



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

SILVENY MEIGA ALVES VIEIRA

**PREVALÊNCIA E INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS - 819 C/T (rs1800871) E
-1082 A/G (rs1800896) DO GENE *IL-10* NA DENGUE SINTOMÁTICA EM UMA
POPULAÇÃO DO NORDESTE DO BRASIL.**

**PARNAÍBA – PI
AGOSTO – 2018**

SILVENY MEIGA ALVES VIEIRA

**PREVALÊNCIA E INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS - 819 C/T (rs1800871) E
-1082 A/G (rs1800896) DO GENE *IL-10* NA DENGUE SINTOMÁTICA EM UMA
POPULAÇÃO DO NORDESTE DO BRASIL.**

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

Área de concentração: Medicina Investigativa e Marcadores Epidemiológicos.

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

V658p Vieira, Silveny Meiga Alves

Prevalência e influência dos polimorfismos -819 c/t (rs1800871) e -1082 a/g (rs1800896) do gene il-10 na dengue sintomática em uma população do nordeste do Brasil [manuscrito] / Silveny Meiga Alves Vieira. – 2018.
95 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

1. Resposta Imune. 2. Citocina Anti-Inflamatória. 3. IL-10. 4. Polimorfismo Genético. 5. *Dengue virus*. I. Título.

CDD: 572.86

SILVENY MEIGA ALVES VIEIRA

**PREVALÊNCIA E INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS - 819 C/T (rs1800871) E
-1082 A/G (rs1800896) DO GENE *IL-10* NA DENGUE SINTOMÁTICA EM UMA
POPULAÇÃO DO NORDESTE DO BRASIL.**

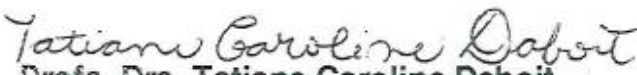
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM: 27/ 08/ 2018.

BANCA EXAMINADORA:


Prof.ª Dra. Anna Carolina T. da C. Pereira
Presidente


Prof.ª Dra. France Keiko Nascimento
Yoshioka
Examinadora


Prof.ª Dra. Tatiane Caroline Daboit
Examinadora

PARNAÍBA – PI
AGOSTO – 2018

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”.
Gandhi

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, por ser minha força diária nas lutas da vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelo Pai amoroso que guia meus passos e jamais me abandona na caminhada da vida.

Ao meu amado pai, Raimundo Vieira, pelo amor que ultrapassa os limites da vida. Por em vida ter me direcionado para o caminho do saber. Onde quer que você esteja, sei que está vibrando com essa conquista. Esta vitória é nossa!

À minha amada mãe, Socorro Alves, representação fiel do amor mais puro e sublime, agradeço por ser luz constante na minha caminhada, por alimentar meus sonhos com o seu apoio, pela sabedoria em confortar-me nos dias ruins, por todos os ensinamentos de vida, e pelo suporte oferecido em tudo que me proponho a fazer. Esta vitória é nossa!

Aos meus sobrinhos Arthur e Maria, que são minha fonte de amor, alegria e paz. Titia ama vocês sem tamanho!

Ao meu amado irmão Giannini, que mais se assemelha a um pai. Obrigada por sonhar comigo, por ser o meu maior incentivador.

Às minhas amadas irmãs Sidely e Iasmim, e cunhados Gonzaga e Verinalda, pelo incentivo, pela torcida diária, pelos momentos de alegria em família.

Ao meu companheiro Juliano, pelo amor, pelo incentivo, pela torcida, pelos conselhos, pela prestatividade, e por ter tornado parte dessa trajetória mais leve e feliz.

Aos meus queridos amigos Luanny, Yohanna, Tuany, Verônica, Gabriela, Matheus e Christian. Aos amigos que ganhei durante a graduação em Biomedicina, Daniela, Aline, Ionésio, Saulo, Ingrid Pereira, Ingrid Velloso, Luiz Felipe e Lucas. Agradeço a todos pela amizade, pela torcida, pelos momentos felizes, pela acolhida em momentos de aflição, e por me mostrarem que não estou sozinha.

À minha estimada orientadora, Anna Carolina, pela confiança depositada em mim, que vem desde 2014 com a iniciação científica. Pela paciência e disponibilidade para me orientar ao longo de todos esses anos. Pela amizade, pelos conselhos, pelo incentivo constante, por todos os ensinamentos científicos e de vida, que certamente me ajudaram a evoluir como pessoa e profissional. Pela orientação primorosa, por toda dedicação e empenho que teve para me conduzir neste trabalho. Principalmente, por ter me permitido descobrir o que mais gosto de fazer, que é pesquisar. Gratidão eterna!

Às professoras Dr^a. France Keiko Nascimento Yoshioka e Dr^a. Tatiane Caroline Daboit pelas considerações ricas feitas na qualificação do meu mestrado e por terem aceitado compor a banca de defesa.

Aos queridos amigos, Luzeni, Thiago, Juliana, Mayck, Francisco Carlos, Emanuela, Mariana, Layla e Iara, pela disponibilidade em me ajudar quando precisei, seja durante o andamento deste projeto, ou em outras ocasiões. Agradeço pela prestatividade, pela amizade, pela torcida, pelo apoio constante, e pelos bons momentos compartilhados juntos.

À equipe querida do Laboratório BIOMIC: Phillipe, Karliane, Mariela, Lorena, Naiany, Felipe Daniel, Dacylla, Vinícius, Lucas, Vanessa e Jaiane. Ainda, às amigas técnicas do Laboratório de Microbiologia, Juelina e Sansara. Obrigada pela amizade, pela assistência prestada, pela companhia diária, pelos conhecimentos compartilhados, pelos bons momentos, e pelo suporte oferecido em dias difíceis.

Ao Hygor, por ter sido fundamental na padronização da PCR em Tempo Real, por ter prestado assistência durante todos os experimentos realizados de genotipagem, por todas as dicas, dúvidas retiradas, reagentes cedidos, manuseio de equipamentos. Muito obrigada por ter sido tão prestativo!

À direção e aos funcionários do Pronto Socorro Municipal de Parnaíba, em especial ao farmacêutico-bioquímico Roberto Régis, aos técnicos de laboratório Adilson e César, e a secretária Auxiliadora, por toda atenção prestada a equipe BIOMIC durante o período de realização da pesquisa.

A todos os participantes voluntários desta pesquisa: indivíduos dos grupos controle negativo e assintomático, e pacientes com suspeita clínica de dengue. Agradeço pela cooperação fundamental de cada um. Sem vocês este estudo não seria viável. Obrigada!

À FAPEPI, pelo apoio financeiro.

Em síntese, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a consolidação deste sonho.

“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e Ele tudo fará”.
Salmos 37:5

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Arboviroses.....	3
2.2 Aspectos Históricos e Perfil Epidemiológico da Dengue no Mundo, no Brasil e no Piauí	4
2.3 Caracterização Molecular do <i>Dengue virus</i>	9
2.3.1 Sorotipos e Genótipos	10
2.4 Vetor e Ciclo de Transmissão Viral	11
2.5 Ciclo de Multiplicação Viral	12
2.6 Imunopatogênese da Dengue.....	14
2.7 Aspectos Clínicos e Classificação da doença	18
2.8 Diagnóstico Laboratorial	20
2.9 Influência de Fatores na Susceptibilidade à Infecção pelo <i>Dengue virus</i>	23
2.9.1 Fatores Inerentes ao Vírus	23
2.9.2 Fatores Inerentes ao Ambiente.....	24
2.9.3 Fatores Inerentes ao Hospedeiro Humano	24
2.10 Influência de Polimorfismos Genéticos em Genes da Resposta Imune na Patogênese da Dengue.....	26
2.11 IL-10.....	26
2.11.1 SNPs no Gene <i>IL-10</i>	27
2.11.1.1 -819 C/T.....	30
2.11.1.2 -1082 A/G.....	30
2.12 Desequilíbrio de Ligação.....	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Aspectos Éticos e Legais	33
4.2 Tipo de Estudo e Local	33
4.3 População e Definições dos Grupos de Estudo	33
4.3.1 Grupo de Pacientes com Dengue	33
4.3.2 Grupo Controle Negativo.....	34

4.3.3 Grupo Assintomático	34
4.4 Coleta de Amostras e Dados Clínicos dos Pacientes	34
4.5 Confirmação do Diagnóstico	35
4.5.1 Extração do RNA viral e Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR).....	35
4.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	36
4.6 Extração, Quantificação e Armazenamento do DNA	37
4.7 Genotipagem dos SNPs do Gene <i>IL-10</i>	38
4.8 Análises Estatísticas.....	40
5 RESULTADOS	41
5.1 Frequências genóticas e alélicas do SNP -819 C/T do gene <i>IL-10</i>	42
5.2 Frequências genóticas e alélicas do SNP -1082 A/G do gene <i>IL-10</i>	48
5.3 Análises haplotípicas dos SNPs do gene <i>IL-10</i>	53
5.4 Associação dos SNPs do gene <i>IL-10</i> com a modulação das manifestações clínicas da dengue	54
5.5 Distribuição do alelo mutante dos SNPs do gene <i>IL-10</i> nas populações do mundo..	56
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	66
8 REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	92
APÊNDICE II - FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS	95

RESUMO

A dengue é a infecção transmitida por vetor artrópode mais prevalente no mundo. A patologia é atualmente classificada em dengue sem sinais de alarme (DSSA), dengue com sinais de alarme (DCSA) e dengue severa (DS). A variedade de manifestações clínicas resulta da sua complexa patogênese, que apresenta influência de fatores virais, ambientais e do hospedeiro. A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória envolvida com a resposta imune do hospedeiro durante o curso da dengue. Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) descritos para o seu gene codificante, tais como -819 C/T (rs1800871) e -1082 A/G (rs1800896), têm exibido diferentes perfis de associação com a doença na literatura. Considerando a heterogeneidade desses achados, o presente estudo objetivou investigar a prevalência e a influência dos polimorfismos em indivíduos sintomáticos, assintomáticos e controles para dengue na população de Parnaíba-PI, relacionando-os com o desenvolvimento das formas clínicas da doença. Os polimorfismos foram investigados por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). As frequências genotípicas foram testadas quanto ao equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. A associação com a dengue foi estimada pelo Teste do Qui-quadrado (χ^2) ou Teste Exato de Fisher e *Odds Ratio*. A análise dos dados foi realizada no *BioEstat 5.0*, sendo adotado um nível de significância de $p < 0,05$. As análises haplotípicas e do desequilíbrio de ligação foram executadas no *Haploview 4.2*. As frequências genotípicas e alélicas do SNP -819 C/T não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados. Ao analisar o SNP -1082 A/G observou-se significância estatística apenas em relação ao grupo assintomático. O genótipo A/G foi associado com susceptibilidade à dengue ($p = 0,01$, OR= 2,17), à DSSA ($p = 0,02$, OR= 2,13) e à DCSA ($p = 0,03$, OR= 2,34). O genótipo G/G foi associado com susceptibilidade à dengue ($p = 0,01$, OR= 3,98) e à DCSA ($p = 0,02$, OR= 4,90). A combinação de genótipos A/G + G/G foi associada com susceptibilidade à dengue ($p = 0,002$, OR= 2,37), à DSSA ($p = 0,01$, OR= 2,23) e à DCSA ($p = 0,01$, OR= 2,63). Todas as frequências genotípicas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. O alelo G foi associado com susceptibilidade à dengue ($p = 0,002$, OR= 1,96), à DSSA ($p = 0,01$, OR= 1,81) e à DCSA ($p = 0,006$, OR= 2,14). Nas análises haplotípicas do gene *IL-10*, o haplótipo C-G foi associado com a dengue ($p = 0,0031$), a DSSA ($p = 0,0195$) e a DCSA ($p = 0,0045$) também em relação ao grupo assintomático, enquanto que o haplótipo C-A foi associado com a dengue assintomática ($p = 0,0265$) em relação ao grupo DCSA. A análise do desequilíbrio de ligação evidenciou forte desequilíbrio entre os SNPs do gene *IL-10*. Com relação a modulação das manifestações clínicas da dengue, apenas os portadores T do SNP -819 C/T apresentaram associação significativa de susceptibilidade à cefaleia ($p^* = 0,0264$) e de proteção contra edemas ($p^* = 0,0323$) e calafrios ($p^* = 0,0478$). A frequência dos alelos T e G dos respectivos SNPs -819 C/T e -1082 A/G deste estudo diferiu significativamente da encontrada em algumas populações do mundo. Em síntese, os dados desta pesquisa sugerem uma possível influência do SNP rs1800896 sobre o fenótipo da dengue sintomática em uma amostra populacional da Região Nordeste do Brasil, sendo encontrado panorama semelhante quando este foi combinado com o SNP rs1800871, corroborando as evidências da literatura acerca do efeito aditivo de polimorfismos.

Palavras-chave: Resposta imune, Citocina anti-inflamatória, IL-10, Polimorfismo genético, *Dengue virus*.

ABSTRACT

Dengue is the most prevalent arthropod vector-borne infection in the world. The pathology is currently classified as dengue without warning signs (DSSA), dengue with warning signs (DCSA) and severe dengue (DS). The variety of clinical manifestations results from its complex pathogenesis, which is influenced by viral, environmental and host factors. Interleukin 10 (IL-10) is an anti-inflammatory cytokine involved with the immune response of the host during the course of dengue. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) described for their coding gene, such as -819 C/T (rs1800871) and -1082 A/G (rs1800896), have exhibited different profiles of association with the disease in the literature. Considering the heterogeneity of these findings, the present study aimed to investigate the prevalence and influence of polymorphisms in symptomatic, asymptomatic and dengue control individuals of Parnaíba-PI population, relating them to the development of clinical forms of the disease. SNPs were investigated by Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR). Genotypic frequencies were tested for *Hardy-Weinberg* equilibrium. The association with dengue was estimated by the Chi-square Test (χ^2) or Fisher's Exact Test and *Odds Ratio*. Data analysis was performed in *BioEstat 5.0*, and a significance level of $p < 0.05$ was adopted. The haplotype and linkage disequilibrium analyzes were performed in *Haploview 4.2*. The genotypic and allelic frequencies of the -819 C/T SNP did not show statistically significant differences between the studied groups. When analyzing -1082 A/G SNP, statistical significance was only observed in relation to the asymptomatic group. The A/G genotype was associated with susceptibility to dengue ($p = 0,01$, OR= 2,17), DSSA ($p = 0,02$, OR= 2,13) and DCSA ($p = 0,03$, OR= 2,34). The G/G genotype was associated with susceptibility to dengue ($p = 0,01$, OR= 3,98) and DCSA ($p = 0,01$, OR= 2,63). The combination of A/G + G/G genotypes was associated with susceptibility to dengue ($p = 0,002$, OR= 2,37), DSSA ($p = 0,01$, OR= 2,23), and DCSA ($p = 0,01$, OR= 2,63). All genotypic frequencies were found in *Hardy-Weinberg* equilibrium. The G allele was associated with susceptibility to dengue ($p = 0,002$, OR= 1,96), DSSA ($p = 0,01$, OR= 1,81) and DCSA ($p = 0,006$, OR= 2,14). In the haplotypic analyzes of the *IL-10* gene, C-G haplotype was associated with dengue ($p = 0.0031$), DSSA ($p = 0.0195$) and DCSA ($p = 0.0045$) also in relation to the asymptomatic group, whereas C-A haplotype was associated with asymptomatic dengue ($p = 0.0265$) in relation to the DCSA group. The analysis of the binding disequilibrium demonstrated a strong imbalance between the SNPs of the *IL-10* gene. Regarding to modulation of the clinical manifestations of dengue, only the T-carriers of the -819 C/T SNP had significant association of susceptibility to headache ($p^* = 0.0264$) and protection against edema ($p^* = 0.0323$) and chills ($p^* = 0.0478$). The frequency of the T and G alleles of the respective SNPs -819 C/T and -1082 A/G of this study differed significantly from that found in some populations of the world. In summary, data from this research suggest a possible influence of the SNP rs1800896 on phenotype of symptomatic dengue in a population sample from the Northeast Region of Brazil. A similar scenario was found when this was combined with the SNP rs1800871, corroborating the literature evidence about the additive effect of polymorphisms.

Keywords: Immune response, Anti-inflammatory cytokine, IL-10, Genetic polymorphism, *Dengue virus*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

ALT - Alanina aminotransferase

ASS - Grupo de indivíduos com infecção assintomática

AST - Aspartato aminotransferase

BIOMIC - Laboratório de Bioquímica e Biologia de Microrganismos e Plantas

cDNA - DNA complementar

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

CHIKV - *Chikungunya virus*

DCs - Do inglês *Dendritic Cells*, traduz-se Células Dendríticas

DCSA - Dengue com sinais de alarme

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

DEN - Grupo de pacientes com dengue

DENV - *Dengue virus*

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

DS - Dengue severa

DSSA - Dengue sem sinais de alarme

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

IFN - Interferon

IFN- α - Interferon-alfa

IFN- γ - Interferon-gama

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IL - Interleucina

IL-1 β - Interleucina-1 beta

IL-2 - Interleucina-2

IL-8 - Interleucina-8

IL-10 - Interleucina 10

MAYV - *Mayaro virus*

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

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

NK - Do inglês *Natural Killer Cell*, traduz-se células natural killer

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

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

OR - *Odds ratio*

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

OROV - *Oropouche virus*

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

PCR - Proteína C reativa

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

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

SAME - Serviço de Arquivo Médico e Estatístico

SCD - Síndrome de Choque da Dengue

SE - Semana Epidemiológica

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

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

SCD - Síndrome de Choque da Dengue

SUS - Sistema Único de Saúde

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

TP - Tempo de protrombina

TTP - Tempo de tromboplastina parcial

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

VHS - Velocidade de hemossedimentação

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

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

ZIKV - *Zika virus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Risco de diferentes regiões do mundo para a transmissão do <i>Dengue virus</i>	5
Figura 2 - Introdução dos sorotipos da Dengue no Brasil.....	7
Figura 3 - Estrutura da partícula viral do <i>Dengue virus</i>	9
Figura 4 - Organização do genoma do <i>Dengue virus</i>	10
Figura 5 - Ciclos de transmissão do <i>Dengue virus</i>	12
Figura 6 - Ciclo de multiplicação do <i>Dengue virus</i>	13
Figura 7 - Patogênese da dengue, de acordo com a fase da doença.....	15
Figura 8 - Potencialização mediada por anticorpos.....	17
Figura 9 - Métodos de diagnóstico para a Dengue.....	20
Figura 10 - Marcadores de diagnóstico para infecções pelo <i>Dengue virus</i>	21
Figura 11 - Localização de polimorfismos na região promotora do gene <i>IL-10</i> investigados em estudos de associação a doenças infecciosas.....	27
Figura 12 - Frequências alélicas do SNP -819 C/T (rs1800871)	30
Figura 13 - Frequências alélicas do SNP -1082 A/G (rs1800896)	31
Figura 14 - Exemplo de <i>plot</i> de discriminação alélica do SNP -1082 A/G (rs1800896) para o gene <i>IL-10</i> gerado por PCR em Tempo Real.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos genômicos de associação envolvendo as variantes polimórficas -819 C/T e -1082 A/G do gene <i>IL-10</i> e os seus fenótipos na dengue.....	29
Tabela 2 - Sequência dos iniciadores para amplificação do gene NS5 dos <i>Flavivirus</i> descritos por Chao, Davis & Chang (2007), seus sorotipos específicos e produtos da PCR.....	36
Tabela 3 - Sequência de iniciadores para amplificação da região do gene NS5 descritos por Bronzoni e colaboradores (2005), seus sorotipos específicos e produtos da PCR...37	37
Tabela 4 - Gene, dbSNP e suas respectivas sondas (VIC/FAM) para PCR em Tempo Real (<i>TaqMan</i> ® <i>SNP Genotyping Assays</i>).....	39
Tabela 5 - Componentes utilizados nas reações de PCR em Tempo Real para genotipagem dos SNPs do gene <i>IL-10</i> ..	39
Tabela 6 - Distribuição genotípica e alélica do SNP -819 C/T (rs1800871) do gene <i>IL-10</i> nos grupos controle e casos (DEN, DSSA e DCSA)	44
Tabela 7 - Distribuição genotípica e alélica do SNP -819 C/T (rs1800871) do gene <i>IL-10</i> nos grupos assintomático (ASS), casos (DEN, DSSA e DCSA) e controle.....	47
Tabela 8 - Distribuição genotípica e alélica do SNP -1082 A/G (rs1800896) do gene <i>IL-10</i> nos grupos controle e casos (DEN, DSSA e DCSA)	49
Tabela 9 - Distribuição genotípica e alélica do SNP -1082 A/G (rs1800896) do gene <i>IL-10</i> nos grupos assintomático (ASS), casos (DEN, DSSA e DCSA) e controle.....	52
Tabela 10 - Distribuição das frequências haplotípicas dos SNPs -819 C/T (rs1800871) e -1082 A/G (rs1800896) do gene <i>IL-10</i> , comparadas entre os grupos controle, DEN, DSSA e DCSA.....	53
Tabela 11 - Distribuição das frequências haplotípicas dos SNPs -819 C/T (rs1800871) e -1082 A/G (rs1800896) do gene <i>IL-10</i> , comparadas entre os grupos assintomático, DEN, DSSA, DCSA e controle.....	54
Tabela 12 - SNP -819 C/T (rs1800871) do gene <i>IL-10</i> e as 18 manifestações clínicas da dengue mais presentes em pacientes do grupo DEN.....	55
Tabela 13 - SNP -1082 A/G (rs1800896) do gene <i>IL-10</i> e as 18 manifestações clínicas da dengue mais presentes em pacientes do grupo DEN.....	56

Tabela 14 - Comparação das frequências alélicas do SNP -819 C/T (rs1800871) do gene <i>IL-10</i> , com base em estudos genômicos de associação realizados na população mundial.....	57
Tabela 15 - Comparação das frequências alélicas do SNP -1082 A/G (rs1800896) do gene <i>IL-10</i> , com base em estudos genômicos de associação realizados na população mundial.....	58

1 INTRODUÇÃO

O *Dengue virus* (DENV) é um vírus envelopado, de genoma constituído por RNA de fita simples com polaridade positiva, e que possui quatro sorotipos virais antigenicamente distintos (DENV 1 - 4), os quais são transmitidos aos seres humanos e a outros hospedeiros vertebrados por meio da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (WILDER-SMITH; SCHWARTZ, 2005). Este vírus é o agente etiológico da dengue, que se caracteriza como uma doença infecciosa febril aguda, de caráter emergente, que causa significativa morbimortalidade em regiões tropicais e subtropicais do mundo (JALILY; PAVANI; NANDESHWAR, 2017; SIERRA et al., 2017).

