



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

JULIANNA LIMA QUEIROZ

**PREVALÊNCIA E INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS -336 A/G (rs4804803)
NO GENE *DC-SIGN* e -174 G/C (rs1800795) NO GENE *IL-6*, NA INFECÇÃO POR
Dengue virus EM UMA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PIAUÍ**

PARNAÍBA – PI
AGOSTO– 2018

JULIANNA LIMA QUEIROZ

**PREVALÊNCIA E INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS -336 A/G (rs4804803)
NO GENE *DC-SIGN* e -174 G/C (rs1800795) NO GENE *IL-6*, NA INFECÇÃO POR
Dengue virus EM UMA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PIAUÍ**

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
AGOSTO – 2018

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

Q384p Queiroz, Julianna Lima.

Prevalência e influência dos polimorfismos -336 A/G (rs4804803) no gene DC-SIGN e -174 G/C (rs1800795) no gene IL-6, na infecção por *Dengue virus* em uma população do estado do Piauí [manuscrito] / Julianna Lima Queiroz. – 2018.

82 f. : il.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2018.

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

JULIANNA LIMA QUEIROZ

**PREVALÊNCIA E INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS -336 A/G (rs4804803)
NO GENE *DC-SIGN* e -174 G/C (rs1800795) NO GENE *IL-6*, NA INFECÇÃO POR
Dengue virus EM UMA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PIAUÍ**

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: 27/08/2018 .

BANCA EXAMINADORA:


Profa. Dra. Anna Carolina T. da C. Pereira
Presidente


Profa. Dra. Renata Canalle
Examinadora


Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira
Examinador

PARNAÍBA – PI
AGOSTO – 2018

*“A persistência é o menor caminho do êxito.”
(Charles Chaplin)*

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, minha família, meus amigos, minha orientadora e a todos que apoiaram e torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Com grande satisfação concluo essa etapa da minha vida, dois anos se passaram, conhecimentos foram adquiridos e desafios superados. Minhas relações já existentes foram fortalecidas e encontrei no caminho pessoas que foram fundamentais, dividindo medos, compartilhando alegrias, tornando todo esse período mais agradável.

Agradeço a Deus, por tudo que sou, pela força e coragem para vencer todos os obstáculos. Por guiar sempre meus passos, me ajudando a cumprir mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, Wilson e Marileide, pelo amor e dedicação, por todo o apoio incondicional nas minhas decisões e incentivo durante a realização deste trabalho. Por sempre acreditarem no meu potencial e por não medirem esforços para que eu consiga alcançar meus objetivos. Ao meu irmão Junior, pelo carinho e por sempre fazer o possível para me ajudar. A todos da minha amada família, meus avós pelo amor imensurável, tios e tias pela presença constante em minha vida e por sempre me incentivaram a não desistir. Aos meus primos, pela alegria e por me proporcionarem momentos indescritíveis a cada encontro. Vocês são minha base e serei eternamente grata.

Agradeço também a todos meus amigos, pelas palavras de estímulo, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e por todo apoio que foi essencial para essa jornada. Obrigada por fazerem meus dias mais felizes.

À minha madrinha Conceição, por todo carinho, apoio e incentivo para que alcançasse meu objetivo.

À minha querida orientadora Prof^a Dr^a Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira, pela confiança, pela paciência e por todos os ensinamentos relacionados a esse trabalho, assim como tantos outros que irei levar para vida. Obrigada pelo companheirismo, por nossas conversas, conselhos, por sempre me tranquilizar e acreditar na minha capacidade. Pelo incentivo à busca do conhecimento e por tornar possível a realização dessa pesquisa. Foi um prazer ter sido sua orientanda e sou imensamente grata por tudo.

A toda equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia de Microrganismos e Plantas (BIOMIC), Philipe, Karllyane, Lorena, Mariella, Naiany, Aline, Vinícius, Dacylla, Felipe Daniel, Jaiane, Lucas, as técnicas do laboratório de Microbiologia, Juelina e

Sansara, obrigada pela ajuda, aprendizado mútuo, amizade e colaboração, que foram primordiais para a execução deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de mestrado Silveny, Thiago, Emanuela, Vanessa, Francisco Carlos, Mayck, Layla, Mariana e Gisele, pelo apoio, convivência, cada um da sua maneira foi de fundamental importância para conclusão dessa etapa. Obrigada pela amizade, por dividir comigo os momentos difíceis e os inesquecíveis momentos de alegria.

Agradeço ao Hygor e à Hianny, pela disponibilidade de sempre, em ajudar nas etapas de padronização da PCR em Tempo Real e na genotipagem, esclarecendo dúvidas, dando sugestões, assim como fornecendo reagentes e manuseio de equipamentos. Muito obrigada!

A Luzeni e a Tereza, por todo apoio, palavras de incentivo, pela assistência prestada durante a caminhada.

Agradeço aos professores Dr. Gustavo Portela Ferreira e Dra. Renata Canalle pela atenção, dedicação, pelas importantes críticas e sugestões que foram dadas na qualificação e que contribuíram para o aperfeiçoamento da dissertação. Também agradeço a disponibilidade para compor a banca de defesa.

Aos professores de todas as disciplinas ministradas durante o curso de Mestrado em Ciências Biomédicas, pelos ensinamentos e por contribuírem para meu crescimento pessoal, acadêmico e formação profissional.

À direção do Pronto Socorro Municipal de Parnaíba, por disponibilizar o acesso aos pacientes com suspeita clínica de dengue. Agradeço todos os funcionários da instituição, em especial à equipe do Laboratório: Dr. Roberto Régis, ao Adilson, César e Auxiliadora, por nos receber tão bem, pela paciência, atenção, por colaborar nessa etapa tão importante da obtenção de amostras e dados clínicos.

Agradeço todos os indivíduos que foram recrutados como sujeitos da pesquisa para formar os grupos de caso, controle negativo e assintomático. Sempre muito prestativos e dispostos a ajudar, meus mais sinceros agradecimentos, sem vocês esta pesquisa não seria realizada. Espero que de forma individual ou coletiva esta pesquisa lhes traga algum tipo de retorno.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Todos aqueles que torceram por mim. Obrigada por confiar e por estarem sempre comigo.

A todos vocês dedico minha imensa gratidão. OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Arboviroses	13
2.1.1 <i>Flavivirus</i>	14
2.1.1.1 <i>Dengue virus</i>	15
2.2 Aspectos epidemiológicos da dengue	17
2.3 Características gerais	19
2.3.1 Vetor.....	19
2.3.2 Transmissão.....	20
2.3.3 Formas clínicas.....	21
2.3.4 Imunopatogênese.....	23
2.3.5 Diagnóstico.....	25
2.3.6 Prevenção e controle	26
2.4 Influências de polimorfismos genéticos do hospedeiro na patogênese da Dengue ...	27
2.4.1 O receptor <i>DC-SIGN</i> e o polimorfismo -336 A/G	28
2.4.2 A <i>IL-6</i> e o polimorfismo -174 G/C	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Aspectos éticos e legais	32
4.2 Tipo de estudo e local	32
4.3 População de estudo, definição de casos e controles e critérios de exclusão	33
4.4 Coletas de amostras, dados pessoais e clínicos dos pacientes	34
4.5 Confirmação diagnóstica dos casos de dengue.....	35
4.5.1 Testes rápidos imunocromatográficos.....	35
4.5.2 Diagnóstico Molecular	36

4.5.2.1 Extração do RNA viral e Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR).....	36
4.6 Extração, quantificação e armazenamento do DNA genômico	39
4.7 Genotipagem dos SNPs no gene <i>DC-SIGN</i> (-336 A/G) e do gene <i>IL-6</i> (-174 G/C)	40
4.8 Análises Estatísticas.....	42
5 RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE I.....	80
APÊNDICE II.....	82

RESUMO

A dengue é considerada a arbovirose mais frequente dentre as que acometem o ser humano, sendo endêmica em países tropicais e subtropicais. A doença é causada pelo *Dengue virus* (DENV), membro da família *Flaviviridae* apresentando a fêmea do mosquito *Aedes aegypti* como principal vetor de transmissão. A variedade de fatores relacionados ao vírus, ao ambiente e ao hospedeiro reflete na diversidade das manifestações clínicas da dengue. Vários estudos apontam que polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em genes de moléculas relacionadas à imunidade da dengue podem estar envolvidas com a susceptibilidade e/ou proteção à doença. O objetivo do presente estudo foi investigar a prevalência e a influência dos polimorfismos -336 A/G (rs4804803) no gene *DC-SIGN* e -174 G/C (rs1800795) no gene *IL-6* em pacientes sintomáticos e assintomáticos infectados pelo DENV, e em indivíduos controles. Trata-se de um estudo do tipo caso-controle, de caráter qualitativo e com abordagem exploratória. Os dados foram obtidos através de coletas feitas em pacientes atendidos em órgãos públicos de saúde, em Parnaíba-PI no período de Agosto de 2016 a Dezembro de 2017. A confirmação laboratorial dos casos suspeitos de dengue foi feita por meio de testes imunocromatográficos e metodologias moleculares (RT-PCR). O DNA genômico celular foi extraído e realizada a genotipagem para os SNPs, através de PCR em Tempo Real. Os dados foram analisados através do programa *BioEstat* 5.0, com um nível de significância de $p < 0,05$. As análises das frequências alélicas e genótípicas para o SNP -336 A/G no gene *DC-SIGN* não mostraram resultados com diferenças estatisticamente significativas. Com relação a prevalência das manifestações clínicas, o sintoma Diarreia se apresentou mais frequente nos portadores do alelo G com diferença estatisticamente significativa. As análises das frequências alélicas e genótípicas para o SNP -174 G/C no gene *IL-6* entre os grupos mostraram que a frequência do genótipo G/C foi estatisticamente maior no grupo controle (41,2%) que no grupo dengue (DEN), com 26,5%. Foi significativamente mais frequente no grupo controle (41,2%) em relação ao grupo Dengue sem sinais de alarme (DSSA), com 24,7%. A associação dos genótipos G/C + C/C teve maior frequência no grupo controle (46,5%) quando comparado ao grupo DEN com 30,8%. E ainda apresentaram maior frequência no grupo controle, com 46,5%, em relação ao grupo DSSA (28,8%). As análises das frequências alélicas revelaram que o alelo C teve frequência significativamente maior no grupo controle (26%), quando comparado ao grupo DEN com 17,5% e ao grupo DSSA, com 16,4%. O alelo C também apresentou frequência maior no grupo assintomático (25,9%) em relação ao grupo DEN, com 17,5%, e em relação ao grupo DSSA com significância. Nas análises da prevalência das manifestações clínicas, a manifestação clínica Náuseas foi mais frequente em não portadores C, com diferença estatisticamente significativa. A frequência do alelo G para o SNP -336 A/G do gene *DC-SIGN* na população piauiense foi de 18,8%. O alelo C do SNP -174 G/C no gene *IL-6* teve frequência de 26% nesta população. Nossos dados sugerem que o genótipo G/C e o alelo C do SNP -174 G/C no gene *IL-6* estão relacionados com proteção para os casos de dengue na população estudada. Estes dados contribuem para um melhor entendimento da patogênese do *Dengue virus* e de fatores genéticos relacionados ao hospedeiro com a doença. Podendo assim, trazer benefícios para o paciente, no que diz respeito ao manejo clínico da doença.

Palavras-Chave: Dengue, Hospedeiro, Polimorfismos, *Dengue virus*

ABSTRACT

Dengue is considered the most frequent arboviral disease which affects humans, it is endemic in tropical and subtropical countries. The disease is caused by Dengue virus (DENV), a member of the Flaviviridae family, which presents the female *Aedes aegypti* as the main vector of transmission. The variety of factors related to the virus, the environment and the host reflects on the diversity of clinical manifestations of dengue. Several studies have pointed out that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes of molecules related to dengue immunity may be involved in the susceptibility and / or protection of the disease. The aim of the present study was to investigate the prevalence and the influence of the -336 A/ G polymorphisms (rs4804803) on the DC-SIGN gene and -174 G / C (rs1800795) on the IL-6 gene in symptomatic and asymptomatic patients infected by DENV, and in control subjects. This is a case-control study of a qualitative nature with an exploratory approach. Data were obtained through collections made in patients attended at public health agencies in Parnaíba-PI from August 2016 to December 2017. The laboratory confirmation of suspected dengue cases was done through immunochromatographic tests and molecular methodologies (RT-PCR). Cell genomic DNA was extracted and genotyped for SNPs through Real-Time PCR. The data were analyzed through the BioEstat 5.0 program, with a significance level of $p < 0.05$. The analysis of the allelic and genotype frequencies for the 336 A/G SNP in the DC-SIGN gene did not show results with statistically significant differences. Regarding the prevalence of clinical manifestations, the Diarrhea symptom was more frequent in patients with the G allele with a statistically significant difference. The analysis of allele and genotype frequencies for SNP-174 G/C in the IL-6 gene between the groups showed that the G/C genotype frequency was statistically higher in the control group (41.2%) than in the dengue group (DEN), with 26.5%. The G/C genotype was also significantly more frequent in the control group (41.2%) than in the Dengue group with no warning signs (24.7%). The association of G/C + C/C genotypes had a higher frequency in the control group (46.5%) when compared to the DEN group with 30.8%. They also presented higher frequency in the control group, with 46.5%, compared to the DSSA group (28.8%). Allele frequencies analysis revealed that the C allele had a significantly higher frequency in the control group (26%), when compared to the DEN group with 17.5% and the DSSA group, with 16.4%. The C allele also had a higher frequency in the asymptomatic group (25.9%) in relation to the DEN group, with 17.5%, and in relation to the DSSA group, with a significant frequency. In the analysis of the prevalence of clinical manifestations, the clinical manifestation Nausea was more frequent in non-C carriers, with a statistically significant difference. The frequency of the G-allele for the SNP-336 A / G of the DC-SIGN gene in the Piauí population was 18.8%. The C allele of the SNP-174 G / C in the IL-6 gene had a frequency of 26% in this population. Our data suggest that the G/C genotype and the C-allele of the SNP -174 G / C in the IL-6 gene are related to protection for dengue cases in the study population. These data contribute to a better understanding of Dengue virus pathogenesis and genetic factors related to the host disease. Thus, it can bring benefits to the patient, regarding the clinical management of the disease.

Key words: Dengue, Host, Polymorphisms, Dengue Virus.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

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

BIOMIC – Laboratório de Bioquímica e Biologia de Microrganismos e Plantas

C – Capsídeo

CHIKV – *Chikungunya virus*

DA – Dalton

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

DCSA – Dengue com sinais de alarme

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

DENV – *Dengue virus*

DENV-1 – *Dengue virus* sorotipo 1

DENV-2 – *Dengue virus* sorotipo 2

DENV-3 – *Dengue virus* sorotipo 3

DENV-4 – *Dengue virus* sorotipo 4

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

E – Proteína de envelope

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

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

FD – Febre da dengue

FHD – Febre hemorrágica da dengue

HEDA – Hospital Estadual Dirceu Arcoverde

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

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IF – Imunofluorescência

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL - Interleucina

IL-1– Interleucina 1

IL-10– Interleucina 10

IL-6– Interleucina 6

JEV– Do inglês *Japanese encephalitis virus* traduz-se Vírus da encefalite japonesa

M – Proteína de membrana

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

NS – Proteína não estrutural

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

NT – Nucleotídeos

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

OR – Odds Ratio

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

PRM – Proteína precursora de membrana

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

SCD – Síndrome do Choque da Dengue

SE – Semana Epidemiológica

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

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

UTR – Do inglês *Untranslated Region*, traduz-se região não codificante

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

YEV – Do inglês *Yellow fever virus*, traduz-se Vírus da febre amarela

ZIKV – *Zika virus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O surgimento de arboviroses de habitats silvestres ou rurais para o meio urbano (adaptado: Mayer; Tesh; Vasilakis, 2017).	12
Figura 2	Demonstração da organização do genoma dos <i>Flavivirus</i> (adaptado: Denman; Mackenzie, 2017).	14
Figura 3	A adequação de diferentes regiões para transmissão do vírus da dengue (adaptado Guzman et al., 2016).	16
Figura 4	Transmissão do Dengue vírus através do mosquito <i>Aedes aegypti</i> (adaptado de Whitehead, 2007).	19
Figura 5	Classificação dos casos de dengue de acordo com a gravidade (adaptado Guzman, 2016).	21
Figura 6	Mapa de localização do município de Parnaíba, Piauí, Brasil. (Fonte: Abreu, 2006).	32
Figura 7	Exemplo de <i>plot</i> de discriminação alélica do SNP -174 G/C (rs1800795) para o gene <i>IL-6</i> gerado por PCR em Tempo Real.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência dos iniciadores para amplificação do gene <i>C/prM</i> do DENV, descritos por Lanciotti e colaboradores (1992), com suas localizações e tamanhos do produto da reação de PCR.	36
Tabela 2	Sequência dos iniciadores para amplificação do gene <i>E</i> do DENV descritos por Figueiredo e colaboradores (2014) e Rocha e colaboradores (2013), com seus sorotipos específicos e tamanhos do produto da reação de PCR.	36
Tabela 3	Sequência dos iniciadores para amplificação do gene <i>NS5</i> dos Flavivirus descritos por Chao, Davis & Chang (2007), e os tamanhos do produto da reação de PCR.	37
Tabela 4	Iniciadores para amplificação da região do gene <i>NS5</i> descritos por Bronzoni e colaboradores (2005), suas respectivas sequências e produtos.	37
Tabela 5	Gene, dbSNP e suas respectivas sondas (VIC/FAM) para PCR em Tempo Real (<i>TaqMan</i> ® <i>SNP Genotyping Assays</i>).	39
Tabela 6	Distribuição genotípica e alélica do SNP -336 A/G (rs4804803) do gene <i>DC-SIGN</i> nos grupos assintomático de casos (DEN, DSSA e DCSA) e controle.	44
Tabela 7	Distribuição genotípica e alélica do SNP -336 A/G (rs4804803) do gene <i>DC-SIGN</i> nos grupos assintomático (ASS), casos (DEN, DSSA e DCSA) e controle	46
Tabela 8	Distribuição genotípica e alélica do SNP -174 G/C (rs1800795) do gene <i>IL-6</i> nos grupos de casos (DEN, DSSA e DCSA) e controle.	48
Tabela 9	Distribuição genotípica e alélica do SNP -174 G/C (rs1800795) do gene <i>IL-6</i> nos grupos assintomático (ASS), casos (DEN, DSSA e I controle.	50
Tabela 10	SNP -336 A/G (rs4804803) do gene <i>DC-SIGN</i> e as 20 manifestações clínicas da dengue mais presentes em pacientes do grupo DEN.	51
Tabela 11	SNP -174 G/C (rs1800795) do gene <i>IL-6</i> e as 20 manifestações clínicas da dengue mais presentes em pacientes do grupo DEN.	52
Tabela 12	Comparação das frequências alélicas do SNP -174 G/C (rs1800795) do gene <i>IL-6</i> , com base em estudos genômicos de associação realizados na população mundial.	53

1 INTRODUÇÃO

A dengue é a arbovirose mais frequente dentre as que acometem o ser humano, sendo endêmica principalmente em países tropicais e subtropicais. A doença é considerada um grande problema de saúde pública, devido às suas elevadas taxas de morbidade e mortalidade, associadas à variedade de formas clínicas da doença (COSTA; SANTOS; BARBOSA, 2009; DIAS et al., 2010; GARCÍA et al., 2011; LO et al., 2016; VADIVALAGAN et al., 2016).

A doença é causada pelo *Dengue virus* (DENV), que apresenta genoma de RNA e pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, sendo as fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* os principais vetores de transmissão da dengue. Os mosquitos da espécie *Aedes aegypti* reproduzem-se em reservatórios de água principalmente no ambiente peridomiciliar, estando envolvidos no ciclo urbano de transmissão da doença. O DENV é classificado em quatro sorotipos com propriedades antigênicas distintas: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (BARRETO; COMETTI, 2007; ARYATI et al., 2013; GONÇALVES et al., 2015; KATZELNICK et al., 2016).

O Brasil pode ser considerado o responsável pelo maior número de casos de dengue na América, uma vez que esta patologia está presente em todo o território nacional. Os quatro sorotipos do DENV têm sido encontrados em o todo país e suas distribuições variam de acordo com as regiões, o que acarreta em grande impacto nas questões de saúde pública (RIBEIRO; BALSAN; MOURA, 2013; COSTA et al., 2017).

A variedade de fatores relacionados ao vírus, ao ambiente e ao hospedeiro reflete na diversidade das manifestações clínicas da dengue. Dentre os vários fatores relacionados com proteção, susceptibilidade e/ou risco de progressão para formas clínicas mais graves da dengue, destacam-se os fatores genéticos do hospedeiro (BELTRAME et al., 2013; NGASANG et al., 2014; ALAGARASU; MEMANE; SHAH, 2015; MOHSIN et al., 2015; DANG et al., 2016). A presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) associados a eventos da resposta imune do hospedeiro no combate à infecção podem desempenhar importantes funções na patogênese da dengue. Tais variações genéticas na região promotora de genes são as mais comumente encontradas no genoma humano, e podem acarretar em diferentes padrões de expressão de proteínas (MAAT et al., 2004; FANG et al., 2012). Existem diversos dados na literatura que

relacionam a influência de SNP presente no gene que codifica receptor de células dendríticas DC-SIGN (-336 A/G) e a citocina pró-inflamatória IL-6 (-174 G/C) com a modulação dos sintomas clínicos da dengue.

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo investigar a prevalência e a influência dos polimorfismos -336 A/G (rs4804803) no gene *DC-SIGN* e -174 G/C no gene *IL-6* na dengue em pacientes com a doença, pacientes assintomáticos para a dengue e indivíduos controle. Através desta pesquisa, pretende-se auxiliar no entendimento dos mecanismos referentes à patogênese da dengue e sua relação com fatores genéticos do hospedeiro, tendo em vista que muitos destes não estão totalmente elucidados. Dessa forma, esse trabalho poderá futuramente colaborar para a adoção de medidas de saúde pública, melhorando a assistência ao paciente e a população em geral, além de colaborar para o levantamento de dados epidemiológicos no Estado do Piauí.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

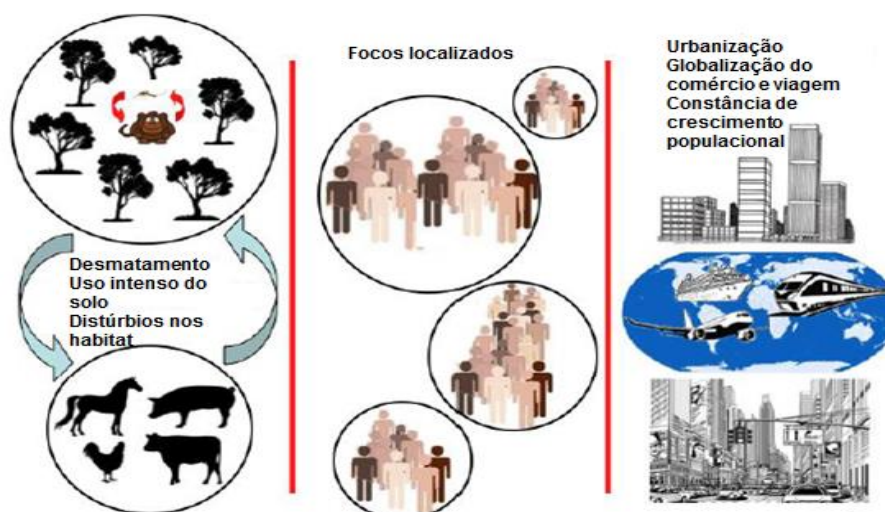
2.1 Arboviroses

Arboviroses são doenças transmitidas através de vetores artrópodes, e abrangem um grande número de vírus que causam doenças em humanos e animais (LOPES; NAZAWA; LINHARES, 2014; ANDRADE et al., 2017). Devido à sua capacidade de propagação e de provocar epidemias, as arboviroses têm se destacado no cenário global e se tornado importante questão de saúde pública (DASH et al., 2013; HONÓRIO et al., 2015).

