunísia	213	75,6	24,4	<0,001	KHLIFI et al., 2016
Oceania					
Nova Zelândia	415	94,0	6,0	0,500	FERGUSON et al., 2008
Austrália	1.299	94,5	5,5	0,500	WHITEMAN et al., 2010

*O valor de p foi determinado pelo Teste Exato de Fisher.

6 DISCUSSÃO

Apesar de investigações extensivas e intensivas sobre a patogênese da dengue, muitas lacunas ainda permanecem sobre a participação da imunidade do hospedeiro perante a infecção pelo DENV, bem como o seu papel contribuindo na proteção, susceptibilidade ou risco de desenvolvimento de formas clínicas mais graves da doença (DIAMOND; PIERSON, 2015; JAIN; CHATUVERDI; JAIN, 2014; ROTHMAN et al., 2014). Especula-se que sua base fisiopatológica tenha origem biológica multifatorial, envolvendo a interação entre três componentes: fatores inerentes ao vírus, ao ambiente, e ao hospedeiro humano (BACK; LUNDKVIST, 2013; COFFEY et al., 2009; GUZMAN; KOURI, 2004; GUZMAN et al., 2016; HERRERO et al., 2013; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009). Neste último fator, destaca-se a ocorrência de SNPs em genes que codificam moléculas envolvidas com a resposta imune e inflamatória, como as citocinas.

O TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória pleiotrópica e potente imunomodulador envolvido na regulação de importantes processos celulares, como proliferação, diferenciação, e indução da apoptose (EL-TAHAN; GHONEUM; EL-MASHAD, 2016; QIDWAY; KHAN, 2011). O papel desta citocina na resposta imune do hospedeiro tem se apresentado de forma contraditória, decorrente da presença de variações na sequência de DNA em regiões regulatórias que alteram a transcrição do seu gene, sua produção, seus níveis séricos circulantes e seu efeito biológico (EL-TAHAN; GHONEUM; EL-MASHAD, 2016; ELAHI et al., 2009; QIDWAY; KHAN, 2011). Dessa forma, diversas pesquisas buscam abordar a relação entre os SNPs dentro da família do gene *TNF- α* , os mecanismos que controlam a expressão da citocina e o papel desempenhado na proteção, susceptibilidade e/ou severidade em um grande número de doenças infecciosas, autoimunes e neurodegenerativas (KNIGHT; KEATING, 2005; QIDWAY; KHAN, 2011).

Neste estudo, as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs -308 G/A (rs1800629) e -238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* foram analisadas na população do estado do Piauí, nordeste do Brasil, em grupos de casos positivos para dengue (DEN), casos com infecção assintomática (ASS), e em grupo controle. Nas comparações deste último com os grupos DEN, DSSA e DCSA, assim como entre os grupos DSSA e DCSA, e também do grupo ASS com os grupos DEN, DSSA, DCSA e controle, os resultados não indicaram associações estatisticamente significativas entre a presença do alelo mutante (A) e dos genótipos mutantes (G/A e A/A) de ambos os SNPs e a ocorrência dos casos de

dengue. Tais achados corroboram os resultados de Loke e colaboradores (2001), que também avaliaram estes polimorfismos em pacientes pediátricos com FHD no Vietnã e não observaram associações estatisticamente significativas destes SNPs com a doença.

As análises das frequências alélicas e genóticas do SNP -308 G/A em estudos realizados nas populações da Índia (ALAGARASU et al., 2013; ALAGARASU et al., 2015), do México (GARCÍA-TREJO et al., 2011), e da Tailândia (VEJBAESYA et al., 2009) também não revelaram associações estatisticamente significativas deste polimorfismo com os casos de dengue. Tais análises também foram realizadas em algumas populações brasileiras, nos estados do Ceará (SILVA, 2010; CANSANÇÃO et al., 2016), Pará (FEITOSA et al., 2016), Paraná (MOREIRA et al., 2008) e Rio de Janeiro (XAVIER-CARVALHO et al., 2013), sendo que os resultados também não indicaram associações estatisticamente significativas da presença do alelo A deste polimorfismo com a ocorrência dos casos de dengue.

Divergindo dos padrões de associação descritos em outros estudos genômicos, Fernando e colaboradores (2015) identificaram que a presença do genótipo G/G (OR= 2,53, CI= 1,10-5,83, $p= 0,04$) foi significativamente maior nos pacientes com dengue severa quando comparados aos pacientes com infecção assintomática, sendo associado como fator de risco para o desenvolvimento da doença na população do Sri-Lanka. Por sua vez, Fernandez-Mestre e colaboradores (2004) demonstraram que a presença do alelo A (risco de recorrência= 2,5 vezes, CI= 1,47-4,13) do SNP -308 G/A do gene *TNF- α* foi significativamente maior nos casos de FHD na população venezuelana. Perez e colaboradores (2010) observaram também que as presenças do alelo A (OR= 3,51, CI= 1,77-7,00, $p= 0,0001$) e do genótipo G/A (OR= 4,07, CI= 0,16-0,75, $p= 0,01$) foram significativamente maiores nos casos de FHD na população cubana. Nestas duas últimas populações, o referido polimorfismo foi associado como fator de susceptibilidade para desenvolvimento dos casos graves de dengue.

Em contrapartida, Sam e colaboradores (2015) encontraram que o alelo A (OR= 0,4, CI= 0,2-0,8, $p= 0,007$) e o genótipo G/A (OR= 0,4, CI= 0,2-0,8, $p= 0,014$) do polimorfismo -308 G/A do gene *TNF- α* foram distribuídos com frequências significativamente menores nos grupos de pacientes com FHD/SCD quando comparados ao grupo controle na população da Malásia, sendo associados como fatores de proteção contra desenvolvimento destes casos. Esta associação também foi identificada por Perez e colaboradores (2010), considerando que a presença do genótipo G/G (OR= 0,35, CI= 0,16-

0,75, $p= 0,01$) foi significativamente maior no grupo controle quando comparado ao grupo de casos FHD na população cubana. Tal fato se corrobora considerando que, no estudo realizado por Feitosa e colaboradores (2016) na população brasileira do estado do Pará, os pacientes dos grupos dengue-positivo e dengue-negativo (com outro tipo de doença febril) não apresentaram sinais de hemorragia, sendo possivelmente compatíveis com uma expressão inferior de TNF- α semelhante aos valores encontrados no grupo controle.

Em seu estudo funcional investigando a expressão de citocinas (pró-inflamatórias e anti-inflamatórias) e sua possível associação com a dengue na população do Estado do Pará, Feitosa e colaboradores (2016) observaram maiores níveis séricos médios de TNF- α , IFN- γ , IL-8 e proteína C-reativa no grupo dengue-positivo, quando comparados ao grupos dengue-negativo e controle, contudo sem nenhuma diferença significativa para TNF- α . Por sua vez, Chuansumrit e colaboradores (2013) demonstraram na população da Tailândia que pacientes com dengue e com outras doenças febris apresentando os genótipos G/G e G/A do SNP -308 G/A tiveram níveis séricos médios de TNF- α ligeiramente mais elevados durante a fase febril da doença, do que na fase de defervescência, nos dias seguintes a esta, e na fase de convalescença, porém sem nenhuma diferença significativa.

Nas análises das frequências alélicas e genotípicas do SNP -238 G/A do gene *TNF- α* , Vejbaesya e colaboradores (2009) revelaram que a presença do alelo A foi significativamente maior em pacientes com FHD secundária quando comparados àqueles com FD secundária (OR= 4,13, CI= 1,59-11,17, $p= 0,002$) e aos controles (OR= 2,38, CI= 1,01-5,7, $p= 0,03$) na população da Tailândia. Além disso, Sam e colaboradores (2015) identificaram que as presenças do alelo A (OR= 4,8, CI= 1,1-21, $p= 0,023$) e do genótipo G/A (OR= 4,9, CI= 1,1-21,9, $p= 0,021$) foram significativamente maiores em pacientes com FHD/SCD quando comparadas ao grupo controle na população da Malásia, sendo associados como fatores de susceptibilidade para desenvolvimento dos casos. Entretanto, García-Trejo e colaboradores (2011) demonstraram que os casos de FD/FHD na população mexicana apresentaram frequência significativamente menor do alelo A quando comparados aos controles (OR= 0,19, CI= 0,02-0,78, $p= 0,01$), sendo associado como fator de proteção contra o desenvolvimento de dengue.