As infecções causadas pelo DENV possuem um amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde infecções assintomáticas à sintomáticas graves. Segundo a antiga classificação definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), as formas clínicas sintomáticas podem manifestar-se sob duas formas principais: febre da dengue (FD) e febre hemorrágica da dengue (FHD), com ou sem síndrome do choque da dengue (SCD) (WHO, 1997). A nova classificação proposta pela OMS dispõe as infecções sintomáticas em três categorias: dengue sem sinais de alarme (DSSA), dengue com sinais de alarme (DCSA) e dengue severa (DS) ou grave (WHO, 2009).

Diante da heterogeneidade das manifestações clínicas da dengue, diversos estudos apontam a influência da interação entre fatores relacionados ao vírus, ao ambiente e ao hospedeiro na modulação do desenvolvimento da doença e na determinação da sua gravidade. Fatores como sorotipos, genótipos e linhagens do DENV aliados às condições ambientais (distribuição vetorial, competência vetorial e mudanças climáticas) podem moldar a severidade da infecção. Do mesmo modo, as características da resposta imune do hospedeiro (inata e adaptativa) e a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) em genes candidatos são categóricos durante o curso da patologia (COFFEY et al., 2009; WHITEHORN; SIMMONS, 2011; HERRERO et al., 2013).

Evidências epidemiológicas indicam que a resposta imune humana desenvolvida durante a infecção pelo DENV tem se mostrado ser o principal contribuinte na patogênese da doença (ALAGARASU et al., 2015). Citocinas pró- e anti-inflamatórias têm sido identificadas como alvos primordiais no processo que leva a sua progressão (SANTOS et al., 2016). Estudos têm mostrado que polimorfismos em genes de citocinas podem afetar a transcrição genética, modificando os níveis e/ou a funcionalidade desses mediadores e,

consequentemente, contribuir no desfecho da patologia (PEREZ et al., 2010; XAVIER-CARVALHO et al., 2010; FERNANDO et al., 2015).

Os polimorfismos -819 C/T (rs1800871) e -1082 A/G (rs1800896) na região promotora do gene da interleucina 10 (IL-10) caracterizam-se como exemplos de fatores genéticos intrínsecos do hospedeiro, que estando envolvidos com a dinâmica da dengue, podem associar-se à progressão da doença para as suas formas mais graves. Alguns dos estudos realizados com os referidos polimorfismos descreveram que estas variantes se relacionam com a susceptibilidade/predisposição genética à dengue, enquanto outras pesquisas as apontam como fatores de proteção, ou ainda não encontram associação com a doença (FERNANDEZ-MESTRE et al., 2004; MOREIRA et al., 2008; ALAGARASU et al., 2015; SAM et al., 2015; CANSANÇÃO et al., 2016; FEITOSA et al., 2016).

Diante destes resultados discordantes, o presente estudo buscou conhecer a prevalência e a influência dos polimorfismos rs1800871 e rs1800896 em população sintomática, assintomática e controle para dengue da cidade de Parnaíba-PI, a fim de compreender melhor a constituição genotípica do hospedeiro e os efeitos dos polimorfismos sobre a patogênese e modulação dos sintomas clínicos da dengue. Os resultados desta pesquisa poderão contribuir com a elucidação de mecanismos complexos envolvendo a patogênese viral e na identificação de grupos de risco dentro da população em estudo exposta ao vírus. Além disso, poderão auxiliar na procura por marcadores genéticos e imunológicos especialmente em regiões onde as populações se encontram mais susceptíveis à infecção pela arbovirose.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Arboviroses

Arboviroses são doenças causadas por um grupo heterogêneo de vírus, ecologicamente chamados de arbovírus, transmitidos aos seres humanos e a outros animais por meio da picada de fêmeas de vetores artrópodes hematófagos (SOUTO; SOUTO, 2012; LIANG et al., 2015; ALVA-URCIA et al., 2017), tais como mosquitos e carrapatos (PFEFFER; DOBLER, 2010; BICHAUD et al., 2014; ANDRADE et al., 2017). Apresentam distribuição mundial, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais, uma vez que estas oferecem condições propícias para a manutenção do ciclo viral (LOPES et al., 2014).

A multiplicidade dos arbovírus conhecidos foi determinada inicialmente nas regiões tropicais da África e América do Sul, e em menor número na Ásia (GOULD; SALOMON, 2008). Contudo, devido a fatores que vão desde a epidemiologia à genética viral, os quais são influentes na distribuição dos vetores e hospedeiros reservatórios da doença, a expansão geográfica e a constância de surtos epidêmicos por arbovírus aumentou exponencialmente em todo o mundo (GUBLER, 1996; GUBLER, 2001).

A dinâmica das epidemias causadas por arboviroses é multifatorial, refletindo mudanças na genética dos microorganismos, na dinâmica da população de hospedeiros e vetores ou nas condições ambientais antropogênicas. Vários fatores têm sido determinantes para a emergência/reemergência das arboviroses ao longo do tempo, como a evolução viral, a adaptação de vetores, o impacto das mudanças climáticas, a urbanização crescente, a globalização do comércio, o transporte moderno, a deficiência nas medidas de controle de vetores, dentre outros (GOULD; HIGGS, 2009; GUBLER, 2011; REZZA, 2014; DONALISIO et al., 2017; GOULD et al., 2017; MARINHO et al., 2017).

Segundo o catálogo internacional de arbovírus, há mais de 545 espécies registradas, das quais, mais de 150 são associadas a doenças envolvendo seres humanos e animais, sendo a maioria listada como zoonoses (KARABATSOS, 1985; LANCIOTTI, 1999; PFEFFE; DOBLER, 2010). No Brasil, mais de 200 espécies diferentes de arbovírus foram isoladas, com aproximadamente 40 delas podendo causar infecções em humanos de forma esporádica, endêmica e/ou epidêmica (ROSA et al., 1998; VASCONCELOS et al., 2001).

Os arbovírus causadores de doenças em humanos e animais pertencem às famílias virais: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (LOPES et al., 2014; TABACHNICK, 2016). O Brasil, situado em território predominantemente tropical,

apresenta condições ideais para a existência dos vetores da doença e, portanto, para a manutenção e emergência de ciclos das arboviroses (FIGUEIREDO, 2000; FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014). Os principais arbovírus circulantes endêmicos pertencem às famílias *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*) e *Bunyaviridae* (gêneros *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus*) (ZHANG et al., 2003; FIGUEIREDO, 2015).

No gênero *Flavivirus*, estão inclusas espécies de arbovírus causadoras de uma grande variedade de doenças, incluindo febres, encefalites e febres hemorrágicas, destacando-se neste grupo: *Yellow fever virus* (YFV), *Dengue virus* (DENV), *Zika virus* (ZIKV), *West Nile virus* (WNV) e *Saint Louis encefalite virus* (SLEV) (BATISTA et al., 2011; CLETON et al., 2012). Além deste, os arbovírus dos gêneros *Alphavirus* e *Orthobunyavirus*, como as espécies *Chikungunya virus* (CHIKV) e *Mayaro virus* (MAYV), e o *Oropouche virus* (OROV), respectivamente, apresentam grande importância epidemiológica (BRONZONI et al., 2005; CASSEB et al., 2013; FORMENTI, 2015).

2.2 Aspectos Históricos e Perfil Epidemiológico da Dengue no Mundo, no Brasil e no Piauí

A dengue é uma importante arbovirose e grave problema de saúde pública global, sendo endêmica em países do Mediterrâneo Oriental, das Américas, do Sudeste Asiático, e em regiões do Pacífico Ocidental e África, com casos esporádicos ocorrendo e se espalhando para áreas não endêmicas nos Estados Unidos e na Europa (BHATT et al., 2013; GUZMAN et al., 2016).

Nas últimas décadas, a taxa de incidência da doença aumentou rapidamente (mais de 30 vezes nos últimos 50 anos). Cerca de 3,9 bilhões de pessoas vivem em áreas potenciais de risco para a infecção (WHO, 2013) e 390 milhões de casos ocorrem anualmente no mundo (GUZMAN; HARRIS, 2015), sendo 96 milhões de infecções clinicamente aparentes (BHATT, 2013; NEDJADI et al., 2015) e 2 milhões de casos graves (GUZMAN; HARRIS, 2015), com 550 mil hospitalizações e 25 mil mortes anuais (VIANA; IGNOTTI, 2013; LOPES et al., 2014) (Figura 1).

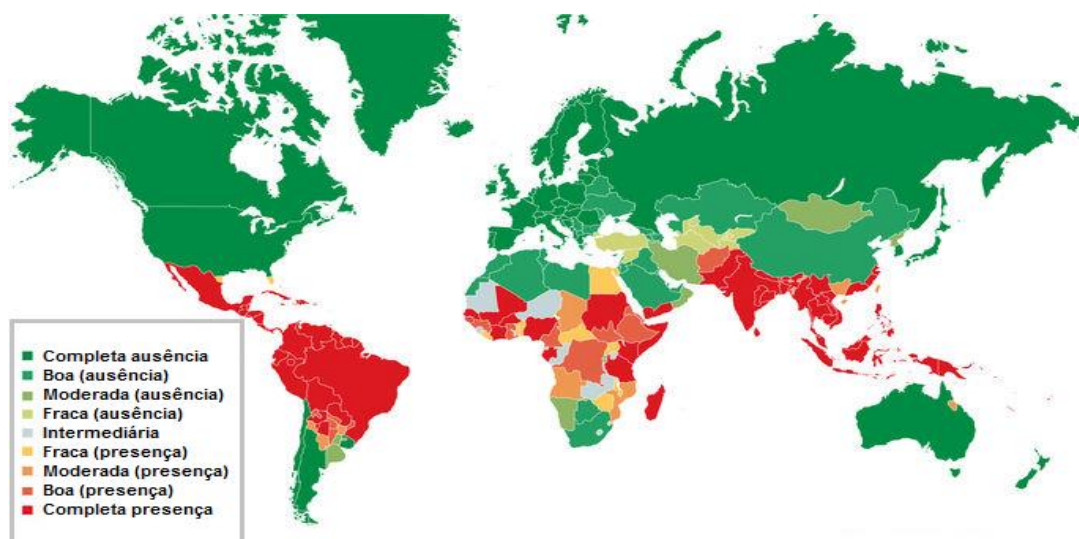


Figura 1 - Risco de diferentes regiões do mundo para a transmissão do *Dengue virus*. As evidências da doença são mostradas na imagem com variação entre completa ausência (verde escuro) e completa presença (vermelho escuro) dos 4 sorotipos da dengue. (Fonte: GUZMAN et al., 2016 - Adaptado).

Grandes epidemias de doença febril ocorreram nos continentes asiático, africano e americano no século XVIII, durante os anos 1779 – 1780. Contudo, o registro mais antigo de uma doença clinicamente compatível com a dengue está em uma enciclopédia chinesa datada de 610 d.C, na qual a doença foi mencionada como “doença da água” associada à insetos voadores (NOBUCHI, 1979; GUZMAN; ISTÚRIS, 2010; MURRAY et al., 2013). Surto epidêmico de doença febril aguda nas Índias Ocidentais (1635) e no Panamá (1699) foram remetidos à dengue, porém sem consenso certo quanto ao real agente etiológico responsável pelos casos (GUBLER, 1997; HALSTEAD, 2008). Em 1779, epidemias foram relatadas na ilha de Java (Jacarta) e em Cairo (Egito), porém também sendo incerta a sua relação com a doença. Apenas no ano seguinte surgiram as ocorrências melhor documentadas sobre a dengue, durante epidemia ocorrida na Filadélfia (1780) (RUSH, 1789; MARTINEZ-TORRES, 1990; GUBLER, 1997; 1998; BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

No decorrer dos três últimos séculos houve o registro de oito pandemias e/ou surtos isolados de dengue ao redor do mundo, tendo duração de três a sete anos, nas Américas, África, Ásia, Europa e Austrália, entre os anos 1779 – 1916 (HOWE, 1997; BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Esta doença foi considerada benigna durante muito tempo. Entretanto, após a Segunda Guerra Mundial, ganhou uma nova visão, devido ao acelerado crescimento urbano e econômico, que levou ao aumento da frequência e magnitude das epidemias,

facilitando a dispersão dos sorotipos da dengue e o surgimento de infecções graves (HALSTEAD, 1980; MARTINEZ-TORRES, 1990; GUBLER, 1997).

No Brasil, a dengue está presente desde 1845, quando a primeira epidemia foi relatada no Estado do Rio de Janeiro (DROLL; SCHNEIDER, 2001). Contudo, as primeiras menções da doença na literatura científica datam do período de 1916-1923, nas cidades de São Paulo e Niterói, respectivamente (MEIRA, 1916; PEDRO, 1923; BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Nos anos seguintes não houve registro de casos da doença, devido ao programa de controle de mosquitos para prevenção da febre amarela urbana, coordenado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), que funcionou com sucesso para manter o Brasil livre do *Aedes aegypti* até 1976 (SIQUEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2013; MARINHO et al., 2017).

A primeira evidência de epidemia da dengue no país confirmada clínica e laboratorialmente foi registrada em 1981, na cidade de Boa Vista, Roraima, e segundo o inquérito sorológico realizado por Osanai e colaboradores (1984), onze mil pessoas foram infectadas pelo vírus nessa ocasião (SIQUEIRA et al., 2005; CÂMARA et al., 2007). Esta ocorrência correspondeu a aproximadamente uma incidência de 22,6%, e foram isolados dois sorotipos do vírus: DENV-1 e DENV-4 (OSANAI et al., 1984). No entanto, essa epidemia foi contida em passo acelerado, uma vez que o vetor da doença, o *Aedes aegypti*, ainda não havia se dispersado por todo o território brasileiro, e o seu combate promoveu a sua eliminação quase que por completo na cidade (DONALÍSIO, 1995).

A dengue reapareceu no Brasil em 1986, no Rio de Janeiro, se tornando um problema de saúde pública de âmbito nacional com a introdução do sorotipo DENV-1 no Estado (NOGUEIRA et al., 2000; DICK et al., 2012). Mais de um milhão de indivíduos foram infectados pelo DENV-1 (TEIXEIRA et al., 2009). A seguir, a virose difundiu-se por vários Estados do país (Ceará, Alagoas, Pernambuco, São Paulo, Bahia e Minas Gerais) (TEIXEIRA et al., 1999; BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Na sequência, um período de dois anos com baixa endemicidade da doença foi observado. Nos anos 1990-1991, a dengue ressurgiu no Rio de Janeiro com o aumento da transmissão do DENV-1 e a introdução do DENV-2, o que promoveu as primeiras ocorrências de dengue hemorrágica, com relatos inclusive de óbitos (TEIXEIRA et al., 1999).

Na década de 1990, nos dois primeiros anos, a dengue permaneceu restrita as cidades dos Estados do Rio de Janeiro, Ceará, Alagoas e Pernambuco, tendo poucas notificações de casos em outros locais. Nos anos seguintes, a circulação dos DENV-1 e -2 e do seu mosquito

transmissor aumentou ligeiramente em outras áreas do território brasileiro, com movimento simultâneo de ambos os sorotipos (TEIXEIRA et al., 2005). Em 2000, a entrada do DENV-3 no país foi confirmada. Este sorotipo foi responsável por causar a epidemia de 2002 no Brasil, onde foram notificados cerca de 800 mil casos da doença (NOGUEIRA et al., 2005) (Figura 2).

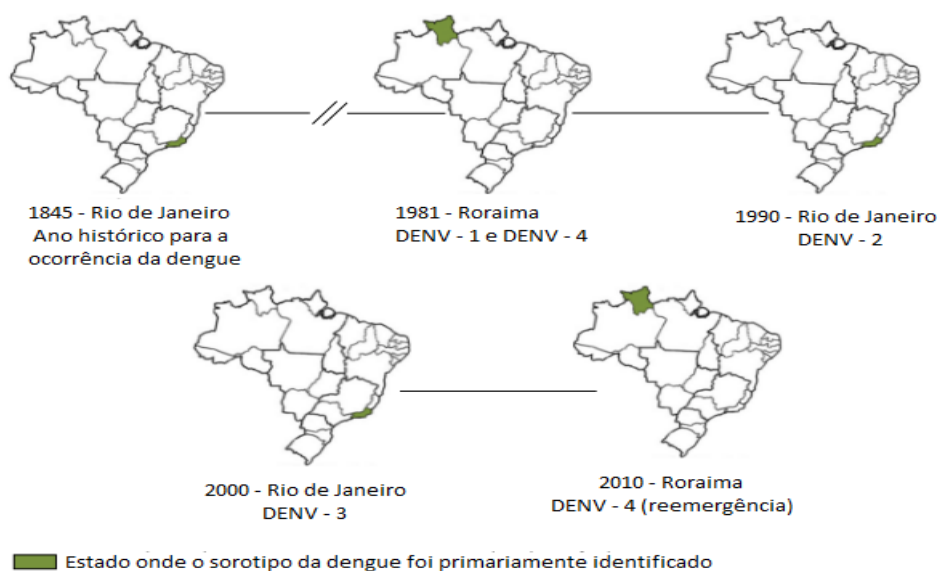


Figura 2 - Introdução dos sorotipos da Dengue no Brasil. (Fonte: FARES et al., 2015 – Adaptado).

Uma queda da incidência de notificação de casos de dengue aconteceu após o ano 2000, retornando à tendência de crescimento em 2005. Em 2008, segundo dados registrados pelo Ministério da Saúde, houve mais de 700 mil casos e mais de 45 mil hospitalizações por dengue (TEIXEIRA et al., 2008). O DENV-4 foi isolado posteriormente de casos da doença nos Estados do Amazonas, Amapá e Pará, São Paulo e Rio de Janeiro (SOUZA et al., 2011).

A região Nordeste do Brasil compõe uma área turística que abrange sete Estados ao longo da costa brasileira e tem sido uma das mais afetadas pela doença, com ocorrência de epidemias anuais. Durante o final da década de 1990, esta região foi responsável pelo maior número de notificações de dengue (NOGUEIRA et al., 2007). No Estado do Piauí, a presença do vetor da doença, o *Aedes Aegypti*, foi determinada em 1986. Os primeiros casos de dengue no Estado foram notificados neste ano, e a primeira epidemia confirmada em 1996. Os primeiros testes de diagnóstico foram realizados a partir do ano 2000, quando foi confirmada a circulação do sorotipo DENV-1. Em 2001, foi detectado o sorotipo DENV-2 (FIGUEIREDO, 1996; MONTEIRO et al., 2009). No ano seguinte, confirmou-se a circulação dos três sorotipos virais: DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (CASTRO et al., 2003).

No Piauí, com base em um levantamento epidemiológico de casos suspeitos de dengue notificados entre os anos de 2006 a 2011, realizado na plataforma do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), observou-se casos de coinfeção viral e uma possível cocirculação dos quatro sorotipos da dengue em 2011, com a introdução do DENV-4 (SANTOS, 2013). Durante os anos de 2011 a 2015, análises experimentais de amostras suspeitas da doença confirmaram a cocirculação dos 4 sorotipos do DENV, refletindo a situação de hiperendemicidade do Estado (VALE, 2015; GARCÊS, 2016). Barros (2018), investigando a dinâmica da circulação dos arbovírus *Dengue virus*, *Chikungunya virus* e *Mayaro virus* entre os anos de 2016 e 2017, detectou os sorotipos DENV-2 e DENV-4, além de caso de coinfeção pelo DENV-1 e CHIKV no Estado.

Segundo dados do Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde, em 2018, até a Semana Epidemiológica (SE) 21 (31/12/2017 a 26/05/2018), foram registrados 149.630 casos prováveis de dengue no Brasil. Destes, 64.341 casos foram confirmados e outros 81.734 casos suspeitos foram descartados. A região Centro-oeste registrou o maior número de casos prováveis (56.676 casos; 37.9%) em relação ao total do país, seguida das regiões Sudeste (46.522 casos; 31.1%), Nordeste (33.473 casos; 22.4%), Norte (10.545 casos; 7.0%) e Sul (2.414 casos; 1.6%). A análise da taxa de incidência de casos prováveis de dengue, segundo regiões geográficas, evidenciou que as regiões Centro-Oeste (357.0 casos/100 mil habitantes) e Norte (58.8 casos/100 mil habitantes) apresentaram as maiores taxas de incidência (BRASIL, 2018).