No geral, as arboviroses são endêmicas em regiões específicas do mundo, ocorrendo uma maior circulação principalmente nas regiões em que os vetores são abundantes, como as regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Isso se deve pelo fato destas apresentarem condições ecológicas propícias para o desenvolvimento dos vetores (CASSEB et al., 2013; LIANG; GAO; GOULD, 2015).

Desmatamento, mudanças climáticas, migração, crescimento urbano de forma desordenada, processos de globalização e modificação do ecossistema através de ações antrópicas, são causas que facilitam a propagação de vetores e consequentemente à ocorrência das arboviroses (BATISTA et al., 2012; CAMARA, 2016; MOTA et al., 2016), como ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – O surgimento de arboviroses de habitats silvestres ou rurais para o meio urbano.



Fonte: Adaptado de Mayer; Tesh; Vasilakis, 2017.

Grande parte dos arbovírus é formada por conteúdo de genoma de RNA de cadeia simples ou dupla. Os vírus são pertencentes às famílias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae*. Ainda, também o vírus do gênero *Asfivirus*, família *Asfaviridae*, causador da Peste Suína Africana, sendo este o único arbovírus com genoma de DNA (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017; MIESEN; JOOSTEN; RIJ, 2016).

De acordo com Smith et al. (2016), a transmissão dos arbovírus é feita através de ciclos zoonóticos, que compreendem hospedeiros vertebrados e mosquitos, que entram em ciclos urbanos, infectando hospedeiros humanos.

Diversos arbovírus emergiram ou reemergiram em regiões de todo mundo e com grande importância para a saúde pública, especialmente no Brasil podemos citar *Chikungunya virus* (CHIKV), *Zika virus* (ZIKV), *Dengue virus* (DENV) e o *Yellow fever virus* (Vírus da Febre amarela) (YFV), ocasionando grandes surtos e/ou epidemias (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAN, 2017; PAPA, 2017).

2.1.1 *Flavivirus*

A família *Flaviviridae* abrange uma grande variedade de arbovírus apresentando mais de 70 membros diferentes, com destaque para: o *Dengue virus* (DENV), o vírus da encefalite japonesa (JEV), o *Yellow fever virus* (YFV), o *West Nile virus* (Vírus da febre do Oeste do Nilo) (WNV) e o *Zika virus* (ZIKV). Estes vírus endêmicos de regiões tropicais e subtropicais, transmitidos por artrópodes, são de grande importância médica e social. Apresentam riscos à população nativa dessas regiões e para viajantes/turistas, devido as características do vetor, como a mobilidade (PEIPEI et al., 2013; DENMAN; MACKENZIE, 2017; GARCÍA; PADILLA; CASTANÕ, 2017; SANLÉS et al., 2017; TAGLIABUE et al., 2017; VALDERRAMA; DIAZ; VERGÈS, 2017; ZHANG et al., 2017).

As infecções causadas pelos *Flavivirus* apresentam sintomas clínicos variados, que vão desde a forma assintomática, a manifestações graves como: febre alta, calafrios, dores de cabeça e musculares, tonturas, vômitos, doença hemorrágica, icterícia, encefalite, meningite, paralisia flácida (SIPS et al., 2012; ISHIKAWA; YAMANAKA; KONISHI, 2014; CONDE et al., 2017).

2.1.1.1 *Dengue virus*

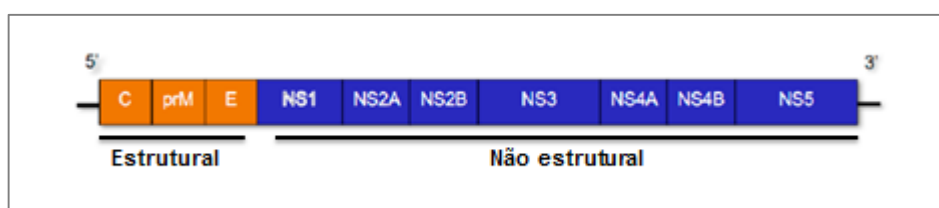
O *Dengue virus* (DENV), pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, pode ser considerado o arbovírus humano de maior relevância encontrado do mundo, infectando 50 a 100 milhões de pessoas anualmente. O principal vetor para propagação desse vírus é o mosquito *Aedes aegypti* (KIM; LI; LINHARDT, 2017; LAI; LIN; HSIEH, 2017; MOTA et al., 2016; TAKAGI et al., 2017).

Existem quatro sorotipos do DENV circulante (DENV-1 a -4), estes são antígenicamente distintos, e conseqüentemente a infecção por um sorotipo viral gera imunidade contra o sorotipo, no entanto, não obrigatoriamente contra uma infecção secundária com um sorotipo distinto. Possui sintomatologia que pode variar desde uma infecção assintomática, febre hemorrágica grave e até a morte (ROCHE; GOULDE, 2013; CHATCHEN; SABCHAREON; SIRIVICHAYAKUL, 2017; PATEL et al., 2017; PERERA; MILLER; ZITZMANN, 2017).

Os quatro sorotipos virais do DENV circulam no Brasil, sendo este o país responsável pelo maior número de casos de dengue no continente americano. O primeiro estado brasileiro com a existência simultânea de três sorotipos foi o Rio de Janeiro (DENV-1, DENV-2 e DENV-3). Nos últimos 20 anos, o sorotipo DENV-4 foi detectado em outras regiões do país, como Manaus, Roraima, São Paulo, Pernambuco, Bahia e Piauí (SANTOS, 2013; GARCÊS, 2016; COSTA et al., 2017).

Por ser um Flavivirus, o *Dengue virus* é um vírus de RNA de fita simples positiva. Possui um genoma com cerca de 11 kb de comprimento, com uma estrutura formada por três proteínas estruturais (C, M e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 2), cada proteína citada exerce uma função, auxiliando na produção de novas partículas virais (BI et al., 2013; RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016; WANG; ZHANG, 2017).

Figura 2 – Demonstração da organização do genoma dos *Flavivirus*.



Fonte: Adaptado de Denman; Mackenzie, 2017.

De acordo com Suwanmanee e Luplertlop (2017), o genoma do DENV é encontrado no nucleocapsídeo, região onde também se localiza a proteína C. Esta proteína estrutural possui forma esférica e é fundamental para o revestimento do seu genoma de RNA (DWIVEDI et al., 2017).

A glicoproteína estrutural M é obtida através do precursor glicosilado prM (proteína precursora de membrana), quando este é clivado pela proteína furina no processo de maturação do vírus, sendo essencial para o dobramento correto da proteína E (LINDEBACH; RICE, 2003; WANG et al., 2017).

A proteína estrutural E, é constituinte do envelope viral, está localizada ao redor do nucleocapsídeo (superfície viral) e faz parte da bicamada lipídica. A proteína é importante para a ligação inicial do vírus à célula hospedeira, por induzir a formação de anticorpos neutralizantes e imunidade protetora ao hospedeiro. Possui três domínios: I, encontrado na região N-terminal; II, que é central e o domínio III, que é o domínio de ligação com o receptor (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; DWIVEDI et al., 2017; SUWANMANEE; LUPLERTLOP, 2017).

A glicoproteína NS1, é a primeira proteína não estrutural, altamente conservada com peso molecular de 46-55 kDa. Esta proteína é essencial para a viabilidade do DENV. Sua importância na infecção pelo vírus ainda não está bem estabelecida, porém algumas pesquisas indicam que o seu papel pode estar relacionado com a replicação viral em estágios iniciais (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008; RABELO et al., 2016; CONDE et al., 2017).

A região NS2 é formada por duas proteínas, a NS2A e NS2B, com aproximadamente 22 kDa e 14,5 kDa, respectivamente. As características e as funções da NS2A são pouco definidas, sendo associadas ao correto processamento proteolítico de NS1. A clivagem entre NS1 e NS2A pode afetar a replicação do RNA viral. A proteína NS2B está relacionada com a função protease do complexo NS2B-NS3 (CHANG, 1997; SAHILI; LESCAR, 2017).

As proteínas NS4A (16 kDa) e NS4B (27kDa) são ligadas por um peptídeo de membrana, o qual é clivado durante a maturação do NS4A. Essa proteína tem a função de prevenir a morte celular causada pela infecção, através da autofagia. NS2A e NS2B podem

atuar como co-fatores ao associarem-se aos complexos de replicação viral (LINDENBACH et al., 2007; ZEIDLER et al., 2017).

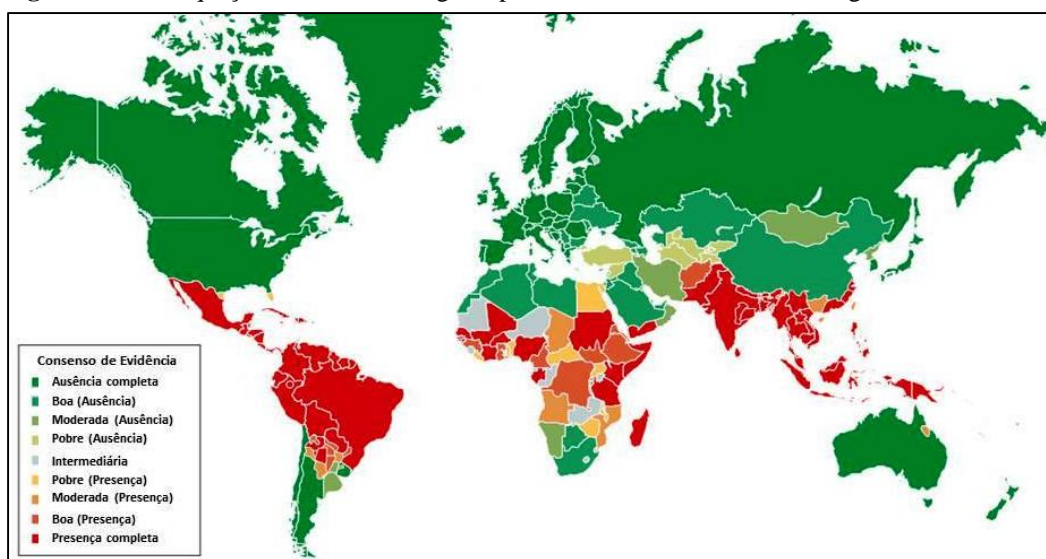
As proteínas NS3 e NS5 são as únicas, entre as proteínas não estruturais, que podem ser encontradas no citoplasma. Elas possuem várias atividades enzimáticas necessárias para a replicação viral (TERAMOTO et al., 2017; YU; TAKEDA, GAO, 2017).

2.2 Aspectos epidemiológicos da dengue

A descrição dos primeiros sintomas de doença condizentes com a dengue foi encontrada em uma enciclopédia chinesa em 992 D.C, sendo reportada como “veneno da água”, e também relacionada a insetos voadores. Porém, as características gerais dessa patologia, como causa e origem foram definidos no século XX (MURRAY et al., 2013).

Supostamente a pandemia de dengue iniciou-se nas regiões da Ásia e Pacífico, até a metade da década de 90 atingia mais a região do Sudeste Asiático. Após esse período houve, uma disseminação para outras regiões, como países da América Central e do Sul, provocada principalmente por alterações ecológicas (Figura 3). Anualmente, ocorrem cerca de 390 milhões de infecções e mais de 70% da população mundial encontra-se em risco de ser infectada pelo *Dengue virus* (GUBLER; CLARK, 1995; BARRETO; TEIXEIRA, 2008; FARES et al., 2015; MEGAWATI et al., 2017).

Figura 3 – A adequação de diferentes regiões para transmissão do vírus da dengue



Fonte: Adaptado de Guzman et al., 2016.

A dengue é uma doença urbana que se difunde mais em países tropicais e subtropicais, devido ao clima quente e úmido. Outros fatores importantes para a disseminação da mesma, levando a formação de epidemias, são as condições socioambientais dessas regiões, mudanças climáticas, crescimento demográfico desordenado, infraestrutura urbana inadequada, deficiência nos serviços de saúde (COELHO, 2008; SILVA; MARIANO; SCOPEL, 2008; FLAUZINO, SANTOS, OLIVEIRA, 2009; OLIVEIRA; DOUHI, 2012; CRUZ et al., 2015).

Em 2016, foram notificados 2.249.842 casos de dengue nas Américas, sendo 64,5% destes no Brasil. Este país apresenta epidemias sazonais e geralmente ocorrem no verão durante ou imediatamente após períodos chuvosos, nos primeiros cinco meses do ano (BRAGA; VALLE, 2007a; CAMARA et al., 2007; PEREIRA; FERREIRA; BORGES, 2013; COSTA; CALADO, 2016; ARAÚJO et al., 2017; PAHO, 2017).

Até 1976 o mosquito *Aedes aegypti* estava erradicado no Brasil, devido ao programa contra a febre amarela, coordenado pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), que levou a eliminação do mesmo. Em 1977, vários fatores levaram a uma reinserção do *A. aegypti* no Brasil, como a pandemia do DENV-1 e a entrada do DENV-4 nas Américas. A introdução da dengue no Brasil com confirmação laboratorial ocorreu em meados de 1981, no estado de Roraima, onde foram isolados os sorotipos de DENV-1 e DENV-4, com 11.000 casos confirmados. A partir daí o país passou por vários surtos epidêmicos e, atualmente, a dispersão do *A. aegypti* atinge todos os estados da federação, e possui mais de 3.587 municípios infestados pelo vetor da doença (NOGUEIRA, MIAGOSTOVICH, SCHATZMAYR, 2000; SIQUEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2013; VIANA; IGNOTTI, 2013; FOGAÇA; MENDONÇA, 2017).

O Brasil dispõe de condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do principal vetor da doença, permitindo a transmissão e a proliferação dos vários sorotipos virais (TEIXEIRA, 2012). De acordo com dados do Boletim Epidemiológico, divulgado pelo Ministério da Saúde, foram registrados em 2016 e 2017, respectivamente, 1.483.623 e 251.711 casos prováveis de dengue em todo país. No ano de 2018, até a semana epidemiológica 23, que vai de 31/12/2017 a 09/06/2018, foram registrados 161.154 casos. Com relação às regiões, no ano de 2018, até a mesma semana epidemiológica, o Nordeste apresentou a terceira maior colocação em números de casos prováveis, com 38.243 casos, o que corresponde a 23,7% (BRASIL, 2018).

A região Nordeste do Brasil tem a dengue como um problema de saúde pública desde 1990, período este em que os surtos foram mais comuns. Esta região é bastante afetada pelo DENV, e a população de todos seus 9 estados encontram-se em situações de risco. No ano de 1986, foi confirmada a presença do *Aedes aegypti* no Estado do Piauí, e em 1996 ocorreu a primeira epidemia notificada da doença. Segundo dados da Secretaria de Estado da Saúde, no ano de 2017, o referido estado teve 3.195 números de casos confirmados para dengue (CASTRO et al., 2003; MONTEIRO et al., 2009; CARVALHO et al., 2016; SESAPI, 2018).

2.3 Características gerais

2.3.1 Vetor

A dengue é uma doença transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, como o *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*; sendo este último o vetor mais importante (MOTA et al., 2016; MINARD et al., 2017; PROPHIRO et al., 2017; RENTERIA et al., 2017). O *A. aegypti* pode ser encontrado em todos os estados brasileiros e o *A. albopictus* em áreas rurais e urbanas. Este é um vetor secundário para a transmissão da dengue, mas ainda não foi relacionado com surtos da doença (MARTINS et al., 2010).

O *A. aegypti* é um mosquito originário da África e sua ocorrência foi inicialmente descrita por Linnaeus, no Egito em 1762. Acredita-se que a entrada deste mosquito no Brasil ocorreu devido ao comércio de escravos, durante o período colonial (ZARA et al., 2016). O vetor é encontrado em regiões tropicais e subtropicais, tem forte associação com habitats humanos, e caráter sinantrópico e antropogênico (BRAGA; VALE, 2007b; BESERRA et al., 2009; CARVALHO; MOREIRA, 2017; ROBLES et al., 2017).

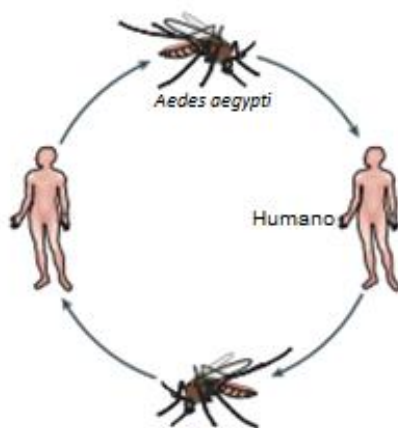
O *Aedes albopictus* é originário de florestas do sudeste da Ásia, porém tem se disseminado em diversas regiões do mundo nos últimos anos. A capacidade que o *A. albopictus* possui de se adaptar a temperaturas é uma das principais características que o difere do *A. aegypti*, fazendo com que resista a baixas temperaturas, permanecendo em estado de dormência no inverno de regiões temperadas (PAUPY et al., 2009; PESSOA et al., 2013).

2.3.2 Transmissão

Segundo Pinto et al. (2013), a transmissão da dengue ocorre pela picada do mosquito fêmea infectada, onde o vírus é depositado no corpo do indivíduo, originando a doença. As fêmeas do *A. aegypti* armazenam seus ovos preferencialmente em recipientes artificiais, encontrados ao ar livre ou em ambientes domésticos, onde ocorre a reprodução destes (MARQUES et al., 2013).

Quando a fêmea do *Aedes aegypti* pica uma pessoa na fase de viremia, através da alimentação sanguínea, o ciclo reprodutivo é iniciado. O vírus fica localizado nas glândulas salivares do mosquito, sendo necessário um tempo de 8 a 12 dias para que ele possa se reproduzir no interior de seu organismo. Depois disso o vetor já possui capacidade de transmitir o vírus e provocar a doença, inoculando-o ao picar um indivíduo sadio (Figura 4). A manifestação clínica da dengue ocorre em um período que varia de 3 a 15 dias (BRASIL, 2009; DIAS et al., 2010; CASTRO et al., 2013).

Figura 4 – Transmissão do *Dengue virus* através do mosquito *Aedes aegypti*



Fonte: adaptado de Whitehead, 2007.

De acordo com Salas et al. (2014), existem diversos fatores relacionados com o aumento da incidência da dengue, dentre eles estão a urbanização descontrolada, carência de serviços públicos como, abastecimento de água e a ineficácia de programas para erradicação do mosquito. Estes levam ao aparecimento de focos utilizados pelos vetores como fontes de reservatório para reprodução dos ovos e propagação da doença.

2.3.3 Formas clínicas

As manifestações clínicas provocadas por qualquer um dos quatro sorotipos virais do DENV (DENV-1 a -4) podem levar a quadros que variam de formas assintomáticas até formas mais graves e fatais. A doença é caracterizada pela presença de febre, dores de cabeça, mialgia, artralgia e prurido cutâneo. Formas graves são caracterizadas pela presença de hemorragia, hipotensão, trombocitopenia e extravasamento de plasma (ROTHMAN, 2011; NOECKER et al., 2014; CARABALI et al., 2015; SCHAEFFER et al., 2015; PANG; MAK, GUBLER, 2017; WARD et al.; 2017).

O vírus possui um período de incubação de 3 a 7 dias, podendo ser seguida por três fases: fase febril, fase crítica e de recuperação (WHO, 2009; GOPAL et al., 2017; ROCHA et al., 2011; SIMMONS et al., 2012):

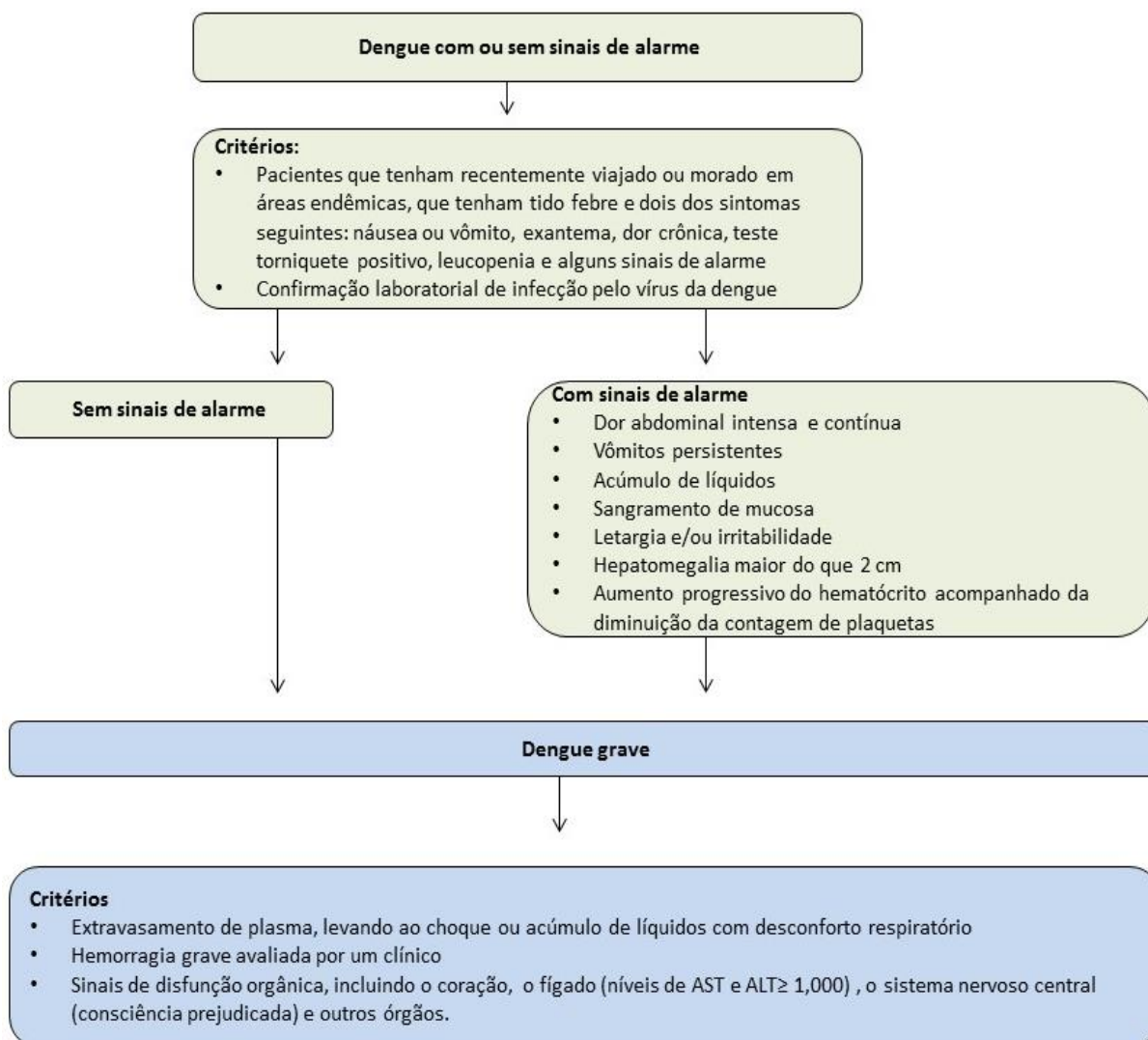
- a) Fase febril: Caracterizada por apresentar febre alta, normalmente de 39° a 40°, podendo vir acompanhada de dor de cabeça, mialgia, dor nas articulações, dor retroorbitária, anorexia, exantema, prurido cutâneo, vômitos, rubor facial e prostração. A prova do laço positiva pode ser indicativa de dengue, tendo em vista a dificuldade de diferenciar nos estágios iniciais a dengue de outras doenças febris. Geralmente, esta fase dura aproximadamente de 2 a 7 dias, e após esse período grande parte dos pacientes evoluem para o estado de recuperação.
- b) Fase crítica: Este período tem início com a defervescência da febre, por volta do terceiro ao sétimo dia de progressão da doença, logo em seguida do período febril. Nesta fase, pode ocorrer o aumento da permeabilidade capilar, o que pode levar ao aumento do hematócrito e extravasamento plasmático. Esta fase pode evoluir para as formas mais graves de dengue.
- c) Fase de recuperação: Nesta fase ocorre a redução da permeabilidade vascular, retornando ao um nível aceitável cerca de 48 a 72 horas. Também ocorre a reabsorção do fluido que foi extravasado, manutenção da hemodinâmica, retorno da diurese, assim como o paciente também pode apresentar rash cutâneo. Observa-se uma melhoria dos sintomas clínicos.