Com relação à investigação das frequências haplotípicas e do desequilíbrio de ligação entre os SNPs -308 G/A e -238 G/A do gene *TNF- α* , este foi o primeiro estudo em que se buscou avaliar o possível efeito da interação entre tais variantes neste gene associadas aos casos de dengue. O haplótipo duplo selvagem (G-G) foi o mais frequente

nos grupos DEN, DSSA e DCSA quando comparados ao grupo controle, foi maior no grupo DCSA quando comparado ao grupo DSSA, e também foi maior no grupo ASS quando comparado aos grupos DEN, DSSA, DCSA e controle, porém não se verificaram associações estatisticamente significativas com os casos de dengue. Em contrapartida, as combinações de ambos os alelos mutantes (A-A) foram pouco frequentes e presentes apenas nas comparações entre os grupos DSSA e DCSA, ASS e DEN, e ASS e DSSA.

Tais achados sobre as distribuições haplotípicas neste estudo corroboram os resultados de outras pesquisas avaliando a interação destes SNPs do gene *TNF- α* em populações da Croácia (BORASKA et al., 2008), Nova Zelândia (FERGUSON et al., 2008), Índia (DUTTA et al., 2013), Brasil (GRANDI et al., 2014), México (VÁZQUEZ-HUERTA et al., 2014) e China (LI et al., 2016). Nestas populações, os polimorfismos associações estatisticamente significativas, respectivamente, com diabetes mellitus tipo 1, doenças inflamatórias intestinais, diabetes mellitus tipo 2, resposta ao tratamento de pacientes com HCV, doença renal crônica e câncer cervical. Contudo, Atan e colaboradores (2013) observaram que o haplótipo G-G foi significativamente associado com proteção contra os casos de uveíte intermediária idiopática nas populações do Reino Unido e da Irlanda ($p < 0,05$). Duas prováveis razões para a menor frequência do haplótipo A-A na população seriam que sua presença poderia produzir algum grande comprometimento letal ou semiletal para todos os indivíduos que o carregam, ou então, que sua ocorrência estaria associada a um evento casual simples (BORASKA et al., 2008).

Conforme observado neste estudo, os SNPs -308 G/A e -238 G/A do gene *TNF- α* apresentaram baixo desequilíbrio de ligação entre si na comparação entre os grupos estudados, corroborando os resultados encontrados nas populações do sul da Croácia (BORASKA et al., 2008), Índia (DUTTA et al., 2013), Brasil (GRANDI et al., 2014), México (VÁZQUEZ-HUERTA et al., 2014) e China (LI et al., 2016). Contudo, ressalta-se a necessidade de também se avaliar a contribuição de outras variantes na região promotora do gene *TNF- α* (VÁZQUEZ-HUERTA et al., 2014), bem como de polimorfismos em outros genes candidatos e os seus efeitos associados com proteção ou susceptibilidade à dengue. As análises das interações entre diferentes genes que codificam citocinas e outras moléculas envolvidas em diferentes vias de sinalização celular podem sugerir que, uma resposta pró-inflamatória exacerbada sem uma oportuna e suficiente regulação anti-inflamatória esteja envolvida na susceptibilidade para desenvolvimento dos casos graves de dengue (ALAGARASU et al., 2015; PEREZ et al., 2010).

Em estudo avaliando o efeito da interação entre polimorfismos na população da Tailândia, Vejbaesya e colaboradores (2009) identificaram que a combinação entre o polimorfismo -238 G/A no gene *TNF- α* (alelo A) e o haplótipo LTA-3 no gene *LTA* foi significativamente maior em pacientes com FHD secundária quando comparados aos pacientes com FD secundária (OR= 4,13, CI= 1,59-11,17, $p= 0,022$), sendo associado como fator de risco para desenvolvimento dos casos. Pesquisas realizadas na população indiana mostraram resultados divergentes, pois enquanto Alagarasu e colaboradores (2015) não encontraram associações significativas nas combinações do polimorfismo -308G/A do gene *TNF- α* com SNPs de outros genes de citocinas inflamatórias (IFN- γ , IL-1B, CXCL8/IL-8, IL-17A, IL-17F e IL-10), Alagarasu e colaboradores (2013) observaram que a combinação dos SNPs -308 G/A (genótipo G/A) e HLA-DRB1*07/*15 teve frequência significativamente maior nos casos de FHD quando comparados aos controles (OR= 4,26, CI= 1,64-11,64, $p= 0,00076$), sendo associado com fator de risco para progressão de casos.

Por sua vez, Perez e colaboradores (2010) identificaram que as combinações entre alelos e genótipos responsáveis por maior produção de TNF- α (A, G/A ou A/A do SNP -308) ou IFN- γ (T, A/T ou T/T do SNP +874) e por menor produção de IL-10 (A e A/A, T e T/T, e A e A/A, nos SNPs -1082, -819 e -592, respectivamente) foram significativamente mais frequentes nos pacientes com FHD quando comparados aos controles na população cubana. Além disso, a presença combinada de quatro variantes polimórficas associadas com risco (alelo A, alelo T, haplótipo ATA e alelo C, nos genes *TNF- α* , *IFN- γ* , *IL-10* e *TGF- β 1*, respectivamente) foram significativamente associadas com pacientes com FHD em comparação aos controles na referida população ($p= 0,034$).

Fernandez-Mestre e colaboradores (2004) demonstraram que as combinações entre os genótipos responsáveis por maior produção de TNF- α (G/A ou A/A do SNP -308) e por menor produção de IL-10 (A/A do SNP -1082) foram significativamente maiores nos pacientes com FHD quando comparado aos controles (OR= 19,5, CI= 1-378,2, $p= 0,013$) ou aos pacientes com FD portadores de outros genótipos (OR= 17,4, CI= 0,89-338, $p= 0,017$), sendo associados como fatores de risco na população venezuelana. No Brasil, Cansanção e colaboradores (2016) observaram que as combinações entre os polimorfismos -819 T/C do gene *IL-10* e -308 G/A do gene *TNF- α* (A/A + C/T; OR= 8,40, CI= 0,92-76,1, $p= 0,03$), bem como entre os SNPs -174 G/C do gene *IL-6* e -308 G/A do gene *TNF- α* (G/G + G/A + A/A; OR= 3,25, CI= 1,08-9,76, $p= 0,03$) foram significativamente associadas com risco de predisposição à dengue sintomática no estado do Ceará.

Em contrapartida, Sam e colaboradores (2015) concluíram que a combinação do SNP -308 G/A do gene *TNF- α* (genótipos G/A + A/A) com os polimorfismos -1082 A/G, -819 T/C e -592 A/C do gene *IL-10* (haplótipos não-GCC; OR= 0,3, CI= 0,2-0,7, $p= 0,002$), homocigotos no gene *IL-12 β* (pro1/pro1 + pro2/pro2; OR= 0,4, CI= 0,2-1,0, $p= 0,042$) e 3'UTR Taq I A/C no gene *IL-12 β* (OR= 0,3, CI= 0,1-0,8, $p= 0,026$) foram significativamente menores nos pacientes com FHD/SCD quando comparados aos controles. Dessa forma, foram associados como fator de proteção contra o desenvolvimento destes casos na população da Malásia.

Os resultados deste estudo mostraram que os pacientes do grupo DEN portadores do alelo A (genótipos G/A ou A/A) em ambos os polimorfismos do gene *TNF- α* apresentaram maior ocorrência das manifestações clínicas da dengue do que os portadores não-A (genótipo G/G), porém não foram encontradas associações estatisticamente significativas de forma específica para nenhuma delas. A partir da análise pelo Teste de Wilcoxon pareado entre todas as frequências dos sintomas em pacientes portadores A e portadores não-A, não houve significância estatística para os SNPs -308 G/A ($Z= 0,69$, $p= 0,49$) e -238 G/A ($Z= 1,60$; $p= 0,11$), embora alguns estudos descritos na literatura tenham descrito que a presença do alelo A destes polimorfismos possa atuar na modulação da patogênese da dengue, e conseqüentemente o mesmo seja um possível fator de risco ou de proteção para o desenvolvimento de manifestações clínicas da doença.

No Brasil, Dettogni e colaboradores (2015) também não observaram nenhuma associação significativa entre o SNP -308 G/A do gene *TNF- α* e a persistência das manifestações clínicas da dengue em pacientes no estado do Espírito Santo. Os autores cogitaram possíveis tendências de associação entre a presença do alelo A deste com a não persistência da sintomatologia 30 dias após seu início, e com a não persistência desta no grupo de casos com dengue secundária, sendo o alelo A significativamente associado com a não persistência ($p= 0,025$). Além disso, o genótipo G/G também foi significativamente associado com a persistência de sintomas neurológicos, psicológicos e comportamentais 30 dias após seu início ($p= 0,038$).