Ainda no Brasil, em 2018, até a SE 21, foram confirmados 124 casos de DS e 1.336 casos de DCSA. A região Centro-Oeste registrou o maior número de casos confirmados de DS e DCSA, com 59 e 918 casos, respectivamente. Um total de 57 óbitos por dengue foram confirmados. Existem ainda em investigação 356 casos de DS e DCSA e 174 óbitos que podem ser confirmados ou descartados. Conforme o citado boletim, no Piauí foram registrados 1.029 casos prováveis de dengue em 2018, e a taxa de incidência de casos prováveis da doença no Estado foi de 32.0/100 mil habitantes até a SE 21 (BRASIL, 2018).

O Brasil é considerado um país tropical, de clima quente e úmido, com diferenças em suas zonas climáticas e na dinâmica das chuvas em áreas da faixa costeira, o que proporciona um ambiente acolhedor e bastante favorável para a proliferação do mosquito vetor da dengue, o *Aedes aegypti* (FARES et al., 2015). A atividade do DENV ocorre ao longo do ano, porém a maior parte dos surtos e os altos níveis de infestação vetorial exibem um padrão sazonal típico, ocorrido durante a estação chuvosa, entre os meses de dezembro

a maio, os quais são os mais quentes do ano (SIQUEIRA et al., 2005). Diante disto, investimentos contínuos na qualificação das ações de vigilância epidemiológica, virológica e vetorial são necessárias para o estabelecimento de métodos de controle e prevenção da doença no país (LIMA-CAMARA, 2016; DONALISIO et al., 2017).

2.3 Caracterização Molecular do *Dengue virus*

A dengue é uma doença viral infecciosa que possui como agente etiológico o DENV. Este vírus pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, e trata-se de uma partícula esférica de aproximadamente 50 nm de diâmetro - segundo análises por microscopia eletrônica e microscopia de força atômica, com genoma protegido por um nucleocapsídeo proteico (C) de simetria icosaédrica (30 nm), envolto por uma membrana chamada de envelope lipídico. Este envelope ancora proteínas de membrana (M) e do envelope (E) em sua superfície (Figura 3) (LINDENBACH; RICE, 2003; FERREIRA et al., 2008; ALCARAZ-ESTRADA et al., 2010; GUZMAN et al., 2010; LOPES et al., 2014). Tais proteínas formam uma camada externa protetora que controla a entrada do vírus em células humanas (NATURE, 2018).

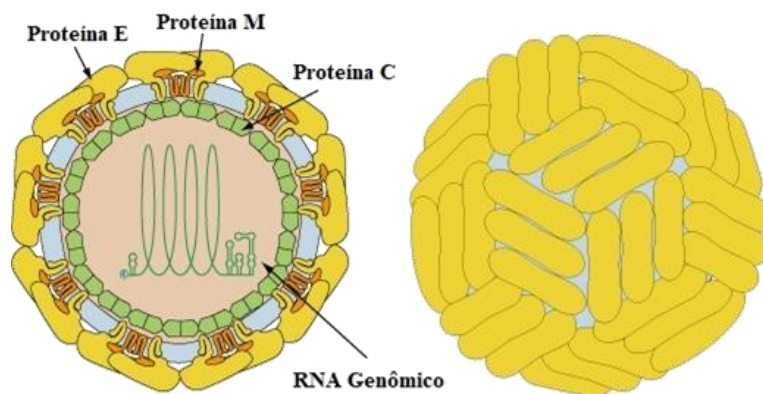


Figura 3 - Estrutura da partícula viral do *Dengue virus*. (Fonte: ViralZone 2016 - Adaptado).

O genoma do vírus é constituído por RNA de fita simples, polaridade positiva, com tamanho de aproximadamente 11 kb. Possui uma única sequência de leitura aberta (ORF, do inglês *Open Reading Frame*), flanqueada por duas regiões não traduzidas (5'UTR/ 3'UTR, do inglês *Untranslated Region*), que contêm os elementos estruturais e funcionais necessários para a replicação e a tradução do genoma. A ORF codifica uma longa poliproteína que, após o seu processamento por proteases celulares e virais, produz dez

proteínas virais maduras. A extremidade N-terminal da poliproteína codifica três proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C), proteína de membrana (M) - que é produzida durante a maturação de partículas virais nascentes a partir de um pequeno fragmento proteolítico da proteína precursora de membrana – prM, e proteína do envelope (E). Seguidamente, codifica sete proteínas não-estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (CHANG, 1997; LINDENBACH; RICE, 2003; ROTHMAN, 2004) (Figura 4).

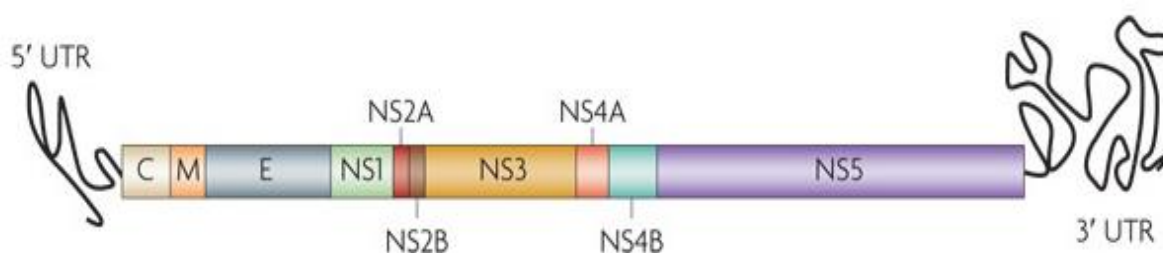


Figura 4 - Organização do genoma do *Dengue virus*. (Fonte: GUZMAN et al., 2010).

A proteína do capsídeo (C), uma proteína altamente básica com afinidade pelo RNA, encontra-se associada ao genoma e é essencial para a montagem dos vírions. A proteína de membrana (M), produzida a partir da proteína precursora de membrana (prM), funciona como chaperona durante a maturação da partícula viral. A proteína de envelope (E) contém a maior parte dos determinantes antigênicos do DENV e tem por função facilitar a entrada viral nas células hospedeiras ligando-se à receptores celulares, além de mediar a fusão das membranas viral e celular (ZHANG et al., 2004; LINDENBACH et al., 2007). As proteínas não-estruturais estão envolvidas com a replicação e morfogênese viral, processos que estão intimamente ligados ao retículo endoplasmático do hospedeiro e a função da via secretora, além de atuar na regulação da transcrição do genoma viral (MACKENZIE et al., 1998; ROSS, 2010; GUZMAN et al., 2016).

2.3.1 Sorotipos e Genótipos

O DENV compreende quatro sorotipos relacionados genética e antígenicamente (1 – 4) (GONÇALVES et al., 2015), com cada um deles agrupados em genótipos e linhagens diferentes, conforme suas variações nucleotídicas. Um provável quinto sorotipo viral (DENV-5) foi descrito recentemente nas florestas do Sudeste Asiático, o qual foi associado a quadros severos da doença em humanos (VASILAKIS, 2013; MUSTAFA et al., 2015;

POZZETTO et al., 2015). Tais sorotipos apresentam cerca de 65-70% de sequências homólogas (GREEN; ROTHMAN, 2006). Essa ampla variabilidade genética tem implicações na aptidão diferencial dos vírus e na sua virulência, no agravamento da doença (progressão da viremia), na variedade de manifestações clínicas, e no aparecimento de epidemias e/ou surtos (GUZMAN; KOURI, 2002; FRIED et al., 2010; OHAINLE et al., 2011).

Os sorotipos do DENV possuem, cada um, de cinco a seis genótipos reconhecidos (YAMASHITA et al., 2013). O DENV-1 é composto por cinco genótipos (I-V), com evidência de apenas o genótipo V circulando no Brasil (GONCALVEZ et al., 2002; SANTOS et al., 2002; CARNEIRO et al., 2012). O DENV-2 possui 6 genótipos delineados (asiático-americano, asiático I, asiático II, cosmopolita, silvestre e americano), sendo o asiático-americano o que circula no país (AÑEZ et al., 2011; FARIA et al., 2012; SIM; HIBBERD, 2016). O DENV-3 apresenta cinco genótipos (I-V), com o III circulando no país (LANCIOTTI et al., 1994; WITTKE et al., 2002). E o DENV-4 apresenta cinco genótipos (I, IIA, IIB, III e silvestre), com o II circulando no país (LANCIOTTI; GUBLER; TRENT, 1997; ABUBAKAR; WONG; CHAN, 2002).

2.4 Vetor e Ciclo de Transmissão Viral

Os mosquitos do gênero *Aedes* (subgênero *Stegomyia*) são os transmissores da dengue, sendo o *A. aegypti* o principal vetor da doença no mundo e no Brasil (LUPI et al., 2007). O *A. aegypti* é encontrado em grande quantidade nos locais de risco para a doença, povoando áreas geograficamente diversas (SINGHI et al., 2007). O vetor é adaptado ao ambiente peridoméstico, onde se alimenta do sangue de seres humanos e animais domésticos, e põe ovos em uma variedade de recipientes de retenção natural e artificial de água (FARES et al., 2015). Além deste, outras espécies de mosquitos podem atuar como vetores para a doença: *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes scutellaris* (GUBLER, 1997; MARTINS et al., 2012).

O DENV possui dois ciclos de transmissão: um silvestre e outro urbano. O primeiro envolve primatas não humanos e mosquitos *Aedes* nas florestas tropicais da Ásia e da África (GUBLER, 1998; 2014). Embora esse ciclo ainda exista, sua relevância para a saúde pública ainda é duvidosa. O segundo ciclo constitui-se o principal, envolvendo seres humanos e

mosquitos, nos grandes centros urbanos tropicais (LOPES et al., 2014; GUZMAN et al., 2016).

No ciclo urbano (Figura 5), a transmissão do DENV se dá por meio da picada do mosquito fêmea infectado, após este se alimentar do sangue de indivíduos que se encontram na fase febril aguda da doença (fase virêmica). Durante o período de incubação extrínseco (8-10 dias), o vírus inicialmente infecta as células do intestino médio do mosquito e, posteriormente, dissemina-se para outros tecidos, infectando as glândulas salivares 5-12 dias mais tarde. Uma vez infectadas, o mosquito se encontra apto a transmitir o vírus durante o resto de sua vida (WHO, 2002). Após o indivíduo ser picado pelo inseto, inicia-se o período de incubação intrínseca, que dura em média de 3-14 dias, e logo mais os sinais clínicos e sintomas da doença começam a aparecer (SILER et al., 1926; GUBLER, 2014; LOUIS et al., 2014; TUKASAN et al., 2017). A transmissão vertical, na qual o mosquito transmite o vírus através dos ovos para a sua prole, pode ocorrer. Porém, a importância deste modo de transmissão é duvidosa (GUBLER, 2014; GUZMAN et al., 2016).

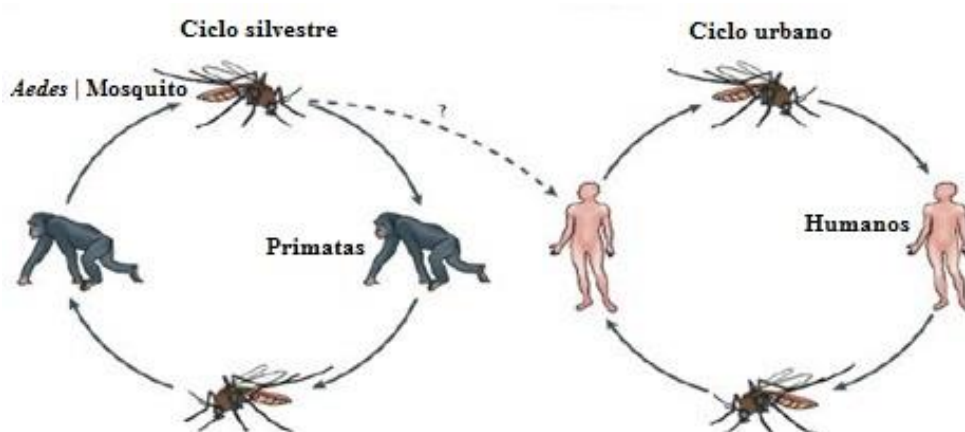


Figura 5 - Ciclos de transmissão do *Dengue virus*. (Fonte: WHITEHEAD et al., 2007 - Adaptado).

2.5 Ciclo de Multiplicação Viral

Após o vírus ser introduzido no hospedeiro humano, a sua ligação e penetração nas células alvo ocorre por endocitose mediada por receptores de superfície celular para proteínas do envelope viral. O vírus se liga com maior frequência às células dendríticas (DCs, do inglês *Dendritic Cells*), e utiliza a molécula não integrina captora da molécula de adesão intracelular 3 específica de células dendríticas (DC-SIGN, do inglês *Dendritic-Cell-Specific ICAM3-Grabbing No-integrin*) como principal receptor, que é expressa na superfície das DCs (PASTORINO et al., 2010; DIAMOND; PIERSON, 2015).

Após o vírus ser internalizado por endocitose, as partículas virais transitam para o endossomo, onde o ambiente ácido desencadeia grandes alterações estruturais importantes na proteína E, que induzem a fusão da membrana celular viral e hospedeira. Posteriormente à fusão, o nucleocapsídeo é liberado para o citoplasma, o RNA viral se dissocia, e então é iniciada a replicação do genoma viral e a montagem das partículas virais (KIMURA; OHYAMA, 1988; PASTORINO et al., 2010; FLIPSE; WISCHUT; SMIT, 2013) (Figura 6).

O RNA viral é traduzido em associação com membranas do retículo endoplasmático. Iniciado o processo de tradução do genoma viral, ocorre a síntese de um genoma de sentido negativo (3'-5') intermediário, o qual irá servir como molde para a síntese de múltiplas cópias de RNA viral de sentido positivo (5'-3'). Ciclos consecutivos de tradução produzem cópias das proteínas estruturais e não estruturais (CHAMBERS et al., 1990; PASTORINO et al., 2010; DIAMOND; PIERSON, 2015).

Após a multiplicação viral, partículas imaturas são formadas no lúmen do retículo endoplasmático. Essas partículas contêm proteínas E, prM, membrana lipídica e nucleocapsídeo, e não podem induzir a fusão da célula hospedeira, o que as torna não infecciosas. Elas são transportadas pela via secretória do complexo de Golgi, onde a prM é clivada por uma protease do hospedeiro, adotando a sua forma madura (M). A clivagem ocorre na rede trans-Golgi e é importante para o potencial de infectividade do vírus, onde cria partículas maduras e infecciosas. Estas são liberadas da célula hospedeira por exocitose, e já podem infectar outras células (MUKHOPADHYAY; KUHN, ROSSMANN, 2005; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; PASTORINO et al., 2010; DIAMOND, PIERSON, 2015).

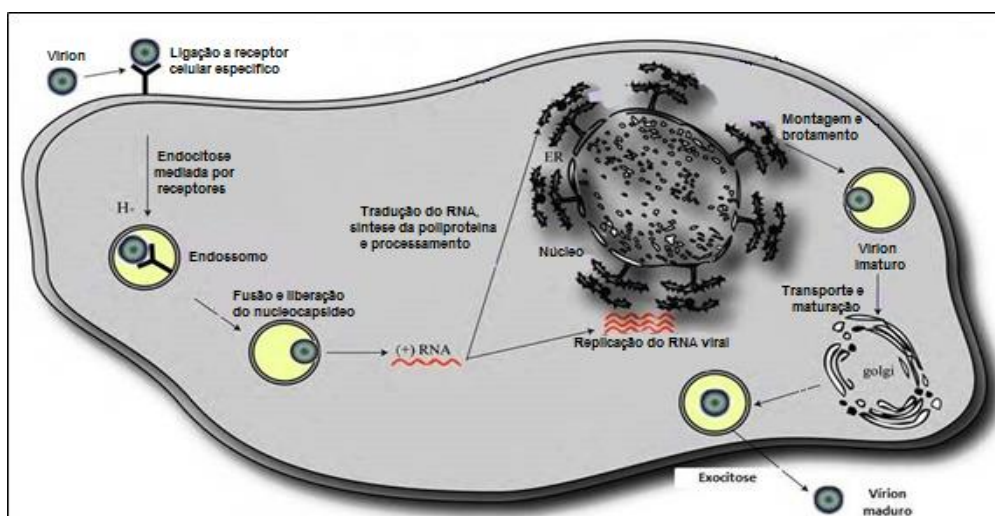


Figura 6 - Ciclo de multiplicação do *Dengue virus*. (Fonte: PASTORINO et al., 2010 – Adaptado).

2.6 Imunopatogênese da Dengue

Durante o repasto sanguíneo dos mosquitos em humanos, o vírus é inoculado na corrente sanguínea, com transbordamento para a epiderme e a derme, o que resulta na infecção de células do sistema imune, como as células de Langerhans, as células dendríticas intersticiais e as células fagocíticas mononucleares (LIBRATY et al., 2001; LIMON-FLORES et al., 2005; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; GUZMAN et al., 2016; CASTILLO-MACÍAS et al., 2017). Tais células se deslocam do seu sítio inicial para os vasos linfáticos, e culminam com o recrutamento de macrófagos e monócitos para conter a infecção, mas estes acabam tornando-se alvos do DENV (TAVARES; MARINHO, 2005). Com isto, a infecção é ampliada e ocorre sua disseminação por todo o sistema linfático, atingindo células da linhagem mononuclear, além de células do baço, da medula óssea, hepatócitos e fibroblastos (MALAVIGE; FERNANDO et al., 2004; BOONNAK et al., 2008).

A resposta imune inata do hospedeiro constitui a primeira linha de defesa contra a invasão pelo DENV, e acredita-se que esta seja responsável por articular o resultado da infecção (HERRERO et al., 2013). Os seus componentes [células *natural killer* (NK), mastócitos, células fagocíticas – monócitos, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas] estão intimamente relacionados com a resposta inflamatória desencadeada durante a doença (NAVARRO-SANCHEZ et al., 2005; HERRERO et al., 2013). A imunidade adaptativa do hospedeiro exerce um papel fundamental na resposta imune ao vírus, provendo proteção mediada por anticorpos dirigidos contra a proteína E viral, e ainda com a depuração viral por linfócitos T (MURPHY; WHITEHEAD, 2011). No entanto, esta última imunidade pode contribuir também com o desenvolvimento das formas graves da doença, devido à potencialização da infecção viral mediada por anticorpos ou à produção de citocinas, pelas respostas mediadas por linfócitos T (*T helper* – Th1 e Th2) (MATHEW; ROTHMAN, 2008).

O surgimento dos sintomas mais comuns da dengue no hospedeiro humano, como febre e mal-estar, ocorre após um período de incubação de 2-7 dias, concomitante à fase virêmica da doença. Tais sintomas se relacionam com altos níveis de citocinas pró-inflamatórias liberadas por macrófagos, quando estes interagem com linfócitos T *helper* ativados (FIGUEIREDO, 1999). Nesta fase, são detectados vários marcadores associados à ativação de linfócitos, macrófagos e células dendríticas, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ), interferon-alfa (IFN- α), interleucina-2 (IL-2),

interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-8 (IL-8), dentre outros (GREEN et al., 1989; FIGUEIREDO, 1999; NAVARRO-SANCHEZ et al., 2005; KURANE, 2007).

A resposta imunológica desencadeada pelo indivíduo infectado pode leva-lo à cura ou progredir, induzindo à forma grave da doença (LIBRATY et al., 2002; ROTHMAN, 2011). Apesar dos numerosos estudos realizados ao longo de várias décadas, a patogênese da dengue grave ainda não se encontra inteiramente compreendida (CHATURVEDI et al., 2006; CLYDE et al., 2006). Supõem-se que a sua base seja multifatorial, sendo determinada pela interação de fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro, além de fatores virais, epidemiológicos e condições ecológicas (GREEN; ROTHMAN, 2006; MARTINA, 2009; PEREZ et al., 2010; RICO-HESSE, 2010; ROTHMAN, 2011) (Figura 7).

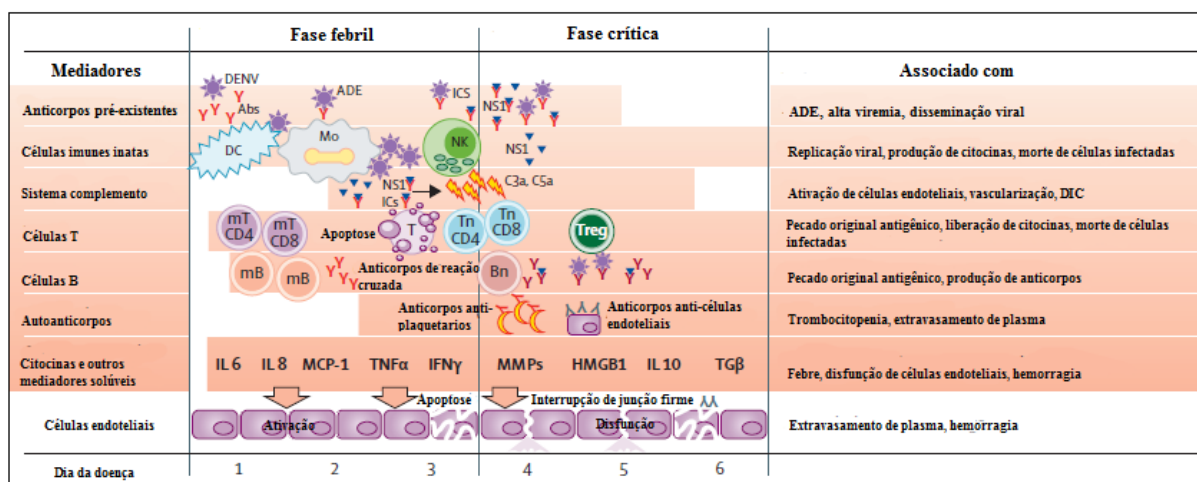


Figura 7: Patogênese da dengue, de acordo com a fase da doença. Mecanismos possivelmente relacionados: anticorpos pré-existent, infecção e ativação de células do sistema imune humano, células T e B, produção de auto-anticorpos, citocinas e outros mediadores solúveis. DENV = vírus da dengue. Abs = anticorpos. ADE = aumento dependente de anticorpos. Ics = imunocomplexos. DC = células dendríticas. Mo = monócitos/macrófagos. NS1 = proteína NS1. mT = células T de memória. Tn = células T naive. Treg = células T reguladoras. mB = células B de memória. Bn = células B naive. DIC = coagulação intravascular disseminada. (Fonte: GUZMAN; HARRIS, 2014 - Adaptado).