A antiga classificação da dengue, publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 1997) classificava as formas clínicas da dengue sintomática, como Febre da

Dengue (FD), caracterizada por ter a evolução na maioria das vezes benigna, Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) com sintomas mais severos e hemorrágicos, e a Síndrome de Choque do Dengue (SCD), que é potencialmente fatal e constitui os quadros mais severos da dengue (MACIEL; SIQUEIRA; MARTELLI, 2008; WARDHANI et al., 2017).

Em 2009, a OMS propôs uma nova classificação para dengue, de acordo com os níveis de gravidade. Nesta a apresentação clínica da dengue é dividida em Dengue Grave e Dengue com ou sem sinais de alarme, cujas características estão descritas na Figura 5. Um dos fatores que contribuíram para essa mudança foi a dificuldade na classificação dos pacientes em várias situações como, por exemplo, a diferenciação entre os casos de FD e casos brandos de FHD (BANDYOPADHYAY; LUM; KROEGER, 2006; DEEN et al., 2006; WHO, 2009).

Figura 5 – Classificação dos casos de dengue de acordo com a gravidade, OMS 2009.



Fonte: Adaptado de Guzman et al., 2016.

2.3.4 Imunopatogênese

Ao ser inoculado no organismo humano, as primeiras células a entrarem em contato com DENV são as células de Langerhans (células dendríticas), que em seguida se espalham para a circulação sanguínea. Tais células movem-se do sítio inicial para os linfonodos, produzem quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e com isso recrutam mais células imunes. Como consequência, a infecção é disseminada por todo sistema linfático, atingindo células como macrófagos, monócitos, células dendríticas, entre outras (LUPI; CARNEIRO; COELHO, 2007; CEDILLO-BARRÓN et al., 2014; LOBO et al., 2014; LAI; LIN; HSIEH, 2017).

Para a entrada na célula, o vírus interage com receptores na adsorção, como a molécula de adesão intracelular 3 específica de células dendríticas (DC-SIGN), em seguida é internalizado em compartimentos endossomais na penetração. A proteína E sofre mudanças conformacionais devido ao pH ácido do endossomo, este processo permite a liberação do genoma viral no citoplasma da célula infectada, por meio da fusão do envelope com a membrana endossomal (MUKHOPADHYAY et al., 2005; SUWANMANEE; LUPLERTLOP, 2017).

A imunidade inata do hospedeiro é responsável pela primeira linha de defesa no processo de multiplicação do DENV, seus principais componentes são as células dendríticas, sistema complemento e células NK. Esta defesa inicia-se quando receptores de reconhecimento padrão identificam as proteínas do vírus ou o ácido nucléico. Assim ocorre a ativação e o amadurecimento das DCs, levando a expressão de citocinas. Este processo é importante para controle da infecção, além de, por meio dos linfócitos T e B, a mediação a resposta imune adaptativa (HO et al., 2001; ROTHMAN, 2004; SÁNCHEZ; DESPRÉS; BARRÓN, 2005; GUZMAN; HARRIS, 2015).

A imunidade adaptativa também desempenha um papel importante no estabelecimento e controle da resposta imune em detrimento da infecção pelo vírus. Tanto os linfócitos CD4+ como CD8+, estimulados pela produção de citocinas, como o IFN e o fator de necrose tumoral (TNF), são ativados e secretam citocinas que possuem caráter pró-inflamatório e anti-inflamatório. Células T CD8+ atuam reconhecendo células infectadas e executam funções efetoras como lise de células alvo. As células CD4+, especificamente T

helper 2 (Th2), estão associadas com a produção de anticorpos por células B, geralmente em pacientes com dengue a resposta humoral produzida por plasmócitos é vigorosa (FIGUEIREDO, 1999; GUPTA; CHATURVEDI, 2009; ROTHMAN, 2011; VELANDIA; CASTELLANOS, 2011).

A patogênese da infecção pelo DENV não é totalmente esclarecida, infecções secundárias pelo vírus são relacionadas com o desenvolvimento das formas graves da doença, principalmente através da não neutralização de anticorpos adquiridos em infecções passadas. Este evento contribui com a entrada do vírus na célula alvo durante exposições futuras com sorotipos diferentes do DENV, o que propicia o aumento da carga viral e conseqüentemente a manifestação da dengue grave. Esta é a hipótese proposta por Halsted (1970), conhecida por potencialização mediada por anticorpos ou ADE (HALSTEAD, 2003; CHAREONSIRISUTHIGUL; KALAYANAROOJ; UBOL, 2007; CASTANHA et al., 2016; THAKUR et al., 2016; RENTERIA et al., 2017).

Outra teoria utilizada para explicar a evolução da dengue para sua forma grave é conhecida como modelo Pecado Antigênico Original. Neste, ocorre uma desordenada produção de citocinas inflamatórias que possuem como alvo de ataque as proteínas do corpo humano. Esta descontrolada liberação de mediadores deve-se ao fato dos linfócitos T de memória, produzidos durante infecção primária, possuírem afinidade baixa para o sorotipo infectante de uma infecção secundária pelo DENV, sendo, portanto, inespecíficos para a eliminação viral, e contribuintes no processo que leva à dengue grave (HALSTEAD, 1989; KLENERMAN; ZINKERNAGEL, 1998; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; MARINHO, 2014).

A Teoria Integral de Multicasualidade é mais uma forma de explicar a ocorrência da dengue grave. Conforme esta, as teorias de Halstead e do Pecado Original Antigênico estão associadas com fatores de risco. Estes fatores podem ser individuais (menores de 15, etnia branca, adultos do sexo feminino, presença de doenças crônicas, preexistência de anticorpos, intensidade da resposta imune anterior), virais (virulência do sorotipo circulante), epidemiológicos (densidade vetorial elevada, competência vetorial, sequência das infecções, população suscetível, intensidade da circulação do vírus). Nesta teoria, a junção de dados clínicos e epidemiológicos são utilizados para compreender os eventos dessa complexa patologia (TEIXEIRA; BARRETO, GUERRA, 1999; ANTOLINE et al., 2002; ABE; MARQUES, COSTA, 2012).

2.3.5 Diagnóstico

O diagnóstico da dengue é baseado principalmente na realização de testes sorológicos, moleculares e isolamento viral. A escolha do método a ser utilizado será feita de acordo com o momento da infecção. Do primeiro ao quinto dia podem ser realizados o isolamento viral ou testes moleculares, como a detecção do RNA viral e antígenos virais, porque nesse período ainda não houve conversão sorológica. Passados os cinco primeiros dias é possível a detecção de anticorpos específicos em métodos sorológicos (VERDERAL et al., 2011; HASAN et al., 2016; CHATCHEN; SABCHAREON; SIRIVICHAYAKUL, 2017).

O isolamento viral é considerado a técnica padrão ouro para a detecção da infecção pelo DENV. Para obtenção de amostras mais significativas é importante que a coleta seja feita no período da viremia, normalmente dentro de 6 dias após o início da febre. As culturas de células derivadas dos mosquitos C6 / 36 (*Aedes albopictus*) são muito utilizadas para diagnóstico e a amostra de soro do paciente é diluída e inoculada em monocamada de células. Em seguida são incubadas e após 1 semana é feita a pesquisa para DENV, utilizando imunofluorescência (IF), com anticorpos monoclonais específicos para cada sorotipo do vírus (DENV-1 a -4) (KAO et al., 2005).

Os testes sorológicos possuem ampla aplicabilidade no diagnóstico de flavivírus, também na diferenciação entre infecções primárias e secundárias. Baseiam-se na detecção de IgM e na conversão em anticorpos específicos de IgG. Ensaio como inibição da hemaglutinação (HI), têm sido muito utilizados, pois detectam imunoglobulinas totais, principalmente a IgG. Outra técnica bastante utilizada são os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), onde há a detecção de IgM e/ou IgG, que são capturados em placas de 96 poços, por meio da adição de anti-anticorpos dos sorotipos virais do DENV. Testes imunocromatográficos (testes rápidos) também vêm sendo usados para pesquisa de antígenos de superfície do tipo NS1, NS2, NS3, NS4 e imunoglobulinas do tipo IgM e IgG encontrados na infecção pelo DENV, geralmente apresentam uma boa acurácia (ARAÚJO et al., 2002; XAVIER et al., 2014; NISALAK, 2015; GIRY et al., 2017).

Os métodos moleculares são baseados na detecção de ácido ribonucleico (RNA viral) para diagnóstico de infecção por DENV. Estes métodos são realizados em etapas que

envolvem primeiramente a transcrição reversa, seguida pela amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) e caracterização dos produtos que foram amplificados, para classificação dos sorotipos virais. Para a realização destas metodologias podem ser utilizadas técnicas de RT-PCR convencional, ou RT-PCR em tempo real (LANCIOTTI et al., 1992; CORDEIRO, 2012; SUBEDI; ROBINSON, 2014; HUIITS et al., 2017).

2.3.6 Prevenção e controle

De acordo com Dias (2011) a transmissão da dengue envolve fatores relacionados ao vírus, ao vetor e ao homem. As medidas de prevenção e controle são principalmente direcionadas ao controle do mosquito, enquanto as que estão relacionadas ao homem ainda são insuficientes. Campanhas informativas através de meios de comunicação, folhetos, cartazes, palestras com a comunidade, para a conscientização da população revelam pouca eficiência (CLARO; TOMASSINI; ROSA, 2004).

Em seu trabalho Roche e Gould (2013) afirmam que as medidas de controle do vetor podem ser eficazes na redução de doenças virais que são transmitidas por artrópodes. A diminuição do agente transmissor no domicílio e peridomicílio são de extrema importância para a prevenção de epidemias. Porém, muitos países em desenvolvimento não têm os recursos e infraestrutura necessários para medidas de erradicação. Sendo a eliminação de recipientes a maneira mais eficaz de reduzir os criadouros do mosquito, evitando a reprodução e proliferação do mesmo (CORREA; FRANÇA; BOGUTCHI, 2005).

Por outro lado, o controle vetorial parece não ser suficiente para diminuir os impactos causados pela dengue. Até o momento, não existe uma terapia antiviral específica, mas há várias décadas tem-se desenvolvido vacinas. Como por exemplo, a Dengvaxia, fabricada pelo laboratório Sanofi-Pasteur, já disponível no mercado, produzida através da combinação do vírus atenuado da vacina febre amarela e os quatro sorotipos dos vírus selvagens da dengue. Alguns fatores têm dificultado o progresso das pesquisas, como: a patologia complexa da dengue, necessidade de controlar quatro sorotipos do vírus e investimentos insuficientes (GUZMAN et al., 2010; ANVISA, 2016, CHURIO et al., 2017).

2.4 Influências de polimorfismos genéticos do hospedeiro na patogênese da Dengue

Variações em eventos imunológicos podem ser relacionadas com a gravidade, persistência do quadro clínico da dengue e com diferenças na susceptibilidade do hospedeiro à infecção. As variações genéticas mais comuns encontradas no genoma humano são os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), que podem ser marcadores genéticos importantes na avaliação do risco a doenças infecciosas ou não e progressão clínica. Diversos estudos têm analisado a relação desses polimorfismos com a gravidade da dengue (SANTOS et al., 2008; FANG et al., 2012; LOEB, 2013; FLEURY et al., 2018).

Vários trabalhos avaliaram a prevalência de polimorfismos em genes que codificam citocinas, como a Interleucina-6 (XAVIER-CARVALHO (2013), CANSANÇÃO (2016), FEITOSA et al., (2016)), Fator de Necrose Tumoral Alfa (PEREZ et al., (2010), FERNANDO et al., (2015), SAM et al., (2015), GOMES (2017)). Além de polimorfismos em receptores de células dendríticas (WANG et al., (2011), DETTOGNI et al., (2015), SAKUNTABHAI et al., (2005)) e o receptor FcγRIIa (GARCÍA et al., (2010).

Estes estudos tiveram por objetivo identificar se a presença dos respectivos SNPs estava relacionada com proteção, susceptibilidade e/ou progressão para formas clínicas mais graves da dengue. Podendo assim esclarecer como fatores genéticos do hospedeiro, no caso os SNPs, influenciam na expressão de genes humanos e consequentemente na resposta/curso da infecção.

Tendo em vista as várias moléculas que estão envolvidas na imunopatogênese da dengue, desde a entrada do vírus, através célula dendrítica, pelo do receptor DC-SIGN, como também nos principais eventos imunológicos ocorridos, dentre eles a produção de citocinas, como a IL-6, pelos linfócitos T helper. Percebe-se a heterogeneidade de moléculas envolvidas e a importância de estudos que analisem os polimorfismos nos genes que as codificam, uma vez que elas iniciaram a resposta imune do hospedeiro contra o DENV (COFFEY et al., 2009; LAN; HIRAYAMA, 2011; FANG et al., 2012; HARAPAN et al., 2013).

2.4.1 O receptor *DC-SIGN* e o polimorfismo -336 A/G

As células dendríticas (CDs) são produzidas na medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes, fazem parte do sistema imune e são importantes apresentadoras de antígenos. Durante a infecção, possivelmente são as primeiras células alvo de alguns vírus, como o *Dengue virus*. Estas reconhecem os patógenos no tecido periférico, em seguida deslocam-se para os gânglios linfáticos, facilitando a infecção de outras células susceptíveis e a proliferação do vírus (CONTI; SANTIAGO; SFORCIN, 2014; LIU et al., 2017).

Nas células dendríticas e em macrófagos são encontrados receptores DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), os quais são codificados pelo gene *CD209*. Os receptores DC-SIGN são longas proteínas transmembranas tetramérica, possuem 4.7 kDa de peso molecular, fazem parte da família das lectinas tipo C, dependentes de íons cálcio e com um único domínio de reconhecimento de carboidratos (SANCHEZ; DESPRES, BARRON, 2005; KHOO; CHAN; CHAN, 2008; REINA; ROJO, 2013).

As moléculas DC-SIGN interagem com patógenos virais e bacterianos, agindo como mediador de reconhecimento de células dendríticas (CHAAITHANYA et al., 2015; BARKHASH et al., 2016). Essas moléculas e outros receptores específicos atuam reconhecendo proteínas de vários vírus, dentre elas resíduos de manose encontrados na glicoproteína E do *Dengue virus*, promovendo a entrada do vírus à célula (ALEN et al., 2012; RICHTER et al., 2014; LO et al., 2016).

Diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram estudados para os genes que codificam o DC-SIGN, sendo estes relacionados à susceptibilidade ou resistência a várias patologias (SILVA, 2011). O polimorfismo DC-SIGN -336 (rs4804803) está localizado na região promotora do gene *CD-209*, nele ocorre a troca de uma adenina por uma guanina (A/G), estando relacionado com a expressão elevada do DC-SIGN (NOECKER et al., 2014). Esse polimorfismo tem sido descrito como fator de proteção contra inúmeros agentes patogênicos que utilizam esse receptor como forma de infectar células dendríticas, inclusive o DENV (SAKUNTABHAI et al., 2005; BARKHASH et al., 2012; SHIMOJIMA et al., 2014; SCHAEFFER et al., 2015).

Pesquisas vêm sendo realizadas na busca de esclarecer a relação do polimorfismo -336 A/G (rs4804804) com a modulação das formas clínicas da dengue, tendo em vista que este mecanismo ainda não se encontra totalmente elucidado. Dentre elas, a pesquisa feita no Brasil, estado da Bahia, por Silva et al. (2010) e Oliveira et al. (2014) no estado do Pará, onde não foram encontradas associação significativa; e no México por Noecker et al. (2014), em que os genótipos GG ou GA estavam associados à casos de dengue sem complicações; no Taiwan por Wang et al. (2011), houve forte associação do alelo G e o risco de FHD e na Tailândia por Sakuntabhai et al. (2005), o alelo G foi associado a proteção contra a febre da dengue.

2.4.2 A *IL-6* e o polimorfismo -174 G/C

A interleucina 6 (*IL-6*) é conhecida como uma citocina pleitrópica e pró-inflamatória, formada por 184 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente de 22 a 27 KDa. Ela é secretada por células hematopoiéticas, macrófagos, monócitos, eosinófilos, células endoteliais, devido ao estímulo de outras citocinas, como a interleucina-1 e o fator de necrose tumoral alfa, como também em resposta a microrganismos. Desempenha um importante papel na resposta imune inata e adaptativa, atuando como mediador na fase aguda dos processos inflamatórios (SOUZA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; CALABRESE; ROSE-JOHN, 2014; VAN BELLE et al., 2014; FONTES; ROSE; ČIHÁKOVÁ, 2015; CAMPOS et al., 2016).

Os níveis de *IL-6* nas células geralmente são baixos, podendo ser aumentado em decorrência das repostas inflamatórias, onde a produção da mesma é fundamental para a indução de proteínas de fase aguda. Dessa forma a produção descontrolada de *IL-6* estimula a inflamação crônica, o que pode levar a diversas doenças inflamatórias crônicas, doenças autoimunes, artrite, hepatite, dentre outras (HODGE; HURT; FARRAR, 2005; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014; YU et al., 2015.; NAN et al., 2018).

Vários estudos demonstram o aumento dos níveis de citocinas circulantes no soro de pacientes com dengue, dentre elas a *IL-6*. Há evidências da associação de SNPs na alteração da expressão de citocinas, mostrando que SNPs em genes de citocinas são fundamentais para compreensão da fisiopatologia de várias doenças infecciosas. Devido a sua importância nos processos inflamatórios, pesquisas vêm sendo desenvolvidos

associando a relação entre SNP no gene da *IL-6* com o desenvolvimento de doenças inflamatórias, como a dengue (CHEN et al., 2006; MOREIRA et al., 2008; FRANCESCH et al., 2009; LEVY et al., 2010; LAN; HIRAYAMA, 2011; MALAVIGE et al., 2013; FEITOSA et al., 2016; IMANI et al., 2017).

O gene da *IL-6* localiza-se no braço curto do cromossomo 7 (7p21), é formado por 5 exóons e 4 íntrons. Na sua região promotora existem diversos polimorfismos, dentre eles o -174 G/C (rs1800795), que tem sido foco de diversos estudos e relacionado com a alteração na transcrição da *IL-6*. O polimorfismo é decorrente da mudança de uma guanina (G) para uma citosina (C), onde, de acordo com pesquisas, o alelo G é responsável por aumentar a expressão da *IL-6*, por outro lado, o alelo C é responsável pela diminuição da expressão da mesma. Dessa forma, ao alelo G estaria associado com risco para doenças inflamatórias e o alelo C com proteção (TERRY et al., 2000; KIM; CHUNG; KWON, 2016; WANG et al., 2015; MOTAWI et al., 2016; ZHU et al., 2016; ATTAR; MANSOORI; SHAHBAZI, 2017; SZPECHT et al., 2017; ZEKOVIC et al., 2018; ZHOU et al., 2018; TETZLAFF et al., 2018).

Para uma melhor compreensão da patogênese da dengue, pesquisas vêm sendo desenvolvidas averiguando a relação entre o SNP -174 G/C com proteção ou susceptibilidade para os casos da doença. Em regiões brasileiras, estudos foram realizados no Ceará, por Cansanção et al. (2016) e observou-se relação entre os genótipos G/C e C/C, associado ao alelo A do SNP no gene *TNF- α* ao risco à infecção por dengue, no Espírito Santo por Dettogni et al. (2015), onde associação entre SNPs *FcyRIIa*, *TNF- α* e *IL-6* e persistência de sintomas clínicos da dengue, Moreira et al. (2008), o genótipo GC foi relacionado como marcador de resistência para febre da dengue; na Venezuela, Fernández-Mestre et al. (2004) e em Cuba, Perez et al. (2010), não foram encontradas associações significativas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a prevalência e a influência dos polimorfismos -336 A/G (rs4804803) no gene *DC-SIGN* e -174 G/C (rs1800795) no gene *IL-6* em pacientes com sintomatologia para dengue, pacientes assintomáticos e indivíduos controle no município de Parnaíba, norte do estado do Piauí, no período de janeiro de 2016 a janeiro de 2018.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismos -336 A/G (rs4804803) e -174 G/C (rs1800795), em uma população de indivíduos com diagnóstico confirmado para dengue, assim como também em indivíduos dos grupos controle e assintomático;
- Verificar a associação destes SNPs como fatores que podem predispor à proteção, ou à susceptibilidade e risco de progressão para manifestações clínicas mais graves da dengue;
- Correlacionar os polimorfismos com a sintomatologia clínica apresentada pelos pacientes;
- Comparar as frequências dos alelos mutantes de cada polimorfismo obtidos nesta pesquisa com os resultados encontrados em outros estudos feitos em diferentes regiões.

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, o presente estudo foi apreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí, com aprovação sob o parecer nº 1197622.

Aos indivíduos recrutados de forma voluntária para compor os grupos controle e assintomático, bem como também aos indivíduos do grupo de casos positivos, foi explicado verbalmente pelos pesquisadores os propósitos da presente pesquisa e sua forma de participação, a qual se deu de forma livre. A recusa em participar não lhe causou nenhuma restrição quanto ao seu atendimento pelos serviços de saúde.