Chuansumrit e colaboradores (2013) também não identificaram associação significativa do SNP -308 G/A deste polimorfismo com risco de severidade da doença na população da Tailândia, embora os autores tenham cogitado que pacientes com dengue e maior frequência do alelo A tenderam a apresentar risco de ocorrência de manifestações hemorrágicas. Por sua vez, Sam e colaboradores (2015) revelaram associações

estatisticamente significativas entre os genótipos dos SNPs nos genes *TNF- α* , *IL-10* e *IL-12 β* e distintas apresentações clínicas dos casos de FHD/SCD na população da Malásia. Segundo os autores, as frequências dos polimorfismos -308 G/A do gene *TNF- α* (genótipos G/A + A/A), 3'UTR Taq I A/C no gene *IL-12 β* , e a combinação com os SNPs -1082 A/G, -819 T/C e -592 A/C do gene *IL-10* (haplótipos não-GCC) e heterozigotos no gene *IL-12 β* (pro1/pro2) foram significativamente reduzidas nos pacientes com trombocitopenia, níveis elevados de ALT e AST, hemoconcentração, hepatomegalia e dor abdominal ($p < 0,05$), sendo associados como fatores de proteção contra progressão para dengue severa.

Conforme apresentado, frequências significativamente maiores do alelo A do SNP -308 G/A foram encontradas nas populações da Tunísia, da África do Sul e da Arábia Saudita, bem como do alelo A do SNP -238 G/A nas populações de Portugal e da Tunísia. Enquanto isso, frequências significativamente menores do alelo polimórfico para este último SNP foram encontradas nas populações da Malásia ($p = 0,032$) e da Índia ($p = 0,032$), quando comparadas aos resultados das frequências obtidas neste estudo. Porém, é válido destacar que a heterogeneidade na distribuição do alelo A em algumas populações é algo que reflete na diversidade de resultados encontrados nos estudos genômicos.

Os referidos achados sugerem a possível influência de fatores como a etnia/raça na base genética da patogenia de muitas doenças (EL-TAHAN; GHONEUM; EL-MASHAD, 2016; JAENISCH et al., 2014), inclusive a dengue. Por exemplo, em populações colombianas e cubanas identificou-se que a ancestralidade genética africana foi associada com efeito protetor contra a severidade da doença (CHÁCON-DUQUE et al., 2014; SIERRA et al., 2017). Dessa forma, os polimorfismos podem ser significativamente associados como fatores de proteção, de susceptibilidade e/ou risco de progressão para formas clínicas mais graves da dengue, ou ainda, podem não revelar nenhuma associação com a doença.

Também é importante ressaltar que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas distribuições das frequências dos alelos A dos SNPs -308 G/A e -238 G/A do gene *TNF- α* obtidas neste estudo quando comparadas a outras pesquisas realizadas na população brasileira. Contudo, esta se caracteriza por apresentar alta variabilidade genética resultante da intensa miscigenação entre diferentes etnias (iniciada após a chegada dos portugueses ao Brasil no século XVI, e intensificada com a chegada dos africanos a partir do tráfico de escravos) (COSTA et al., 2015). Por ser um país de grande extensão territorial associado a diferentes aspectos históricos da

colonização, é válido inferir que os diferentes padrões de miscigenação da população brasileira entre as regiões podem influenciar nas variações de distribuição de polimorfismos nas diferentes regiões do país (CANSANÇÃO et al., 2016; COSTA et al., 2015; FEITOSA et al., 2016; MOREIRA et al., 2008).

Por exemplo, ao se avaliar o grau de miscigenação na população do estado do Piauí residente na cidade de Parnaíba por meio de marcadores informativos de ancestralidade, foi revelado que a constituição genética desta população predominantemente se compõe por descendências europeia (60%), africana (21,5%) e ameríndia (18,5%) (COSTA et al., 2015; FERREIRA-FERNANDES et al., 2015; LOPES et al., 2014). Tal padrão de composição também foi concomitante ao encontrado na população brasileira do Estado do Paraná (MOREIRA et al., 2008; PROBST et al., 2000), bem como também ao da população de Cuba (PEREZ et al., 2010).

Muitas são as limitações apontadas no grau de reprodução entre os diferentes estudos genômicos que possam detectar corretamente uma verdadeira associação de diferentes polimorfismos com as mais variadas doenças infecciosas (CHAPMAN; HILL, 2012). Dentre tais obstáculos destacam-se: a etnicidade e estratificação das populações estudadas, onde as diferenças de ancestralidade sistemática entre casos e controles podem levar a associações falsas ou confusas; os pequenos tamanhos amostrais, que juntamente com a distribuição da frequência alélica, a magnitude do efeito e o limiar de significância estatística podem acarretar em baixo poder de associação; a definição e diferenciação incorreta de casos e controles; e outras variações não identificadas na interação entre patógeno-hospedeiro ou gene-ambiente (CHAPMAN; HILL, 2012; CHATUVERDI; NAGAR; SHRIVASTAVA, 2006; COFFEY et al., 2009; LAN; HIRAYAMA, 2011).

7 CONCLUSÃO

De acordo com o referido estudo, pode-se concluir que:

- 158 pacientes tiveram diagnóstico confirmado para dengue e compuseram o grupo DEN. Com base na apresentação das manifestações clínicas destes, 68,4% foram classificados no grupo DSSA, e 31,6% foram classificados no grupo DCSA.
- As análises das frequências alélicas dos SNPs -308 G/A (rs1800629) e -238 G/A (rs361525) do gene *TNF- α* mostraram que o alelo A foi mais frequente grupo DEN quando comparado ao grupo controle, porém sem apresentar diferenças estatisticamente significativas. Quando estas frequências foram comparadas ao grupo ASS, o alelo A foi mais presente no grupo DEN, porém sem mostrar diferenças estatisticamente significativas;
- As análises das frequências genóticas de ambos os SNPs do gene *TNF- α* revelou que estes se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, e mostraram que a presença do genótipo G/A + A/A foi maior no grupo DEN quando comparado ao grupo controle, porém sem apresentar diferenças estatisticamente significativas. Quando estas frequências foram comparadas ao grupo ASS, a presença destes genótipos foi maior no grupo DEN, porém sem mostrar diferenças estatisticamente significativas;
- Na análise das frequências haplotípicas, a presença do haplótipo duplo selvagem (G-G) foi maior nos grupos DEN, DSSA e DCSA quando comparado ao grupo controle, foi maior no grupo DCSA quando comparado ao grupo DSSA, e também foi maior no grupo ASS quando comparado aos grupos DEN, DSSA, DCSA e controle. Contudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas que revelassem um possível efeito combinado destes SNPs com a dengue. Além disso, os haplótipos dos SNPs do gene *TNF- α* apresentaram baixo desequilíbrio de ligação entre si;
- Na investigação da prevalência das manifestações clínicas nos indivíduos do grupo DEN, para ambas as variantes polimórficas do gene *TNF- α* foi observada uma maior ocorrência em pacientes portadores do alelo A do que em não portadores do alelo A, porém sem apresentar diferença estatisticamente significativa;

- Comparando-se as frequências do alelo A observadas neste estudo com os resultados obtidos em outras pesquisas descritas na literatura, a frequência do alelo A para o SNP -308 G/A foi de 11%, enquanto que para o SNP -238 G/A foi de 7,1%. Os resultados corroboraram a distribuição heterogênea dos alelos A de ambos os polimorfismos do gene *TNF- α* nas diferentes populações do mundo, e a provável influência da ancestralidade genética no desenvolvimento da dengue.

De modo geral, não foram identificadas associações estatisticamente significativas entre os polimorfismos -308 G/A (rs1800629) e -238 G/A (361525) do gene *TNF- α* e sua influência no delineamento das manifestações clínicas dos pacientes com dengue. Os resultados ressaltam a necessidade de realização de estudos genômicos de associação que auxiliem na compreensão dos mecanismos da sua patogênese, bem como da real influência dos fatores do hospedeiro com a doença. Assim, poder-se-á inferir se a prevalência dos referidos SNPs desempenham possíveis papéis como fatores de proteção, de susceptibilidade e/ou risco de desenvolvimento de formas graves da dengue na população norte-piauiense, cooperando futuramente para que haja um melhor manejo clínico dos casos, e que também possam ser adotadas medidas mais efetivas de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle, considerando os impactos causados pela doença.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ALAGARASU, K.; et al. Association of combinations of interleukin-10 and pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms with dengue hemorrhagic fever. **Cytokine**, v. 74, p. 130-136, 2015.