Diferenças nas respostas de anticorpos, citocinas e células T contribuem para o desenvolvimento da dengue em sua forma grave (MALAVIGE et al., 2004). As interações entre as células apresentadoras de antígenos e os linfócitos T desencadeiam respostas adaptativas e também a permanência de células T de memória, envolvidas no extravasamento de plasma (MCBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000). A ativação das células T de memória leva ao acionamento da cascata de citocinas e a liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias, onde o efeito sinérgico destas no endotélio pode facilitar o

extravasamento de plasma (STEPHENSON, 2005; OLIVEIRA, 2011; WHITEHORN; SIMMONS, 2011).

Em resposta à infecção por dengue, a produção potente de mediadores inflamatórios é crucial para iniciar a depuração viral rápida, reduzindo assim a infecção e a progressão da doença. Contudo, a inflamação excessiva e persistente pode contribuir com o agravamento da doença (GARCIA et al., 2010; FAGUNDES et al., 2011). A secreção maciça de citocinas correlaciona-se positivamente com os sintomas sistêmicos da dengue, que inclui disfunção hepática, trombocitopenia, hipotensão e choque hemorrágico (GARCIA et al., 2010).

No período de defervescência da dengue – quando o extravasamento de plasma é evidente, níveis altos de produtos resultantes da ativação do sistema complemento (C3a e C5a) são detectados no plasma (WHITEHORN; SIMMONS, 2011; WAN et al., 2013; GUZMAN; HARRIS, 2014). A proteína NS1 (Do inglês, *Nonstructural Protein 1*) é importante para a ativação desse sistema (AVIRUTNAN et al., 2006). Altos níveis desta proteína, secretada por células infectadas pelo DENV, juntamente com a presença de anticorpos pré-existentes, podem desencadear a ativação do sistema complemento, e a ocorrência desta ativação na superfície do endotélio acentua a infecção, estimulando a produção de citocinas inflamatórias associadas à FHD/SCD, e desencadeia efeitos locais e sistêmicos envolvidos no processo de coagulação intravascular (GUZMAN; KOURI, 2002; KURANE, 2007; WHITEHORN; SIMMONS, 2011).

Embora controversos, os auto-anticorpos que resultam em disfunção das células plaquetárias e endoteliais podem estar envolvidos na patogênese da FHD/SCD. Os anticorpos dirigidos contra alguns epítomos da proteína E viral podem se ligar ao plasminogênio humano e inibir a atividade da plasmina (GUZMAN; HARRIS, 2014). Os anticorpos anti-NS1 relacionam-se com a gravidade da doença e a reação cruzada de anticorpos anti-NS1 com células hepáticas, endoteliais e plaquetas parecem estar implicados no processo de indução à apoptose de tais células (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS; 2009; WAN et al., 2013).

Acredita-se que a hipótese mais relevante relacionada à gênese da dengue grave seja a proposta por Halstead (1970), conhecida por potencialização mediada por anticorpos ou ADE (Do inglês, *Antibody-dependent Enhancement*) (Figura 8). Nesta, os anticorpos de um indivíduo previamente infectado por um sorotipo do DENV não neutralizam o sorotipo heterólogo em uma infecção secundária, o que acaba formando um complexo antígeno-anticorpo, exacerbando a infecção, por facilitar a penetração viral especialmente em

macrófagos e monócitos. Os vírus utilizam a porção Fc dos anticorpos para se ligarem às células que possuem receptores gama para fragmento cristalizável (FcγR), resultando em um número aumentado de alvos de infecção para o DENV. Este evento leva a um aumento na viremia e estimula a produção de mediadores inflamatórios, com consequente aumento da permeabilidade vascular e gravidade da dengue (HALSTEAD, 1970; LITTAUA et al., 1990; DEJNIRATTISAI et al., 2010; GUZMAN; LUPI et al., 2007; VAZQUEZ, 2010; WHITEHORN; SIMMONS, 2011).

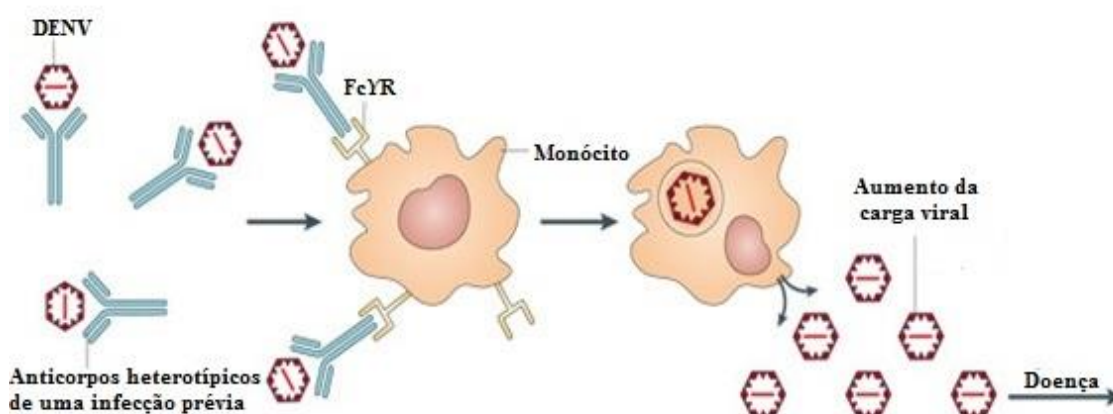


Figura 8 - Potencialização mediada por anticorpos. (Fonte: WHITEHEAD et al., 2007 - Adaptado).

A teoria ADE por si só não é capaz de elucidar todos os fatores ligados às manifestações da dengue grave, uma vez que indivíduos com infecção primária também podem evoluir para quadros clínicos graves, e apenas uma parcela da população infectada pelo DENV durante uma infecção secundária desenvolve quadros graves da doença (SCOTT et al., 1976; WATTS et al., 1999).

Uma outra explicação para a ocorrência da dengue grave é dada pelo modelo conhecido como Teoria do Pecado Antigênico Original, com a participação de linfócitos T de memória ativados em infecções secundárias por sorotipos heterólogos. Durante uma infecção primária, ocorre expansão clonal de populações de células T com maior afinidade pelos epítomos presentes no sorotipo infectante, originando células de memória para esse sorotipo. Quando ocorre uma infecção secundária, por outro sorotipo, as células T de memória geradas na infecção primária são ativadas e se expandem de forma mais rápida do que as específicas para o sorotipo infectante em questão. Estas células possuem afinidade baixa para o sorotipo infectante, sendo ineficientes para eliminação viral. Contudo, liberam

citocinas inflamatórias de forma alterada, o que acaba por aumentar a viremia e contribuir com a gravidade da doença (MONGKOLSAPAYA et al., 2003; MARTINA et al., 2009).

A teoria mais aceita atualmente é denominada de Teoria Integral de Multicausalidade, proposta por pesquisadores cubanos. Esta teoria sustenta a ideia de que a dengue grave esteja relacionada à vários fatores de risco. Fatores do hospedeiro (idade, gênero, raça, estado nutricional, presença de anticorpos, magnitude da resposta imune à infecções anteriores, enfermidades crônicas), aliados à fatores epidemiológicos (população susceptível, cocirculação de sorotipos, elevada densidade do vetor da doença, presença de vetor eficiente, intervalo de tempo entre as infecções por sorotipos heterólogos) e fatores virais (sorotipos circulantes e virulência da cepa viral) amplificam as condições para a ocorrência da gravidade da dengue (PALACIOS SERRANO; VARGAS CABALLERO; AGUIRRE PORTUONDO, 2001; GUZMAN; KOURI, 2002).

2.7 Aspectos Clínicos e Classificação da doença

A dengue é uma doença dinâmica que pode culminar em uma ampla gama de manifestações clínicas, que variam desde formas assintomáticas até quadros severos com choque, disfunção orgânica e sangramento expressivo (ROSS, 2010; VERDEAL et al., 2011). O curso da patologia apresenta três fases de evolução: febril, crítica e de recuperação (WHO, 2009; KALAYANAROOJ, 2011; GUZMAN et al., 2016).

A fase febril ou aguda tem início após um período de incubação de 4-10 dias e possui duração de 2-7 dias, sendo caracterizada por febre alta, cefaleia, mialgia, artralgia, anorexia, náusea, vômitos, letargia, exantemas, dor retroorbitária, dentre outros sintomas. A fase crítica tem duração de 1-3 dias e coincide com a defervescência febril e resolução da viremia, sendo caracterizada por vazamento plasmático nas cavidades abdominal e pleural, que se não tratado, pode evoluir para quadro de choque. A fase de recuperação tem duração de 1-3 dias. Nesta, há uma melhora progressiva da disfunção endotelial, onde o estado hemodinâmico do paciente estabiliza-se com a reabsorção de fluido extravasado. Nesta fase, a administração de líquidos deve ser cuidadosamente ponderada, a fim de evitar o desenvolvimento de ascite, insuficiência cardíaca congestiva, edema pulmonar e dificuldade respiratória pelo paciente (VERDEAL et al., 2011; CHAN; OOI, 2015; GUZMAN et al., 2015; PATTERSON et al., 2016).

A OMS publicou em 1975 e atualizou em 1997 a base para a classificação das formas clínicas da dengue, as quais estas foram agrupadas de acordo com suas formas assintomáticas ou sintomáticas, variando de uma síndrome viral não-diferenciada até FD ou FHD, com ou sem SCD, podendo levar o paciente a óbito (WHO, 1997). Contudo, a OMS, com o seu Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais, publicou novas diretrizes para a dengue em 2009, adotando um novo sistema de classificação desenvolvido com base em um estudo multicêntrico (DENCO) envolvendo países endêmicos para a doença. Este estudo foi projetado para avaliar as limitações da tradicional categorização de 1997, que dentre elas destacava-se a perda de um número considerável de casos graves (WHO, 2009; BASUKI et al., 2010; ALEXANDER et al., 2011; HORSTICK et al., 2015).

As infecções por DENV sintomáticas passaram a ser agrupadas em três categorias de acordo com o nível de gravidade da doença: DSSA, DCSA e DS ou grave. Este novo esquema de classificação teve a finalidade de facilitar a triagem e o manejo clínico dos pacientes, induzindo à melhoria na qualidade da vigilância e na coleta de dados epidemiológicos em termos globais (WHO, 2009; BARNIOL et al., 2011; HADINEGORO, 2012; CAVALCANTI et al., 2014; BRASIL, 2016; JAENISCH et al., 2016).

A DSSA é classificada por uma combinação de febre ($> 38^{\circ} \text{C}$), usualmente entre 2 e 7 dias, com dois ou mais dos seguintes sinais e sintomas: náuseas, vômitos, exantema, mialgias, artralgia, cefaleia, dor retroorbital, petéquias ou prova do laço positiva, e leucopenia (BRASIL, 2016).

A DCSA é todo caso que apresente os sintomas anteriores e, no período de defervescência da febre, apresente um ou mais dos seguintes sinais de alarme: dor abdominal intensa e contínua ou dor na palpação do abdômen, vômitos persistentes, acúmulo de líquidos (ascites, derrame pleural, derrame pericárdico), sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, hipotensão postural, hepatomegalia e aumento progressivo do hematócrito com rápida trombocitopenia (BRASIL, 2016).

Por sua vez, a DS ou grave é todo caso que compreenda qualquer um dos seguintes sinais: choque (em decorrência do extravasamento de plasma), acúmulo de líquidos com insuficiência respiratória, sangramento grave e sinais de comprometimento grave de órgãos (BRASIL, 2016).

2.8 Diagnóstico Laboratorial

A confirmação laboratorial da infecção por dengue é crucial, pois o amplo espectro de manifestações clínicas que esta doença apresenta pode dificultar o seu diagnóstico preciso (GUZMAN et al., 2010). Dessa forma, o diagnóstico laboratorial possui relevância para o manejo clínico do paciente, vigilância epidemiológica e pesquisa científica (PEELING et al., 2010; SAN MARTÍN et al., 2010). Atualmente, o diagnóstico da dengue baseia-se nas seguintes metodologias: isolamento viral, métodos moleculares e/ou métodos sorológicos (GUBLER, 1998; GUZMAN; KOURI, 2004; MARTÍNEZ TORRES, 2008; WHO; 2009). A escolha da técnica depende do momento da colheita da amostra e da finalidade do teste (GUZMAN; HARRIS, 2015).

Os métodos diretos baseiam-se na identificação precoce, precisa e específica de infecções por dengue durante a fase aguda da doença. O vírus ou os seus componentes (RNA ou antígenos) podem ser detectados no soro, plasma, sangue total e tecidos infectados de 0 a 7 dias após o início dos sintomas, o que condiz aproximadamente ao período de duração da febre. Já os métodos indiretos baseiam-se nos diferentes padrões de respostas de anticorpos observados em pacientes apresentando infecção primária ou secundária de dengue (PEELING et al., 2010) (Figura 9).

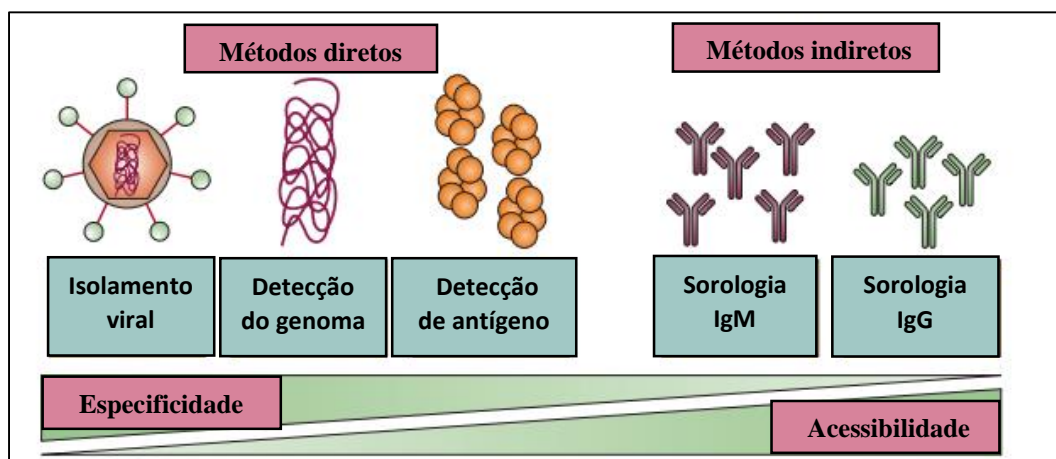


Figura 9 - Métodos de diagnóstico para Dengue. (Fonte: PEELING et al., 2010 - Adaptado).

A viremia pelo DENV é detectável 1-2 dias antes do início da febre e perdura por mais 5-6 dias. Ao longo deste período, o vírus, o seu RNA viral e a proteína NS1 podem ser detectados no sangue, soro e plasma do paciente, e também em tecidos de casos fatais (GUZMAN et al., 2016). Sendo assim, nesse ínterim de tempo, utilizam-se métodos diretos

para o diagnóstico da infecção (isolamento viral, detecção do genoma ou antígenos virais, como o NS1).

Após 5 ou mais dias da doença, a imunoglobulina M (IgM) pode ser detectada na maioria dos indivíduos infectados, e a imunoglobulina G (IgG) pode ser detectada de 10 a 15 dias nas infecções primárias. Nas infecções secundárias, a IgM aparece mais cedo ou no mesmo período de tempo, mas comumente em títulos mais baixos do que na infecção primária. Já a IgG que estava presente na infecção primária tem seu título aumentado rapidamente. Sendo assim, nesse curso de tempo, utilizam-se métodos indiretos para o diagnóstico da infecção (detecção de anticorpos IgM e IgG anti-dengue) (VAUGHN et al., 2000; PEELING et al., 2010) (Figura 10).

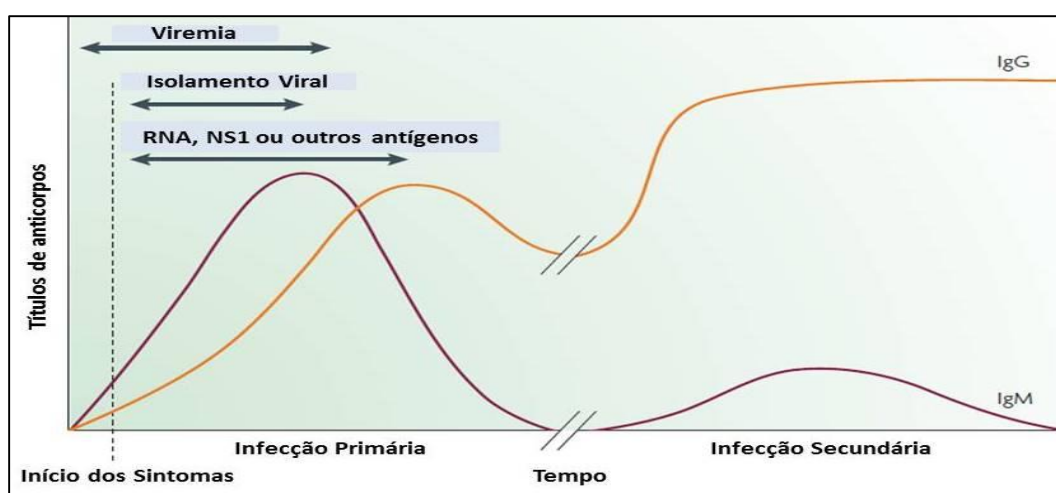


Figura 10 - Marcadores de diagnóstico para infecções pelo *Dengue virus*. (Fonte: PEELING et al., 2010 - Adaptado).

A técnica de isolamento viral, considerada o método padrão ouro para o diagnóstico convencional da dengue, é realizada por meio da inoculação de amostras biológicas (soro, plasma, leucócitos, sangue total e tecidos) de pacientes, coletadas até 5 dias após o início da febre, em cultura de células (empregando linhagens celulares de mosquitos ou mamíferos) ou inoculação intracerebral em camundongos (PEELING et al., 2010; PINHO, 2013). A linhagem celular C6/36 do mosquito *A. albopictus* é o método de escolha para o isolamento do DENV, porém células de mamíferos tais como *Vero*, LLC-MK2 ou BHK-21 podem ser utilizadas, embora ofereçam menor sensibilidade que a primeira (SINGH; PAUL, 1968; KUBERSKI; ROSEN, 1997). A identificação do sorotipo do vírus é feita por meio de ensaios de imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais sorotipo-específicos (*mAbs*) (GUBLER et al., 1984; GUZMAN et al., 2010; PEELING et al., 2010). Este método,

apesar de apresentar alta sensibilidade e especificidade, não é comumente utilizada no diagnóstico de rotina pelos laboratórios, uma vez que apresenta limitações: demora para obtenção do resultado (em média 7 dias), requer amostras da fase aguda da doença (1-5 dias), profissionais qualificados e instalações de alto custo (CHUA et al., 2011; TELES, 2011).

O genoma viral do DENV pode ser detectado por meio de testes de amplificação do ácido nucleico na fase aguda da doença, em amostras como soro, plasma, sangue total e tecidos (PEELING et al., 2010). A tecnologia de *Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase* (RT-PCR) tem sido amplamente utilizada para este fim, e possui capacidade também para realizar a tipagem do vírus (LANCIOTTI et al., 1992). Há muitos ensaios de RT-PCR que se dirigem a genes diferentes (*C/prM*, *E* e *NS5*, por exemplo) e utilizam procedimentos de amplificação distintos (MORITA et al., 1991; LANCIOTTI et al., 1992; BRONZONI et al., 2005; CHAO, DAVIS, CHANG, 2007; ROCHA et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2014). Esta metodologia é rápida, fornecendo resultados dentro de 1-2 dias, e possui alta sensibilidade e especificidade diagnóstica (GUZMAN; HARRIS, 2014).

O antígeno NS1 é uma proteína não estrutural do DENV (SMITH; WRIGHT, 1985) que está presente em altas concentrações no soro de indivíduos infectados com o vírus, podendo ser detectado até nove dias após o início da doença, por meio de ensaios imunoenzimáticos ou imunocromatográficos (DUSSART et al., 2006; SHU et al., 2009). A captura deste antígeno destaca-se como ferramenta diagnóstica pelo fato de detectar o vírus precocemente (fase aguda da doença) e de forma rápida. No entanto, com o uso desta técnica há a possibilidade de interferência de imunocomplexos vírus-anticorpo (IgG) pré-existentes com o antígeno NS1 na fase aguda de infecções secundárias (PEELING et al., 2010; MULLER; YOUNG, 2013).

Os testes sorológicos são mais usualmente utilizados na rotina laboratorial para diagnosticar as infecções por dengue, em virtude de sua facilidade de manipulação e por serem relativamente baratos (GUZMAN et al., 2010). As técnicas atualmente disponíveis são: inibição da hemaglutinação (HI, do inglês *Haemagglutination Inhibition*), fixação do complemento (CF, do inglês *Complement Fixation*), teste de neutralização (TN) e ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (BRASIL, 2005). Contudo, o ELISA, usado para detecção de anticorpos IgM e/ou IgG anti-DENV tem se destacado pela sua notável sensibilidade, especificidade, simplicidade e viabilidade para automação (TANG; OOI, 2012).