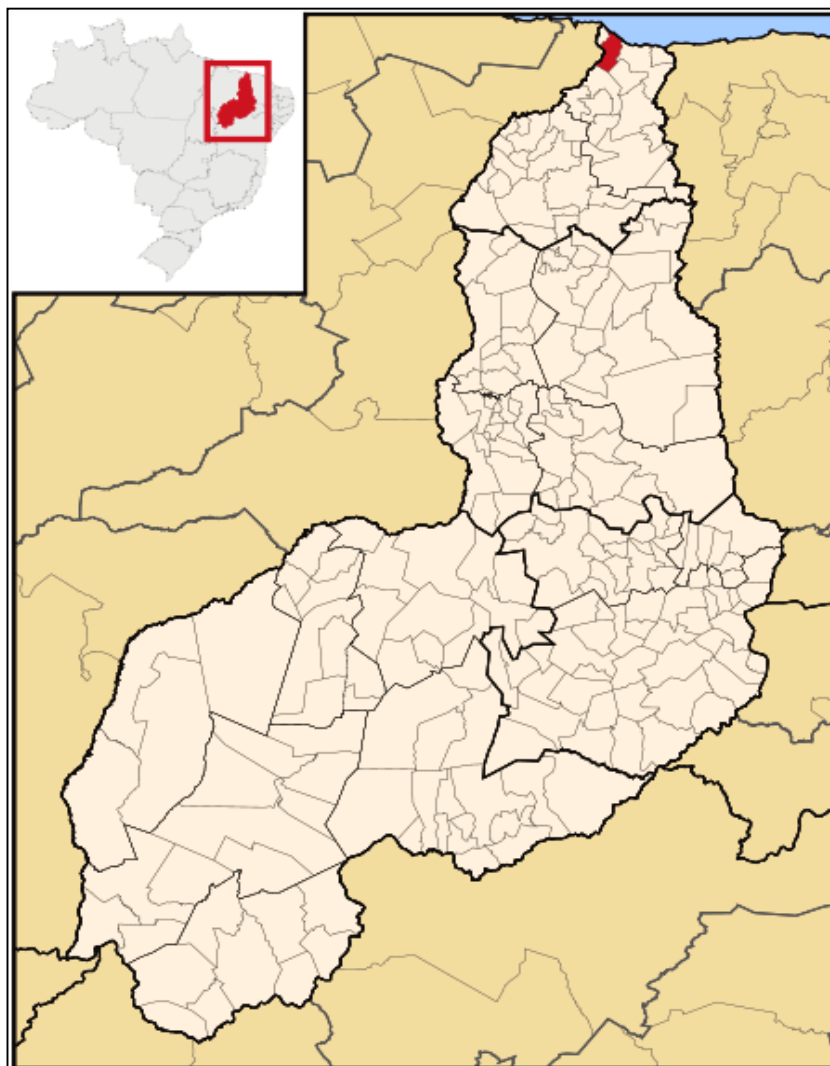
As informações pessoais e de exames laboratoriais dos pacientes que foram obtidas por revisão de prontuários (ou eventualmente informadas de forma verbal pelos próprios participantes ou por seus familiares) ficaram em sigilo absoluto e com garantia de anonimato de identidade, sendo utilizadas somente 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 de forma voluntária, através da leitura e posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice I) em duas vias de igual teor, tanto pelos pesquisadores quanto pelo sujeito participante do estudo ou seu respectivo representante legal.

4.2 Tipo de estudo e local

O estudo foi do tipo caso-controle, de caráter qualitativo e com abordagem exploratória. Foi realizado no polo de saúde do município de Parnaíba-PI, localizado ao norte do estado (Figura 6), próximo ao litoral, com clima tropical e vegetação adaptada as condições locais. O município possui área de aproximadamente 436 km² e população total estimada em 150.201 habitantes (IBGE, 2017).

A pesquisa foi realizada no período compreendido entre agosto de 2016 a julho de 2018, após o projeto ter sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí.

Figura 6 – Mapa de localização do município de Parnaíba, Piauí, Brasil.



Fonte: ABREU, 2006.

4.3 População de estudo, definição de casos e controles e critérios de exclusão

Participou da formação da amostra do presente trabalho os casos de pacientes suspeitos de dengue, independente do sexo e faixa etária. As amostras foram divididas em: positivas, assintomáticos e controle. 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.

O grupo de casos positivos (DEN) foi composto por amostras em que os pacientes apresentaram a sintomatologia da doença e com resultados positivos para dengue através de testes moleculares por RT-PCR ou sorologia positivo para dengue, IgM e/ou IgG, confirmados através ELISA e/ou testes imunocromatográficos. Os pacientes deste grupo ainda foram classificados em dois subgrupos: dengue sem sinais de alarme (DSSA), e dengue com sinais de alarme (DCSA), de acordo com critérios clínicos e laboratoriais.

O grupo controle foi formado por amostras de indivíduos voluntários, recrutados de forma aleatória, que nunca apresentaram histórico de sintomatologia, e que os resultados de testes imunocromatográficos, tanto IgM quanto IgG foram negativos para dengue e/ou outras arboviroses. As amostras utilizadas para esse grupo foram coletadas nos anos de 2014, 2015 e 2017.

O grupo de casos assintomáticos (ASS) foi formado por amostras de indivíduos que a princípio fariam parte do grupo controle, ou seja, estes relataram não terem tido dengue e sintomas relacionados à doença ou outras arboviroses, contudo apresentaram resultados positivos para dengue, através de testes imunocromatográficos, indicando que os mesmos tiveram infecção pelo DENV, mas não desenvolveram manifestações clínicas.

4.4 Coletas de amostras, dados pessoais e clínicos dos pacientes

Os dados pessoais e clínicos foram obtidos através de entrevista e aplicação de formulário (Apêndice II) feitas em pacientes atendidos no laboratório do Pronto Socorro Municipal (PSM), localizado no município de Parnaíba-Piauí, no período de agosto de 2016 a dezembro de 2017.

As amostras foram obtidas através de punção venosa de sangue periférico (5ml) dos pacientes, utilizando-se seringas descartáveis e/ou tubos de coleta à vácuo contendo o anticoagulante EDTA. Posteriormente, as amostras foram levadas para a Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, Parnaíba-PI, e devidamente processadas para análises posteriores a serem realizadas no Laboratório de Biologia e Bioquímica de

Micro-organismos e Plantas (BIOMIC) e no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da referida instituição.

4.5 Confirmação diagnóstica dos casos de dengue

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

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

4.5.1 Testes rápidos imunocromatográficos

O teste imunocromatográfico foi realizado por meio do Kit SD Bioline Dengue Duo (Standart Diagnostics Inc, Republico of Koren), formados por dois dispositivos. O dispositivo superior corresponde ao teste para identificação de anticorpos anti-DENV, em que foram adicionados 10 µl de soro de pacientes com suspeita de dengue no local indicado pelo fabricante. Depois, foram adicionadas 3 a 4 gotas do diluente de amostra (fornecido pelo kit) no poço de formato circular, após transcorrer 15 a 20 minutos, foi feita a leitura e interpretação dos resultados.

A parte inferior do dispositivo corresponde ao teste para detecção do antígeno NS1. Com o auxílio de um conta-gotas descartável, foram adicionadas 3 gotas da amostra no poço de formato circular, esperou-se um tempo de 15 a 20 minutos para leitura e interpretação dos resultados.

4.5.2 Diagnóstico Molecular

4.5.2.1 Extração do RNA viral e Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

Primeiramente foi realizada a extração do RNA viral a partir das amostras de soro dos pacientes suspeitos de dengue, utilizando o kit comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), seguindo as instruções estabelecidas no protocolo dos fabricantes.

Após a realização da extração, seguiu-se a técnica de RT-PCR, que foi dividida em duas etapas: a Transcrição Reversa (RT), que permite a conversão do RNA viral em DNA complementar (cDNA), através da enzima MMLV-RT (do inglês *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*). A segunda etapa, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi utilizada para amplificação dos fragmentos de interesse, por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase (Ludwing, Biotec). As duas reações foram realizadas no termociclador AmpliTherm® Thermal Cycler (Madison, WI, USA).

Foram utilizados dois protocolos para a detecção do DENV nas amostras. O primeiro, foi descrito por Lanciotti et al. (1992). Neste o RNA viral foi submetido à ação da enzima MMLV-RT (PROMEGA INC., USA), usando o iniciador D2 (primer reverse) para sua conversão em cDNA. A reação ocorreu em três etapas, na primeira etapa, o RNA molde e o iniciador D2 foram incubados no termociclador, na segunda foi adicionado o Tampão da enzima (5X), dNTPs e DTT (0,1 M) e na última etapa foi adicionado a enzima MMLV e os produtos foram novamente incubados.

No segundo protocolo, foram utilizados iniciadores Random Hexamers, nele a reação foi realizada em duas etapas: na primeira, o RNA molde e os Random Hexamers (50 µM) foram incubados no termociclador. Quando retiradas do termociclador, as amostras foram armazenadas no gelo, para evitar a formação de dímeros. Na segunda etapa foram adicionados o Tampão da enzima (5X), dNTP (10 mM) e a enzima MMLV e foram novamente incubados.

A técnica de PCR foi utilizada para amplificação das regiões de interesse do genoma viral, através da enzima Taq DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia Alvorada,

Brasil), os reagentes foram incubados no termociclador AmpliTherm® Thermal Cycler (Madison, WI, USA). Para a realização desta técnica foram usados 4 protocolos, o primeiro descrito por Lanciotti e colaboradores (1992), visou amplificar a região do gene *C/prM* do genoma do DENV, encontrada nos 4 sorotipos.

As amostras de cDNA foram submetidas a uma primeira reação de amplificação, que permitiu a identificação do DENV com uso de iniciadores D1 e D2 específicos para a região do gene *C/prM*. As amostras que foram positivas, amplificaram um padrão de 511 pb, para todos os sorotipos do vírus. Os produtos da primeira reação foram submetidos a uma segunda etapa, onde foi feita outra amplificação que possibilitou a identificação entre os 4 sorotipos do DENV, utilizando iniciadores sorotipo-específicos. Os iniciadores, sua localização e o tamanho dos seus produtos após a PCR, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores para amplificação do gene *C/prM* do DENV, descritos por Lanciotti e colaboradores (1992), com suas localizações e tamanhos do produto da reação de PCR.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5' - 3')	POSICÃO	PRODUTO
<i>C/prM</i>	<i>Forward</i> D1	TCAATATGCTGAAACGCGGAGAACCG	134-161	511 pb
	<i>Reverse</i> D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	616-644	(DENV)
	TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	568-586	482 pb (DENV-1)
	TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232-252	119 pb (DENV-2)
	TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	400-421	290 pb (DENV-3)
	TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	506-527	392 pb (DENV-4)

O segundo protocolo baseou-se na amplificação do gene *E*, codificante da proteína de envelope, que possui a mais alta taxa de mutação entre os *Flavivirus*. Os iniciadores para tal técnica são sorotipo-específicos para o DENV e foram desenvolvidos por Figueiredo e colaboradores (2014) e Rocha e colaboradores (2013) (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequência dos iniciadores para amplificação do gene *E* do DENV descritos por Figueiredo e colaboradores (2014) e Rocha e colaboradores (2013), com seus sorotipos específicos e tamanhos do produto da reação de PCR.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5' - 3')	PRODUTO
<i>E</i>	D13F	AGCCAAAATATCAAACACCAC	972 pb (DENV-1)
	D14R	AAAGGTGGTTCTGTCTCAATG	
	DEN2 3EF	GTTCACGGGACATCTCAA	651 pb (DENV-2)
	DEN2 4ER	GTTCTTTATTTTCCAGC	
	DEN3 1EF	CAATGAGATGTGTGGGAG	1012 pb (DENV-3)
	DEN3 2ER	CTTCTTTCTTCAACACAA	
	DEN4E-F	TATAGGATCCCGATGCGTAGGAGTAGGAAAC	1212 pb (DENV-4)
	DEN4E-R	AGCAAGCTTTTATGTGGACTCAAACATCTTGCC	

O terceiro protocolo teve como interesse a amplificação dos produtos do gene *NS5*, esta região é considerada a região mais conservada do genoma dos *Flavivirus*. Os iniciadores foram desenvolvidos por Chao, Davis & Chang (2007), permitindo a identificação inicial geral para *Flavivirus* circulantes, que podem ser posteriormente diferenciados através de outros protocolos específicos (Tabela 3).

Tabela 3 – Sequência dos iniciadores para amplificação do gene *NS5* dos *Flavivirus* descritos por Chao, Davis & Chang (2007), e o tamanho do produto da reação de PCR.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5' - 3')	PRODUTO
<i>NS5</i>	MFU1	TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAAA	270 pb (<i>Flavivirus</i>)
	CFD2	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC	

Baseado nos iniciadores descritos por Bronzoni e Colaboradores (2005), um quarto protocolo de PCR passou a ser utilizado, com a finalidade de amplificar a região *NS5*. Após ter sido feita a RT-PCR, as amostras de cDNA foram submetidas a uma primeira amplificação, que permitirá a identificação de *Flavivirus* a partir da utilização dos iniciadores FG1 e FG2 para a região do gene *NS5*. Quando foram positivas, as amostras amplificaram a um padrão de 958 pb. Esses produtos da primeira reação também 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. Foi desenvolvida de 2 formas: uma para detecção simultânea dos sorotipos de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e uma outra para a detecção individual de DENV-4 (Tabela 4).

Tabela 4 – Iniciadores para amplificação da região do gene NS5 descritos por Bronzoni e colaboradores (2005), suas respectivas sequências e produtos.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5' - 3')	PRODUTO
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, os produtos das amplificações foram submetidos à corrida de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, foram corados com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Corporate Place, Hayward, CA, USA) e visualizados sob luz ultravioleta em transluminador L-PIX (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil).

4.6 Extração, quantificação e armazenamento do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de alíquotas de amostras do sangue total (300µL) coletado, utilizando o kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Inc., USA), conforme as especificações descritas pelo protocolo do fabricante. Em seguida, a concentração do material genético foi determinada por meio de espectrofotômetro de luz ultravioleta visível, utilizando-se um comprimento de onda de 260 a 280nm no equipamento *BioSpec-Nano* (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Utilizando 1µL de cada amostra de DNA extraído, as leituras no aparelho foram realizadas em duplicata, porém se a diferença entre a primeira e a segunda medição foi > 10 ng/µL (ou seja, apresente um valor discrepante), foi realizada 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 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 das amostras, estas foram armazenadas em freezer (-20°C) até que fosse realizado o procedimento de genotipagem.

4.7 Genotipagem dos SNPs no gene *DC-SIGN* (-336 A/G) e do gene *IL-6* (-174 G/C)

A genotipagem foi feita para os SNPs no gene *DC-SIGN* (-336 A/G) e do gene *IL-6* (-174 G/C) em amostras de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial confirmado para dengue, assim como também para amostras dos indivíduos do grupo controle e do grupo assintomático, por meio de PCR em Tempo Real.

Nos experimentos foram utilizados ensaios validados *SNP TaqMan® Genotyping Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), juntamente com o conjunto de reagentes *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. Cada ensaio de genotipagem validado é composto por dois iniciadores para a amplificação das regiões de interesse de cada polimorfismo (Tabela 5), e duas sondas que são responsáveis pela detecção de alelos.

Tabela 5 - Gene, dbSNP e suas respectivas sondas (VIC/FAM) para PCR em Tempo Real (*TaqMan® SNP Genotyping Assays*).

GENE	DbSNP	SEQUÊNCIA [VIC/FAM]
<i>DC-SIGN</i>	rs4804803 (-336A/G)	ACACCCCCTCCACTAGGGCAAGGGT[A/G]GGCAGGTAGCACCCCCA GTTCTGG
<i>IL-6</i>	rs1800795 (-174 G/C)	ACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGC[C/G]ATGCTAAAGGACGTCACA TTGCACAGCAGGGAGGATGGGGAGTGTGAG

As reações de amplificação e genotipagem por PCR em Tempo Real deste estudo foram realizadas para um volume final de 5 µL, adaptado a partir do protocolo padrão sugerido pela empresa fabricante dos ensaios (para um volume final de 10 µL) (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%.

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, 2018), os quais possibilitaram a visualização dos *plots* de discriminação alélica-específica gerados como observado na Figura 7, bem como também as curvas de amplificação do material genético das amostras.

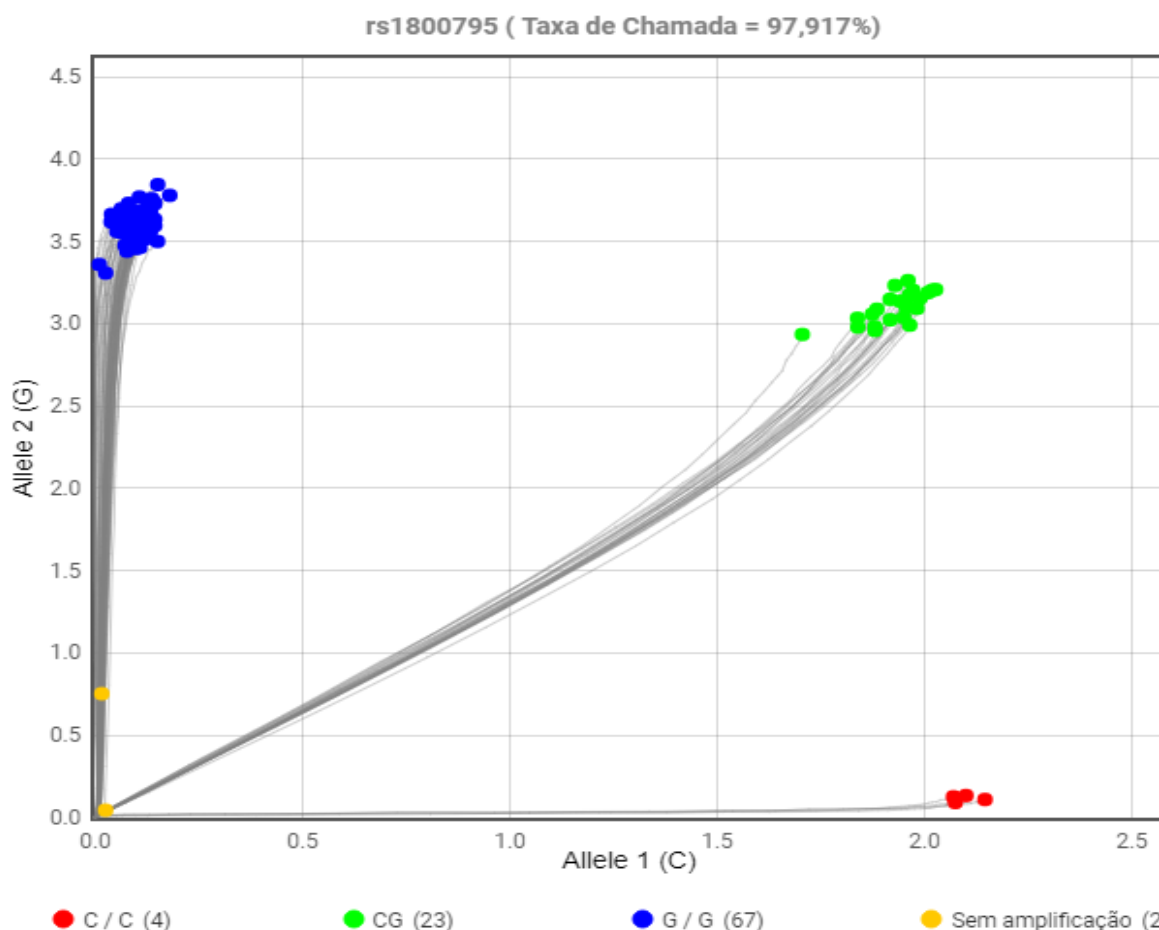


Figura 7 – Exemplo de *plot* de discriminação alélica do SNP -174 G/C (rs1800795) para o gene *IL-6* gerado por PCR em Tempo Real. Na figura pode-se verificar: indivíduos com presença do alelo selvagem (homozigotos) representando o genótipo G/G (cor azul); indivíduos com presença do alelo mutante (homozigoto) representando o genótipo C/C (cor vermelha); indivíduos com presença de ambos os alelos (heterozigotos) representando o genótipo G/C (cor verde); e dois indivíduos em que o material genético não foi amplificado (cor amarela). (Fonte: THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2018 – Adaptado).

4.8 Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados através do programa estatístico *BioEstat 5.0* (Instituto Mamirauá, Tefé, Brasil). As frequências genotípicas e alélicas das mutações dos polimorfismos estudados 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, indivíduos do grupo controle e indivíduos do grupo assintomático, tendo sua significância estimada pelo teste do Qui-quadrado (χ^2). O teste exato de Fisher foi utilizado quando um valor na tabela de contingência for menor que 5.

Para cada comparação foi calculada uma força de associação ou razão de chances (OR, do inglês *Odds Ratio*). Valores de $OR > 1$ indicaram 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. Em todas as análises, foi adotado um nível de significância de $p < 0,05$ para que as diferenças sejam consideradas estatisticamente significativas.

5 RESULTADOS

Durante o período compreendido entre Janeiro de 2016 a Dezembro de 2017, foram coletadas 592 amostras de pacientes atendidos no Pronto Socorro Municipal de Parnaíba e no Hospital Estadual Dirceu Arcoverde, que apresentavam sintomatologia clínica para dengue, destas 245 foram referentes ao ano de 2016 e 347 referentes ao ano de 2017.

A confirmação das amostras positivas para a infecção pelo *Dengue virus* foi realizada através de testes rápidos imunocromatográficos e/ou testes moleculares. Do número total de amostras, 119 foram positivas para a infecção pelo DENV, sendo 53 delas referentes ao ano de 2016 e 66 para o ano de 2017. A média de idade do grupo de casos positivos (DEN) foi de 35,9 anos, com a maioria dos casos correspondendo a indivíduos do sexo feminino (70%). Quanto à classificação da dengue, 74 pacientes foram classificados como DSSA, o que representa a 62% do total de amostras, e 45 foram classificados como DCSA, o que corresponde a 38%.

O grupo controle foi composto por voluntários que foram recrutados de maneira aleatória e que relataram nunca terem apresentado sintomas clínicos para arboviroses, com a realização de testes imunocromatográficos estes também apresentaram resultados negativos para a infecção pelo DENV. Sendo assim, o grupo foi formado por um total de 131 amostras, sendo 72% pertencente ao sexo feminino e a média de idade foi de 24,1 anos.

O grupo assintomático (ASS), foi formado por amostras de pacientes que inicialmente foram recrutados para a composição do grupo controle, que declararam nunca terem manifestado sintomatologia para as arboviroses, porém com a realização dos testes imunocromatográficos, foi observada a presença de anticorpos IgM/IgG anti-DENV, indicando que os mesmos haviam sido infectados pelo DENV, mas não apresentaram manifestação de sintomatologia clínica de dengue. Dessa forma, fizeram parte desse grupo 83 amostras, onde 70% correspondia ao sexo feminino, com uma média de idade de 22,5 anos.