ALAGARASU, K.; et al. Association of HLA-DRB1 and TNF genotypes with dengue hemorrhagic fever. **Human Immunology**, v. 74, p. 610-617, 2013.

ARAÚJO, J. M.; Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. 1-10, set. 2012.

ATAN, D.; et al. Tumor necrosis factor polymorphisms associated with tumor necrosis factor production influence the risk of idiopathic intermediate uveitis. **Molecular Vision**, v. 19, n. 1, p. 184-195, 2013.

AVIRUTNAN, P.; et al. Dengue Virus Infection of Human Endothelial Cells Leads to Chemokine Production, Complement Activation, and Apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 1, p. 6338-6346, dez. 1998.

AVIRUTNAN, P.; et al. Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 8, p. 1078-1088, 2006.

AZAD, A. K.; SADEE, W.; SCHLESINGER, L. S. Innate immune gene polymorphisms in Tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 10, p. 3343-3359, out. 2012.

BACK, A. T.; LUNDKVIST, A. Dengue viroses, an overview. **Infection and Epidemiology**, v. 3, n. 19839, p. 1-21, ago. 2013.

BALMASEDA, A.; et al. Serotype-Specific Differences In Clinical Manifestations Of Dengue. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 3, p. 449-456, 2006.

BANDYOPADHYAY, S.; LUM, L. C. S.; KROEGER, A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. **Tropical Medicine and International Health**, v. 2, n. 8, p. 1238-1255, ago. 2006.

BARBISAN, G.; et al. TNF- α and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk. **Tumor Biology**, v. 33, n. 5, p. 1549-1556, out. 2012.

BARNIOL, J.; et al. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 106, p. 1-12, abr. 2011.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. **Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa.** Estudos avançados (Dossiê Epidemias), v. 22. N. 64, p. 53-72, dez. 2008

BAYLEY, J. P.; OTTENHOFF, T. H. M.; VERWEIJ, C. L. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? **Genes and Immunity**, v. 5, n. 5, p. 315-329, ago. 2004.

BHATT, S.; et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, p. 504-507, abr. 2013.

BOONPUCKNAVIG, S.; et al. Demonstration Of Dengue Antibody Complexes On The Surface Of Platelets From Patients With Dengue Hemorrhagic Fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 28, n. 5, p. 881-884, 1979.

BORASKA, V.; et al. Association of TNF promoter polymorphisms with type 1 diabetes in the South Croatian population. **Biological Research**, v. 41, n. 2, p. 157-163, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 37, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 34, p. 1-10, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 3, p. 1-10, 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança.** Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 58 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. **Plano de Contingência Nacional para Epidemias de Dengue.** Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 42 p.

BRONZONI, R. V. M.; et al. Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696-702, fev. 2005.

CAFFERATA, M. L.; et al. Dengue Epidemiology and Burden of Disease in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. **Value In Health Regional Issues**, v. 2, n. 3, p. 347-356, dez. 2013.

CÂMARA, F. P.; et al. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 192-196, mar-abr. 2007.

CANSANÇÃO, I. F.; et al. Association of genetic polymorphisms of IL1b -511 C>T, IL1RN VNTR 86 bp, IL6 -174 G>C, IL10 -819 C>T and TNF α -308 G>A, involved in symptomatic patients with dengue in Brazil. **Inflammation Research**, p. 1-8. 2016. Ahead of print. DOI: 10.1007/s00011-016-0975-5.

CASSEB, A. R.; et al. Arbovírus: importante zoonose na Amazônia brasileira. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 9-21, set. 2013.

CASTRO, J. A. F.; et al. Dengue Viruses Activity in Piauí, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1021-1023, dez. 2003.

CATÃO, R. C. **Dengue no Brasil – Abordagem Geográfica na Escala Nacional**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012.

CAVALCANTI, L. P. G.; et al. Evaluation of the WHO classification of dengue disease severity during an epidemic in 2011 in the state of Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 93-98, fev. 2013.

CEDILLO-BARRÓN, L.; et al. Antibody response to dengue virus. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 9, p. 711-720, set. 2014.

CHAAITHANYA, I. K.; et al. Association of Oligoadenylate Synthetase Gene Cluster and DC-SIGN (*CD209*) Gene Polymorphisms with Clinical Symptoms in Chikungunya Virus Infection. **DNA and Cell Biology**, v. 35, n. 1, p. 44-50, jan. 2016.

CHACÓN-DUQUE, J. C.; et al. African genetic ancestry is associated with a protective effect on Dengue severity in colombian populations. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 27, p. 89-95, out. 2014.

CHAMBERS, T. J.; et al. Flavivirus Genome Organization, Expression, And Replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHAO, D. Y.; DAVIS, B. S.; CHANG, G. J. J. Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n.2, p. 584-589, fev. 2007.

CHAPMAN, S. J; HILL, A. V. S. Human genetic susceptibility to infectious disease. **Nature Reviews – Genetics**, v. 13, n. 1, p. 175-188. 2012.

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

CHATUVERDI, U. C.; NAGAR, R.; SHRIVASTAVA, R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. **Immunology & Medical Microbiology**, v. 47, n. 1, p.155-166, fev. 2006.

CHUANSUMRIT, A.; et al. Tumour necrosis factor gene polymorphism in dengue infection: association with risk of bleeding. **Paediatrics and International Child Health**, v. 33, n. 2, p. 97-101, mai. 2013.

CHURDBOONCHART, V.; BHAMARAPRAVATI, N.; FUTRAKUL, P. Crossed Immunoelectrophoresis For The Detection Of Split Products Of The Third Complement In Dengue Hemorrhagic Fever. **The American Journal Of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 3, p. 569-576, 1983.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, dez. 2006.

COFFEY, L. L.; et al. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 1, p. 143-156, 2009.

COHEN, C. J.; et al. Human Th1 and Th17 cells exhibit epigenetic stability at signature cytokine and transcription factor loci. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 11, p. 5615-5626, dez. 2011.

COLOGNA, R.; ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes, **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 853-859, jan. 2005.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.

CORBETT, E. L.; et al. Polymorphisms in the Tumor Necrosis Factor- α Gene Promoter May Predispose to Severe Silicosis in Black South African Miners. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, n. 5, p. 690-693, mar. 2002.

CORREA, P. A.; et al. Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. **The Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 2, p. 219-224, nov. 2005.

COSTA, P. N.; et al. Frequency of SNP -336A/G in the promoter region of CD209 in a population from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 9395-9403, 2015.

COSTA, R. L.; VOLOCH, C. M.; SCHRARGO, C. G. Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. **Infections, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 309-314, mar. 2012.

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. 1950-1961, jun. 2013.

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

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, p. 717-723, 2015.

DIAS, L. B. A.; et al. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, n. 2, p. 143-152, 2010.

DIAMOND, M. S.; PIERSON, T. C. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. **Cell**, v. 162, n. 3, p. 488-492, jul. 2015.

DINU, S.; et al. Molecular epidemiology of dengue fever cases imported into Romania between 2008 and 2013. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 13, n. 1, p. 69-73, fev. 2015.

DRUMOND, B. P.; et al. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by cocirculation and strain/lineage replacement. **Archives of Virology**, v. 157, n. 11, p. 2061-2073, nov. 2012.

DUTTA, D.; et al. Tumor necrosis factor alpha S238G/A (rs 361525) gene polymorphism predicts progression to type-2 diabetes in an Eastern Indian population with prediabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 99, n. 1, p. 37-41, mar. 2013.

EL-TAHAN, R. R.; GHONEIM, A. M.; EL-MASHAD, N. TNF- α gene polymorphisms and expression. **Springerplus**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2016.

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, p. 163-172, 2009.

ESSADIK, A.; et al. Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Alpha in Moroccan Patients with Gastric Pathology: New Single-Nucleotide Polymorphisms in TNF- α -193 (G/A). **Mediators of Inflammation**, v. 2015, n. 1, p. 1-5, 2015.

FANG, X.; et al. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. **Immunology & Medical Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 134-146, nov. 2012.

FARES, R. C. G.; et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

FAWZI, M. S.; et al. Influence of tumor necrosis factor alpha gene promoter polymorphisms and its serum level on migraine susceptibility in Egyptian patients. **Journal of The Neurological Sciences**, v. 348, n. 1-2, p. 74-80, jan. 2015.