Há ainda, os testes inespecíficos utilizados de maneira complementar no diagnóstico laboratorial da dengue. São eles: hemograma, velocidade de hemossedimentação (VHS), dosagem de fibrinogênio, tempo de tromboplastina parcial (TTP), tempo de protrombina (TP), dosagem do complemento C3, dosagem de proteínas totais e frações, ureia, creatinina, eletrólitos (sódio, potássio e cloro), transaminases (ALT e AST), proteína C-reativa (PCR) e gasometria (XAVIER et al., 2014).

2.9 Influência de Fatores na Susceptibilidade à Infecção pelo *Dengue virus*

A razão pela qual apenas alguns indivíduos infectados pelo vírus progridem para as formas mais graves da dengue, enquanto outros desenvolvem uma forma leve ou permanecem assintomáticos se deve às interações complexas entre fatores virais, ambientais e do hospedeiro humano (WHO, 2016; XAVIER et al., 2017). Tais observações foram baseadas em estudos epidemiológicos, dados laboratoriais e experimentais. Estudos de associação genética sem considerar esses fatores podem levar a falsas associações (COFFEY et al., 2009; SRIKIATKHACHORN; GREEN, 2010; BACK; LUNDKVIST, 2013; HERRERO et al., 2013).

2.9.1 Fatores Inerentes ao Vírus

O DENV possui sorotipos que dispõem de uma variedade de genótipos e linhagens, os quais exibem grande diversidade genética entre si. Os genótipos apresentam diferentes níveis de virulência, onde alguns são mais virulentos e possuem maior potencial epidêmico, causando mais doença (RICO-HESSE et al., 1997; FRIED et al., 2010; BACK; LUNDKVIST, 2013; SIM; HIBBERD, 2016). As proteínas estruturais e não estruturais do vírus também constituem um fator determinante de susceptibilidade viral, uma vez que estimulam a resposta humana de anticorpos durante a infecção, potencializando-a (HERRERO et al., 2013; CEDILLO-BARRÓN et al., 2014). Somado a isto, a estrutura do vírion, a sequência de infecções por diferentes sorotipos virais e os intervalos longos entre elas têm sido associados com uma predisposição humana à doença, bem como associam-se a sua severidade (DEJNIRATTISAI et al., 2010; SIERRA et al., 2010; ALAGARASU et al., 2012).

2.9.2 Fatores Inerentes ao Ambiente

A transmissão do DENV depende diretamente da competência vetorial dos seus mosquitos transmissores do gênero *Aedes*. Em geral, o *A. aegypti* é menos suscetível à infecção viral do que o *A. albopictus*, e essa diferenciação entre espécies pode atuar como um mecanismo de seleção para estirpes mais virulentas do DENV. Conseqüentemente, uma menor susceptibilidade passa a exigir uma maior carga viral no hospedeiro humano para a infecção do mosquito (BACK; LUNDKVIST, 2013). Os mosquitos apresentam ecologia, comportamento, distribuição geográfica e aptidão vetorial específica para dengue. Cada um desses fatores pode influenciar o papel de determinada espécie na transmissão e disseminação da doença (WHO, 2009; PAUPY et al., 2010; HERRERO et al., 2013).

A propagação viral é reflexo da ampla distribuição geográfica dos vetores. O mosquito *A. aegypti* é bem adaptado ao ambiente urbano e caracteriza-se como um vetor altamente competitivo devido à sua natureza antropofílica. Assim, a avaliação de fatores como a densidade dos mosquitos, competência e distribuição vetorial, condições climáticas e condições de moradias constituem parâmetros críticos e importantes que devem ser avaliados para um melhor entendimento das epidemias de dengue anuais (COFFEY et al., 2009; BACK; LUNDKVIST, 2013).

2.9.3 Fatores Inerentes ao Hospedeiro Humano

Além da influência de determinantes genéticos virais e ambientais, os fatores do hospedeiro podem ter conseqüências importantes frente a susceptibilidade à dengue e sua apresentação clínica. Dentre eles, destacam-se: idade, gênero, etnicidade, tipo sanguíneo, estado nutricional, genética humana e doenças crônicas preexistentes (GUZMAN; KOURI, 2003; COFFEY et al., 2009; WHO, 2009; FANG et al., 2012; SILVA, 2013; GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2016).

Um estudo realizado com crianças vietnamitas e adultos demonstrou que a probabilidade de crianças com idade entre 1-5 anos ir à óbito por dengue foi quatro vezes maior que em uma criança de 11-15 anos de idade. A maior prevalência da dengue grave em crianças, quando comparado à adultos, possivelmente está ligada a presença de um endotélio vascular mais permeável (GAMBLE et al., 2000; HAMMOND et al., 2005).

O gênero feminino é o mais prevalente por entre os casos graves e fatais da doença. Sugere-se que esse destaque esteja relacionado a condições fisiológicas ou imunológicas inerente as mulheres. Contudo, mais estudos são necessários para compreender o papel do

sexo, bem como da idade na determinação do resultado da doença (VASCONCELOS et al., 1993; ANDERS et al., 2011).

A etnia do hospedeiro também foi explorada por alguns estudos, como os realizados no Haiti, Caribe e África, que sugeriram que populações de origem negra podem ter uma predisposição menor para o desenvolvimento da dengue grave do que populações caucasianas, uma vez que a incidência da forma grave da doença se mostrou maior nestas últimas (KOURI et al., 1989; HALSTEAD, 2001; SIERRA; KOURI; GUZMAN, 2007).

Em um estudo pioneiro de associação entre tipos sanguíneos humanos e a dengue, foi observado que crianças tailandesas com grupo sanguíneo AB apresentaram maior probabilidade de desenvolver dengue grave após infecção secundária quando comparadas com crianças com sangue tipos O, A ou B (KALAYANAROO et al., 2007; COFFEY et al., 2009).

Estudos envolvendo o estado nutricional de indivíduos e a complicação da dengue tem mostrado resultados conflitantes (TRANG et al., 2016). Alguns descobriram que o sobrepeso está ligado a um maior risco para o desenvolvimento da FHD (CHUANSUMRIT et al., 2003; PICHAINARONG et al., 2006), enquanto a desnutrição trata-se de um fator protetor devido a supressão da resposta imune em crianças desnutridas (THISYAKORN; NIMMANNITYA, 1993; NGUYEN et al., 2005). Por outro lado, há estudos que sugerem que o estado nutricional não é capaz de influenciar a gravidade da dengue (CARLOS et al., 2005; MALAVIGE et al., 2006; TANTRACHEEWATHORN; TANTRACHEEWATHORN, 2007).

Polimorfismos em genes candidatos constituem fatores genéticos do hospedeiro e tem apresentado influência significativa sobre a infecção pelo DENV (SAKUNTABHAI et al., 2005; BLANTON et al., 2008; CHEN et al., 2009; LAN; HIRAYAMA, 2011). Doenças crônicas pré-existentes (asma brônquica, diabetes mellitus, úlceras pépticas e anemia falciforme) também são determinantes no fenótipo da doença (DESPRÈS et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2010; GUZMAN et al., 2010; FANG et al., 2012; BACK; LUNDKVIST, 2013).

2.10 Influência de Polimorfismos Genéticos em Genes da Resposta Imune na Patogênese da Dengue

Os polimorfismos são variações genéticas pontuais que podem influenciar a expressão gênica, tendo comumente efeito sobre a regulação e função das proteínas (CYNTHIA, 2012; SANTOS, 2016). De modo intrigante, são considerados marcadores de escolha em estudos de caso-controle, uma vez que possuem características formidáveis, como o bialelismo, a ampla distribuição no genoma, além da facilidade para genotipagem e capacidade de teste em grande escala (CHAPMAN; HILL, 2012).

A exposição ao DENV culmina com uma ampla gama de respostas imunológicas desenvolvidas e controladas geneticamente no hospedeiro humano. Estudos genômicos de associação envolvendo polimorfismos em regiões codificadoras de moléculas com papel imunomodulador e envolvidas com a entrada e replicação viral vêm sendo associados à susceptibilidade ou proteção à dengue, bem como à gravidade da doença (MOSHIN et al., 2015; SAM et al., 2015; CANSANÇÃO et al., 2016).

A presença de determinados genótipos em genes que codificam citocinas e moléculas relacionadas com respostas imunes desenvolvidas durante a infecção pelo DENV são determinantes para a sua modulação. A heterogeneidade genética das referidas moléculas é um dos fatores influentes na apresentação clínica da doença (STEPHENS, 2010; FANG et al., 2012).

2.11 IL-10

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que tem sido associada à várias doenças, sendo considerada um importante imunomodulador, produzida por numerosas células do sistema imune, tais como monócitos/macrófagos, DCs, linfócitos T e B, células NK, neutrófilos e eosinófilos (MOSSER et al., 2008; TSAI et al., 2013; LIANG et al., 2014). Esta citocina atua regulando negativamente mecanismos envolvidos com a inflamação, através da inibição da secreção de mediadores imunes, da apresentação de antígenos e da fagocitose (JUNG et al., 2004; DUELL; TAN et al., 2012). Atua também suprimindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão (ABBAS et al., 2008; ZHAO et al., 2016).

Altos níveis séricos da IL-10 têm sido associados à linfopenia transitória, ao aumento da trombocitopenia (redução do número de plaquetas), à extensão de derrames pleurais, e ao

desenvolvimento de manifestações hemorrágicas durante a infecção por dengue (AZEREDO et al., 2001; SCHEXNEIDER; REEDY, 2005; ALAGARASU et al., 2015; FERREIRA et al., 2015). Os níveis são maiores em pacientes com infecção secundária do que naqueles com infecção primária, e isto se deve ao fato da IL-10 estar associada a reinfecções (YEH et al., 2006; TANG et al., 2010; CANSANÇÃO, 2015). Esta citocina é indicada como um biomarcador útil para predição precoce da gravidade da dengue, uma vez que vários estudos relatam observações de níveis elevados da interleucina no soro de pacientes com dengue grave (BROOKS et al., 2006; CHEN et al., 2007; SRIKIATKHACHORN; GREEN, 2010; BRASIER et al., 2012; BUTTHEP et al., 2012).

2.11.1 SNPs no Gene *IL-10*

O gene que codifica a IL-10 está localizado no cromossomo 1q31-32 e é altamente polimórfico (KE et al., 2015). Há vários polimorfismos descritos para este gene, sobretudo os que estão na sua região promotora (-1082 A/G, -819 C/T, -592 C/A) (Figura 11), destacando-se as variantes -819 C/T e -1082 A/G. A primeira, resulta da transição de uma citosina (C) para uma timina (T) na posição -819, enquanto a segunda resulta da transição de uma adenina (A) para uma guanina (G) na posição -1082, (SOUZA, 2010; BUTTHEP et al., 2012; BRASIER et al., 2012).

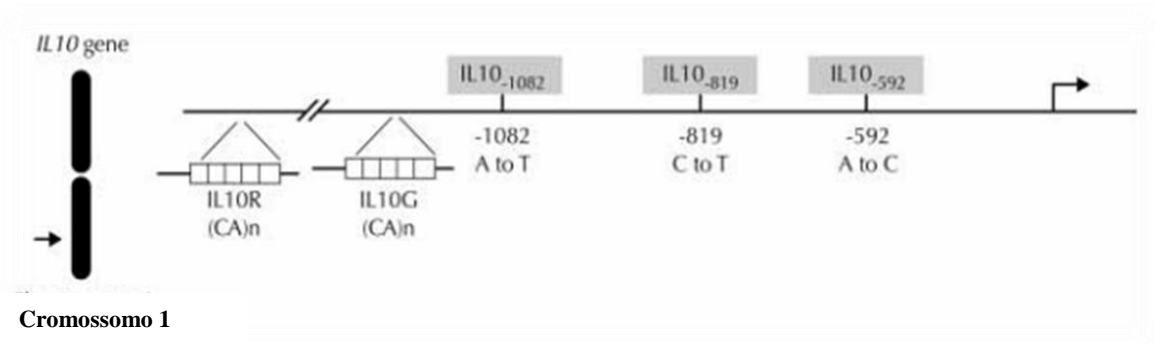


Figura 11 - Localização de polimorfismos na região promotora do gene *IL-10* investigados em estudos de associação a doenças infecciosas. (Fonte: KNIGHT, 2001 – Adaptado).

Fatores genéticos, tais como polimorfismos de genes de citocinas, influenciam substancialmente a natureza da produção de citocinas, levando à modificação da resposta imunológica do hospedeiro. Há cada vez mais evidências de que mudanças na sequência de genes de citocinas podem resultar em sítios alterados de reconhecimento para fatores de transcrição, afetando a ativação transcricional e influenciando a produção do peptídeo

correspondente de forma única, ou devido à ligação com outro marcador que afeta diretamente a expressão gênica (PRAVICA et al., 1999, WARLE et al., 2003; TRAJKOV, 2009).

Os três polimorfismos localizados na região promotora do gene da IL-10 estão associados a diferentes níveis de expressão gênica, uma vez que alteram sítios específicos de reconhecimento para fatores de transcrição, afetando diretamente a regulação dos níveis de produção da citocina (POWELL et al., 2000; MORMANN et al., 2004). O haplótipo GCC (alelos -1082G, -819C e -592C) exibe transcrição gênica elevada e tem sido correlacionado com níveis elevados de produção da IL-10. Enquanto o haplótipo ATA (alelos -1082A, -819T e -592A) exibe transcrição gênica baixa e tem sido correlacionado com a baixa produção da IL-10. Além disso, o haplótipo ACC exibe transcrição gênica intermediária e tem sido correlacionado com a produção intermediária da IL-10 (YILMAZ; YENTÜR, SARUHAN-DIRESKENELI, 2005; WILSON et al., 2005; ATES et al., 2008; WANG et al., 2011; CARDONA-CASTRO et al., 2012; ZASTAVNA et al., 2014; MOHAYA et al., 2015).

De acordo com dados da literatura, os polimorfismos -819 C/T e -1082 A/G quando avaliados isoladamente ou combinados com outros polimorfismos podem produzir ou não efeito sobre os fenótipos da dengue (Tabela 1). Os variados tipos de associação observados nos estudos podem ser atribuídos à etnicidade, interações gene-ambiente e interações gene-gene (ALAGARASU et al., 2015).

Tabela 1 - Estudos genômicos de associação envolvendo as variantes polimórficas -819 C/T e -1082 A/G do gene *IL-10* e os seus fenótipos na dengue.

Referência	População	Grupos Amostrais	Polimorfismo (marcador)	Fenótipo
CANSANÇÃO et al., 2016	Brasil	Casos Dengue (n = 111) Controles (n = 85) Total = 196	<i>IL-10</i> (-819 C/T) <i>TNFα</i> (-308 G/A)	Susceptibilidade
PEREZ et al., 2010	Cuba	Casos FHD (n = 43) Controles (n = 99) Total = 142	<i>IL-10</i> (-819 C/T) <i>IL-10</i> (-1082 A/G) <i>IL-10</i> (-592 C/A)	Susceptibilidade
FERNANDO et al., 2015	Sri Lanka	Casos FHD (n = 107) Controles (n = 62) Total = 169	<i>IL-10</i> (-819 C/T) <i>IL-10</i> (-1082 A/G) <i>IL-10</i> (-592 C/A)	Susceptibilidade e proteção
ALAGARASU et al., 2015	Índia	Casos FD (n = 87) Casos FHD (n = 45) Controles (n = 108) Total = 240	<i>IL-10</i> (-819 C/T)	Proteção
SAM et al., 2015	Malásia	Casos FD (n = 86) Casos FHD (n = 196) Controles (n = 120) Total = 402	<i>IL-10</i> (-819 C/T) <i>IL-10</i> (-1082 A/G) <i>IL-10</i> (-592 C/A) <i>TNFα</i> (-308 G/A)	Proteção
FERNANDEZ - MESTRE et al., 2004	Venezuela	Casos FD (n = 41) Casos FHD (n = 25) Controles (n = 46) Total = 112	<i>IL-10</i> (-819 C/T) <i>IL-10</i> (-1082 A/G) <i>IL-10</i> (-592 C/A)	Susceptibilidade
SANTOS et al., 2017	Brasil	Casos FD (n = 78) Casos FHD (n = 49) Controles (n = 135) Total (n = 262)	<i>IL-10</i> (-819 C/T)	Susceptibilidade e proteção
CARVALHO et al., 2013	Brasil	Casos severos de crianças com Dengue (n = 88) Controles (n = 335) Total = 423	<i>IL-10</i> (-819 C/T)	Sem associação
MOREIRA et al., 2008	Brasil	Casos FD (n = 200) Controles (n = 313) Total = 513	<i>IL-10</i> (-819 C/T) <i>IL-10</i> (-1082 A/G)	Sem associação
FEITOSA et al., 2016	Brasil	Dengue positivos (n = 80) Dengue negativos (n = 100) Controles (n = 99) Total = 279	<i>IL-10</i> (-1082 A/G)	Sem associação

2.11.1.1 -819 C/T

De acordo com o Projeto Genoma, o alelo T polimórfico apresenta maior prevalência em população do Leste Asiático (68%), seguida das populações: Sul Asiático (46%), África (44%), América (33%) e Europa (24%). Já o alelo C selvagem apresenta maior prevalência em população da Europa (76%), seguida das populações: América (67%), África (56%), Sul Asiático (54%) e Leste Asiático (32%) (Ensembl, 2017) (Figura 12).

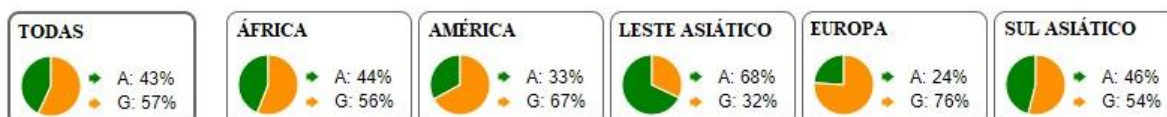


Figura 12 – Frequências alélicas do SNP -819 C/T (rs1800871). Cores: verde (alelo T), laranja (alelo C) (Fonte: Ensembl, 2017 – Adaptado).

Estudos tem relacionado o SNP rs1800871 com diversas doenças além da dengue. An et al. (2015) descreveram associação de risco do SNP para o desenvolvimento de calcificação valvular em população da China. Hsia et al. (2014) relataram associação de risco do SNP para o desenvolvimento de câncer pulmonar em população da China. Indhumathi et al. (2017) encontraram associação de risco do SNP para a psoríase em população da Índia. Amre et al. (2009) revelaram associação de risco do SNP para a doença de Crohn em adultos do Canadá. Naib et al. (2013) apresentaram associação de risco do SNP para a doença de Behçet na população da Argélia Ocidental. Jin et al. (2013) indicaram que o SNP pode estar associado a tumores para o HPV e à sobrevida do carcinoma de células escamosas da orofaringe em população do Texas. Hu et al. (2016) sugeriram que o SNP pode ser um biomarcador útil para a detecção de glioma em população da China. Alvarado-Arnez et al. (2015) encontraram associação do SNP com a suscetibilidade para hanseníase em população brasileira.

2.11.1.2 -1082 A/G

De acordo com o Projeto Genoma, o alelo G polimórfico apresenta maior prevalência em população do Europa (45%), seguida das populações: América (39%), África (31%), Sul Asiático (24%) e Leste Asiático (5%). Já o alelo A selvagem apresenta maior prevalência em população da Leste Asiático (95%), seguida das populações: Sul Asiático (76%), América (70%), África (69%) e Europa (55%) (Ensembl, 2017) (Figura 13).



Figura 13 – Frequências alélicas do SNP -1082 A/G (rs1800896). Cores: vermelho (alelo A), azul (alelo G) (Fonte: Ensembl, 2017 – Adaptado).

Estudos tem mostrado a relação do SNP rs1800896 com uma gama de doenças além da dengue. Xuan et al. (2016) encontraram associação de susceptibilidade do SNP para a doença arterial coronariana em população da China. Zhang et al. (2012) revelaram associação de risco do SNP para infecções clínicas por malária em crianças de Moçambique. Jiang et al. (2016) sugeriram que o SNP pode estar intimamente correlacionado com o risco de pancreatite aguda em população da China. Yu et al. (2014) descreveram associação de susceptibilidade do SNP para o câncer gástrico. Talaat et al. (2014) mostraram que o SNP pode desempenhar papel de susceptibilidade para a doença de Behçet em população do Egito. Talaat et al. (2016) relataram que o SNP pode desempenhar também papel de susceptibilidade à síndrome do ovário policístico em mulheres da população do Egito. Outros estudos relataram associação do SNP com o desenvolvimento de vários tipos de cânceres, como câncer cervical, câncer de pulmão, câncer colorretal e câncer digestivo (LI et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

2.12 Desequilíbrio de Ligação

O desequilíbrio de ligação em genética populacional trata-se de uma associação não aleatória de alelos em *loci* diferentes. Este desequilíbrio acontece quando as frequências observadas dos haplótipos apresentam desvios quanto às esperadas (WEIR, 1979). A sua análise tem por função estimar a distância genética entre *loci*, de modo a colaborar no entendimento dos efeitos de combinações alélicas ocasionados em determinada população (PIRRI et al., 2009). Um forte desequilíbrio entre dois *loci* indica que ambos estão situados fisicamente muito próximos um do outro no cromossomo, o que é útil para o mapeamento de *loci* susceptível a determinada doença, uma vez que um *locus* pode ser usado para prever a presença de outro *locus* (SADOCK; SADOCK; RUIZ, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a prevalência e a influência dos polimorfismos -819 C/T (rs1800871) e -1082 A/G (rs1800896) do gene *IL-10* em pacientes com sintomatologia para dengue, bem como em indivíduos assintomáticos e controles da cidade de Parnaíba – PI, durante o período de 2016 a 2018.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos -819 C/T e -1082 A/G do gene *IL-10* nos grupos controle, DEN, DSSA, DCSA e ASS;
- Associar os polimorfismos com susceptibilidade ou proteção à dengue, ou ainda com o risco de progressão para as formas clínicas mais graves da doença;
- Correlacionar os polimorfismos com as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com dengue;
- Realizar análises das frequências haplotípicas e do desequilíbrio de ligação dos polimorfismos do gene *IL-10* entre os grupos controle, DEN, DSSA, DCSA e ASS;
- Comparar a frequência obtida do alelo mutante de ambos os polimorfismos deste estudo com os resultados descritos em outras pesquisas da literatura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos e Legais

Atendendo as diretrizes da Resolução nº 466/2012 da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa do Ministério da Saúde, que trata das diretrizes e normas de pesquisas envolvendo seres humanos, o presente estudo foi apreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí, e aprovado sob o parecer de nº 1197622.