Na genotipagem do polimorfismo do gene *DC-SIGN* (-336 A/G), observou-se 118 amostras foram genotipadas para o grupo de casos DEN (99,2%), 118 amostras (97,7%)

foram genotipadas para o grupo controle, e 83 amostras (100%) foram genotipadas para o grupo ASS.

As análises das frequências genóticas do SNP -336 A/G do gene *DC-SIGN* (Tabela 6) entre o grupo controle e DEN, demonstraram que a frequência do genótipo AG foi maior no grupo DEN (34,8%) em relação ao grupo controle, com 31,2% ($p= 0,514$, $OR=1,20$, $p^*= 0,61$), porém sem diferença estatística significativa. O genótipo G/G também foi mais frequente no grupo DEN (4,2%), quando comparado ao grupo controle, com 3,2% ($p= 0,735$, $OR= 1,46$, $p^*= 0,84$), não apresentando diferença estatisticamente significativa. Assim como os genótipos A/G + G/G que tiveram maior frequência no grupo DEN (39,0%) quando comparado ao grupo controle com 34,4% ($p= 0,453$; $OR= 1,22$; $p^*= 0,54$), mas também sem diferença estatística significativa. E os genótipos A/A + A/G que tiveram maior frequência no grupo controle (96,8%) em relação ao grupo DEN com 95,8% ($p= 0,767$; $OR= 1,06$; $p^*= 0,85$), sem diferença estatística significativa. Todas as frequências genóticas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Com relação as análises das frequências genóticas (Tabela 6) entre o grupo controle e DSSA, não mostraram diferença significativa entre os genótipos analisados, A/G ($p= 0,854$; $OR= 0,94$; $p^*= 0,98$), G/G ($p= 0,999$; $OR= 1,29$; $p^*= 0,94$), A/G + G/G ($p= 0,932$; $OR= 0,97$; $p^*= 0,94$), A/A + G/G ($p= 0,936$; $OR= 0,98$; $p^*= 0,97$). Como nas análises entre o grupo controle e DCSA, A/G ($p= 0,129$; $OR= 1,73$; $p^*= 0,18$), G/G ($p= 0,610$; $OR=1,83$; $p^*= 0,86$), A/G + G/G ($p= 0,115$; $OR= 1,74$; $p^*= 0,16$), A/A + G/G ($p= 0,471$; $OR= 1,24$ $p^*= 0,56$). Todas as frequências genóticas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Na comparação entre os grupos DSSA e DCSA não ocorreu diferença significativa entre os genótipos analisados, A/G ($p= 0,128$; $OR= 1,84$; $p^*= 0,19$), G/G ($p= 0,997$; $OR=1,42$; $p^*= 0,90$), A/G + G/G ($p= 0,133$; $OR=1,79$; $p^*= 0,19$), A/A + A/G ($p= 0,468$; $OR= 1,26$; $p^*= 0,57$). Todas as frequências genóticas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

As análises das frequências alélicas do polimorfismo do gene em questão revelaram que o alelo G teve menor frequência no grupo controle (18,8%) quando comparado ao grupo DEN (Tabela 6), com 21,6%, ($p= 0,429$; $OR= 1,19$; $p^*= 0,50$), porém não foi observada diferença estatisticamente significativa. Conforme apresentado na

mesma tabela, nas demais comparações das frequências do alelo G entre os grupos DSSA e controle ($p = 0,966$, OR= 1,01, $p^* = 0,93$), DCSA e controle ($p = 0,139$, OR= 1,53, $p^* = 0,19$), e DSSA e DCSA ($p = 0,192$, OR= 1,52, $p^* = 0,25$), também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Todas as frequências genótípicas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Tabela 6 - Distribuição genotípica e alélica do SNP -336 A/G (rs4804803) do gene *DC-SIGN* nos grupos casos (DEN, DSSA e DCSA) e controle.

<i>DC-SIGN</i> -336 A/G	Controle (%)	DEN (%)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *	Controle (%)	DSSA (%)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *
Genótipos										
AA	84 (65,6)	72 (61,0)	-	-	-	84 (65,6)	49 (66,2)	-	-	-
AG	40 (31,2)	41 (34,8)	0,514	1,20 (0,70-2,05)	0,61	40 (31,2)	22 (29,7)	0,854	0,94 (0,50-1,77)	0,98
GG	4 (3,2)	5 (4,2)	0,735	1,46 (0,38-5,64)	0,84	4 (3,2)	3 (4,1)	0,999	1,29 (0,28-5,98)	0,94
AG + GG	44 (34,4)	46 (39,0)	0,453	1,22 (0,72-2,05)	0,54	44 (34,4)	25 (33,8)	0,932	0,97 (0,53-1,78)	0,94
AA + AG	124 (96,8)	113 (95,8)	0,767	1,06 (0,71-1,59)	0,85	124 (96,8)	71 (95,9)	0,936	0,98 (0,62-1,55)	0,97
Alelos										
A	208 (81,2)	185 (78,4)	-	-	-	208 (81,2)	120 (81,1)	-	-	-
G	48 (18,8)	51 (21,6)	0,429	1,19 (0,77-1,86)	0,49	48 (18,8)	28 (18,9)	0,966	1,01 (0,60-1,70)	0,92

<i>DC-SIGN</i> -336 A/G	Controle (%)	DCSA (%)	<i>P</i>	OR (95%IC)	<i>p</i> *	DSSA (%)	DCSA (%)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *
Genótipos										
AA	84 (65,6)	23 (52,3)	-	-	-	49 (66,2)	23 (52,3)	-	-	-
AG	40 (31,2)	19 (43,2)	0,129	1,73 (0,85-3,55)	0,18	22 (29,7)	19 (43,2)	0,128	1,84 (0,84-4,05)	0,19
GG	4 (3,2)	2 (4,5)	0,610	1,83 (0,31-10,60)	0,86	3 (4,1)	2 (4,5)	0,997	1,42 (0,22-9,09)	0,90
AG+ GG	44 (34,4)	21 (47,7)	0,115	1,74 (0,87-3,49)	0,16	25 (33,8)	21 (47,7)	0,133	1,79 (0,83-3,83)	0,19
AA+ AG	124 (96,8)	42 (95,5)	0,471	1,24 (0,69-2,21)	0,56	71 (95,9)	42 (95,5)	0,468	1,26 (0,67-2,35)	0,57
Alelos										
A	208 (81,2)	65 (73,9)	-	-	-	120 (81,1)	65 (73,9)	-	-	-
G	48 (18,8)	23 (26,1)	0,139	1,53 (0,87-2,71)	0,18	28 (18,9)	23 (26,1)	0,192	1,52 (0,81-2,84)	0,25

A = alelo selvagem; G = alelo mutante; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; Significância estatística ($p < 0,05$).

Quando analisadas as frequências genotípicas do SNP -336 A/G do gene *DC-SIGN* (Tabela 7) entre o grupo ASS e DEN, observou-se que a frequência do genótipo A/G foi maior no grupo DEN (34,8%) em relação ao grupo ASS, com 30,1% ($p= 0,432$, $OR=1,28$, $p^*= 0,53$), porém sem diferença estatística significativa. O genótipo G/G também foi mais frequente no grupo DEN (4,2%), quando comparado ao grupo ASS, com 2,4% ($p= 0,698$, $OR= 1,94$, $p^*= 0,69$), não apresentando diferença estatisticamente significativa. Assim como os genótipos A/G + G/G que tiveram maior frequência no grupo DEN (39,0%) quando comparado ao grupo ASS com 32,5% ($p= 0,348$; $OR= 1,32$; $p^*= 0,43$), mas também sem diferença estatística significativa. E os genótipos A/A + A/G que tiveram maior frequência no grupo ASS (97,6%) em relação ao grupo DEN com 95,8% ($p= 0,723$; $OR= 1,08$; $p^*= 0,81$), sem diferença estatística significativa. Todas as frequências genotípicas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

As análises das frequências genotípicas do SNP -336 A/G do gene *DC-SIGN* (Tabela 7) entre o grupo ASS e DSSA, não mostraram diferença significativa entre os genótipos analisados, A/G ($p= 0,987$; $OR= 1,01$; $p^*= 0,87$), G/G ($p= 0,666$; $OR= 1,71$; $p^*= 0,90$), A/G + G/G ($p= 0,867$; $OR= 1,06$; $p^*= 0,99$), A/A + G/G ($p= 0,994$; $OR= 1,00$; $p^*= 0,90$). Como nas análises entre o grupo ASS e DCSA, A/G ($p= 0,117$; $OR= 1,85$; $p^*= 0,17$), G/G ($p= 0,580$; $OR=2,43$; $p^*= 0,74$), A/G + G/G ($p= 0,092$; $OR= 1,89$; $p^*= 0,13$), A/A + G/G ($p= 0,455$; $OR= 1,26$ $p^*= 0,55$). Todas as frequências genotípicas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Nas análises entre os grupos controle e ASS não ocorreu diferença significativa entre os genótipos analisados, A/G ($p= 0,834$; $OR= 0,94$; $p^*= 0,95$), G/G ($p= 1,000$; $OR=0,75$; $p^*= 0,92$), A/G + G/G ($p= 0,781$; $OR=0,92$; $p^*= 0,89$), A/A + A/G ($p= 0,927$; $OR= 0,98$; $p^*= 0,98$). Todas as frequências genotípicas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Na avaliação das frequências alélicas do SNP -336 A/G no grupo assintomático em relação aos demais observamos que (Tabela 7), o alelo G apresentou maior frequência (21,6%) no grupo DEN quando comparado ao grupo ASS, com 17,5% ($p= 0,306$, $OR= 1,30$, $p^*= 0,36$), porém não foi observada diferença estatisticamente significativa. Além disso, o alelo G teve maior frequência de 18,8% no grupo controle em relação ao ASS ($p= 0,739$, $OR= 0,92$, $p^*= 0,83$), contudo não foi observada nenhuma diferença

estatisticamente significativa. Conforme observado na Tabela 8, nas demais comparações das frequências alélicas entre os grupos ASS e DSSA ($p= 0,739$, $OR= 1,10$, $p^*= 0,85$), e ASS e DCSA ($p= 0,103$, $OR= 1,67$, $p^*= 0,14$), também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 7 – Distribuição genotípica e alélica do SNP -336 A/G (rs4804803) do gene *DC-SIGN* nos grupos assintomático (ASS), casos (DEN, DSSA e DCSA) e controle.

<i>DC-SIGN</i> -336 A/G	ASS (%)	DEN (%)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *	ASS (%)	DSSA (%)	<i>P</i>	OR (95%IC)	<i>p</i> *
Genótipos										
AA	56 (67,5)	72 (61,0)	-	-	-	56 (67,5)	49 (66,2)	-	-	-
AG	25 (30,1)	41 (34,8)	0,432	1,28 (0,69-2,34)	0,53	25 (30,1)	22 (29,7)	0,987	1,01 (0,50-2,00)	0,87
GG	2 (2,4)	5 (4,2)	0,698	1,94 (0,36-10,39)	0,69	2 (2,4)	3 (4,1)	0,666	1,71 (0,27-10,68)	0,90
AG + GG	27 (32,5)	46 (39,0)	0,348	1,32 (0,73-2,39)	0,43	27 (32,5)	25 (33,8)	0,867	1,06 (0,54-2,06)	0,99
AA + AG	81 (97,6)	113 (95,8)	0,723	1,08 (0,69-1,70)	0,81	81 (97,6)	71 (95,9)	0,994	1,00 (0,61-1,65)	0,90
Alelos										
A	137 (82,5)	185 (78,4)	-	-	-	137 (82,5)	120 (81,1)	-	-	-
G	29 (17,5)	51 (21,6)	0,306	1,30 (0,78-2,16)	0,36	29 (17,5)	28 (18,9)	0,739	1,10 (0,62-1,96)	0,85

<i>DC-SIGN</i> -336 A/G	ASS (%)	DCSA (%)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *	Controle (%)	ASS (%)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *
Genótipos										
AA	56 (67,5)	23 (52,3)	-	-	-	84 (65,6)	56 (67,5)	-	-	-
AG	25 (30,1)	19 (43,2)	0,117	1,85 (0,86-3,99)	0,17	40 (31,2)	25 (30,1)	0,834	0,94 (0,51-1,71)	0,95
GG	2 (2,4)	2 (4,5)	0,580	2,43 (0,32-18,34)	0,74	4 (3,2)	2 (2,4)	1,000	0,75 (0,13-4,23)	0,92
AG+ GG	27 (32,5)	21 (47,7)	0,092	1,89 (0,89-4,00)	0,13	44 (34,4)	27 (32,5)	0,781	0,92 (0,52-1,65)	0,89
AA+ AG	81 (97,6)	42 (95,5)	0,455	1,26 (0,68-2,33)	0,55	124 (96,8)	81 (97,6)	0,927	0,98 (0,63-1,52)	0,98
Alelos										
A	137 (82,5)	65 (73,9)	-	-	-	208 (81,2)	137 (82,5)	-	-	-
G	29 (17,5)	23 (26,1)	0,103	1,67 (0,90-3,11)	0,14	48 (18,8)	29 (17,5)	0,739	0,92 (0,55-1,52)	0,83

A = alelo selvagem; G = alelo mutante; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; Significância estatística ($p < 0.05$).

Quanto a genotipagem do polimorfismo do gene *IL-6* (-174 G/C), 117 amostras (99,2%) foram genotipadas para o grupo de casos DEN, 131 amostras (100%) foram genotipadas para o grupo controle, e 81 amostras (97,6%) foram genotipadas para o grupo ASS.

As análises das frequências genóticas do SNP -174 G/C do gene *IL-6* (Tabela 7) entre o grupo controle e DEN, mostraram que a frequência do genótipo G/C foi significativamente maior no grupo controle (41,2%) em relação ao grupo DEN, com 26,5% ($p= 0,011$, OR= 0,50, $p^*= 0,02$). Os genótipos G/C + C/C tiveram maior frequência no grupo controle (46,5%) quando comparado ao grupo DEN com 30,8% ($p= 0,010$; OR= 0,51; $p^*= 0,02$), apresentando diferença estatisticamente significativa. Estes dados apontam para um efeito protetor destes genótipos de acordo com referido valor de OR. As análises dos genótipos C/C ($p= 0,424$; OR= 0,62; $p^*= 0,62$), e G/G + G/C ($p= 0,235$; OR= 0,78; $p^*= 0,28$) não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Todas as frequências genóticas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Com relação às análises das frequências genóticas do SNP -174 G/C do gene *IL-6* (Tabela 8) entre o grupo controle e DSSA, mostraram que a frequência do genótipo G/C foi significativamente maior no grupo controle (41,2%) em relação ao grupo DSSA, com 24,7% ($p= 0,013$, OR= 0,45, $p^*= 0,02$). Os genótipos G/C + C/C também apresentaram maior frequência no grupo controle, com 46,5% em comparação ao grupo DSSA (28,8%) ($p= 0,012$; OR= 0,46; $p^*= 0,02$), com diferença estatística significativa. Sugerindo que estes genótipos estão relacionados como fator de proteção para o controle de acordo com valor de OR. As análises dos genótipos C/C ($p= 0,520$; OR= 0,58; $p^*= 0,66$), e G/G + G/C ($p= 0,245$; OR= 0,76; $p^*= 0,30$) não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Todas as frequências genóticas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Na comparação entre os grupos controle e DCSA não ocorreu diferença significativa entre os genótipos analisados, G/C ($p= 0,150$; OR= 0,58; $p^*= 0,21$), C/C ($p= 0,727$; OR= 0,69; $p^*= 0,95$), G/C + C/C ($p= 0,148$; OR= 0,59; $p^*= 0,20$), G/G + G/C ($p= 0,478$; OR= 0,82; $p^*= 0,57$). Assim como nas análises entre o grupo DSSA e DCSA, G/C ($p= 0,549$; OR= 1,29; $p^*= 0,70$), C/C ($p= 0,995$; OR= 1,19; $p^*= 0,77$), G/C + C/C ($p= 0,546$; OR= 1,28; $p^*= 0,69$), G/G + G/C ($p= 0,809$; OR= 1,08; $p^*= 0,93$).

Tabela 8 – Distribuição genotípica e alélica do SNP -174 G/C (rs1800795) do gene *IL-6* nos grupos casos (DEN, DSSA e DCSA) e controle.

<i>IL-6</i> -174 G/C	Controle (%)	DEN (%)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *	Controle (%)	DSSA (%)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *
Genótipos										
GG	70 (53,5)	81 (69,2)	-	-	-	70 (53,5)	52 (71,2)	-	-	-
GC	54 (41,2)	31 (26,5)	0,011	0,50 (0,29-,85)	0,02	54 (41,2)	18 (24,7)	0,013	0,45 (0,24-0,85)	0,02
CC	7 (5,3)	5 (4,3)	0,424	0,62 (0,19-2,03)	0,62	7 (5,3)	3 (4,1)	0,520	0,58 (0,14-2,34)	0,66
GC + CC	61 (46,5)	36 (30,8)	0,010	0,51 (0,30-0,86)	0,01	61 (46,5)	21 (28,8)	0,012	0,46 (0,25-0,85)	0,02
GG+ GC	124 (94,7)	112 (95,7)	0,235	0,78 (0,52-1,17)	0,28	124 (94,7)	70 (95,9)	0,245	0,76 (0,48-1,21)	0,30
Alelos										
G	194 (74,0)	193 (82,5)	-	-	-	194 (74,0)	122 (83,6)	-	-	-
C	68 (26,0)	41 (17,5)	0,023	0,606 (0,39-0,94)	0,03	68 (26,0)	24 (16,4)	0,027	0,56 (0,33-0,94)	0,04

<i>IL-6</i> -174 G/C	Controle (%)	DCSA (%)	<i>P</i>	OR (95%IC)	<i>p</i> *	DSSA (%)	DCSA (%)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *
Genótipos										
GG	70 (53,5)	29 (66,0)	-	-	-	52 (71,2)	29 (66,0)	-	-	-
GC	54 (41,2)	13 (29,5)	0,150	0,58 (0,28-1,22)	0,21	18 (24,7)	13 (29,5)	0,549	1,29 (0,56-3,02)	0,70
CC	7 (5,3)	2 (4,5)	0,727	0,69 (0,13-3,52)	0,95	3 (4,1)	2 (4,5)	0,995	1,19 (0,19-7,57)	0,77
GC + CC	61 (46,5)	15 (34,0)	0,148	0,59 (0,29-1,21)	0,20	21 (28,8)	15 (34,0)	0,546	1,28 (0,57-2,86)	0,69
GG + GC	124 (94,7)	42 (95,5)	0,478	0,82 (0,47-1,43)	0,57	70 (95,9)	42 (95,5)	0,809	1,08 (0,59-1,95)	0,93
Alelos										
G	194 (74,0)	71 (80,7)	-	-	-	122 (83,6)	24 (16,4)	-	-	-
C	68 (26,0)	17 (19,3)	0,209	1,71 (0,97-3,02)	0,27	71 (80,7)	17 (19,3)	0,574	1,22 (0,61-2,42)	0,70

G= alelo selvagem; C= alelo mutante; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; Significância estatística ($p < 0.05$).

As análises das frequências alélicas do polimorfismo do gene em questão revelaram que o alelo C teve frequência maior no grupo controle, com 26%, quando comparado ao grupo DEN com 17,5% ($p= 0,023$; OR= 0,606; $p^*= 0,03$), observando diferença estatisticamente significativa e que o valor de OR evidencia um fator de proteção para o controle. Conforme apresentado na mesma tabela, nas demais comparações das frequências do alelo C entre os grupos DSSA e controle, observou-se menor frequência no grupo DSSA, com 16,4% ($p= 0,027$, OR= 0,56, $p^*= 0,04$), resultado estatisticamente

significativo, o que também indica fator de proteção. As análises entre os grupos DCSA e controle ($p= 0,209$, $OR= 1,71$, $p^*= 0,27$), e DSSA e DCSA ($p= 0,574$, $OR= 1,22$, $p^*= 0,70$), não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 8).

Ao avaliar as frequências genóticas do SNP -174 G/C do gene IL-6 (Tabela 9) entre o grupo ASS e DEN, nota-se que não houve diferença estatística significativa entre os genótipos analisados, G/C ($p= 0,253$; $OR= 0,69$; $p^*= 0,33$), C/C ($p= 0,080$; $OR= 0,36$; $p^*= 0,15$), G/C + C/C ($p= 0,104$; $OR= 0,61$; $p^*= 0,14$), G/G + G/C ($p= 0,624$; $OR= 0,89$; $p^*= 0,71$). O mesmo ocorreu nas análises entre o grupo ASS e DSSA, G/C ($p= 0,200$; $OR= 0,63$; $p^*= 0,27$), C/C ($p= 0,112$; $OR= 0,34$; $p^*= 0,20$), G/C + C/C ($p= 0,087$; $OR= 0,56$; $p^*= 0,12$), G/G + G/C ($p= 0,584$; $OR= 0,87$; $p^*= 0,68$).

As comparações entre as frequências genóticas entre o grupo ASS e DCSA também demonstraram que não houve diferença significativa entre os genótipos analisados, G/C ($p= 0,611$; $OR= 0,81$; $p^*= 0,76$), C/C ($p= 0,318$; $OR= 0,40$; $p^*= 0,44$), G/C + C/C ($p= 0,388$; $OR= 0,71$; $p^*= 0,50$), G/G + G/C ($p= 0,819$; $OR= 0,93$; $p^*= 0,94$). Da mesma forma, as análises entre o grupo controle e ASS, G/C ($p= 0,274$; $OR= 0,72$; $p^*= 0,34$), C/C ($p= 0,330$; $OR= 1,70$; $p^*= 0,49$), G/C + C/C ($p= 0,513$; $OR= 0,83$; $p^*= 0,61$), G/G + G/C ($p= 0,583$; $OR= 0,88$; $p^*= 0,67$).

Quando analisadas as frequências alélicas do grupo ASS em relação aos demais (Tabela 9), observamos que o alelo C apresentou frequência maior no grupo ASS (25,9%) em relação ao grupo DEN, com 17,5% ($p= 0,043$, $OR= 0,61$, $p^*= 0,06$), e com relação ao grupo DSSA, com 16,4% ($p= 0,042$, $OR= 0,56$, $p^*= 0,06$), sendo observada diferença significativa e o referido valor de OR indicando fator de proteção para os casos assintomáticos. As demais comparações das frequências do alelo C entre os grupos ASS e DCSA ($p= 0,239$, $OR= 0,68$, $p^*= 0,31$), e entre ASS e controle ($p= 0,994$, $OR= 1,00$, $p^*= 0,91$) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 9 – Distribuição genotípica e alélica do SNP -174 G/C (rs1800795) do gene *IL-6* nos grupos assintomático (ASS), casos (DEN, DSSA e DCSA) e controle.