FEITOSA, R. N. M.; et al. Gene Polymorphisms and Serum Levels of Pro- and Anti-Inflammatory Markers in Dengue Viral Infections. **Viral Immunology**, p. 1-10, jun. 2016. Ahead of print. DOI:10.1089/vim.2016.0026.

FERGUSON, L. R.; et al. Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 29, p. 4652-4661, ago. 2008.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D.; et al. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318-328, abr. 2009.

FERNANDEZ-MESTRE, M. T.; et al. TNF- α -308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens**, v. 64, p. 469-472, 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. 157-164, out-dez. 2015.

FERREIRA, G. P.; et al. Climbing the steps of viral atomic force microscopy: visualization of Dengue virus particles. **Journal of Microscopy**, v. 231, n. 1, p. 180-185, jul. 2008.

FERREIRA-FERNANDES, H.; et al. Prevalence of CCR5- Δ 32 and CCR2-V64I polymorphisms in a mixed population from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 11710-11718. 2015.

FIGUEIREDO, L. B.; et al. Dengue virus 2 American-Asian genotype identified during the 2006/2007 outbreak in Piauí, Brazil reveals a Caribbean route of introduction and dissemination of dengue virus in Brazil. **PLOS One**, v. 9, n. 8, p. 1-11, ago. 2014.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviroses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, mar-abr. 2007.

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

FIGUEIREDO, L. T. M. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 233-234, mai-jun. 2015.

FLIPSE, J.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Molecular Mechanisms Involved in Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection in Humans. **Traffic**, v. 14, n. 1, p. 25-35, jan. 2013.

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

GARCÊS, T. C. C. S. **Caracterização molecular de Dengue virus circulantes e investigação de Flavivirus emergentes no estado do Piauí**. 2016. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2016.

GARCÍA-TREJO, A. R.; et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with dengue fever. **Acta Tropica**, v. 120, p. 67-71, 2011.

GOMES, A. V. B. T.; et al. Demethylation Profile of the TNF- α Promoter Gene Is Associated With High Expression of This Cytokine in Dengue virus Patients. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 8, p. 1-6, 2016.

GRANDI, T.; et al. Tumour necrosis factor -308 and -238 promoter polymorphisms are predictors of a null virological response in the treatment of Brazilian hepatitis C patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 345-351, mai. 2014.

GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 429-436, out. 2006.

GUBLER, D. J. Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever: History and Current Status. In: Novartis Foundation Symposium (Editors: BOCK, G.; GOODE, J). **New Treatment Strategies for Dengue e Other Flaviviral Diseases**. Chiclester: John Wiley & Sons, 2006. v. 277, p. 3-22.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, jul. 1998.

GUBLER, D. J. Dengue, urbanization and globalization: The unholy Trinity of the 21st Century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4, p. 3-11, 2011.

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

GUBLER, D. J.; CLARK, G. C. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 55-57, abr-jun. 1995.

GUZMAN, A.; ISTÚRIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 1, p. 40-42, nov. 2010.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453-465, jan. 2015.

GUZMAN; M. G.; KOURI, G. Advances in Dengue Diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 6, p. 621-627, nov. 1996.

GUZMAN, M.; KOURI, G. Dengue: um update. **The Lancet**, v. 2, n. 1, p. 33-42, jan. 2002.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challanges. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 69-80, mar. 2004.

GUZMAN, M. G.; et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Rewies – Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 7-16, dez. 2010.

GUZMAN, M. G.; et al. Dengue infection. **Nature Reviews – Disease Primers**, v. 2, n. 16055, p. 1-25, ago. 2016. Ahead of print. DOI: 10.1038/nrdp.2016.55.

HADINEGORO, S. R. S. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? **Pediatrics and International Child Health**, v. 32, n. 1, p. 33-38, 2012.

HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. Influence of TNF- α Gene Polymorphisms on TNF- α Production and Disease. **Human Immunology**, v. 62, n. 11, p. 1191-1199, nov. 2001.

HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. TNF- α Gene Polymorphism: Clinical and Biological Implications. **Microscopy Research And Technique**, v. 50, n. 3, p. 216-228, ago. 2000.

HALSTEAD, S. B. Dengue Virus–Mosquito Interactions. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 273-291, 2008.

HALSTEAD, S. B. Observations Related To Pathogenesis Of Dengue Hemorrhagic Fever (VI - Hypotheses And Discussion). **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 42, n. 5, p. 350-362, abr. 1970.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of Dengue: Dawn of a New Era. **F1000 Research**, v. 4, p. 1-8, nov. 2015. doi: 10.12688/f1000research.7024.1

HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Dengue Viruses And Mononuclear Phagocytes (I - Infection Enhancement By Non-Neutralizing Antibody). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 1, p. 201-217, jul. 1977.

HALSTEAD, S. B.; NIMMANNITYA, S.; COHEN, S. N. Observations Related To Pathogenesis Of Dengue Hemorrhagic Fever (IV - Relation Of Disease Severity To Antibody Response And Virus Recovered). **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 42, n. 5, p. 311-328, abr. 1970.

HAMADIEN, M. A.; et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor alpha in Middle Eastern population with colorectal câncer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 4, p. 5529-5537, abr. 2016.

HARAPAN, H.; et al. Genetic Polymorphisms of HLA and HLA-Related Proteins: Implications on Dengue Virus Infection. **Journal of Mosquito Research**, v. 3, p. 1-10, 2013.

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

HERNÁNDEZ, S. I. C.; et al. Primary dengue virus infections induce differential cytokine production in Mexican patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, n. 3, p. 161-167, mar. 2016.

HERRERO, L. J.; et al. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 137, n. 2, p. 266-282, fev. 2013.

HOUNIE, A. G.; et al. TNF-alpha polymorphisms are associated with obsessive-compulsive disorder. **Neuroscience Letters**, v. 442, n. 2, p. 86-90, set. 2008.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Parnaíba - população estimada 2016**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/perfil.php?codmun=220770>>. Acesso em 23 jun. 2017.

- IVORY, M. O.; BIRCHALL, J. C.; PIGUET, V. Early Dengue Virus Infection in Human Skin: A Cycle of Inflammation and Infectivity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 7, p. 1711-1712, jul. 2015.
- JAEGER, M.; et al. Genetic variation in pattern recognition receptors: functional consequences and susceptibility to infectious disease. **Future Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 989-1008, 2015.
- JAENISH, T.; et al. Dengue Expansion in Africa—Not Recognized or Not Happening? **Emerging Infectious Disease**, v. 20, n. 10, p. 1-14, out. 2014.
- JAIN, B.; CHATUVERDI, U. C.; JAIN, A. Role of intracellular events in the pathogenesis of dengue; An overview. **Microbial Pathogenesis**, v. 69-70, p. 45-52, abr-mai. 2014.
- JAPOLLA, G.; et al. Teste Imunocromatográfico de Fluxo Lateral: Uma Ferramenta Rápida de Diagnóstico. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, p. 26-35, 2015.
- JOHN, A. L. S.; ABRAHAM, S. N.; GUBLER, D. J. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 420-426, jun. 2013.
- JOHNSTON, L. J.; HALLIDAY, G. M.; KING, N. J. C. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with na arbovírus. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 3, p. 560-568, mar. 2000.
- KALAYANAROOJ, S.; et al. Blood Group AB Is Associated with Increased Risk for Severe Dengue Disease in Secondary Infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 7, p. 1014-1017, 2007.
- KALUZA, W.; et al. Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 6, p. 1180-1183, jun. 2000.
- KAO, C. L.; et al. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 38, n. 1, p. 5-16, fev. 2005.
- KELLEY, J. F.; KAUFUSI, P. H.; NERURKAR, V. R. Dengue hemorrhagic fever-associated immunomediators induced via maturation of dengue virus nonstructural 4B protein in monocytes modulate endothelial cell adhesion molecules and human microvascular endothelial cells permeability. **Virology**, v. 422, n. 2, p. 326-337, 2012.
- KHALILULLAH, S. A.; et al. Host genome polymorphisms and tuberculosis infection: What we have to say? **Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis**, v. 63, n. 1, p. 173-185, 2014.
- KHLIFI, L.; et al. Analysis Of Tumor Necrosis Factor G238A and G308A Gene Polymorphisms In Tunisian Patients With Pressure Ulcer. **International Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v. 7, n. 3, p. 976-983, mar. 2016.

KNIGHT, J. C.; KEATING, B. J. Polymorphism of TNF Genes and Disease Susceptibility. **Encyclopedia Of Life Sciences (ELS)**. John Wiley & Sons, 2005.