Os indivíduos recrutados de forma voluntária para a composição dos grupos do estudo (pacientes com dengue, controle negativo e assintomático) foram esclarecidos verbalmente pelos pesquisadores sobre o escopo da pesquisa e sua forma de participação, que se deu de forma livre.

As informações dos pacientes, tanto pessoais como de exames laboratoriais, permaneceram em sigilo total e com garantia de anonimato de identidade, sendo utilizadas exclusivamente para fins da pesquisa. Havendo a concordância, o consentimento para participação na pesquisa foi solicitado, mediante leitura e posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice I).

4.2 Tipo de Estudo e Local

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle, de caráter qualitativo e com abordagem exploratória. A pesquisa foi realizada no pólo de saúde do município de Parnaíba-PI, situado no extremo norte do Estado, próximo ao litoral. Segundo dados de 2016, o município possui área de 435.573 km² e uma população total estimada em 150.201 habitantes (IBGE, 2017).

4.3 População e Definições dos Grupos de Estudo

A população estudada foi composta por indivíduos sem distinção de idade, sexo, raça ou nível socioeconômico. Os participantes deste estudo foram agrupados em três grupos: pacientes com dengue, controle negativo e assintomático.

4.3.1 Grupo de Pacientes com Dengue

O grupo DEN foi composto por pacientes voluntários que apresentaram sintomatologia sugestiva e infecção pelo *Dengue virus* confirmada laboratorialmente. Tais indivíduos, por sua vez, foram alocados nos seguintes subgrupos: DCSA ou DSSA, de

acordo com a nova classificação da dengue preconizada pelo Ministério da Saúde e adotada nacionalmente desde 2014.

4.3.2 Grupo Controle Negativo

O grupo foi composto por indivíduos voluntários e residentes na área de realização do estudo, maiores de 18 anos, que declararam nunca terem apresentado sintomatologia clínica característica da dengue e o seu diagnóstico laboratorial confirmatório.

4.3.3 Grupo Assintomático

O grupo ASS foi composto por indivíduos que inicialmente fizeram parte do grupo controle do estudo, por não apresentarem sintomas sugestivos de dengue e confirmação laboratorial da doença. Contudo, ao serem realizados testes imunocromatográficos em suas amostras, exibiram títulos de anticorpos IgM ou IgG anti-DENV, demonstrando que tiveram um contato prévio com o vírus, mas não exibiram manifestação clínica da doença.

4.4 Coleta de Amostras e Dados Clínicos dos Pacientes

Uma punção venosa foi realizada nos participantes do estudo para a coleta de amostras de sangue periférico (aproximadamente 10 ml), utilizando seringas descartáveis e/ou tubos de coleta à vácuo contendo EDTA para obtenção de sangue total, e microtubos de 1,5 mL para obtenção do soro. Posteriormente, tais amostras foram transportadas para a Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba-PI, em seguida devidamente processadas e estocadas em freezer -70°C no Laboratório de Biologia e Bioquímica de Microrganismos e Plantas (BIOMIC).

De fevereiro de 2016 a janeiro de 2018, as coletas de amostras biológicas foram realizadas diariamente em pacientes com sintomatologia clínica sugestiva para dengue, atendidos em duas instituições públicas de saúde da cidade de Parnaíba (Pronto Socorro Municipal – PSM e Hospital Estadual Dirceu Arcoverde – HEDA).

A obtenção dos dados clínicos dos pacientes atendidos ocorreu de duas formas. No PSM, se deu por meio de entrevista e aplicação de formulário semi-estruturado (Apêndice II) abrangendo informações sobre variáveis demográficas e clínicas do paciente. Já no HEDA, se deu por meio da análise de prontuários dos pacientes, disponíveis no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do hospital.

4.5 Confirmação do Diagnóstico

A confirmação dos casos de dengue se deu mediante a avaliação clínica dos pacientes em associação com testes laboratoriais. Estes últimos consistiram em duas técnicas, molecular (até o 5º dia de sintomas do paciente) e/ou sorológica (após o 5º dia de sintomas do paciente). A primeira metodologia consistiu na técnica de Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR). A segunda metodologia incluiu os testes rápidos de ensaios imunocromatográficos: *SD Bioline Dengue Duo*® (Standard Diagnostics Inc, Republic of Korea), para detecção de IgM/IgG anti-DENV e do antígeno NS1; e *OL Dengue IgG/IgM*® (Orange Life Comércio e Indústria LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) para detecção de anticorpos anti-DENV.

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

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

Após a extração foi realizada a técnica de RT-PCR, a qual foi subdivida em 2 etapas. A primeira etapa correspondeu à Transcrição Reversa (RT) para a conversão do RNA viral em DNA complementar (cDNA), pela ação da enzima *MMLV-RT* (do inglês *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*). A segunda etapa correspondeu à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação dos fragmentos de interesse, pela ação da enzima *Taq DNA polimerase*. Ambas as reações foram realizadas no termociclador *AmpliTherm*® *Thermal Cyclers* (Madison, WI, USA).

Para a detecção do DENV nas amostras suspeitas, foram utilizados *Random Hexamers*®, que são oligodesoxirribonucleotídeos de sequências curtas e aleatórias (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), os quais se ligam a qualquer região do RNA e permitem a síntese do cDNA.

Este protocolo foi realizado em duas etapas: na primeira etapa, 10 µl de RNA molde e 5 µl de *Random Hexamers* (50 µM) foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers* (*Amplitherm*®) a 25°C por 10 min e 70°C por 5 min. Após serem retiradas do termociclador, as amostras foram armazenadas no gelo por 2 minutos para evitar a formação de dímeros.

Na segunda etapa foram adicionados 5 µl de tampão da enzima (5X), 5 µl de dNTP (10mM) e 1 µl de MMLV (200U/ µl), obtendo-se um volume final de 26 µl, onde estes foram novamente incubados a 37°C por 60 min e 85°C por 5 min.

4.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Para a amplificação das regiões de interesse do genoma viral foram utilizados 2 protocolos. O primeiro teve como interesse a amplificação dos produtos do gene *NS5*, que é considerada a região mais conservada do genoma dos *Flavivirus*. Os iniciadores foram desenvolvidos por Chao, Davis & Chang (2007), permitindo a detecção de *Flavivirus* nas amostras testadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores para amplificação do gene *NS5* dos *Flavivirus* descritos por Chao, Davis & Chang (2007), seus sorotipos específicos e produtos da PCR.

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

O protocolo acima teve um volume final de 25µl: 2,5µl de tampão (10x), 2µl de MgCl₂ (50mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de mFU1 (10pM/µl), 0,3µl de CFD2 (10pM/µl), 0,2µl de *Taq DNA polimerase* (5U/µl), 2,5µl de cDNA para cada amostra e 16,7µl de H₂O estéril. Após a adição dos reagentes, a reação foi submetida a 94°C por 5 minutos, com 35 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto; 58°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto), seguida ao final a 72°C por 10 min.

O segundo protocolo baseou-se na amplificação da região do gene *NS5*. Os iniciadores foram desenvolvidos por Bronzoni e colaboradores (2005). As amostras de cDNA foram submetidas a uma primeira reação de amplificação, que possibilitou a identificação de *Flavivirus*. Em seguida, os produtos da primeira reação foram submetidos a uma segunda reação de amplificação que possibilitou a identificação dos sorotipos do DENV. Esta segunda reação foi subdividida em 2 etapas: uma para detecção simultânea dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, e outra para a detecção individual de DENV- 4 (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequência de iniciadores para amplificação da região do gene *NS5* descritos por Bronzoni e colaboradores (2005), seus sorotipos específicos e produtos da PCR.

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

O protocolo acima teve um volume final de 25µl: 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl₂ (50mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de *Primer forward* – FG1 (10 pmol/ µL), 0,3µl de *Primer reverse* – FG2 (10pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 17µl de H₂O estéril e 3µl de cDNA para cada amostra. Após a adição dos reagentes, estes foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* e submetidos às etapas de: desnaturação inicial por 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 seg; 53°C por 45 seg; 72°C por 1 min.) e de uma extensão final a 72°C por 10 min. Uma quantidade de 2,5ul do produto da primeira etapa foi utilizada em uma segunda reação com os iniciadores FG1, nDEN1, nDEN2, nDEN3 e nDEN4, adotando os mesmos parâmetros e condições da primeira reação.

Ao final das reações de PCR, os produtos de amplificação foram submetidos a corridas de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com o agente intercalante *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

O DNA genômico dos participantes foi extraído a partir de amostras de sangue total (300µL), utilizando 2 kits comerciais de marcas distintas: *QIAamp® DNA Blood Mini Kit*

(Qiagen Inc., Hilden, Germany) e *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Inc., USA), conforme as instruções descritas pelos protocolos dos fabricantes.

Após a extração, o DNA foi quantificado por meio do espectrofotômetro *BioSpec-Nano* (Shimadzu Corporation), com a utilização de uma pequena quantidade de amostra (1µL). As análises foram feitas em duplicatas para cada amostra. Mas, havendo diferença entre a primeira e a segunda medição, com valor discrepante (> 10 mg/ml), uma terceira medição (triplicata) foi realizada.

Uma vez concluída a etapa da quantificação do DNA, as amostras foram corridas em gel de agarose a 0,8% e visualizadas em transluminador L-PIX (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil), a fim de se avaliar a qualidade/integridade do material. Posteriormente, estas foram armazenadas no freezer -20°C.

4.7 Genotipagem dos SNPs do Gene *IL-10*

A genotipagem para os polimorfismos -819 C/T (rs1800871) e -1082 A/G (rs1800896) do gene *IL-10* foi realizada em amostras de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial confirmado para infecção pelo DENV, assim como também para amostras dos indivíduos dos grupos controle e assintomático, por meio de PCR em Tempo Real.

Nos experimentos foram utilizados ensaios validados *SNP TaqMan® Genotyping Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), juntamente com *Master Mix 2x TaqMan®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que corresponde a um conjunto de componentes otimizados necessários para a realização da PCR, permitindo uma discriminação alélica reprodutível para a genotipagem de SNPs.

Por sua vez, cada ensaio de genotipagem validado é composto por dois iniciadores (um senso e outro anti-senso) para a amplificação das regiões de interesse de cada polimorfismo (Tabela 4), e duas sondas (fragmentos de DNA marcados para hibridizar outra molécula de DNA) responsáveis pela detecção de alelos (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; SIQUEIRA et al., 2015; THERMOFISCHER SCIENTIFIC, 2016).

Tabela 4 - Gene, dbSNP e suas respectivas sondas (VIC/FAM) para PCR em Tempo Real (*TaqMan*® SNP Genotyping Assays).

GENE	dbSNP	SEQUÊNCIA [VIC/FAM]
<i>IL-10</i>	rs1800871 (-819 C/T)	AGTGAGCAAACACTGAGGCACAGAGAT[A/G]TTACATCACCTGTAC
	rs1800896 (-1082 A/G)	TCCTCTTACCTATCCCTACTTCCCC[T/C]TCCCAAAGAAGCCTTAGT AGTGTTG

As reações de genotipagem por PCR em Tempo Real deste estudo foram realizadas por protocolo otimizado com volume final de 5 µL, adaptado a partir do protocolo padrão (Tabela 5). Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços, sendo também incluídos dois controles negativos para confirmar a ausência de contaminação da reação.

Tabela 5 – Componentes utilizados nas reações de PCR em Tempo Real para genotipagem dos SNPs do gene *IL-10*.

Componentes	Protocolo Padrão	Protocolo Otimizado
<i>Master Mix 2x TaqMan</i> ®	5 µL	2,5 µL
<i>TaqMan</i> ® SNP Genotyping Assays (diluída para 20x)	0,5 µL	0,08µL
H ₂ O <i>miliQ</i> autoclavada	3,5 µL	0,5 µL
Amostra de DNA	1 µL	1,92 µL
Volume Final	10 µL	5 µL

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: pré-incubação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida por 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, e consecutivamente o anelamento e extensão a 60 °C durante 1 minuto e 30 segundos.

Após a realização da PCR, o genótipo de cada amostra foi interpretado e determinado utilizando o software *1.1 SDS* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), e os aplicativos *Design and Analysis Application qPCR* e *Genotyping qPCR* disponíveis na ferramenta online *Thermo FisherCloud* (THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2017), os quais

possibilitaram a visualização dos *plots* de discriminação alélica-específica gerados (Figura 15), bem como também as curvas de amplificação do material genético das amostras.

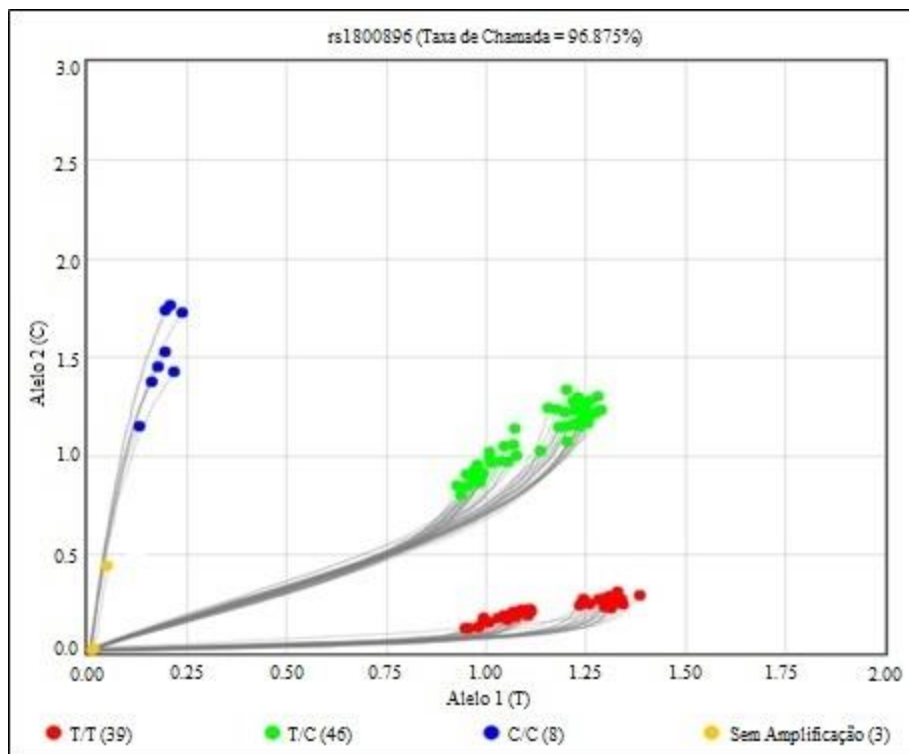


Figura 14 - Exemplo de *plot* de discriminação alélica do SNP -1082 A/G (rs1800896) para o gene *IL-10* gerado por PCR em Tempo Real. Na figura pode-se verificar: indivíduos com presença do alelo selvagem (homozigotos) representando o genótipo T/T (cor vermelha); indivíduos com presença do alelo mutante (homozigotos) representando o genótipo C/C (cor azul); indivíduos com presença de ambos os alelos (heterozigotos) representando o genótipo T/C (cor verde); e três amostras em que o material genético não foi amplificado (cor amarela). (Fonte: THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2018 – Adaptado).

4.8 Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados por meio do software *BioEstat 5.0* (Instituto Mamirauá, Tefé, Brasil). As frequências genotípicas e alélicas dos SNPs foram determinadas por contagem simples. Para testar o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, as distribuições genotípicas observadas e esperadas foram comparadas entre os grupos do estudo, tendo a sua significância estimada pelo teste do Qui-quadrado (χ^2). O teste exato de Fisher foi utilizado quando um valor na tabela de contingência foi menor que 5.

Para cada comparação foi calculada uma força de associação ou razão de chances (OR, do inglês *Odds Ratio*). Valores de $OR > 1$ indicam presença de um fator de risco, $OR < 1$ um fator protetor e $OR = 1$, um equilíbrio entre risco e proteção, não havendo associação. As

distribuições das frequências dos sintomas foram comparadas pelo teste de Wilcoxon pareado (*Signed-rank Test*). O Teste Exato de Fisher também foi utilizado para a comparação das frequências alélicas obtidas neste estudo com as de outras pesquisas descritas na literatura.

Para avaliar o desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *IL-10*, as análises das frequências haplotípicas e a correção para múltiplos testes por 1.000 permutações aleatórias utilizou-se o programa *Haploview 4.2* (Whitehead Institute for Biomedical Research, EUA). Para todas as análises realizadas, foi adotado um nível de significância de $p < 0.05$ a fim as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

5 RESULTADOS

No período de fevereiro de 2016 a janeiro de 2018, foram coletadas 541 amostras de pacientes com sintomatologia clínica suspeita de dengue, atendidos em instituições de saúde públicas e privadas da cidade de Parnaíba-PI.

Por meio de testes rápidos imunocromatográficos e/ou moleculares, 119 amostras foram positivas para infecção pelo DENV. O grupo DEN apresentou média de idade de 35,9 anos, variando de 11 a 82 anos, em sua maioria do sexo feminino (70%). No que diz respeito à classificação da doença no grupo DEN, 74 pacientes foram categorizados como DSSA e 45 pacientes foram categorizados como DCSA.

Durante os anos de 2014, 2015 e 2017 foram recrutados 214 indivíduos voluntários para a composição do grupo controle, os quais relataram nunca terem apresentado histórico clínico ou diagnóstico laboratorial confirmatório da doença. Contudo, após a triagem de suas amostras por meio de testes rápidos imunocromatográficos, 85 indivíduos apresentaram anticorpos IgM e/ou IgG anti-DENV (ou seja, tais indivíduos foram infectados pelo vírus em algum momento de sua vida, porém não manifestaram sintomatologia clínica da doença), sendo os mesmos alocados no grupo ASS. Este último, apresentou média de idade de 23,1 anos, variando de 17 a 54 anos, em sua maioria do sexo feminino (70%). Dessa maneira, o grupo controle negativo passou a ser composto por 129 indivíduos, apresentando média de idade de 23,7 anos, variando de 17 a 69 anos, em sua maioria do sexo feminino (71%).

5.1 Frequências genotípicas e alélicas do SNP -819 C/T do gene *IL-10*

Nas análises das frequências genotípicas do SNP -819 C/T (Tabela 6), o genótipo C/T exibiu frequência de 46,1% no grupo controle quando comparado ao grupo DEN com 42,8% ($p= 0,37$, OR= 0,78, $p^*= 0,45$), porém não apresentou diferença estatisticamente significativa. As análises entre os grupos controle e DSSA ($p= 0,22$, OR= 0,68, $p^*= 0,29$), controle e DCSA ($p= 0,97$, OR= 0,98, $p^*= 0,87$), e DSSA e DCSA ($p= 0,36$, OR= 1,43 $p^*= 0,48$) também não mostraram diferenças estatisticamente significativas.

O genótipo T/T exibiu frequência de 14,8% no grupo controle quando comparado ao grupo DEN com 11,0% ($p= 0,24$, OR= 0,62, $p^*= 0,33$), entretanto não houve diferença estatisticamente significativa. As análises entre os grupos controle e DSSA ($p= 0,15$, OR= 0,49, $p^*= 0,22$), controle e DCSA ($p= 0,81$, OR= 0,87, $p^*= 0,97$), e DSSA e DCSA ($p= 0,52$, OR= 1,76, $p^*= 0,55$) também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Os genótipos C/T + T/T exibiram frequência de 60,9% no grupo controle quando comparado ao grupo DEN com 53,7% ($p= 0,25$, OR= 0,74, $p^*= 0,31$), no entanto não foi observada diferença estatisticamente significativa. As análises entre os grupos controle e DSSA ($p= 0,13$, OR= 0,64, $p^*= 0,17$), controle e DCSA ($p= 0,91$, OR= 0,96, $p^*= 0,94$), e DSSA e DCSA ($p= 0,28$, OR= 1,50, $p^*= 0,38$) também não mostraram diferenças estatisticamente significativas.