<i>IL-6</i> -174 G/C	ASS (%)	DEN (%)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *	ASS (%)	DSSA (%)	<i>P</i>	OR (95%IC)	<i>p</i> *
Genótipos										
GG	47 (58,0)	81 (69,2)	-	-	-	47 (58,0)	52 (71,2)	-	-	-
GC	26 (32,1)	31 (26,5)	0,253	0,69 (0,37-1,30)	0,33	26 (32,1)	18 (24,7)	0,200	0,63 (0,30-1,28)	0,27
CC	8 (9,9)	5 (4,3)	0,080	0,36 (0,11-1,17)	0,15	8 (9,9)	3 (4,1)	0,112	0,34 (0,08-1,35)	0,20
GC + CC	34 (42,0)	36 (30,8)	0,104	0,61 (0,34-1,11)	0,14	34 (42,0)	21 (28,8)	0,087	0,56 (0,28-1,09)	0,12
GG+ GC	73 (90,1)	112 (95,7)	0,624	0,89 (0,56-1,42)	0,71	73 (90,1)	70 (95,9)	0,584	0,87 (0,52-1,45)	0,68
Alelos										
G	120 (74,1)	193 (82,5)	-	-	-	120 (74,1)	122 (83,6)	-	-	-
C	42 (25,9)	41 (17,5)	0,043	0,61 (0,37-0,99)	0,06	42 (25,9)	24 (16,4)	0,042	0,56 (0,32-0,98)	0,06
Genótipos										
GG	47 (58,0)	29 (66,0)	-	-	-	70 (53,5)	47 (58,0)	-	-	-
GC	26 (32,1)	13 (29,5)	0,611	0,81 (0,36-1,82)	0,76	54 (41,2)	26 (32,1)	0,274	0,72 (0,39-1,30)	0,34
CC	8 (9,9)	2 (4,5)	0,318	0,40 (0,08-2,04)	0,44	7 (5,3)	8 (9,9)	0,330	1,70 (0,58-5,01)	0,49
GC + CC	34 (42,0)	15 (34,0)	0,388	0,71 (0,33-1,53)	0,50	61 (46,5)	34 (42,0)	0,513	0,83 (0,47-1,45)	0,61
GG + GC	73 (90,1)	42 (95,5)	0,819	0,93 (0,51-1,70)	0,94	124 (94,7)	73 (90,1)	0,583	0,88 (0,55-1,40)	0,67
Alelos										
G	120 (74,1)	71 (80,7)	-	-	-	194 (74,0)	120 (74,1)	-	-	-
C	42 (25,9)	17 (19,3)	0,239	0,68 (0,36-1,29)	0,31	68 (26,0)	42 (25,9)	0,994	1,00 (0,64-1,56)	0,91

G= alelo selvagem; C= alelo mutante; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; Significância estatística ($p < 0.05$).

No presente trabalho, também analisamos a existência de uma possível relação da presença do alelo mutante e o desenvolvimento de sintomas nas formas clínicas da dengue. Para isso, as amostras do grupo DEN foram divididas em dois subgrupos: portadores do alelo mutante e não portadores do alelo mutante do SNP em questão. As 20 principais manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes do grupo DEN foram analisadas (febre, cefaleia, artralgia, mialgia, exantema, dor retro orbitária, fraqueza/prostração, prurido, náuseas, dor abdominal, vômitos, irritação ocular, diarreia, dores nas costas, falta

de apetite, edemas, calafrios, fotofobia, manifestações hemorrágicas, tontura). Foram comparadas as frequências de cada uma para os respectivos subgrupos, através do Teste Exato de Fisher. O teste de Wilcoxon pareado também 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.

Tabela 10 – SNP -336 A/G (rs4804803) do gene *DC-SIGN* e as 20 manifestações clínicas da dengue mais presentes em pacientes do grupo DEN.

Manifestação Clínica	Frequência (n=118**) (%)	Frequências Alélicas		p*
		Portadores G (n=46) (%)	Não portadores-G (n=72) (%)	
Febre	106 (90)	43 (93)	63 (88)	0,3629
Cefaleia	98 (83)	39 (85)	59 (82)	0,8037
Artralgia	106 (90)	41 (89)	65(90)	0,9999
Mialgia	88 (75)	31 (67)	57 (79)	0,1941
Exantema	82 (69)	32 (70)	50 (69)	1,0000
Dor retro-orbitária	75 (64)	29 (63)	46 (64)	1,0000
Fraqueza/Prostração	100 (85)	38 (83)	62 (86)	0,8926
Prurido	65 (55)	26 (57)	39 (54)	0,8509
Náuseas	54 (46)	23 (50)	31 (43)	0,4472
Dor abdominal	29 (25)	13 (28)	16 (22)	0,5138
Vômitos	38 (32)	18 (39)	20 (28)	0,2285
Irritação ocular	29 (25)	13 (28)	16 (22)	0,5138
Diarreia	23 (19)	14 (30)	9 (13)	0,0303
Dores nas costas	43 (36)	14 (30)	29 (40)	0,3293
Falta de apetite	27 (23)	13 (28)	14 (19)	0,3690
Edemas	40 (34)	19 (41)	21 (29)	0,1626
Calafrios	7 (6)	4 (9)	3 (4)	0,4291
Fotofobia	15 (13)	7 (15)	8 (11)	0,5764
Manifestações hemorrágicas	11 (9)	4 (9)	7 (10)	1,0000
Tontura	6 (5)	1 (2)	5 (7)	0,4021

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

Com relação a prevalência das manifestações clínicas nos indivíduos do grupo DEN com o alelo G do SNP -336 A/G do gene *DC-SIGN*, foi observada maior ocorrência em portadores G, onde 13 delas foram mais prevalentes neste grupo quando comparado ao grupo de não portadores-G, porém sem nenhuma diferença estatisticamente significativa, exceto na manifestação clínica diarreia que foi mais frequente em portadores G, com 30%, que em não portadores G (13%), o valor de *p** foi de 0,0303 (Tabela 10). Quando aplicado o teste de Wilcoxon pareado para comparar as frequências de todos os sintomas entre os grupos, não foi observado significância estatística ($Z= 1,75$, $p= 0,08$).

Na análise da prevalência das manifestações clínicas nos indivíduos do grupo DEN com o alelo C do SNP -174 G/C (rs1800795) do gene *IL-06*, observou-se maior

ocorrência de sintomas em não portadores do alelo C, sendo 11 delas mais prevalentes neste grupo, em relação aos portadores C. Foi encontrada diferença estatística significativa na comparação da manifestação clínica Náuseas ($p^*=0,0440$), sendo esta mais frequente em não portadores C (52%), do que nos portadores C (31%). Nas demais manifestações não foi encontrada diferenças estatisticamente significativas (Tabela 11). Quando aplicado o teste de Wilcoxon pareado para comparar as frequências de todos os sintomas entre os grupos, não foi observado significância estatística ($Z= 1,35, p= 0,18$).

Tabela 11 – SNP -174 G/C (rs1800795) do gene *IL-6* e as 20 manifestações clínicas da dengue mais presentes em pacientes do grupo DEN.

Manifestação Clínica	Frequência (n=117**) (%)	Frequências Alélicas		p*
		Portadores C (n=36) (%)	Não portadores-C (n=81) (%)	
Febre	105 (90)	32 (89)	73 (90)	0,9988
Cefaleia	97 (83)	28 (78)	69 (85)	0,4249
Artralgia	105 (90)	31 (86)	74 (91)	0,5097
Mialgia	87 (74)	24 (67)	63 (78)	0,2524
Exantema	82 (70)	26 (72)	56 (69)	0,8286
Dor retro-orbitária	74 (63)	18 (50)	56 (69)	0,0618
Fraqueza/Prostração	99 (85)	31 (86)	68 (84)	0,8869
Prurido	65 (56)	20 (56)	45 (56)	1,0000
Náuseas	53 (45)	11 (31)	42 (52)	0,0440
Dor abdominal	28 (24)	9 (25)	19 (23)	1,0000
Vômitos	39 (33)	8 (22)	31 (38)	0,0956
Irritação ocular	28 (24)	10 (28)	18 (22)	0,6392
Diarreia	24 (21)	8 (22)	16 (20)	0,8061
Dores nas costas	42 (36)	10 (28)	32 (40)	0,2969
Falta de apetite	27 (23)	12 (33)	15 (19)	0,0977
Edemas	41 (35)	14 (39)	27 (33)	0,6750
Calafrios	7 (6)	4 (11)	3 (4)	0,1994
Fotofobia	15 (13)	3 (8)	12 (15)	0,3886
Manifestações hemorrágicas	10 (9)	2 (6)	8 (10)	0,5073
Tontura	6 (5)	1 (3)	5 (6)	0,6649

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

No presente estudo, a frequência do alelo G para o SNP -336 A/G do gene *DC-SIGN* na população piauiense foi de 18,8%. Resultado semelhante ao encontrado por Costa et al. (2015), que analisou a população norte piauiense também, onde a frequência do alelo G foi 20,2%. O mesmo analisou a frequência do alelo em comparação a outras regiões do Brasil, como em populações do Pará (17,4%, $p=0,358$), Espírito Santo (19,5%, $p=0,570$), e do mundo, como a Rússia (18,4%, $p= 0,428$), Irlanda (19%, $p=0,500$), Espanha (20,8%, $p=0,500$), Índia (22,3%, $p=0,431$), Austrália (16%, $p=0,290$), e obteve resultados semelhantes ao desse estudo. Resultados divergentes foram encontrados em populações

brasileiras, Pernambuco (31,4%, $p=0,052$), Mato Grosso (0%, $p<0,001$). E em outras regiões do mundo, como África do Sul (40,3%, $p=0,001$), Taiwan (3,5%, $p=0,0004$), Tailândia (9,5%, $p=0,036$).

Tabela 12 – Comparação das frequências alélicas do SNP -174 G/C (rs1800795) do gene *IL-6*, com base em estudos genômicos de associação realizados na população mundial.

Continentes e População	N (Amostras Genotipadas)	Frequência (%)		p^*	Referência
		G	C		
América					
Brasil (Piauí)	131	74,0	26,0	-	Este estudo
Brasil (Paraná)	311	70,9	29,1	0,751	MOREIRA et al., 2008
Cuba	92	72,3	27,7	0,873	PEREZ et al., 2010
Brasil (Ceará)	71	70,0	30,0	0,636	CANSANÇÃO et al., 2016
Brasil (Pará)	99	78,8	21,2	0,411	FEITOSA et al., 2016
Brasil (São Paulo)	420	73,0	27,0	1,000	PIERONI et al., 2007
Estados Unidos	611	56,0	44,0	0,008	EATON et al., 2018
Argentina	126	74,0	26,0	1,000	BESTACH et al., 2017
Europa					
Sérvia	93	68,0	32,0	0,436	ZEKOVIC et al., 2018
Eslováquia	276	55,0	45,0	0,007	JURECEKOVÁ et al., 2018
Polônia	62	61,0	39,0	0,051	WUJCICKA; WILCZYNSKI; NOWAKOWSKA, 2017
Croácia	187	60,0	40,0	0,050	BAZINA et al., 2015
Suécia	378	52,0	48,0	0,002	BENNERMO et al., 2011
Ásia					
Índia	464	77,0	23,0	0,626	HAMEED et al., 2018
Irã	361	70,5	29,5	0,636	ATTAR; MANSOORI; SHAHBAZI et al., 2017
Arábia Saudita	89	83,7	16,2	0,086	JABIR et al., 2016
China	805	76,0	24,0	0,747	MA; ZHANG; YANG., 2017
África					
Egito	99	87,4	12,6	0,031	AMR; EL-AWADY; RASLAN et al., 2016
Tunísia	164	89,0	11,0	0,006	ZIDI et al., 2016

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

Os dados desta pesquisa mostram que a frequência do alelo C do SNP -174 G/C no gene *IL-6* na população do norte do Estado do Piauí foi 26%. Ao ser analisado a frequência deste alelo em populações de outras regiões brasileiras e do mundo (Tabela 12) verificou-se semelhança nas frequências das populações brasileiras dos Estados do Paraná, Ceará, Pará e São Paulo, assim como nas populações de Cuba, Argentina, Índia, Irã e China. As frequências da população piauiense diferiram das encontradas na Arábia Saudita, e de populações dos continentes Americano, Europeu e Africano, apresentado frequências significativamente menores que as encontradas nos Estados Unidos (44%, $p^*=0,008$), Eslováquia (45%, $p^*=0,007$), Suécia (48%, $p^*=0,002$), e significativamente maiores às encontradas no Egito (12,6%, $p^*=0,031$) e Tunísia (11%, $p^*=0,006$).

6 DISCUSSÃO

Acredita-se que a patogênese da dengue seja resultado da interação de muitos fatores, como fatores relacionados ao vírus, ao ambiente e ao hospedeiro. Dentre os relacionados ao hospedeiro, diversos estudos associam as respostas imunológicas nas manifestações graves da dengue, abrangendo células, citocinas, complementos, como também alterações nos genes que codificam estas células. Com relação a fatores genéticos do hospedeiro, os polimorfismos de nucleotídeo têm sido alvo de pesquisas que avaliam sua possível influência na manifestação clínica de diversas doenças (COFFEY et al., 2009; JOHN; LIN; PERNG et al., 2015; DANG et al., 2016; ALAGARASU et al., 2015; PANDEY et al., 2015; SANTOS et al., 2017; SEHRAWAT et al., 2018).

O receptor de células dendríticas DC-SIGN, é uma proteína envolvida em muitos processos imunológicos sendo responsável pelo reconhecimento e interação de inúmeros patógenos como, bactérias, vírus e parasitas, com as células dendríticas. Estudos associam os SNPs no gene *DC-SIGN*, dentre eles o -336 G/A, e sua relação com proteção ou susceptibilidade às formas graves de doenças humanas, como a dengue, porém os resultados são divergentes (LI et al., 2017; PABALAN et al., 2018).

No presente estudo, foram realizadas as análises das frequências alélicas e genotípicas do SNP -336 A/G (rs4804803) do gene *DC-SIGN* em uma população do norte do estado do Piauí. As amostras analisadas pertenciam ao grupo de casos positivos para infecção por dengue (DEN), casos que tiveram infecção assintomática (ASS) e em grupo controle.

No polimorfismo -336 A/G (rs4804803) as comparações entre o grupo controle e os grupos de casos, e entre o grupo DSSA e DCSA, como também as comparações entre o grupo ASS com os grupos de casos e controle, não obtiveram resultados estatisticamente significativos entre portadores do alelo mutante (G) e dos genótipos mutantes (A/G e G/G) do SNP em questão e ocorrência dos casos de dengue. Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por Alagarasu e colaboradores (2013), em seu estudo realizado na Índia, por Silva e colaboradores (2010) e por Oliveira e colaboradores (2014), em trabalhos desenvolvidos no Brasil nos estados da Bahia e Pará, respectivamente, onde também não houve resultado com significância estatística para a associação do polimorfismo e os casos dengue, quando comparados com grupo controle.

A pesquisa feita por Wang et al. (2011), em uma população do Taiwan, revelou resultados diferentes aos encontrados neste estudo. Nela houve uma forte associação do alelo G e o risco de FHD, onde a frequência do alelo G foi significativamente maior em pacientes com FHD do que em pacientes com outras doenças febris e grupo controle (OR=4.84 e 3.57, $p=2 \times 10^{-5}$ e 0.001). O SNP em questão colaborou para a suscetibilidade à infecção por dengue, além da complicação da dengue hemorrágica. No trabalho realizado por Sakuntabhai e colaboradores (2005), na Tailândia, o alelo G foi associado a proteção contra a febre da dengue (OR= 4.90; $P= 2 \times 10^{-6}$), mas não contra a dengue hemorrágica, sendo que os genótipos GG e GA aumentaram o risco de desenvolvimento da dengue hemorrágica em pacientes com dengue.

Por outro lado, no estudo desenvolvido por Xavier-Carvalho et al. (2013), foi observado que o genótipo GG estava associado à proteção contra a dengue grave (OR = 0,12 e $p = 0,04$), em uma população brasileira. Resultado divergente do encontrado por Noecker e colaboradores (2014), em pesquisa realizada no México, onde os resultados apontaram que os genótipos GG ou GA estavam associados à casos de dengue sem complicações, quando comparados com dengue assintomática (OR= 2,4, $p = 0,076$). Por sua vez, Dettogni e colaboradores (2015), encontraram em seu trabalho tendência a uma associação entre o alelo A e não persistência de sintomas em pacientes com dengue, 60 dias após o início dos sintomas, em estudo feito no Brasil.

O mecanismo pelo qual o receptor DC-SIGN influencia na patogênese da dengue ainda não é totalmente conhecido, estudos relatam que este medeia a entrada do DENV para posterior infecção. Sabe-se que as células dendríticas são fundamentais na replicação do DENV, levando a infecção a atingir o sangue, fígado, baço e rim, e possivelmente ocorrendo uma segunda replicação em monócitos, macrófagos e células endoteliais. Acredita-se que a expressão do DC-SIGN seja regulada devido a uma associação do alelo G com os sítios de ligação do fator de transcrição. Vários estudos mostram que portadores deste alelo apresentam menor expressão do receptor na superfície de células dendríticas, o que leva a diminuição da ligação do vírus as mesmas, influenciando no processo de replicação viral (COFFEY et al., 2009; SHUEB et al., 2016; PABALAN et al., 2018).

Um dos SNPs no gene da *IL-6* também foi analisado nesse estudo. *IL-6* é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por células mononucleares, como

macrófagos, células B e T. Há evidências de que SNP -174 (G/C) do gene em questão pode alterar os níveis de citocinas, influenciando nas respostas inflamatórias, por atuar na transcrição gênica. E que a alta produção de IL-6 reflete no desenvolvimento de inúmeras doenças inflamatórias e autoimunes (RIBEIRO; VISENTAINER; MOLITERNO, 2007; IMANI, et al., 2017; KATKAM et al., 2017; YANG et al., 2017).

Dessa forma, também foram realizadas as análises das frequências alélicas e genóticas do SNP -174 G/C (rs1800795) do gene *IL-6*, em uma população do norte do estado do Piauí. Assim como para o gene *DC-SIGN*, as amostras analisadas pertenciam ao grupo de casos positivos para infecção por dengue (DEN), casos que tiveram infecção assintomática (ASS) e em grupo controle.

Na análise das frequências genóticas entre grupo controle e DEN, foi encontrado resultados estatisticamente significantes entre o genótipo G/G *versus* G/C ($p=0,011$, OR=0,50 e $p^*=0,02$), G/C+C/C *versus* G/G ($p=0,010$, OR=0,51 e $p^*=0,015$). Com relação ao grupo controle e DSSA, também foi observada diferença estatística significativa entre genótipo G/G *versus* G/C ($p= 0,013$, OR=0,45, $p^*=0,02$) e entre G/C + C/C *versus* G/G ($p= 0,012$, OR=0,46, $p^*=0,02$). Estes dados sugerem proteção dos genótipos mutantes GC e CC mais prevalentes significativamente no grupo controle. Resultado esse semelhante ao encontrado por Moreira e colaboradores (2008), onde o genótipo GC foi relacionado como marcador de resistência, ou seja, proteção para febre da dengue ($P = 0.015$; OR = 0.62), em indivíduos do estado do Paraná, Brasil.

Na análise da frequência alélica, houveram resultados estatisticamente significativos entre o grupo controle e DEN ($p=0,023$, OR=0,606 e $p^*=0,03$), entre o grupo controle e DSSA ($p=0,27$, OR=0,56 e $p^*=0,04$). Demonstrando que, nessa população estudada, o alelo C pode ser associado com proteção contra a doença. Entre o grupo ASS e DEN ($p=0,043$, OR=0,61 e $p^*=0,06$), e entre o grupo ASS e DSSA ($p=0,043$, OR=0,56 e $p^*=0,06$). Nesses resultados sugere-se que o alelo C também pode exercer papel protetor em relação ao desenvolvimento de manifestações clínicas.

Os dados da literatura para o SNP nesse gene são diversos, como por exemplo, no trabalho desenvolvido no Brasil, por Cansanção et al. (2016), em que observou uma relação entre os genótipos G/C e C/C, associado ao alelo A do SNP no gene *TNF- α* ao risco à infecção por dengue. Em outro estudo também realizado no Brasil por Dettogni e

colaboradores (2015), foi demonstrado uma associação entre SNPs *FcyRIIIa*, *TNF- α* e *IL-6* e persistência de sintomas 60 dias após o início da doença.

Por outro lado, nos resultados obtidos por Fernandez-Mestre et al. (2004), em uma população da Venezuela, não foi encontrado associação entre o SNP e a susceptibilidade para a dengue. Assim como na pesquisa feita por Perez e colaboradores (2010), onde a distribuição genotípica e alélica não apresentaram diferenças significativas entre o grupo controle e FHD, em estudo realizado em Cuba.

Os polimorfismos nos genes de citocinas podem influenciar diretamente na transcrição gênica, e como resultado a alterar a produção de citocinas, modulando a resposta imune (REYNARD; TURNER; NAVARRETE, 2000; POLI et al., 2002; CHAN et al., 2008). Pesquisas indicam que o polimorfismo -174 G/C no gene *IL-6* está relacionado com suscetibilidade a quadros agudos e crônicos nas doenças inflamatórias. Onde, estudos mostram que o alelo G é um forte ativador de transcrição, relacionado com aumento do risco de doenças inflamatórias. Por sua vez, o alelo C tem sido relacionado com função protetora, por meio diminuição da produção da *IL-6*. Porém os dados da literatura para essa relação são controversos. (ENDLER et al., 2004; PIERONI et al., 2007; ASSARI et al., 2016; IMANI et al., 2017; TETZLAFF et al., 2018).

Conforme os resultados deste estudo, percebe-se a prevalência dos genótipos mutantes no grupo controle, assim como no grupo assintomático. Evidenciando o efeito protetor do alelo C em relação a doença e ao desenvolvimento de sintomas clínicos desta, pois conseqüentemente a presença do alelo C pode reduzir a produção da *IL-6*, que por ser uma citocina pró-inflamatória leva à uma diminuição da resposta inflamatória. Dessa forma, este mecanismo poderia acarretar proteção para indivíduos do grupo controle, como também ser responsável pela manifestação da dengue na forma assintomática.

No entanto, Zekovic et al. (2018), demonstrou, em seu estudo feito na Sérvia, que a expressão gênica de *IL-6* foi significativamente aumentada em pacientes com esclerose sistêmica em comparação com controles saudáveis, onde pacientes com genótipo C/C tiveram maior expressão da *IL-6* em comparação ao genótipo G/C e G/G. E que portadores do alelo C tiveram também expressão significativamente maior de *IL-6* quando comparados com não portadores C. Concordando com Wujcicka et al. (2018), na pesquisa realizada com mulheres grávidas polonesas infectadas pelo *Toxoplasma gondii*, em que

possivelmente o alelo C no SNP no gene da IL-6 estava relacionado com níveis elevados dessa citocina, juntamente com o alelo A no SNP da IL-10, associado com níveis diminuídos da mesma.

No que diz respeito as análises dos sintomas, percebeu-se que para o SNP -336 A/G do gene *DC-SIGN*, 13 manifestações clínicas foram mais prevalentes em portadores G, sendo que a manifestação Diarreia obteve resultado estatisticamente significativo, demonstrando que este alelo pode ser relacionado como fator de risco para o desenvolvimento deste sintoma. No entanto, Oliveira et al. (2014), observou que dos 16 sintomas analisados em sua pesquisa, 11 deles foram mais prevalentes em não portadores G.