KOROLIJA, M.; et al. Genetic evaluation of the TNF- α -238 G>A and -308 G>A promoter polymorphisms in Croatian patients with type I diabetes. **Human Immunology**, v. 71, n. 12, p. 1228-1232, dez. 2010.

KRISHNAN, M. N.; GARCIA-BLANCO, M. A. Targeting host factors to treat West Nile and dengue viral infections. **Viruses**, v. 6, n. 2, p. 683-708, fev. 2014.

KROEGER, K. M.; CARVILLE, K. S.; ABRAHAM, L. J. The -308 Tumor Necrosis Factor- α promoter polymorphism effects transcription. **Molecular Immunology**, v. 34, n. 5, p. 391-399, 1997.

KUHN, R. J.; et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-725, mar. 2002.

KURANE, I.; Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n. 5-6, p. 329-340, set. 2007.

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

KUROSU, T.; et al. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 4, p. 1051-1056, nov. 2007.

LAN, N. T. P.; HIRAYAMA, K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4, p. 73-81, out. 2011.

LANCIOTTI, R. S.; et. al. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545-551, mar. 1992.

LIBRATY, D. H.; et al. Human Dendritic Cells Are Activated by Dengue Virus Infection: Enhancement by Gamma Interferon and Implications for Disease Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 3501-3508, abr. 2001.

LIMA, F. R.; et al. Evaluation of the traditional and revised world health organization classifications of dengue cases in Brazil. **Clinics**, v. 68, n. 10, p. 1299-1304, out. 2013.

LIMA-CÂMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 36, p. 1-7, 2016.

LI, H.; et al, Association of tumor necrosis factor alpha polymorphisms with cervical câncer in a Chinese population. **International Journal of Clinical and Experimental Patology**, v. 9, n. 2, p. 2200-2207, 2016.

LIN, C. F.; et al. Expression of Cytokine, Chemokine, and Adhesion Molecules during Endothelial Cell Activation Induced by Antibodies against Dengue Virus Nonstructural Protein 1. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 1, p. 395-403, jan. 2005.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Editors). **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1101-1152.

LOEB, M. Genetic Susceptibility to West Nile Virus and Dengue. **Public Health Genomics**, v. 16, n. 1, p. 4-8, 2013.

LOKE, H.; et al. Strong HLA Class I–Restricted T Cell Responses in Dengue Hemorrhagic Fever: A Double-Edged Sword? **The Journal of Infectious Disease**, v. 184, n. 1, p. 1369-1373, dez. 2001.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LOPES, T. R.; et al. Population data of the 46 insertion-deletion (INDEL) loci in population in Piauí State, Northeastern Brazil. **Forensic Science International Genetics**, v. 9, n. 1, p. 13-15, 2014.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, R.; et al. Genetic polymorphisms of tumour necrosis factor alpha (TNF- α) promoter gene and response to TNF- α inhibitors in Spanish patients with inflammatory bowel disease. **International Journal of Immunogenetics**, v. 41, n. 1, p. 63-68, fev. 2014.

LV. Y. J.; et al. Association of tumor necrosis factor- α gene polymorphism with osteoarticular tuberculosis prognosis in a Hebei population. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1-9, out. 2016.

MABUNDA, N.; et al. Gene polymorphisms in patients with pulmonary tuberculosis from Mozambique. **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 1, p. 71-76, jan. 2015.

MACEDO, L. C.; et al. Association of *TNF* polymorphisms with *JAK2* (V617F) myeloproliferative neoplasms in Brazilian patients. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 57, n. 1, p. 54-57, mar. 2016.

MAIRUHU, A. T. A.; et al. Is clinical outcome of dengue-virus infections influenced by coagulation and fibrinolysis? A critical review of the evidence. **The Lancet**, v. 3, n. 1, p. 33-41, jan. 2003.

MALAVIGE, G. N.; et al. Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, v. 80, n. 948, p. 588-601, out. 2004.

MAMANI, E. Nuevo serotipo 5 del virus dengue: necesidad de fortalecer la vigilancia molecular en Perú. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 31, n. 1, p. 169-180, 2014.

- MARTINA, B. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 564-581, out. 2009.
- MATHEW, A.; ROTHMAN, A. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunological Reviews**, v. 225, p. 300-313, 2008.
- MENDONÇA, F. A.; VEIGA E SOUZA, A.; DUTRA, D. A. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. **Sociedade & Natureza**, v. 21, n. 3, p. 257-269, dez. 2009.
- MESSINA, J. P.; et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 138-146, mar. 2014.
- MONATH, T. P.; HEINZE, F. Flaviviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Editors). **Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 961-1034.
- MONTEIRO, E. S. C.; et al. Aspectos epidemiológicos e vetoriais da dengue na cidade de Teresina, Piauí – Brasil, 2002 a 2006. **Epidemiologia em Serviços de Saúde**, v. 18, n. 4, p. 365-374, out-dez. 2009.
- MOREIRA, S. T.; et al. The Possible Protective Role of the Il6 -174GC Genotype in Dengue Fever. **The Open Tropical Medicine Journal**, v. 1, p. 87-91, 2008.
- MORELI, M. L.; COSTA, V. G. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. **Virology Discovery**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2013.
- MOUKOKO, C. E.; et al. No Evidence for a Major Effect of Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Polymorphisms in Periportal Fibrosis Caused by *Schistosoma mansoni* Infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5456-5460, out. 2003.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A Structural Perspective Of The Flavivirus Life Cycle. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13-22, jan. 2005.
- MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, presente and future prospect. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 299-309, 2013.
- 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, 2015.
- NARVAEZ, F.; et al. Evaluation of the Traditional and Revised WHO Classifications of Dengue Disease Severity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 11, p. 1-8, 2011.

NEDOSZYTKO, B.; et al. Associations of promoter region polymorphisms in the tumour necrosis factor- α gene and early-onset psoriasis vulgaris in a northern Polish population. **The British Journal of Dermatology**, v. 157, n. 1, p. 165-167, jul. 2007.

NGUYEN, T. H.; et al. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 4, p. 370-374, abr. 2005.

NIELSEN, D. G. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. **Virology Journal**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2009.

NISHIOKA, K. Serum complement level in dengue hemorrhagic fever. **Allergie und Immunologie (Leipzig)**, v. 20-21, n. 4, p. 385-392, 1974.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws A Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, v. 342, p. 415, out. 2013.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, n. 1, p. 10-13, jul-dez. 2004.

OISHI, K.; et al. Correlation Between Increased Platelet-associated IgG and Thrombocytopenia in Secondary Dengue Virus Infections. **Journal of Medical Virology**, v. 71, n. 2, p. 259-264, out. 2003.

OHAINLE, M.; et al. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 114, p. 114-128, dez. 2011.

OSANAI, Carlos. H. et al. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima. **Revista do Instituto de Medicina tropical**, v. 25, n. 1, p. 53-54, jan-fev. 1983.

PAHO – Pan American Health Organization. **Description of the current epidemiological trends of dengue in the Americas**. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494&Itemid=2481&lang=en>. Acesso em 20 jul. 2016.

PASTORINO, B.; et al. Role of host cell factors in Flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. **Antiviral Research**, v. 87, n. 3, p. 281-294, set. 2010.

PEELING, R. W.; et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 30-38, dez. 2010.

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, p. 1135-1140, 2010.

PRADA-ARISMENDY, J.; CASTELLANOS, J. E. Genes de susceptibilidad/resistencia a *Flavivirus*, implicaciones en la severidad de la infección. **Acta Biológica Colombiana**, v. 11, n. 2, p. 21-30, jun. 2006.

PRIME CIRÚRGICA. **Kit Teste Rápido Dengue IgG/IgM, Orangelife**. Disponível em: <<http://www.primecirurgica.com.br/produto/kit-teste-rapido-dengue-iggigm-caixa-com-20-orangelife/>>. Acesso em 11 jul. 2016.

PRIME CIRÚRGICA. **Teste Rápido Imunocromatografia Dengue Duo Combo Ns1 Ag + Ac Bioeasy**. Disponível em: <<http://www.primecirurgica.com.br/produto/teste-rapido-imunocromatografia-dengue-duo-combo-ns1-ag-ac-bioeasy/>>. Acesso em 11 jul. 2016.

PROBST, C. M.; et al, HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. **Human Biology**, v. 72, n. 4, p. 597-617, ago. 2000.