Os genótipos C/C + C/T exibiram frequência de 89,0% no grupo DEN quando comparado ao grupo controle com 85,1% ($p= 0,60$, OR= 0,88, $p^*= 0,69$), contudo não foi observada diferença estatisticamente significativa. As análises entre os grupos controle e DSSA ($p= 0,48$, OR= 0,83, $p^*= 0,57$), controle e DCSA ($p= 0,98$, OR= 0,99, $p^*= 0,88$), e DSSA e DCSA ($p= 0,61$, OR= 1,19, $p^*= 0,73$) também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Todas as frequências genotípicas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Ao analisar as frequências alélicas do SNP -819 C/T (Tabela 6), observou-se que o alelo T exibiu frequência de 37,9% no grupo controle quando comparado ao grupo DEN com 32,4% ($p= 0,19$, OR= 0,78, $p^*= 0,23$), entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa. As análises entre os grupos controle e DSSA ($p= 0,09$, OR= 0,69, $p^*= 0,12$), controle e DCSA ($p= 0,83$, OR= 0,94, $p^*= 0,93$), e DSSA e DCSA ($p= 0,26$, OR= 1,36, $p^*= 0,33$) também não mostraram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 6 - Distribuição genotípica e alélica do SNP -819 C/T (rs1800871) do gene *IL-10* nos grupos controle e casos (DEN, DSSA e DCSA).

<i>IL-10</i> -819 C/T	Controle (n= 128)	DEN (n= 119)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *	Controle (n= 128)	DSSA (n= 74)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *
Genótipos										
C/C	50 (39,1)	55 (46,2)	-	-	-	50 (39,1)	37 (50,0)	-	-	-
C/T	59 (46,1)	51 (42,8)	0,37	0,78 (0,45-1,34)	0,45	59 (46,1)	30 (40,5)	0,22	0,68 (0,37-1,26)	0,29
T/T	19 (14,8)	13 (11,0)	0,24	0,62 (0,27-1,38)	0,33	19 (14,8)	7 (9,45)	0,15	0,49 (0,18-1,30)	0,22
C/T + T/T	78 (60,9)	64 (53,7)	0,25	0,74 (0,44-1,23)	0,31	78 (69,9)	37 (50,0)	0,13	0,64 (0,35-1,14)	0,17
C/C+ C/T	109 (85,1)	106 (89,0)	0,60	0,88 (0,55-1,41)	0,69	109 (85,1)	67 (90,5)	0,48	0,83 (0,49-1,40)	0,57
Alelos										
C	159 (62,1)	161 (67,6)	-	-	-	159 (62,1)	104 (70,3)	-	-	-
T	97 (37,9)	77 (32,4)	0,19	0,78 (0,54-1,13)	0,23	97 (37,9)	44 (29,7)	0,09	0,69 (0,44-1,06)	0,12
<i>IL-10</i> -819 C/T	Controle (n= 128)	DCSA (n= 45)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *	DSSA (n= 74)	DCSA (n= 45)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *
Genótipos										
C/C	50 (39,1)	18 (40,0)	-	-	-	37 (50,0)	18 (40,0)	-	-	-
C/T	59 (46,1)	21 (46,7)	0,97	0,98 (0,47-2,05)	0,87	30 (40,5)	21 (46,7)	0,36	1,43 (0,65-3,17)	0,48
T/T	19 (14,8)	6 (13,3)	0,81	0,87 (0,30-2,54)	0,97	7 (9,45)	6 (13,3)	0,52	1,76 (0,51-6,01)	0,55
C/T + T/T	78 (60,9)	27 (60,0)	0,91	0,96 (0,48-1,92)	0,94	37 (50,0)	27 (60,0)	0,28	1,50 (0,70-3,17)	0,38
C/C+ C/T	109 (85,1)	39 (86,6)	0,98	0,99 (0,51-1,90)	0,88	67 (90,5)	39 (86,6)	0,61	1,19 (0,60-2,38)	0,73
Alelos										
C	159 (62,1)	57 (63,3)	-	-	-	104 (70,3)	57 (63,3)	-	-	-
T	97 (37,9)	33 (36,7)	0,83	0,94 (0,57-1,56)	0,93	44 (29,7)	33 (36,7)	0,26	1,36 (0,78-2,38)	0,33

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

Nas análises das frequências genóticas do SNP -819 C/T (Tabela 7), o genótipo C/T exibiu frequência de 42,8% no grupo DEN quando comparado ao grupo ASS com 44,1% ($p= 0,47$, $OR= 0,80$, $p^*= 0,57$), contudo não houve diferença estatisticamente significativa. Além disso, o referido genótipo teve frequência maior no grupo controle quando comparado ao grupo ASS ($p= 0,94$, $OR= 0,97$, $p^*= 0,92$), entretanto sem significância estatística. As análises entre os grupos ASS e DSSA ($p= 0,30$, $OR= 0,70$, $p^*= 0,38$), e ASS e DCSA ($p= 0,98$, $OR= 1,01$, $p^*= 0,85$) também não mostraram diferença estatisticamente significativa.

O genótipo T/T exibiu frequência de 11,0% no grupo DEN quando comparado ao grupo ASS com 17,8 % ($p= 0,11$, $OR= 0,50$, $p^*= 0,17$), porém não apresentou diferença estatisticamente significativa. Além disso, o referido genótipo teve frequência menor no grupo controle quando comparado ao grupo ASS ($p= 0,61$, $OR= 1,23$, $p^*= 0,76$), no entanto não houve significância estatística. As análises entre os grupos ASS e DSSA ($p= 0,07$, $OR= 0,40$, $p^*= 0,12$), e ASS e DCSA ($p= 0,54$, $OR= 0,71$, $p^*= 0,74$) também não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Os genótipos C/T + T/T exibiram frequência de 53,7% no grupo DEN quando comparado ao grupo ASS com 61,9% ($p= 0,25$, $OR= 0,71$, $p^*= 0,31$), contudo não houve diferença estatisticamente significativa. Além disso, os referidos genótipos tiveram frequência menor no grupo controle quando comparado ao grupo ASS ($p= 0,88$, $OR= 1,04$, $p^*= 0,99$), entretanto sem significância estatística. As análises entre os grupos ASS e DSSA ($p= 0,13$, $OR= 0,61$, $p^*= 0,17$), e ASS e DCSA ($p= 0,83$, $OR= 0,92$, $p^*= 0,98$) também não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Os genótipos C/C + T/T exibiram frequência de 89,0% no grupo DEN quando comparado ao grupo ASS com 82,1% ($p= 0,67$, $OR= 0,89$, $p^*= 0,77$), no entanto não foi observada diferença estatisticamente significativa. Além disso, os referidos genótipos tiveram frequência maior no grupo controle quando comparado ao grupo ASS ($p= 0,96$, $OR= 0,98$, $p^*= 0,92$), entretanto sem significância estatística. As análises entre os grupos ASS e DSSA ($p= 0,55$, $OR= 0,83$, $p^*= 0,65$), e ASS e DCSA ($p= 0,99$, $OR= 1,00$, $p^*= 0,87$) também não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Todas as frequências genóticas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Ao analisar as frequências alélicas do SNP -819 C/T (Tabela 7), observou-se que o alelo T exibiu frequência de 40,0% no grupo ASS quando comparado ao grupo DEN com 32,4% ($p= 0,11$, $OR= 0,72$, $p^*= 0,14$), entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa. As análises entre os grupos ASS e DSSA ($p= 0,06$, $OR= 0,63$,

$p^* = 0,07$), ASS e DCSA ($p = 0,61$, OR = 0,87, $p^* = 0,71$), e ASS e controle ($p = 0,68$, OR = 1,08, $p^* = 0,75$) também não mostraram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 7 - Distribuição genotípica e alélica do SNP -819 C/T (rs1800871) do gene *IL-10* nos grupos assintomático (ASS), casos (DEN, DSSA e DCSA) e controle.

<i>IL-10</i> -819 C/T	ASS (n= 84)	DEN (n= 119)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>P</i> *	ASS (n= 84)	DSSA (n= 74)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>P</i> *
Genótipos										
C/C	32 (38,1)	55 (46,2)	-	-	-	32 (38,1)	37 (50,0)	-	-	-
C/T	37 (44,1)	51 (42,8)	0,47	0,80 (0,43-1,47)	0,57	37 (44,1)	30 (40,5)	0,30	0,70 (0,35-1,37)	0,38
T/T	15 (17,8)	13 (11,0)	0,11	0,50 (0,21-1,19)	0,17	15 (17,8)	7 (9,45)	0,07	0,40 (0,14-1,11)	0,12
C/T + T/T	52 (61,9)	64 (53,7)	0,25	0,71 (0,40-1,26)	0,31	52 (61,9)	37 (50,0)	0,13	0,61 (0,32-1,15)	0,17
C/C+ C/T	69 (82,1)	106 (89,0)	0,67	0,89 (0,52-1,51)	0,77	69 (82,1)	67 (90,5)	0,55	0,83 (0,47-1,50)	0,65
Alelos										
C	101 (60,0)	161 (67,6)	-	-	-	101 (60,0)	104 (70,3)	-	-	-
T	67 (40,0)	77 (32,4)	0,11	0,72 (0,47-1,08)	0,14	67 (40,0)	44 (29,7)	0,06	0,63 (0,39-1,01)	0,07
<i>IL-10</i> -819 C/T	ASS (n= 84)	DCSA (n= 45)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>P</i> *	ASS (n= 84)	Controle (n= 128)	<i>P</i>	OR (95% IC)	<i>P</i> *
Genótipos										
C/C	32 (38,1)	18 (40,0)	-	-	-	32 (38,1)	50 (39,1)	-	-	-
C/T	37 (44,1)	21 (46,7)	0,98	1,01 (0,45-2,21)	0,85	37 (44,1)	59 (46,1)	0,94	0,97 (0,53-1,79)	0,92
T/T	15 (17,8)	6 (13,3)	0,54	0,71 (0,23-2,15)	0,74	15 (17,8)	19 (14,8)	0,61	1,23 (0,54-2,77)	0,76
C/T + T/T	52 (61,9)	27 (60,0)	0,83	0,92 (0,43-1,93)	0,98	52 (61,9)	78 (60,9)	0,88	1,04 (0,59-1,83)	0,99
C/C+ C/T	69 (82,1)	39 (86,6)	0,99	1,00 (0,49-2,02)	0,87	69 (82,1)	109 (85,1)	0,96	0,98 (0,57-1,69)	0,92
Alelos										
C	101 (60,0)	57 (63,3)	-	-	-	101 (60,0)	159 (62,1)	-	-	-
T	67 (40,0)	33 (36,7)	0,61	0,87 (0,51-1,48)	0,71	67 (40,0)	97 (37,9)	0,68	1,08 (0,72-1,62)	0,75

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

5.2 Frequências genotípicas e alélicas do SNP -1082 A/G do gene *IL-10*

Nas análises das frequências genotípicas do SNP -1082 A/G (Tabela 8), o genótipo A/G exibiu frequência de 51,7% no grupo DEN quando comparado ao grupo controle com 46,5% ($p=0,21$, $OR=1,39$, $p^*=0,27$), contudo não foi observada diferença estatisticamente significativa. As análises entre os grupos controle e DSSA ($p=0,30$, $OR=1,36$, $p^*=0,38$), controle e DCSA ($p=0,27$, $OR=1,50$, $p^*=0,36$), e DSSA e DCSA ($p=0,81$, $OR=1,10$, $p^*=0,97$) também não apresentaram significância estatística.

O genótipo G/G exibiu frequência de 11,9% no grupo DEN quando comparado ao grupo controle com 7,75% ($p=0,15$, $OR=1,92$, $p^*=0,22$), entretanto não mostrou diferença estatisticamente significativa. As análises entre os grupos controle e DSSA ($p=0,47$, $OR=1,47$, $p^*=0,66$), controle e DCSA ($p=0,19$, $OR=2,36$, $p^*=0,24$), e DSSA e DCSA ($p=0,52$, $OR=1,60$, $p^*=0,68$) também não tiveram significância estatística.

Os genótipos A/G + G/G exibiram frequência de 63,5% no grupo DEN quando comparado ao grupo controle com 54,2% ($p=0,13$, $OR=1,47$, $p^*=0,17$), contudo não foi observada diferença estatisticamente significativa. As análises entre os grupos controle e DSSA ($p=0,27$, $OR=1,38$, $p^*=0,34$), controle e DCSA ($p=0,17$, $OR=1,62$, $p^*=0,24$), e DSSA e DCSA ($p=0,68$, $OR=1,17$, $p^*=0,83$) também não apresentaram significância estatística.

Os genótipos A/A + A/G exibiram frequência de 92,2% no grupo controle quando comparado ao grupo DEN com 88,1% ($p=0,45$, $OR=1,19$, $p^*=0,52$), no entanto não foi observada diferença estatisticamente significativa. As análises entre os grupos controle e DSSA ($p=0,53$, $OR=1,18$, $p^*=0,62$), controle e DCSA ($p=0,50$, $OR=1,25$, $p^*=0,62$), e DSSA e DCSA ($p=0,88$, $OR=1,05$, $p^*=0,96$) também não mostraram significância estatística. Todas as frequências genotípicas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Ao analisar as frequências alélicas do SNP -1082 A/G (Tabela 8), observou-se que o alelo G exibiu frequência de 37,7% no grupo DEN quando comparado ao grupo controle com 31,0% ($p=0,11$, $OR=1,34$, $p^*=0,14$), entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa. As análises entre os grupos controle e DSSA ($p=0,32$, $OR=1,24$, $p^*=0,37$), controle e DCSA ($p=0,13$, $OR=1,46$, $p^*=0,16$), e DSSA e DCSA ($p=0,54$, $OR=1,18$, $p^*=0,63$) também não apresentaram significância estatística.

Tabela 8 - Distribuição genotípica e alélica do SNP -1082 A/G (rs1800896) do gene *IL-10* nos grupos controle e casos (DEN, DSSA e DCSA).

<i>IL-10</i> -1082 A/G	Controle (n= 129)	DEN (n= 118)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *	Controle (n= 129)	DSSA (n= 74)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *
Genótipos										
A/A	59 (45,7)	43 (36,4)	-	-	-	59 (45,7)	28 (37,8)	-	-	-
A/G	60 (46,5)	61 (51,7)	0,21	1,39 (0,82-2,37)	0,27	60 (46,5)	39 (52,7)	0,30	1,36 (0,74-2,50)	0,38
G/G	10 (7,75)	14 (11,9)	0,15	1,92 (0,77-4,73)	0,22	10 (7,75)	7 (9,5)	0,47	1,47 (0,50-4,28)	0,66
A/G + G/G	70 (54,2)	75 (63,5)	0,13	1,47 (0,88-2,44)	0,17	70 (54,2)	46 (62,1)	0,27	1,38 (0,77-2,48)	0,34
A/A + A/G	119 (92,2)	104 (88,1)	0,45	1,19 (0,74-1,92)	0,52	119 (92,2)	67 (90,5)	0,53	1,18 (0,69-2,03)	0,62
Alelos										
A	178 (69,0)	147 (62,3)	-	-	-	178 (69,0)	95 (64,2)	-	-	-
G	80 (31,0)	89 (37,7)	0,11	1,34 (0,92-1,95)	0,14	80 (31,0)	53 (35,8)	0,32	1,24 (0,80-1,90)	0,37
<i>IL-10</i> -1082 A/G	Controle (n= 129)	DCSA (n= 44)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *	DSSA (n= 74)	DCSA (n= 44)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *
Genótipos										
A/A	59 (45,7)	15 (34,1)	-	-	-	28 (37,8)	15 (34,1)	-	-	-
A/G	60 (46,5)	23 (52,3)	0,27	1,50 (0,71-3,17)	0,36	39 (52,7)	23 (52,3)	0,81	1,10 (0,48-2,47)	0,97
G/G	10 (7,75)	6 (13,6)	0,19	2,36 (0,73-7,52)	0,24	7 (9,5)	6 (13,6)	0,52	1,60 (0,45-5,62)	0,68
A/G + G/G	70 (54,2)	29 (65,9)	0,17	1,62 (0,79-3,32)	0,24	46 (62,1)	29 (65,9)	0,68	1,17 (0,53-2,56)	0,83
A/A + A/G	119 (92,2)	38 (86,3)	0,50	1,25 (0,64-2,46)	0,62	67 (90,5)	38 (86,3)	0,88	1,05 (0,50-2,22)	0,96
Alelos										
A	178 (69,0)	53 (60,2)	-	-	-	95 (64,2)	53 (60,2)	-	-	-
G	80 (31,0)	35 (39,8)	0,13	1,46 (0,88-2,42)	0,16	53 (35,8)	35 (39,8)	0,54	1,18 (0,68-2,03)	0,63

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

Nas análises das frequências genóticas do SNP -1082 A/G (Tabela 9) observou-se que o genótipo A/G exibiu frequência de 51,7% no grupo DEN, apresentando significância estatística em relação ao grupo ASS com 37,6% ($p=0,01$, OR= 2,17, $p^*=0,01$), sendo associado como fator de susceptibilidade à dengue. No grupo DSSA, o genótipo A/G exibiu frequência de 52,7%, apresentando significância estatística quando comparado ao grupo ASS com 37,6% ($p=0,02$, OR= 2,13, $p^*=0,03$), sendo associado como fator de susceptibilidade à DSSA. No grupo DCSA, o genótipo A/G exibiu frequência de 52,3%, apresentando significância estatística em relação ao grupo ASS com 37,6% ($p=0,03$, OR= 2,34, $p^*=0,05$), sendo associado como fator de susceptibilidade à DCSA. Além disso, o referido genótipo teve frequência maior no grupo controle quando comparado ao grupo ASS ($p=0,12$, OR= 0,64, $p^*=0,16$), porém sem significância estatística.

O genótipo G/G exibiu frequência de 11,9% no grupo DEN, apresentando significância estatística quando comparado ao grupo ASS com 4,71% ($p=0,01$, OR= 3,98, $p^*=0,03$), sendo associado como fator de susceptibilidade à dengue. No grupo DCSA, o genótipo G/G exibiu frequência de 13,6%, apresentando significância estatística em relação ao grupo ASS com 4,71% ($p=0,02$, OR= 4,90, $p^*=0,04$), sendo associado como fator de susceptibilidade à DCSA. Além disso, o referido genótipo teve frequência maior no grupo DSSA em comparação ao grupo ASS ($p=0,10$, OR= 3,06, $p^*=0,16$), e frequência maior no grupo controle em comparação ao grupo ASS ($p=0,23$, OR= 0,48, $p^*=0,36$), contudo ambas as análises não relevaram significância estatística.

A combinação de genótipos A/G + G/G exibiu frequência de 63,5% no grupo DEN, apresentando significância estatística quando comparada ao grupo ASS com 42,3% ($p=0,002$, OR= 2,37, $p^*=0,004$), sendo associada como fator de susceptibilidade à dengue. No grupo DSSA, a combinação A/G + G/G exibiu frequência de 62,1%, apresentando significância estatística em relação ao grupo ASS com 42,3% ($p=0,01$, OR= 2,23, $p^*=0,02$), sendo associada como fator de susceptibilidade à DSSA. No grupo DCSA, a combinação A/G + G/G exibiu frequência de 65,9%, apresentando significância estatística em relação ao grupo ASS com 42,3% ($p=0,01$, OR= 2,63, $p^*=0,01$), sendo associada como fator de susceptibilidade à DCSA. Além disso, a referida combinação teve frequência maior no grupo controle quando comparada ao grupo ASS ($p=0,08$, OR= 0,61, $p^*=0,11$), contudo sem significância estatística.

A combinação de genótipos A/A + A/G exibiu frequência de 88,1% no grupo DEN em relação ao grupo ASS com 95,2% ($p=0,13$, OR= 1,46, $p^*=0,17$), entretanto não

apresentou diferença estatisticamente significativa. Além disso, a referida combinação teve frequência menor no grupo DSSA em comparação ao grupo ASS ($p= 0,19$, $OR= 1,44$, $p^*= 0,25$), frequência menor no grupo DCSA em comparação ao grupo ASS ($p= 0,22$, $OR= 1,53$, $p^*= 0,29$), e frequência menor no grupo controle em comparação ao grupo ASS ($p= 0,40$, $OR= 0,81$, $p^*= 0,48$), contudo as análises mencionadas não apresentaram significância estatística. Todas as frequências genotípicas se encontraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Ao analisar as frequências alélicas do SNP -1082 A/G (Tabela 9), observou-se que o alelo G exibiu frequência de 37,7% no grupo DEN, apresentando significância estatística quando comparado ao grupo ASS com 23,5% ($p= 0,002$, $OR= 1,96$, $p^*= 0,003$), sendo associado como fator de susceptibilidade à dengue. No grupo DSSA, o alelo G exibiu frequência 35,8%, apresentando significância estatística em relação ao grupo ASS com 23,5% ($p= 0,01$, $OR= 1,81$, $p^*= 0,02$), sendo associado como fator de susceptibilidade à DSSA. No grupo DCSA, o alelo G exibiu frequência de 39,8%, apresentando significância estatística em relação ao grupo ASS com 23,5% ($p= 0,006$, $OR= 2,14$, $p^*= 0,01$), sendo associado como fator de susceptibilidade à DCSA. Além disso, o referido alelo teve frequência maior no grupo controle em comparação ao grupo ASS ($p= 0,09$, $OR= 0,68$, $p^*= 0,11$), entretanto não mostrou diferença estatisticamente significativa.

Tabela 9 - Distribuição genotípica e alélica do SNP -1082 A/G (rs1800896) do gene *IL-10* nos grupos assintomático (ASS), casos (DEN, DSSA e DCSA) e controle.