Para o SNP -174 G/C do gene *IL-06*, observou-se maior ocorrência de sintomas em não portadores do alelo C, onde 11 deles foram mais frequentes nesse grupo, com diferença estatística significativa para a manifestação Náuseas, corroborando com a hipótese do efeito protetor do alelo C. No trabalho desenvolvido por Dettogni et al. (2015) verificou-se associação entre o alelo C e persistência de sintomas dermatológicos em 30 dias após o início dos sintomas. Estes dados do presente estudo também reforça o efeito protetor do alelo mutante para o grupo assintomático, indicando a correlação deste com não manifestação de formas clínicas. É importante destacar que não existem dados na literatura sobre análises com casos assintomáticos, sendo este o primeiro estudo a fazer tais comparações com esse grupo.

Tendo a vista a complexidade de fatores que envolvem a patogênese da dengue e de outras doenças inflamatórias, percebe-se a diversidade de resultados encontrados em estudos feitos em diferentes regiões do mundo. Como pode ser observado na frequência do alelo mutante para os dos SNPs avaliados neste estudo e sua distribuição mundial. Provavelmente, deve-se ao fato dos fatores genéticos e individuais de cada hospedeiro, além dos efeitos das respostas imunes, que ainda não estão completamente esclarecidos. É importante lembrar que mais de um polimorfismo pode atuar na expressão de genes de citocinas ou de células dendríticas, levando a diferenças nos padrões de respostas imunológicas. Outro fator que também pode explicar a heterogeneidade de resultados são etnias das populações, o que pode influenciar na patogenia de doenças como a dengue. Por último, vale salientar a influência de fatores como o sorotipo do vírus e a carga viral.

(FERNANDEZ-MESTRE et al., 2004; MOREIRA et al., 2008; PEREZ et al., 2010; EL-TAHAN; GHONEUM; EL-MASHAD, 2016)

Conforme o que foi exposto, percebe-se o importante papel que os SNPs desempenham na patogenia da dengue, estando relacionados com risco ou proteção para dengue. Para a IL-6 os dados desta pesquisa apontam proteção para o grupo controle e para o não desenvolvimento de sintomas para os casos assintomáticos. Tendo em vista que existem poucos dados na literatura sobre essa relação, o presente estudo mostra-se fundamental para o entendimento no que diz respeito a influência desse polimorfismo sobre o curso da dengue e suas consequências.

7 CONCLUSÃO

Diante do que foi exposto, pode-se concluir para o presente estudo que:

- As amostras de 119 pacientes foram positivas para a infecção pelo DENV. Sendo que 74 delas foram classificadas como DSSA e 45 foram classificadas como DCSA.
- As análises das frequências alélicas e genotípicas para o SNP -336 A/G (rs4804803) no gene *DC-SIGN* não mostraram resultados com diferenças estatisticamente significativas.
- As análises das frequências genotípicas para o SNP -174 G/C (rs1800795) no gene *IL-6* demonstraram que a frequência do genótipo GC foi estatisticamente maior no grupo controle (41,2%) do que no grupo DEN, com 26,5%. Também observamos diferença significativa na relação entre grupo controle (41,2%) e grupo Dengue sem sinais de alarme (DSSA), com 24,7%. Os genótipos G/C + C/C tiveram significativamente maior frequência no grupo controle (46,5%) quando comparado ao grupo DEN com 30,8%. Também apresentaram maior frequência no grupo controle, com 46,5%, em relação ao grupo DSSA (28,8%).
- As análises das frequências alélicas para o SNP -174 G/C (rs1800795) no gene *IL-6* revelaram que o alelo C teve frequência significativamente maior no grupo controle (26%), quando comparado ao grupo DEN com 17,5% e ao grupo DSSA, com 16,4%. O alelo C também apresentou frequência significativamente maior no grupo ASS (25,9%) em relação ao grupo DEN, e em relação ao grupo DSSA, com 16,4%.
- Com relação a prevalência das manifestações clínicas para SNP -336 A/G (rs4804803) no gene *DC-SIGN*, observou-se que estas foram mais prevalentes em portadores G, em relação aos não portadores-G, porém sem nenhuma diferença estatisticamente significativa. Com exceção apenas na manifestação clínica Diarreia mais frequente nos portadores do alelo G com diferença estatisticamente significativa.
- As análises da prevalência das manifestações clínicas para SNP -174 G/C (rs1800795) no gene *IL-6*, mostraram que estas foram mais prevalentes em não portadores C, em relação aos portadores-C, porém sem nenhuma diferença

estatisticamente significativa. Somente manifestação clínica Náuseas mais frequente em não portadores C foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

- A frequência do alelo G para o SNP -336 A/G do gene *DC-SIGN* na população piauiense foi de 18,8%. E do alelo C do SNP -174 G/C no gene *IL-6* foi 26%.

Dessa forma, nossos dados sugerem que o genótipo G/C e o alelo C do SNP -174 G/C no gene *IL-6* estão relacionados com proteção para os casos de dengue na população estudada. Estes dados contribuem para um melhor entendimento da patogênese do *Dengue virus* e de fatores genéticos relacionados ao hospedeiro com a doença. Podendo assim, trazer benefícios para a população em geral, auxiliando na identificação de grupos de risco e para o paciente, no que diz respeito ao manejo clínico e a possibilidade de um tratamento específico. Futuramente novos estudos podem ser realizados, avaliando outras variantes do no gene da *IL-6*, para que estas sejam analisadas em conjunto, tendo em vista que a patogenia da dengue é complexa e pode ser influenciada por mais de um polimorfismo de um único gene.

REFERÊNCIAS

- ABE, A.H.M.; MARQUES, S.M.; COSTA, P.S.S. Dengue em crianças: da notificação ao óbito. **Revista Paulista de Pediatria**, v.30, n.2, p.263-271, 2012.
- ABREU, R. L. **Mapa de localização do município de Parnaíba, Piauí, Brasil**. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Parnaíba>>. Acesso em: 10/06/17.
- ALAGARASU, K.; et al. Association of combinations of interleukin-10 and pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms with dengue hemorrhagic fever. **Cytokine**, v. 74, n.1, p.130-136, 2015.
- ALAGARASU, K.; et al. Association of promoter region polymorphisms of CD209 gene with clinical outcomes of dengue virus infection in Western India. **Infection, Genetics And Evolution**, v. 17, p.239-242, 2013.
- ALAGARASU, K.; R. S. MEMANE, R.S.; SHAH, P.S. Polymorphisms in the retinoic acid-1 like-receptor family of genes and their association with clinical outcome of dengue virus infection. **Archives of Virology**, v.160, n.6, p.1555-1560, 2015.
- ALEN, M.M.F.; DALLMEIER, K.; BALZARINI, J.; SCHOLS, D. Crucial role of the N-glycans on the viral E-envelope glycoprotein in DC-SIGN-mediated dengue virus infection. **Antiviral Research**, v. 96, n.3, p. 280–287, 2012.
- AMR, K.; EL-AWADY, R.; RASLAN, H. Assessment of the –174G/C (rs1800795) and –572G/C (rs1800796) Interleukin 6 Gene Polymorphisms in Egyptian Patients with Rheumatoid Arthritis. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v.4, n.4, p.574-577, 2016.
- ANDRADE, G.C.; et al. Arboviruses and the eye. **International Journal of Retina and Vitreous**, v.3, n.4, p.1-7, 2017.
- ANTOLINE, J.; et al. Dengue – Atualização Epidemiológica e Abordagem Homeopática Preventiva e Curativa. **Revista Homeopatia Brasileira**, v.8, n.2, p.70-80, 2002.
- ANVISA, **Dengvaxia**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=21821872016&pIdAnexo=3813889>. Acesso em: 10/11/17.
- ARAÚJO, T.P.; et al. Diagnóstico sorológico de infecções por dengue e febre amarela em casos suspeitos no estado do Pará, Brasil, 1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p. 579-584, 2002.
- ARAÚJO, V. E. M.; et al. Aumento da carga de dengue no Brasil e unidades federadas, 2000 e 2015: análise do Global Burden of Disease Study 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, n. 1, p.205-216, 2017.
- ARYATI, A.; et. Performance of commercial dengue NS1 ELISA and molecular analysis of NS1 gene of dengue viruses obtained during surveillance in Indonesia. **BMC Infectious Diseases**, v.13, n. 1, p.2-11, 2013.

- ASSARI, R.; et al. Pro-inflammatory cytokine single nucleotide polymorphisms in Kawasaki disease. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v.21, n.5, p.1120-1126, 2016.
- ATTAR, M.; MANSOORI, M.; SHAHBAZI, M. Interleukin-6 Genetic Variation and Susceptibility to Gastric Cancer in an Iranian Population. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.18, n.11, p.3025-3029, 2018.
- BANDYOPADHYAY, S., LUM, L.C.S., AND 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, 1238-1255, 2006.
- BARKHASH, A.V.; et al. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the CD209 gene is associated with human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis. **Antiviral Research**, v.93, n.1, p.64–68, 2012.
- BARKHASH, A.V.; et al. Polymorphism of CD209 and TLR3 Genes in Populations of North Eurasia. **Russian Journal of Genetics**, v.52, n. 6, p.608–614, 2016.
- BARRETO, A.A.N.; COMETTI, R.R. Sensoriamento remoto como ferramenta auxiliar no combate à ocorrência de dengue na cidade de Vitória-ES. **Anais do XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Florianópolis, Brasil, 21-26 abril 2007, INPE, p. 3733-3738.
- BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v.22, n.64, p. 53-72, 2008.
- BARTENSCLAGER, R.; MILLER, S. Molecular aspects of Dengue virus replication. **Future Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 155-165, 2008.
- BATISTA, P. M.; et al. Seroepidemiological monitoring in sentinela animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p.168-173, 2012.
- BAZINA, A.; et al. PPAR γ and IL-6 -174G>C gene variants in Croatian patients with ischemic stroke. **Gene**, v. 560, n. 2, p.200-204, abr. 2015.
- BELTRAME, L.M.; et al. Influence of KIR genes and their HLA ligands in susceptibility to dengue in a population from southern Brazil. **Tissue Antigens**, v.82, n.6, p.397-404, 2013.
- BENNERMO, M.; et al. Genetic and Environmental Influences on the Plasma Interleukin-6 Concentration in Patients with a Recent Myocardial Infarction: A Case–Control Study. **Journal Of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 2, p.259-264, 2011.
- BESERRA, E.B.; et al. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 99, n.3, p.281-285, 2009.
- BESTACH, Y.; et al. Influence of TNF and IL6 gene polymorphisms on the severity of cytopenias in Argentine patients with myelodysplastic syndromes. **Annals Of Hematology**, v. 96, n. 8, p.1287-1295, 2017.

- BI, Y.; et al. Backbone ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of dengue virus NS2B–NS3p in complex with aprotinin. **Biomol NMR Assign**, v. 7, p.137–139, 2013.
- BRAGA, I.A.; VALLE, D. Aedes aegypti: histórico do controle no Brasil*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007a.
- BRAGA, I.A.; VALLE, D. Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16, n.4, p.279-293, 2007b.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 23 de 2018. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n.31, 2018.
- 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, 2005.
- CALABRESE, L. H.; ROSE-JOHN, S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 12, p.720-727, 2014.
- CAMARA, 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, 2007.
- CAMARA, T.N.L. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n.36, 2016.
- CAMPOS, D. L.; et al. Uma abordagem sobre a inter-relação de citocinas na artrite reumatóide. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v.7, n.1, p. 93-102, 2016.
- CANSANÇÃO, I. F.; et al. Association of genetic polymorphisms of IL1 β -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**, v. 65, n. 11, p.925-932, 2016.
- CANSANÇÃO, I.F.; et al. Association of Polymorphisms in IL1b -511C>T, IL1RN 86 bp VNTR, and IL6 -174G>C Genes with Clinical Dengue Signs and Symptoms in Brazilian Dengue Patients. **Viral Immunology**, v.29, n.6, 2016.
- CARABALI, M.; et al. Why are people with dengue dying? A scoping review of determinants for dengue mortality. **BMC Infectious Diseases**, v.15, n.301, p.1-14, 2015.
- CARVALHO, A.C.P.; et al. Epidemiologia do vírus do dengue em São Luís, Maranhão, no período de 2002 a 2012. **Revista de Patologia Tropical**, v.45, n.3, p. 243-255, 2016.
- CARVALHO, F.D.; MOREIRA, L.A; Why is Aedes aegypti Linnaeus so Successful as a Species? **Neotropical Entomology**, v.46, n.3, p.243-255, 2017.
- CASSEB, A.R.; et al. Arbovírus: importante zoonose na Amazônia brasileira. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, n.3, p. 391-403, 2013.
- CASTANHA, P.M.S; et al. Placental Transfer of Dengue Virus (DENV)–Specific Antibodies and Kinetics of DENV Infection–Enhancing Activity in Brazilian Infants. **The Journal of Infectious Diseases**, v.214, n.2, p.265-72, 2016.

CASTRO JR, F.P.; et al. Ciclos de vida comparados de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) do semiárido da Paraíba. **Iheringia, Série Zoológica**, v.103, n.2, p.118-123, 2013.

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

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

CHAATHANYA, 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. 1–7, 2015.

CHAN, H.L.Y.; et al. Association of cytokine gene polymorphisms and liver fibrosis in chronic hepatitis B. **Journal Of Gastroenterology And Hepatology**, v. 23, n. 5, p.783-789, 2008.

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

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.

CHAREONSIRISUTHIGUL, T.; KALAYANAROOJ, S.; UBOL, S.; Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. **Journal of General Virology**, v.88, n. 2, p.365–375, 2007.

CHATCHEN, S.; SABCHAREON, A.; SIRIVICHAYAKUL, C. Serodiagnosis of asymptomatic dengue infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.10, n.1, p. 11–14, 2017.

CHEN, L.C.; et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n.1, p. 142–147, 2006.

CHURIO, Y.T.B.; et al. Determinants of felt demand for dengue vaccines in the North Caribbean region of Colombia. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.16, n.38, p.1-10, 2017.

CLARO, L.B.L.; TOMASSINI, H.C.B.; ROSA, M.L.G. Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, n.6, p.1447-1457, 2004.

COELHO, G.E. Dengue: desafios atuais. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.17, n.3, p.231-233, 2008.

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

CONDE, J.N.; et al. The Complement System in Flavivirus Infections. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n. 213, p.1-7, 2017.

- CONTI, B.J.; SANTIAGO, K.S.; SFORCIN, J.M. Células dendríticas: mini-revisão. **Biosaúde**, v. 16, n. 1, p.28-33, 2014.
- CORDEIRO, M.T. Laboratory diagnosis for dengue. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.54, p.10-12, 2012.
- CORREA, P.R.L.; FRANÇA, E.; BOGUTCHI, T.F. Infestação pelo *Aedes aegypti* e ocorrência da dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista de Saúde Pública**, v.39, n.1, p.33-40, 2005.
- COSTA, C.A.; SANTOS, I.G.C.; BARBOSA, M.G. Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.6, p.677-68, 2009.
- COSTA, C.F.; et al. Transovarial transmission of DENV in *Aedes aegypti* in the Amazon basin: a local model of xenomonitoring. **Parasites & Vectors**, v.10, n.249, p.1-9, 2017.
- COSTA, I. M. P.; CALADO, D.C. Incidência dos casos de dengue (2007-2013) e distribuição sazonal de culicídeos (2012-2013) em Barreiras, Bahia*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 4, p.735-744, out. 2016.
- 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.
- CRUZ, N.L.N.; et al. Epidemiologia da dengue e sua relação com a variabilidade climatológica no município de Igarassu, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v.11, n. 21, p. 107-115, 2015.
- DANG, T.N.; et al. Association of BAK1 single nucleotide polymorphism with a risk for dengue. **BMC Medical Genetics**, v. 17, n. 43, p. 1-5, 2016.
- DASH, A.P.; BHATIA, R.; SUNYOTO, T.; MOURYA, D.T. Emerging and re-emerging arboviral diseases in Southeast Asia. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 50, n. 2, p. 77–84, 2013.
- DEEN, J.L.D.; et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. **Lancet**, v. 368, n. 9530, p.170-173, 2006.
- DENMAN, A.J.L.; MACKENZIE, J.M. The Importance of the Nucleus during Flavivirus Replication. **Viruses**, v. 9, n.14, P.1-11, 2017.
- 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**, v.43, n.2, p. 143-52, 2010.
- DWIVEDI, V.D.; et al. Genomics, proteomics and evolution of dengue virus. **Briefings in Functional Genomics**, v.16, n.4, p.217-227, 2017.
- EATON, K. D.; et al. Inflammatory Gene Polymorphisms in Lung Cancer Susceptibility. **Journal Of Thoracic Oncology**, v. 13, n. 5, p.649-659, 2018.

- ENDLER, G.; et al. The Interleukin-6 G(-174)C Promoter Polymorphism Does Not Determine Plasma Interleukin-6 Concentrations in Experimental Endotoxemia in Humans. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 1, p.195-200, 2004.
- 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.
- FANG, X.; et al. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.66, n.2, p.134-146, 2012.
- FARES, R. C. G.; et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-14, 2015.
- FEITOSA, R.N.M.; et al. Gene Polymorphisms and Serum Levels of Pro- and Anti-Inflammatory Markers in Dengue Viral Infections. **Viral Immunology**, v.29, n.7, p. 379-388, 2016.
- FERNANDEZ-MESTRE, M.T.; et al. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 4, p.469-472, 2004.
- FERNANDO, A.N.; et al. Polymorphisms of Transporter Associated with Antigen Presentation, Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 and their Implications for Protection and Susceptibility to Severe Forms of Dengue Fever in Patients in Sri Lanka. **Journal of Global Infectious Diseases**, v.7, n.4, p.157-64, 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. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. **Medicina**, v.32, n.1, p.15-20, 1999.
- FLAUZINO, R.F.; SOUZA-SANTOS, R.; OLIVEIRA, R.M. Dengue, geoprocessamento e indicadores socioeconômicos e ambientais: um estudo de revisão. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.25, n.5, p.456-61, 2009.
- FLEURY, A.; et al. No association of IL2, IL4, IL6, TNF, and IFNG gene polymorphisms was found with *Taenia solium* human infection or neurocysticercosis severity in a family-based study. **Human Immunology**, v. 79, n. 7, p.578-582, 2018.
- FOGAÇA, T.K.; MENDONÇA, F.A. Dengue nas Américas: distribuição espacial e circulação viral (1995-2014). **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v.13, n. 24, p. 175 – 188, 2017.
- FONTES, J. A.; ROSE, N. R.; ČIHÁKOVÁ, D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p.62-68, 2015.
- FRANCESCHI, D.A.S.; et al. Otimização de metodologia PCR-SSP para identificação de polimorfismos genéticos de TNF e IL2. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.4, p. 241-246, 2009.

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, G.; et al. Assymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the FCyRIIIa polymorphism. **The American journal of tropical medicine ad hygiene**, v.82, n,6, p.1153-1156, 2010.

GARCÍA, G.; et al. Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n.1, p.38–43, 2011.

GARCÍA, L.L.; PADILHA, L.; CASTAÑO, J. Inhibitors compounds of the flavivirus replication process. **Virology Journal**, v.14, n.1, p.1-12, 2017.

GIRY, C.; et al. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan® assay. **BMC Microbiology**, v.17, n.105, p. 1-10, 2017.

GOMES, T.N. **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.** 2017. 126f. Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2017.

GONÇALVES, R.P.; et al. Contribuições recentes sobre conhecimentos, atitudes e práticas da população brasileira acerca da dengue. **Saúde e Sociedade**, v.24, n.2, p.578-593, 2015.

GOPAL, S.S.S.; et al. Increased serum levels of macrophage activation marker sCD163 in Dengue patients. **Journal of Clinical Virology**, v.86, p.62–67, 2017.

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, 1995.

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

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

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

GUZMAN, M.G.; et al. Dengue infection. **Nature Reviews**, v.2, p.1-25, 2016.

HALSTEAD, S. B. et al. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. **Reviews in Infectious Diseases**, v.11, n. 4, p.830-839, 1989.

HALSTEAD, S.B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Advances in Virus Research**, v.60, p.421–467, 2003.

HAMEED, I.; et al. Genetic variations in key inflammatory cytokines exacerbates the risk of diabetic nephropathy by influencing the gene expression. **Gene**, v. 661, p.51-59, 2018

HASAN, S.; et al. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v.6, n. 1, p. 1-6, 2016.

- HO, L.J.; et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1499-1506, 2001.
- HODGE, D. R.; HURT, E.M.; FARRAR, W. L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. **European Journal Of Cancer**, v. 41, n. 16, p.2502-2512, 2005.
- HONÓRIO, N.A.; et al. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos Saúde Pública**, v. 31, n.5, p.906-908, 2015.
- HUANG, Y.J.S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAN, D.L. Biological Control Strategies for Mosquito Vectors of Arboviruses. **Insects**, v. 8, n.1, p. 1-25, 2017.
- HUITS, R.; et al. Clinical Utility of the Nonstructural 1 Antigen Rapid Diagnostic Test in the Management of Dengue in Returning Travelers With Fever. **Open Forum Infectious Diseases**, v.4, n.1, 2017.
- IMANI, D.; et al. Association Between IL6-174 G/C Polymorphism and Graves' Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Acta Medica Iranica**, v. 55, n. 11, p. 665-671, 2017.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Parnaíba – população estimada 2017**. Disponível em:<<http://www.cidades.ibge.gov.br/v4/brasil/pi/parnaiba/panorama>>. Acesso em: 01/06/2017.
- ISHIKAWA, T; YAMANAKA, A; KONISHI, E. A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. **Vaccine**, v. 32, n. 12, p. 1326-37, 2014.
- JABIR, N.R.; et al. Assessment of genetic diversity in IL-6 and RANTES promoters and their level in Saudi coronary artery disease patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v.31, n.5, p. 1-8, 2016.
- JOHN, D.V.; LIN, Y.S.; PERNG, G.C. Biomarkers of severe dengue disease - a review. **Journal of Biomedical Science**, v.22, n.83, p.2-7, 2015.
- JUREČEKOVÁ, J.; et al. The Role of Interleukin-6 Polymorphism (rs1800795) in Prostate Cancer Development and Progression. **Anticancer Research**, v. 38, n. 6, p.3663-3667, 2018.
- KAO, C.L.; KING, C.C.; CHAO, D.Y.; WU, H.L.; CHANG, G.J.J. 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, 2005.
- KATKAM, S. K.; et al. Association of IL-6 -174 G>C polymorphism with the risk of SLE among south Indians: evidence from case–control study and meta-analysis. **Lupus**, v. 26, n. 14, p.1491-1501, 2017.
- KATZELNICK, L.; et al. Neutralizing antibody titers against dengue virus correlate with protection from symptomatic infection in a longitudinal cohort. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.113, n.3, p. 728–733, 2016.
- KHOO, U.S.; CHAN, K.Y.K.; CHAN, V.S.F. DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNs for infection. **Journal of Molecular Medicine**, v.86, n. 8, p.861–874, 2008.