QIDWAY, T.; KHAN, M. Y. Tumour Necrosis Factor Gene Polymorphism and Disease Prevalence. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 74, n. 6, p. 522-547, dez. 2011.

QIDWAY, T.; JAMAL, F.; KHAN, M. Y. DNA sequence variation and regulation of genes involved in pathogenesis of pulmonar tuberculosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 75, n. 1, p. 568-587, jun. 2012.

REZENDE, J. F. Notas históricas e filológicas sobre a dengue. **Revista de Patologia Tropical**, v. 26, n. 2, p. 375-380, jul-dez. 1997.

RICO-HESSE, R. Dengue Virus Evolution and Virulence Models. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 1462-1468, jun. 2007.

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viroses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 315-341, 2003.

RICO-HESSE, R. Origins of Dengue Type 2 Viruses Associated with Increased Pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 244-251, abr. 1997.

RIGAU-PÉREZ, J. G.; et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **The Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 971-977, set. 1998.

ROCHA, E. S.; et al. Recombinant envelope protein-based enzyme immunoassay for IgG antibodies is comparable to neutralization tests for epidemiological studies of dengue infection. **Journal of Virological Methods**, v. 187, n. 1, p. 114-120, jan. 2013.

RODENHIUS-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. 2773-2786, ago. 2010.

ROTHMAN, A. L. Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. In: ROTHMAN, A. L. (Editor). **Dengue virus - Current Topics in Microbiology and Immunology**. New York: Springer, 2010. v. 338, p. 83-98.

- ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews – Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532-543, jul. 2011.
- ROTHMAN, A. L. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. **Advances in Virus Research**, v. 60, p. 397-419, 2003.
- ROTHMAN, A. L.; et al. Immunopathogenesis versus Protection in Dengue Virus Infections. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, n. 1, p. 13-20, mar. 2014.
- SAITO, M.; et al. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 2, p. 299-303, nov. 2004.
- SALAZAR, M. I.; et al. The role of cell proteins in dengue virus infection. **Journal of Proteomics**, v. 111, p. 6-15, 2014.
- 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. 177-186, 2015.
- SANDERS, V. M. Epigenetic regulation of Th1 and Th2 cell development. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 20, n. 4, p. 317-324, jul. 2006.
- SANTOS, L. S. **Vigilância epidemiológica e análise molecular do Dengue virus no Piauí**: busca dos sorotipos circulantes. 2013. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2013.
- SANTOS, M. J.; et al. TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G polymorphisms in Portuguese patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology International**, v. 32, n. 8, p. 2239-2244, ago. 2012.
- SANTOS, N. O. S.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. 532 p.
- SANTOS, S. L. **Avaliação das ações de controle da dengue**: Aspectos críticos e percepção da população – estudo de caso em um município do Nordeste. 2003. 133f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2003.
- SCHÜBELER, D. Function and information content of DNA methylation. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 321-326, jan. 2015.
- SHAIQ, M. F.; CHANG, F. Y.; HOU, S. C. Complement pathway activity in serum from patients with classical dengue fever. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 6, p. 672-675, nov-dez. 1992.
- SHEPARD, D. S.; UNDURRAGA, E. A.; HALASA, Y. A. Economic and Disease Burden of Dengue in Southeast Asia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, p. 1-12, fev. 2013.

SHEPARD, D. S.; et al. Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200-207, fev. 2011.

SIERRA, B.; KOURI, G.; GUZMAN, M. G. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. **Archives of Virology**, v. 152, n. 3, p. 533-542, 2007.

SIERRA, B.; et al. OSBPL10, RXRA and lipid metabolism confer African-ancestry protection against dengue haemorrhagic fever in admixed Cubans. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 1-21, fev. 2017.

SILVA, A. A. **Avaliação de fatores de risco da dengue com interface no sistema ABO em pacientes internados com a infecção no Hospital Universitário Lauro Wanderley-PB**. 2013. 71f. Tese (Doutorado em Medicina e Saúde) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

SILVA, F. M. P. **Investigação de polimorfismos nos genes das citocinas TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-6 e IL-10 em pacientes com febre hemorrágica da dengue**. 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SILVA, G. A. V.; et al. Association of TNF- α -1031 C/C as a potential protection marker for leprosy development in Amazonas state patients, **Brazil. Human Immunology**, v. 76, n. 1, p. 137-141, 2015.

SIM, S.; HIBBERD, M. L. Genomic approaches for understanding dengue: insights from the virus, vector, and host. **Genome Biology**, v. 17, n. 38, p. 1-15, mar. 2016.

SIMMONS, C. P.; et al. Dengue. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423-1432, abr. 2012.

SINGH, P. K.; et al. Association of TNF- α (-238 and -308) promoter polymorphisms with susceptibility of oral squamous cell carcinoma in North Indian population. **Cancer Biomarkers**, v. 15, n. 1, p. 125-131, 2015.

SIQUEIRA, T. R. **Investigação de fatores sorológicos e genéticos relacionados com a predisposição ao desenvolvimento das formas graves da dengue em Juiz de Fora**. 2015. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

SIQUEIRA, J. B.; et al. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 48-53, jan. 2005.

SORTICA, V. A.; et al. *IL1B*, *IL4R*, *IL12RB1* and *TNF* gene polymorphisms are associated with Plasmodium vivax malária in Brazil. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 1-7, dez. 2012.

SOUSA, E.; et al. Ankylosing spondylitis susceptibility and severity--contribution of TNF gene promoter polymorphisms at positions -238 and -308. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1, n. 1, p. 581-588, set. 2009.

STANCZUK, G. A.; et al. Polymorphism at the -308-promoter position of the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) gene and cervical câncer. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 13, n. 2, p. 148-153, mar-abr. 2003.

STEPHENS, H. A. F. HLA and other gene associations with dengue disease severity. In: ROTHMAN, A. L. (Editor). **Dengue virus - Current Topics in Microbiology and Immunology**. New York: Springer, 2010. v. 338, p. 99-114.

TANG, K. F.; OOI, E. E. Diagnosis of dengue: an update. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 8, p. 895-907, ago. 2012.

TEDDE, A.; et al. Lack of association between TNF- α polymorphisms and Alzheimer's disease in an Italian cohort. **Neuroscience Letters**, v. 446, n. 2-3, p. 139-142, dez. 2008.

TEIXEIRA, A. C.; et al. Alleles and genotypes of polymorphisms of IL-18, TNF-a and IFN-c are associated with a higher risk and severity of hepatocellular carcinoma (HCC) in Brazil. **Human Immunology**, v. 74, n. 8, p. 1024-1029, ago. 2013.

TEIXEIRA, M. G.; et al. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000–2010): A Systematic Literature Search and Analysis. **PLOS Neglected Diseases**, v. 7, n. 12, p. 1-13, dez. 2013.

THERMOFISHER SCIENTIFIC. **SNP Genotyping Analysis Using TaqMan® Assays**. Disponível em: < <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/taqman-assay-genetic-variation-research-br.pdf>>. Acesso em 11 jul. 2016.

THERMOFISHER SCIENTIFIC. **ThermoFisher Cloud**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/cloud.html>>. Acesso em 01 fev. 2017.

TRUNG, D. D.; WILLS, B. Systemic vascular leakage associated with dengue infections. In: ROTHMAN, A. L. (Editor). **Dengue virus - Current Topics in Microbiology and Immunology**. New York: Springer, 2010. v. 338, p. 57-66.

VALE, V. S. **Caracterização molecular de Dengue virus circulantes no Nordeste Brasileiro**. 2015. 61f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2015.

VÁZQUEZ-HUERTA, D. I.; et al. Tumor necrosis factor alpha -238 G/A and -308 G/A polymorphisms and soluble TNF- α levels in chronic kidney disease: correlation with clinical variables. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 8, p. 2111-2119, ago. 2014

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, p. 1442-1448, mai. 2009.

VIANA, D. V.; IGNOTTI, E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 2, p. 240-256, 2013.

VIRALZONE. **Virion Structure of the Flaviviridae**. 2016. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/43.html>. Acesso em 17 jul. 2016.

WAHALA, W. M. P. B; SILVA, A. M. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. **Viruses**, v. 3, n. 12, p. 2374-2395, dez. 2011.

WANG, L.; et al. DC-SIGN (CD209) Promoter -336 A/G Polymorphism Is Associated with Dengue Hemorrhagic Fever and Correlated to DC-SIGN Expression and Immune Augmentation. **PLOS One Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, p. 1-10, jan. 2011.

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

WHITEHORN, J.; SIMMONS, C. P. The Pathogenesis of Dengue. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7221-7228, set. 2011.