- KIM, S. K.; CHUNG, J.H; KWON, O. Y. Promoter Polymorphism (-174, G/C) of Interleukin-6 and Arterial Thromboembolic Events: A Meta-Analysis. **Medical Science Monitor**, v. 22, p.4345-4353, 2016.
- KIM, S.Y.; LI, B.; LINHARDT, R.J. Pathogenesis and Inhibition of Flaviviruses from a Carbohydrate Perspective. **Pharmaceuticals**, v.10, n.2, p.1-24, 2017.
- KLENERMAN, P.; ZINKERNAGEL, R.M. Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. **Nature**, v.394, n.6692, p.482-485, 1998.
- LAI, J.H.; LIN, Y.L.; HSIEH, S.L. Pharmacological intervention for dengue virus infection. **Biochemical Pharmacology**, 2017.
- LAN, N.T.P.; HIRAYAMA K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. **Tropical Medicine and Health**, v. 39 , n. 4, p.73-81, 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.545-551,1992.
- LEE, Y.H.; LEONG, W.Y.; SMITH, A.W. Markers of dengue severity: a systematic review of cytokines and chemokines. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 12, p. 3103–3119, 2016.
- LEVY, A.; et al. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 104, n. 1, p.16-23, 2010.
- LI, S.; et al. Association of Single-Nucleotide Polymorphisms in DC-SIGN with Nasopharyngeal Carcinoma Susceptibility. **Disease Markers**, v. 2017, p.1-6, 2017.
- LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E.A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes and Infections**, v.4, n.3, n.1-5, 2015.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23-61, 2003.
- 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.
- LIU, P.; et al. Beyond attachment: Roles of DC-SIGN in dengue virus Infection. **Traffic**, v.18, n.4, p. 218–231, 2017.
- LO, Y.L.; et al. Dengue Virus Infection Is through a Cooperative Interaction between a Mannose Receptor and CLEC5A on Macrophage as a Multivalent Hetero-Complex. **Plos One**, v.11, n.11, p.1-13, 2016.
- LOBO, M.R.L.; et al. Citocinas na dengue: inovações do sistema imune. **Scientia Amazonia**, v. 3, n.1, p. 25-40, 2014.
- LOEB, M. Genetic Susceptibility to West Nile Virus and Dengue. **Public Health Genomics**, v.16, p.4–8, 2013.

- LOPES, N.; NAZAWUA, 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.
- LUPI, O.; CARNEIRO, C.G.; COELHO, I.C.B. Manifestações mucocutâneas da dengue. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, n.4, p. 291-305, 2007.
- MA, J.; et al. Association between TNF, IL1B, IL6, IL10 and IFNG polymorphisms and recurrent miscarriage: a case control study. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.15, n.1, p.1-6, 2017.
- MAAT, M. P. M.; et al. Genetic influence on inflammation variables in the elderly. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 2168-2173, 2004.
- MACIEL, I.J.; SIQUEIRA, J.B.J.; MARTELLI, C.M.T. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical**, v.37, n.2, p.111-130, 2008.
- MALAVIGE, G.N.; et al. Suppression of Virus Specific Immune Responses by IL-10 in Acute Dengue Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n.9, P.1-10, 2013.
- MARINHO, I. **Contra a dengue, um caminho inovador-Intituto Oswaldo Cruz**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2237&sid=32>>. Acesso em: 08/11/17.
- MARQUES, G.R.A.M.; et al. Public drinking water supply and egg laying by Aedes. **Revista de Saúde Pública**, v.47, n.3, p.1-8, 2013.
- MARTINA, B.E.E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A.D.M.E. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, n.4, p. 564–581, 2009.
- MARTINS, V.E.P.; et al. Distribuição espacial e características dos criadouros de Aedes albopictus e Aedes aegypti em Fortaleza, Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.1, p.73-77, 2010.
- MAYER, S.V.; TESH, R.B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borneviral diseases: a global prospective on Dengue, Chikungunya and Zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, p. 155-163, 2017.
- MEGAWATI, D.; et al. Dengue in Bali: Clinical characteristics and genetic diversity of circulating dengue viroses. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.11, n.5, 2017.
- MIESEN, P.; JOOSTEN, J.; RIJ, R.P.V. PIWIs Go Viral: Arbovirus-Derived piRNAs in Vector Mosquitoes. **PLoS Pathog**, v.12, n.12, p.1-17, 2016.
- MINARD, G.; et al. Identification of sympatric cryptic species of Aedes albopictus subgroup in Vietnam: new perspectives in phyllosymbiosis of insect vector. **Parasites & Vectors**, v.10, n.1, p.1-14, 2017.
- MOHSIN, S.N.; et al. Association of FcγRIIIa Polymorphism with Clinical Outcome of Dengue Infection: First Insight from Pakistan. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.93, n.4, p. 691–696, 2015.
- MONTEIRO, E.S.C.; et al. Aspectos epidemiológicos e vetoriais da dengue na cidade de Teresina, Piauí – Brasil, 2002 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.18, n.4, p.365-374, 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.
- MOTA, M.T.O.; et al. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 38-50, 2016.
- MOTAWI, T.; et al. Polymorphisms of α 1-antitrypsin and Interleukin-6 genes and the progression of hepatic cirrhosis in patients with a hepatitis C virus infection. **Balkan Journal Of Medical Genetics**, v. 19, n. 2, p.35-44, 2016.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13-22, 2005.
- MURRAY, N.E.A.; QUAM, M.B.; SMITH, A.W. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v.5, p. 299–309, 2013.
- NAN, J.; et al. IRF9 and unphosphorylated STAT2 cooperate with NF- κ B to drive IL6 expression. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 115, n. 15, p.3906-3911, 2018.
- NGASANG, A.S.; et al. Association of IL1B –31C/T and IL1RA Variable Number of an 86-bp Tandem Repeat With Dengue Shock Syndrome in Thailand. **The Journal of Infectious Diseases**, v.210, n.1, p.138-45, 2014.
- NISALAK, A. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.46, 2015.
- NOECKER, C.A.; et al. Contrasting associations of polymorphisms in Fc γ RIIa and DC-SIGN with the clinical presentation of dengue infection in a Mexican population. **Acta Tropica**, v. 138, p.15-22, 2014.
- NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SCHATZMAYR, H.G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.16, n.1, p.205-211, 2000.
- OLIVEIRA, C.M.B.; et al. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.61, n. 2, p.255-265, 2011.
- OLIVEIRA, E.S.; DOUHI, N. Levantamento epidemiológico dos casos de dengue no município de Assis Chateaubriand, Paraná, e sistemas de prevenção e controle. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.10. n. 32, p.19-27, 2012.
- OLIVEIRA, L. F.; et al. Polymorphism of DC-SIGN (CD209) Promoter in Association with Clinical Symptoms of Dengue Fever. **Viral Immunology**, v. 27, n. 5, p.245-249, 2014.
- PABALAN, N.; et al. Associations of DC-SIGN (CD209) promoter -336G/A polymorphism (rs4804803) with dengue infection: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 177, p.186-193, 2018.
- Pan American Health Organization. **Dengue**. 2017. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=1&Itemid=4073
4. Acesso em: 12 de outubro de 2017.

- PANDEY, N.; et al. Serum levels of IL-8, IFN γ , IL-10, and TGF β and their gene expression levels in severe and non-severe cases of dengue virus infection. **Archives of Virology**, v. 160, n. 6, p.1463–1475, 2015.
- PANG, T.; MAK, T.K.; GUBLER, D.J. Prevention and control of dengue—the light at the end of the tunnel. **The Lancet Infectious Diseases**, v.17, n.3, p.79-87, 2017.
- PAPA, A. Emerging arboviral human diseases in Southern Europe. **Journal of Medical Virology**, v.89, n.8, p.1315-1322. 2017.
- PATEL, B.; et al. Dissecting the human serum antibody response to secondary dengue virus infections. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.11, n.5, p.1-15, 2017.
- PAUPY, C.; et al. Aedes albopictus, an arbovirus vector: **From the darkness to the light**. **Microbes and Infection**, v.11, n. 14, p.1177-1185, 2009.
- PEPEI, L.; et al. Duck egg drop syndrome virus: an emerging Tembusu-related flavivirus in China. **Science China Life Sciences**, v.56, n.8, p.701–710, 2013.
- PEREIRA, C.F.; FERREIRA, T.G.; BORGES, J.L. Política de saúde e controle da dengue em Uberaba-MG. **Revista Eletrônica da Univar**, v.1, n.9, p. 90-95, 2013.
- PERERA, N.; MILLER, J.; ZITZMANN, N. The role of the unfolded protein response in dengue virus pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 19, n.5, p.1-9, 2017.
- PEREZ, A.B.; et al. Tumor necrosis factor–alpha, transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. **Human Immunology**, v.71, n.11, p.1135-1140, 2010.
- PESSOA, M.V.E.; et al. Aedes albopictus no Brasil: aspectos ecológicos e riscos de transmissão da dengue. **Entomotropica**, v.28, n.2, p.75-86, 2013.
- PIERONI, F.; et al. Cytokine gene variants and venous thrombotic risk in the BRATROS (BRAZILIAN THROMBOSIS STUDY). **Thrombosis Research**, v. 120, n. 2, p.221-229, 2007.
- PINTO, P.S.; PINTO, F.O.; DUARTE, S.C. A Dengue e sua relação com Educação Ambiental no município de Quissamã/RJ. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 8, n.1, p.14-18, 2013.
- POLI, F.; et al. Allele frequencies of polymorphisms of TNFA, IL-6, IL-10 and IFNG in an Italian Caucasian population. **European Journal of Immunogenetics**, v.29, n. 3, p. 237-240, 2002.
- PROPHIRO, J.S.; et al. Ascogregarina taiwanensis infection in Aedes aegypti and Aedes albopictus in Santa Catarina, South Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.50, n.2, p.235-238, 2017.
- RABELO, K.; et al. The effect of the dengue non-structural 1 protein expression over the HepG2 cell proteins in a proteomic approach. **Journal of Proteomics**, v.152, v.339-354, 2016.
- RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S.K. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, v.13, n.131, p.1-10, 2016.

- REINA, J.J.; ROJO, J. Glycodendritic structures: tools to interact with DC-SIGN. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.49, p. 109 -124, 2013.
- RENTERIA, B.L.; et al. Role of Mast Cells in Dengue Virus Pathogenesis. **DNA and Cell Biology**, v. 36, n 6, p.1-5, 2017.
- REYNARD, M.P.; TURNER, D.; NAVARRETE, C.V. Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor- α , interleukin-10, interferon- γ and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. **European Journal of Immunogenetics**, v. 27, n.4, p.241-249, 2000.
- RIBEIRO, A.L.N.; BALSAN, L.A.G.; MOURA, G.L. Análise das políticas públicas de combate à dengue. **Contribuciones a las Ciencias Sociales**, 2013. Disponível em: <www.eumed.net/rev/cccscs/24/politicas-publicas-dengue.html> .Acesso em: 05/07/2016.
- RIBEIRO, C.S.S.; VISENTAINER, J.E.L.; MOLITERNO, R.A. Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n. 4, p. 1-6, 2007.
- RICHTER, M.K.S.; et al. Immature Dengue Virus Is Infectious in Human Immature Dendritic Cells via Interaction with the Receptor Molecule DC-SIGN. **Plos One**, v. 9, n.2, p.1-8, 2014.
- ROBLES, V.P.; BATISTA, C.V. Aedes-Borne Virus–Mosquito Interactions: Mass Spectrometry Strategies and Findings. **Vector-Borne and zoonotic diseases**, v.17, n.6, p.361-375, 2017.
- ROCHA, A.P.S.; et al. Dengue: história natural e definição de casos graves e potencialmente graves. **Revista Médica de Minas Gerais**, v.21, p.49-53, 2011.
- 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.
- ROCHE, R.R.; GOULD, E.A. Understanding the Dengue Viruses and Progress towards Their Control. **BioMed Research International**, v.2013, p. 1-20, 2013.
- ROTHMAN, A.L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, v.113, n.7, p. 46-951, 2004.
- ROTHMAN, A.L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532-543, 2011.
- SAHILI, A.E.; LESCAR, J. Dengue Virus Non-Structural Protein 5. **Viruses**, v.9, n.4, p.2-20, 2017.
- SAKUNTABHAI, A.; et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nature Genetics**, v.37, n.5, p. 507-513, 2005.
- SALAS, Z.I.V.; et al. Dengue Seroprevalence and Risk Factors for Past and Recent Viral Transmission in Venezuela:A Comprehensive Community-Based Study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.91, n.5, p. 1039–1048, 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.

- SÁNCHEZ, E. N.; DESPRÉS, P.; BARRÓN, L.C. Innate immune responses to dengue virus. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 425-435, 2005.
- SANLÉS, A.F.; et al. Functional Information Stored in the Conserved Structural RNA Domains of Flavivirus Genomes. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n. 546, 2017.
- SANTOS, A.C.M.; et al. Meta-analysis of the Relationship between TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) Gene Polymorphisms and Susceptibility to Dengue. **Immunological Investigations**, v.46, n.2, p.201-220, 2017.
- SANTOS, B.A.; et al. MBL2 Gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. **Human Immunology**, v.69, n.2, p.122–128, 2008.
- 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.
- SCHAEFFER, E.; et al. Dermal CD14+ Dendritic Cell and Macrophage Infection by Dengue Virus Is Stimulated by Interleukin-4. **Journal of Investigative Dermatology**, v.135, n.7, p.1743–1751, 2015.
- SEHRAWAT, P.; et al. Role of Cytokines as Molecular Marker of Dengue Severity. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v.10, n.1, p. 1-5, 2018.
- SESAPI-Secretaria de Estado da Saúde, Piauí. **Boletim da 25ª Semana Epidemiológica, Dengue, Chikungunya, Zica, Microcefalia**, 2018.
- SHIMOJIMA, M.; et al. Distinct usage of three C-type lectins by Japanese encephalitis virus: DC-SIGN, DC-SIGNR, and LSECtin. **Archives Of Virology**, v. 159, n. 8, p.2023-2031, 2014.
- SHUEB, R. H.; et al. The identification of copy number variation of CD209 (DCSIGN) gene among dengue patients from peninsular Malaysia. **Meta Gene**, v. 10, p.73-76, 2016.
- SILVA, J.S.; MARIANO, Z.F.; SCOPEL,I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao Aedes aegypti: datentativa de erradicação ás políticas de controle. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v.3, n.6, p.163-175, 2008.
- SILVA, L.K.; et al. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, n. 11, p. 1221–1227, 2010.
- SILVA, R.C. **Associação de polimorfismos nos genes DC-SIGN e L-SIGN com a proteção e susceptibilidade a transmissão vertical do HIV-1 e ao desenvolvimento de tuberculose ativa na população pernambucana**. 2011. 123f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- SIMMONS, C. P.; et al. Dengue. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423-1432, abr. 2012.
- SIPS, G. J.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. **Neuroinvasive flavivirus infections**. Reviews in Medical Virology, v. 22, n. 2, p. 69-87, 2012.
- 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.

SMITH, A.W.; et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **The Lancet Infectious Diseases**, v.17, n.3, p.101-106, 2016.

SOUSA, J.R.M.; et al. Níveis Séricos de Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-18 (IL-18) e Proteína C Reativa (PCR) na Síndrome Coronariana Aguda sem Supradesnívelamento do ST em Pacientes com Diabetes Tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.90, n.2, p. 94-99, 2008.

SUBEDI, D.; ROBINSON, A.W.T. Clinical Utility of the Nonstructural 1 Antigen Rapid Diagnostic Test in the Management of Dengue in Returning Travelers With Fever. **Open Journal of Clinical Diagnostics**, v. 4, n.1, p. 63-70, 2014.

SUWANMANEE, S.; LUPLERTLOP, N. Dengue and Zika viruses: lessons learned from the similarities between these Aedes mosquito-vectored arboviruses. **Journal of Microbiology**, v.55, n. 2, p. 81–89, 2017.

SZPECHT, D.; et al. The significance of IL-1 β +3953C>T, IL-6 -174G>C and -596G>A, TNF- α -308G>A gene polymorphisms and 86 bp variable number tandem repeat polymorphism of IL-1RN in bronchopulmonary dysplasia in infants born before 32 weeks of gestation. **Central European Journal Of Immunology**, v. 42, n.3, p.287-293, 2017.

TAGLIABUE, G., et al. A label-free immunoassay for Flavivirus detection by the Reflective Phantom Interface technology. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.492, n.4, p.558-564, 2017.

TAKAGI, Y.; et al. Discovery of Novel Cyclic Peptide Inhibitors of Dengue Virus NS2B-NS3 Protease with Antiviral Activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.27, n.15, p.3586-3590, 2017.

TANAKA, T., NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, p. 1-16, 2014.

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.

TEIXEIRA, M.G. Few characteristics of dengue's fever epidemiology in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n.18, p.1-4, 2012.

TEIXEIRA, M.G.; BARRETO, M.L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v.8, n.4, p. 5-33, 1999.

TERAMOTO, T.; BALASUBRAMANIAN, A.; CHOI, K.H.; PADMANABHAN, R. Serotype-specific interactions among functional domains of Dengue virus 2 non-structural proteins (NS) 5 and NS3 are crucial for viral RNA replication. **The Journal of Biological Chemistry**, v.292, n.23, p.9465-9479, 2017.

TERRY, C.F.; LOUKACI, V.; GREEN, F.R. (2000). Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 24, p. 18138–18144, 2000.

TETZLAFF, W. F.; et al. – 174 G>C IL-6 polymorphism and primary iron overload in male patients. **Annals Of Hematology**, v. 97, n. 9, p.1683-1687, 2018.

- THAKUR, P.; et al. Elevated levels of vascular endothelial growth factor in adults with severe dengue infection. **VirusDisease**, v.27, n.1, p.48–54, 2016.
- VADIVALAGAN, C.; et al. Genetic deviation in geographically close populations of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of environmental barriers in South India. **Parasitology Research**, v.115, n.3, p.1149-1160, 2016.
- VALDERRAMA, A.; DIAZ, Y.; VERGÈS, S.L. Interaction of Flavivirus with their mosquito vectors and their impact on the human health in the Americas. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.492, v.4, p.541-547, 2017.
- VAN BELLE, T.L.; et al. Beta-cell specific production of IL6 in conjunction with a mainly intracellular but not mainly surface viral protein causes diabetes. **Journal Of Autoimmunity**, v. 55, p.24-32, 2014.
- VELANDIA, M.L; CASTELLANOS, J.E. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. **Infectio**, v.15, n.1, p.33-43, 2011.
- VERDERAL, J.C.R.; et al. Recomendações para o manejo de pacientes com formas graves de dengue. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n.2, p.125-133, 2011.
- VIANA, V.D.; IGNOTTI, E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.16, n.2, p. 240-56, 2013.
- WANG, L.; et al. DC-SIGN (CD209) Promoter 2336 A/G Polymorphism Is Associated with Dengue Hemorrhagic Fever and Correlated to DC-SIGN Expression and Immune Augmentation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.1, p. 1-10, 2011.
- WANG, M.; et al. Anti-Idiotypic Antibodies Specific to prM Monoantibody Prevent Antibody Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, n.157, p.1-11, 2017.
- WANG, Q.; et al. Meta-analysis of the correlation between IL-6 -174 G/C polymorphism and polycystic ovarian syndrome. **Journal Of Obstetrics And Gynaecology Research**, v. 41, n. 7, p.1087-1092, 2015.
- WANG, Y.; ZHANG, P. Recent advances in the identification of the host factors involved in dengue virus replication. **Virologica Sinica**, v.32, n.1, p.23–31, 2017.
- WARD, T.; et al. Dengue data and surveillance in Tanzania: a systematic literature review. **Tropical Medicine & International Health**, v.22, n.8, p. 960-970, 2017.
- WARDHANI, P.; et al. Clinical and virological characteristics of dengue in Surabaya, Indonesia. **Plos One**, v.12, n.6, p. 1-21, 2017.
- WHITEHEAD, S.S.; et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Publishing Group**, v.5, n. 7, p. 518-528, 2007.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva: World Health Organization, 2009. 160 p.
- WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment prevention and control**. Geneva: WHO, 1997.

- WUJCICKA, W. I.; WILCZYŃSKI, J. S.; NOWAKOWSKA, D. E. Association of SNPs from IL1A, IL1B, and IL6 Genes with Human Cytomegalovirus Infection Among Pregnant Women. **Viral Immunology**, v. 30, n. 4, p.288-297, 2017.
- XAVIER, A.R.; et al. Manifestações clínicas na dengue-Diagnóstico laboratorial. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.102, n.2, 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, 2013.
- YANG, S.; et al. Association of IL-6-174G/C and IL10-1082G/A polymorphisms with recurrent aphthous stomatitis risk. **Medicine**, v. 96, n. 52, p.1-7, 2017.
- YU, L.; TAKEDA, K.; GAO, Y. Characterization of virus-specific vesicles assembled by West Nile virus non-structural proteins. **Virology**, v. 506, p.130-140, 2017.
- YU, S.H.; et al. A Paracrine Role for IL6 in Prostate Cancer Patients: Lack of Production by Primary or Metastatic Tumor Cells. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 10, p.1175-1184, 2015.
- ZARA, A.L.S.A.; et al. Aedes aegypti control strategies: a review. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.25, n.2, p.391-404, 2016.
- ZEIDLER, J.D.; et al. Non-Canonical Roles of Dengue Virus Non-Structural Proteins. **Viruses**, v.9, n. 42, p.2-16, 2017.
- Zekovic, A. et al. Association between the -174 C/G polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene and gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. **Clinical Rheumatology**, v. 37, n. 9, p.2447-2454, 2018.
- ZHANG, X.; et al. Complete genome sequence of Menghai flavivirus, a novel insect-specific flavivirus from China. **Archives of Virology**, v.162, n.5, p.1435-1439, 2017.
- ZHOU, L.; et al. Associations of interleukin-6 gene polymorphisms with cancer risk: Evidence based on 49,408 cancer cases and 61,790 controls. **Gene**, v. 670, p.136-147, 2018.
- ZHU, J.; et al. Interleukin-6-174G/C Polymorphism Contributes to Periodontitis Susceptibility: An Updated Meta-Analysis of 21 Case-Control Studies. **Disease Markers**, v. 2016, p.1-12, 2016.
- ZIDI, S.; et al. Relationships between Common and Novel Interleukin-6 Gene Polymorphisms and Risk of Cervical Cancer: a Case-Control Study. **Pathology & Oncology Research**, v. 23, n. 2, p.385-392, 2016.

APÊNDICE 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 arbovirose, 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.

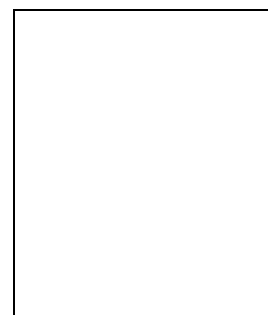
CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

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

APÊNDICE 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 algia Ictícia
 Prostração Diarreia Vômitos Antena: In prurido In 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 Hemoptóicos

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: _____