WHITEMAN, D. C.; et al. Association of *Helicobacter pylori* Infection With Reduced Risk for Esophageal Cancer Is Independent of Environmental and Genetic Modifiers. **Gastroenterology**, v. 139, n. 1, p. 73-83, jul. 2010.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva: World Health Organization, 2009. 160 p.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Handbook for Clinical Management of Dengue**. Geneva: World Health Organization, 2012. 124 p.

WILDER-SMITH, A.; et al. Update on Dengue: Epidemiology, Virus Evolution, Antiviral Drugs, and Vaccine Development. **Current Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 3, p. 1457-164, mai. 2010.

WILSON, A. G.; et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America**, v. 94, n. 1, p. 3195-3199, abr.1997.

XAVIER, A. L. R.; et al. Manifestações clínicas na dengue: Diagnóstico laboratorial. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 102, n. 2, p. 7-14, mar-abr. 2014.

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, dez. 2013.

YAMADA, K., et al. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 24, n. 3, p. 203-209, 2002.

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

YIM, J. J.; SELVARAJ, P. Genetic susceptibility in tuberculosis. **Respirology**, v. 15, n. 2, p. 241-256, fev. 2010.

ZHAO, Z.; et al. Association of -308G/A and -238G/A polymorphisms of TNF- α and osteosarcoma risk. **International Journal of Clinical & Experimental Patology**, v. 8, n. 4, p. 4177-4188, abr. 2015.

ZHU, H.; et al. Tumor necrosis factor alpha -308G>A, -863C>A, -857C>T gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: A meta-analysis. **Gene**, v. 509, n. 1, p. 206-214, 2012.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA: “Identificação molecular de *Dengue virus* e outros arbovírus e prevalência de polimorfismos genéticos em pacientes do Piauí”.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira e Prof. Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira
Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso, Av. São Sebastião, nº 2819, Bairro Reis Velloso, CEP 64204-035, Parnaíba, Piauí, Brasil. Telefone para contato (inclusive a cobrar): (86) 99920-3470 / (86) 99401-3035

ESCLARECIMENTOS:

Prezado colaborador(a), você está sendo convidado(a) a participar como **VOLUNTÁRIO** desta pesquisa, que irá contribuir para o conhecimento dos arbovírus circulantes no estado do Piauí, bem como fatores do paciente (hospedeiro) que podem predispor a infecções pelos arbovírus. O paciente pode ser incluído na pesquisa se apresentar sintomatologia sugestiva de dengue/outras arboviroses, e caso ocorra a realização de exames em instituição pública de saúde de Parnaíba. Caso você concorde com a participação (ou participação da criança), uma pequena quantidade de sangue será obtida, por punção venosa, e transportada imediatamente para o laboratório. O paciente será atendido no serviço de saúde, mesmo que não concorde com a inclusão no estudo ou desista de participar a qualquer momento. Todos os resultados de exames que estiverem prontos estarão a sua disposição a qualquer momento da pesquisa. Você ou a criança não receberão qualquer remuneração pela participação.

Você poderá sentir desconforto durante a coleta de sangue, mas os técnicos disponíveis para o procedimento são bem treinados e credenciados, além de utilizarem todo o material devidamente estéril que forneça segurança ao processo. Qualquer dúvida ou constrangimento que você tiver será esclarecido pelo pesquisador.

Os resultados desta pesquisa serão úteis para avaliarmos os sorotipos/genótipos virais circulantes na cidade de Parnaíba e estado do Piauí, e quais condições relacionadas ao hospedeiro diante da Dengue que são encontradas na população do Piauí. Por se tratar de um estudo populacional, não há benefício direto para o participante. Somente no final do estudo poderemos concluir a participação de alguns fatores genéticos como causadores de uma maior gravidade da infecção. Você terá a garantia de receber esclarecimentos sobre qualquer dúvida relativa aos procedimentos, riscos, benefícios e outras situações relacionadas com a pesquisa. Além disso, você também terá a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, e sua decisão não acarretará em qualquer prejuízo na continuidade do seu atendimento e tratamento no serviço de saúde. Se concordar em participar do estudo, suas informações pessoais (nome, endereço, telefone, dentre outras) serão mantidas em sigilo absoluto. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe da pesquisa e os representantes do Comitê de Ética terão acesso a suas informações pessoais.

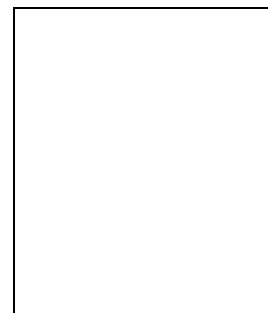
CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____, portador(a) da cédula de identidade/CPF de número _____, abaixo assinado, declaro que concordo em participar da pesquisa/estudo “Identificação molecular de *Dengue virus* e outros arbovírus e prevalência de polimorfismos genéticos em pacientes do Piauí”, como **VOLUNTÁRIO**. Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa. Eu discuti com o Dr.

Gustavo Portela Ferreira / Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira ou qualquer um dos demais membros da equipe de pesquisadores sobre minha decisão em participar desta pesquisa. Ficaram claros para mim quais são os propósitos da pesquisa, os procedimentos a serem realizados, seus possíveis desconfortos e riscos, e as garantias de sigilo e de esclarecimentos. Também ficou claro que minha participação é isenta de despesas. Concordo VOLUNTARIAMENTE em participar da pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento / tratamento neste serviço de saúde.

E por estar de acordo, assino o presente termo.

Parnaíba, _____ de _____ de _____ .



Assinatura do sujeito participante ou responsável legal

Impressão Digital

.....

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Nome: _____

RG/CPF: _____ Assinatura: _____

Nome: _____

RG/CPF: _____ Assinatura: _____

.....

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Parnaíba, _____ de _____ de _____ .

Gustavo Portela Ferreira

Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira

OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com;
Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI – *Campus* Ministro Reis Velloso
Endereço: Avenida São Sebastião, 2819 – Bloco 16 – Sala 05 – Bairro Reis Velloso
CEP: 64202-020 – Parnaíba-PI, Fone: (86) 3323-5251
E-mail: cep.ufpi.cmr@gmail.com

ANEXO II
FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS

PACIENTE/AMOSTRA Nº _____ Nº CARTÃO DO SUS: _____

AMOSTRAS COLETADAS: _____

DATA DO ATENDIMENTO: _____ LOCAL DE ATENDIMENTO: _____

NOME: _____ TEL: _____

SEXO: Masculino Feminino DATA DE NASCIMENTO: _____

NOME DA MÃE: _____

ENDEREÇO: _____

NÚMERO: _____ BAIRRO: _____ CEP: _____

MUNICÍPIO: _____ UF: _____

Adulto Criança (até 12 anos) Idoso (acima de 60 anos) Gestante: 1º T 2º T 3º T

Início dos sintomas: _____ dias. Febre: há _____ dias.

SINAIS E SINTOMAS PRESENTES:

- Cefaleia Artralgia Náuseas Dor retroorbitaria Mialgia Icterícia
 Prostração Diarreia Vômitos Exantema: com prurido sem prurido
 Manifestações hemorrágicas: gengivorragia - epistaxe - metrorragia - hematêmese - melena - hematúria - petéquias - equimoses.
 Dor abdominal Choro persistente/irritabilidade
 Outros: _____

COMORBIDADES/ DOENÇAS CRÔNICAS COEXISTENTES:

- Hipertensão Arterial Doença Hematológica _____
 Diabetes Mellitus Doença Cardiovascular _____
 DPOC Doença Autoimune Insuficiência Renal Doença ácido-péptica Hepatopatia
 Anemia Falciforme
 Outras: _____
 Não há comorbidades/doenças crônicas coexistentes.

AVALIAÇÃO QUANTO À PRESENÇA DE SINAIS DE CHOQUE/HEMORRAGIA GRAVE:

- Comprometimento respiratório Hemorragia grave com ou sem sinais de choque
Hemorragia presente Não Sim. Qual (is)?
 Conjuntival Epistaxe Gengivorragia Petéquias Equimose
 Metrorragia Hematúria Hematêmese Melena Hemoptoicos

SINAIS DE CHOQUE:

- Pulso rápido e fino Extremidades frias Pele pálida e úmida Enchimento capilar lento (> 2 seg.)
 Pressão arterial convergente (PA diferencial < 20 mmHg) Hipotensão postural (queda > 30 mmHg)
 Não há presença de sinais de choque hipovolêmico/hemorragia grave
 Outros: _____