<i>IL-10</i> -1082 A/G	ASS (n= 85)	DEN (n= 118)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *	ASS (n= 85)	DSSA (n= 74)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *
Genótipos										
A/A	49 (57,6)	43 (36,4)	-	-	-	49 (57,6)	28 (37,8)	-	-	-
A/G	32 (37,6)	61 (51,7)	0,01	2,17 (1,20-3,92)	0,01	32 (37,6)	39 (52,7)	0,02	2,13 (1,10-4,12)	0,03
G/G	4 (4,71)	14 (11,9)	0,01	3,98 (1,22-13,0)	0,03	4 (4,71)	7 (9,5)	0,10	3,06 (0,82-11,3)	0,16
A/G + G/G	36 (42,3)	75 (63,5)	0,002	2,37 (1,34-4,20)	0,004	36 (42,3)	46 (62,1)	0,01	2,23 (1,18-4,22)	0,02
A/A+ A/G	81 (95,2)	104 (88,1)	0,13	1,46 (0,88-2,41)	0,17	81 (95,2)	67 (90,5)	0,19	1,44 (0,82-2,54)	0,25
Alelos										
A	130 (76,5)	147 (62,3)	-	-	-	130 (76,5)	95 (64,2)	-	-	-
G	40 (23,5)	89 (37,7)	0,002	1,96 (1,26-3,05)	0,003	40 (23,5)	53 (35,8)	0,01	1,81 (1,11-2,95)	0,02
<i>IL-10</i> -1082 A/G	ASS (n= 85)	DCSA (n= 44)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *	ASS (n= 85)	Controle (n= 129)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> *
Genótipos										
A/A	49 (57,6)	15 (34,1)	-	-	-	49 (57,6)	59 (45,7)	-	-	-
A/G	32 (37,6)	23 (52,3)	0,03	2,34 (1,06-5,16)	0,05	32 (37,6)	60 (46,5)	0,12	0,64 (0,36-1,13)	0,16
G/G	4 (4,71)	6 (13,6)	0,02	4,90 (1,21-19,6)	0,04	4 (4,71)	10 (7,75)	0,23	0,48 (0,14-1,63)	0,36
A/G + G/G	36 (42,3)	29 (65,9)	0,01	2,63 (1,23-5,61)	0,01	36 (42,3)	70 (54,2)	0,08	0,61 (0,35-1,07)	0,11
A/A+ A/G	81 (95,2)	38 (86,3)	0,22	1,53 (0,76-3,07)	0,29	81 (95,2)	119 (92,2)	0,40	0,81 (0,51-1,31)	0,48
Alelos										
A	130 (76,5)	53 (60,2)	-	-	-	130 (76,5)	178 (69,0)	-	-	-
G	40 (23,5)	35 (39,8)	0,006	2,14 (1,23-3,73)	0,01	40 (23,5)	80 (31,0)	0,09	0,68 (0,44-1,06)	0,11

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

5.3 Análises haplotípicas dos SNPs do gene *IL-10*

Com o propósito de avaliar o possível efeito combinado entre os SNPs -819 C/T e -1082 A/G do gene *IL-10*, as frequências haplotípicas e o desequilíbrio de ligação foram analisados entre os grupos controle, DEN, DSSA e DCSA. Conforme evidenciado na Tabela 10, a presença do haplótipo duplo selvagem (C-A) foi menor nos grupos DEN e DCSA quando comparado ao grupo controle, porém não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Com relação ao haplótipo duplo polimórfico (T-G), a sua presença foi menor nos grupos DSSA e DCSA quando comparado ao grupo controle, contudo também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Ambos os SNPs do gene *IL-10* investigados apresentaram forte desequilíbrio de ligação entre si.

Tabela 10 – Distribuição das frequências haplotípicas dos SNPs -819 C/T (rs1800871) e -1082 A/G (rs1800896) do gene *IL-10*, comparadas entre os grupos controle, DEN, DSSA e DCSA.

Haplótipos	Controle (%)	DEN (%)	χ^2	p	p^a
T-A	36,4	31,8	1,141	0,2855	0,5290
C-G	29,4	37,4	3,514	0,0609	0,1640
C-A	32,7	30,4	0,295	0,5869	0,8720
Desequilíbrio	D' = 0,922	r ² = 0,239			
Haplótipos	Controle (%)	DSSA (%)	χ^2	p	p^a
T-A	36,3	29,3	2,073	0,1499	0,3660
C-A	32,8	34,9	0,181	0,6701	0,9620
C-G	29,3	35,3	1,608	0,2047	0,4490
T-G	1,6	0,5	1,031	0,3099	0,6690
Desequilíbrio	D' = 0,897	r ² = 0,209			
Haplótipos	Controle (%)	DCSA (%)	χ^2	p	p^a
T-A	36,3	3,8	0,007	0,9341	1,0000
C-G	29,3	4,4	3,69	0,0547	0,1560
C-A	32,8	2,2	2,83	0,0925	0,2400
T-G	1,6	0,5	0,553	0,4572	0,8840
Desequilíbrio	D' = 0,897	r ² = 0,243			
Haplótipos	DSSA (%)	DCSA (%)	χ^2	p	p^a
C-G	35,8	40,9	0,611	0,4345	0,6890
T-A	29,7	36,4	1,112	0,2916	0,5450
C-A	34,5	22,7	3,611	0,0574	0,1670
Desequilíbrio	D' = 1,0	r ² = 0,288			

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

A fim de avaliar o provável efeito combinado entre ambos os SNPs do gene *IL-10*, as frequências haplotípicas e o desequilíbrio de ligação também foram avaliados entre os grupos ASS, DEN, DSSA, DCSA e controle. De acordo com a Tabela 11, o haplótipo C-G foi mais frequente nos grupos DEN ($p = 0,0031$), DSSA ($p = 0,0195$) e DCSA ($p = 0,0045$)

quando comparado ao grupo ASS, sendo observadas associações estatisticamente significativas. O haplótipo C-A foi menos frequente nos grupos DEN, DSSA e DCSA em relação ao grupo ASS, porém não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Por outro lado, o haplótipo C-A foi mais frequente no grupo ASS ($p = 0,0265$) quando comparado ao grupo DCSA, sendo observada associação estatisticamente significativa. Ambos os SNPs do gene *IL-10* investigados apresentaram forte desequilíbrio de ligação entre si.

Tabela 11 – Distribuição das frequências haplotípicas dos SNPs -819 C/T (rs1800871) e -1082 A/G (rs1800896) do gene *IL-10*, comparadas entre os grupos assintomático, DEN, DSSA, DCSA e controle.

Haplótipos	ASS (%)	DEN (%)	χ^2	p	p^a
T-A	39,9	32,2	2,53	0,1117	0,2770
C-A	36,3	30,1	1,729	0,1886	0,4110
C-G	23,8	37,7	8,727	0,0031	0,0110
Desequilíbrio	D' = 1,0	$r^2 = 0,257$			
Haplótipos	ASS (%)	DSSA (%)	χ^2	p	p^a
C-A	36,3	34,5	0,118	0,7315	0,9570
T-A	39,9	29,7	3,558	0,0593	0,1530
C-G	23,8	35,8	5,457	0,0195	0,0630
Desequilíbrio	D' = 1,0	$r^2 = 0,226$			
Haplótipos	ASS (%)	DCSA (%)	χ^2	p	p^a
T-A	39,9	36,4	0,301	0,5831	0,8660
C-A	36,3	22,7	4,926	0,0265	0,0790
C-G	23,8	40,9	8,089	0,0045	0,0190
Desequilíbrio	D' = 1,0	$r^2 = 0,266$			
Haplótipos	Controle (%)	ASS (%)	χ^2	p	p^a
T-A	36,0	39,6	0,563	0,4532	0,8530
C-A	32,8	36,6	0,694	0,4046	0,8040
C-G	29,7	23,5	2,049	0,1523	0,3580
T-G	1,5	0,3	1,385	0,2392	0,5390
Desequilíbrio	D' = 0,903	$r^2 = 0,202$			

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

5.4 Associação dos SNPs do gene *IL-10* com a modulação das manifestações clínicas da dengue

Com o propósito de investigar melhor a associação dos SNPs do gene *IL-10* com a patogênese da dengue, e detectar um provável efeito de susceptibilidade ou proteção do alelo mutante sobre o desenvolvimento das manifestações clínicas da doença, o grupo DEN foi dividido em dois subgrupos: portadores do alelo T (carreadores C/T ou T/T) e não portadores -T (carreadores C/C) para o SNP -819 C/T. Ainda, portadores G (carreadores C/G ou G/G)

e não portadores-G (carreadores C/C) para o SNP -1082 A/G. Um total de 18 manifestações clínicas foram descritas no grupo DEN. As frequências de cada manifestação para os dois subgrupos foram comparadas pelo Teste Exato de Fisher. Um teste de Wilcoxon pareado foi aplicado para avaliar qualquer tendência de maior frequência de sintomas entre portadores do alelo mutante em comparação aos não portadores do alelo mutante.

Conforme visto na Tabela 12, a frequência das manifestações mostrou uma tendência a ser maior em portadores do alelo T (com 10 delas sendo mais prevalentes neste grupo). Ao comparar portadores T e não portadores-T para cada manifestação, as únicas diferenças significativas observadas foram para cefaleia ($p^*= 0,0264$), edemas ($p^*= 0,0323$) e calafrios ($p^*= 0,0478$), sugerindo assim o alelo T como fator de susceptibilidade para a cefaleia e fator de proteção para edemas e calafrios. Contudo, ao ser aplicado o Teste de Wilcoxon Pareado para comparar as frequências de todos os sintomas entre os grupos, não se identificou significância estatística ($z= 0,92, p= 0,35$).

Tabela 12 - SNP -819 C/T (rs1800871) do gene *IL-10* e as 18 manifestações clínicas da dengue mais presentes em pacientes do grupo DEN.

Manifestação Clínica	Frequência (n=119) (%)	Frequências alélicas		p*
		Portadores T (n=64) (%)	Não portadores-T (n=55) (%)	
Febre	107 (89,9)	58 (90,6)	49 (89,1)	1,0000
Cefaleia	99 (83,2)	58 (90,6)	41 (74,5)	0,0264
Artralgia	107 (89,9)	56 (87,5)	51 (92,7)	0,3801
Mialgia	89 (74,7)	51 (79,6)	38 (69,1)	0,2087
Exantema	84 (70,5)	43 (67,1)	41 (74,5)	0,0903
Dor retroorbitária	75 (63,0)	43 (67,1)	32 (58,1)	0,3448
Fraqueza/Prostração	83 (69,7)	45 (70,3)	38 (69,1)	1,0000
Prurido	80 (67,2)	40 (62,5)	40 (72,7)	0,2481
Náuseas	55 (46,2)	33 (51,5)	22 (40,0)	0,2687
Dor abdominal	28 (23,5)	14 (21,8)	14 (25,4)	0,6703
Vômitos	38 (31,9)	24 (37,5)	14 (25,4)	0,1735
Diarreia	24 (20,1)	14 (21,8)	10 (18,1)	0,6536
Dores nas costas	38 (31,9)	23 (35,9)	15 (27,2)	0,3316
Falta de apetite	26 (21,8)	14 (21,8)	12 (21,8)	1,0000
Edemas	28 (23,5)	10 (15,6)	18 (32,7)	0,0323
Calafrios	7 (5,8)	1 (1,5)	6 (10,9)	0,0478
Fotofobia	15 (12,6)	11 (17,1)	4 (7,2)	0,1649
Manifestações hemorrágicas	6 (5,0)	3 (4,6)	3 (5,4)	1,0000

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

Conforme visto na Tabela 13, a frequência das manifestações se mostrou similar entre os portadores do alelo G e não portadores-G (com prevalência de 9 delas em cada grupo). Ao comparar portadores G e não portadores-G para cada manifestação, foi observada

apenas uma tendência de associação à proteção contra a febre ($p^* = 0,0535$). Contudo, ao ser aplicado o Teste de Wilcoxon Pareado para comparar as frequências de todos os sintomas entre os grupos, não se identificou significância estatística ($z = 0,45$, $p = 0,64$).

Tabela 13 - SNP -1082 A/G (rs1800896) do gene *IL-10* e as 18 manifestações clínicas da dengue mais presentes em pacientes do grupo DEN.

Manifestação Clínica	Frequência (n=118) (%)	Frequências alélicas		p*
		Portadores G (n=75) (%)	Portadores Não-G (n=43) (%)	
Febre	106 (89,8)	64 (85,3)	42 (97,6)	0,0535
Cefaleia	98 (83,0)	62 (82,6)	36 (83,7)	1,0000
Artralgia	106 (89,8)	68 (90,6)	38 (88,3)	0,7559
Mialgia	88 (74,5)	58 (77,3)	30 (69,7)	0,3864
Exantema	83 (70,3)	55 (73,3)	28 (65,1)	0,4043
Dor retroorbitária	74 (62,7)	46 (61,3)	28 (65,1)	0,6983
Fraqueza/Prostração	82 (69,4)	55 (73,3)	27 (62,7)	0,2992
Prurido	79 (66,9)	54 (72,0)	25 (58,1)	0,1554
Náuseas	54 (45,7)	34 (45,3)	20 (46,5)	1,0000
Dor abdominal	27 (22,8)	15 (20,0)	12 (27,9)	0,3665
Vômitos	38 (32,2)	25 (33,3)	13 (30,2)	0,8385
Diarreia	24 (20,3)	14 (18,6)	10 (23,2)	0,6363
Dores nas costas	38 (32,2)	24 (32,0)	14 (32,5)	1,0000
Falta de apetite	26 (22,0)	16 (21,3)	10 (23,2)	0,8208
Edemas	28 (23,7)	18 (24,0)	10 (23,2)	1,0000
Calafrios	7 (5,9)	6 (8,0)	1 (2,3)	0,2618
Fotofobia	15 (12,7)	9 (12,0)	6 (13,9)	0,7794
Manifestações hemorrágicas	6 (5,0)	4 (5,3)	2 (4,6)	1,0000

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

5.5 Distribuição do alelo mutante dos SNPs do gene *IL-10* nas populações do mundo

Outro fator a ser apontado diz respeito à distribuição heterogênea do alelo mutante dos polimorfismos do gene *IL-10* nas populações do mundo. Neste estudo, a frequência do alelo T para o SNP -819 C/T na população norte-piauiense foi de 37,9%, sendo próxima às das populações de Cuba (37,7%) e Malawi (37,2%) (Tabela 14). Pode-se observar também que a frequência do alelo T na população brasileira do Estado do Ceará (51,0%, $p = 0,0437$) e na população do Sri Lanka (50,8%, $p = 0,0437$) foi significativamente maior quando comparada à frequência deste alelo na população norte-piauiense. Ainda, que a frequência do alelo T encontrada na população brasileira do Estado do Alagoas (26,3%, $p = 0,0475$), bem como nas populações da Ucrânia (24,0%, $p = 0,0232$), da Índia (23,8%, $p = 0,0232$) e da Tunísia (26,0%, $p = 0,0475$) foi significativamente menor quando comparada à frequência deste alelo na população norte-piauiense.

Tabela 14 - Comparação das frequências alélicas do SNP -819 C/T (rs1800871) do gene *IL-10*, com base em estudos genômicos de associação realizados na população mundial.

Etnicidade e País	N (Tamanho amostral)	Frequência (%)		p*	Referência
		C	T		
América					
Brasil (Piauí)	128	62,1	37,9	-	Este estudo
Brasil (Ceará)	46	49,0	51,0	0,0437	CANSANÇÃO et al., 2016
Brasil (Alagoas)	135	73,7	26,3	0,0475	SANTOS et al., 2017
Brasil (Rio de Janeiro)	325	64,0	36,0	0,4418	XAVIER-CARVALHO et al., 2013
Brasil (Paraná)	310	67,6	32,4	0,2293	MOREIRA et al., 2008
Brasil (Bahia)	91	58,2	41,8	0,3326	ALMEIDA et al., 2013
Canadá	332	72,0	28,0	0,0879	AMRE et al., 2008
Cuba	90	62,2	37,7	0,5579	PEREZ et al., 2010
Colômbia	100	57,0	43,0	0,2823	CARDONA-CASTRO et al., 2012
Europa					
Istanbul	150	69,0	31,0	0,1861	ATES et al., 2008
Macedônia	299	72,7	27,3	0,0654	TRAJKOV et al., 2009
Bulgária	86	58,7	41,3	0,3862	MIHAILOVA et al., 2005
Ucrânia	106	76,0	24,0	0,0232	ZASTAVNA et al., 2014
Ásia					
Sri Lanka	62	49,2	50,8	0,0437	FERNANDO et al., 2015
Índia	107	76,2	23,8	0,0232	ALAGARASU et al., 2015
Irã	140	71,1	28,9	0,1153	HANAEL et al., 2018
Arábia Saudita	211	65,8	34,1	0,3293	MOHAYA et al., 2015
Bahrain	307	70,5	29,5	0,1480	QADDOURAH et al., 2014
África					
Tunísia	300	74,0	26,0	0,0475	RAGUEMA et al., 2018
Moçambique	367	60,0	40,0	0,4424	MABUNDA et al., 2015
Sudão	206	51,7	48,3	0,0993	MHMOUD et al., 2013
Ghana	1972	57,6	42,4	0,3326	THYE et al., 2009
Malawi	698	62,8	37,2	0,4359	FITNESS et al., 2004

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

Neste estudo, a frequência do alelo G para o SNP -1082 A/G na população norte-piauiense foi de 31,0%, sendo próxima a da população brasileira do Estado do Pará (30,3%) (Tabela 15). Pode-se observar também que a frequência do alelo polimórfico foi significativamente maior na população da Turquia (48,2%, $p= 0,0102$) quando comparada à frequência deste alelo na população norte-piauiense. Já a frequência nas populações do Peru (16,9%, $p= 0,0154$) e da Malásia (6,8%, $p<0,001$) foi significativamente menor quando comparada à frequência do alelo na população norte-piauiense.

Tabela 15 – Comparação das frequências alélicas do SNP -1082 A/G (rs1800896) do gene *IL-10*, com base em estudos genômicos de associação realizados na população mundial.

Continentes e População	N (Amostras Genotipadas)	Frequência (%)		p*	Referência
		A	G		
América					
Brasil (Piauí)	129	69,0	31,0	-	Este estudo
Brasil (Paraná)	310	62,1	37,9	0,1861	MOREIRA et al., 2008
Brasil (Pará)	99	69,7	30,3	0,5000	FEITOSA et al., 2016
Colômbia	100	72,0	28,0	0,3783	CARDONA-CASTRO et al., 2012
Chile	172	71,8	28,2	0,3783	HORMAZABAL et al., 2014
Peru	510	83,1	16,9	0,0154	TAYPE et al., 2010
Honduras	161	78,0	22,0	0,0998	MORGAN et al., 2006
Cuba	90	66,1	33,8	0,3814	PEREZ et al., 2010
Europa					
Turquia	110	51,8	48,2	0,0102	ULGER et al., 2013
Macedônia	299	58,9	41,1	0,0924	TRAJKOV et al., 2008
Romênia	78	57,7	42,3	0,0708	BURADA et al., 2010
Filândia	205	58,5	41,5	0,0708	KAMANGAR et al., 2006
Ásia					
Índia	559	67,0	33,0	0,4398	PANDEY et al., 2018
Sri Lanka	62	67,0	33,0	0,4398	FERNANDO et al., 2015
Malásia	118	93,2	6,8	<0,001	SAM et al., 2015
Irã	140	64,2	35,4	0,3260	HANAEI et al., 2018
Cambodia	106	66,9	33,1	0,4398	DELGADO et al., 2002
África					
Tunísia	300	68,0	32,0	0,5000	RAGUEMA et al., 2018
Egito	80	61,0	39,0	0,1497	TALAAT et al., 2015
Malawi	541	60,7	39,3	0,1497	FITNESS et al., 2004
Ghana	1968	71,9	28,1	0,3783	THYE et al., 2009

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

6 DISCUSSÃO

Avanços recentes em estudos epidemiológicos revelaram que a base fisiopatológica da dengue resulta do envolvimento de três fatores: vírus, ambiente e hospedeiro (COFFEY et al., 2009; HERRERO et al., 2013; NEDJADI et al., 2015). Dentro deste último fator, destacam-se os polimorfismos em genes potencialmente envolvidos com a imunopatogênese da dengue, os quais podem ter efeitos significativos sobre a doença, com implicação em proteção, susceptibilidade ou risco de progressão para as suas formas graves (PEREZ et al., 2010; FANG et al., 2012; FERNANDO et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

A *IL-10* é uma citocina anti-inflamatória pleiotrópica que apresenta papel de destaque na patogênese da dengue com a sua atividade imunossupressora. Esta deprime a resposta antiviral mediada pelo IFN, levando a deficiência imunológica do hospedeiro e a persistência da doença (HARAPAN et al., 2013; TSAI et al., 2013; TAUSEEF et al., 2016; FLORES-MENDOZA et al., 2017). Diante disto, múltiplos estudos demonstraram que polimorfismos em genes de citocina podem influenciar o fenótipo de várias patologias, sendo considerados assim importantes marcadores de susceptibilidade ou proteção (VALLINOTO et al., 2010; FEITOSA et al., 2016; HANAIEI et al., 2018. HOLSTER et al., 2018; KUMARI et al., 2018).

Neste estudo, as frequências alélicas e genótípicas dos SNPs -819 C/T e -1082 A/G do gene *IL-10* foram analisadas em uma população do Nordeste do Brasil, em grupos de indivíduos com infecção confirmada por DENV, indivíduos com infecção assintomática e indivíduos do grupo controle negativo. Com relação ao SNP -819 C/T, não foi observada associação estatisticamente significativa deste com a dengue. Tais achados corroboram os resultados de Moreira et al. (2008), Xavier-Carvalho et al. (2013) e Santos et al. (2016), que também não encontraram associação do referido polimorfismo e a dengue nas populações brasileiras do Estado do Paraná, do Estado do Rio de Janeiro, e em um estudo de meta-análise compreendendo os SNPs dos genes *TNF- α* (-308 A/G) e *IL-10* (-819 C/T), respectivamente.

Contrastando com o perfil de associação encontrado aqui e em outros estudos, Cansanção e colaboradores (2016) identificaram uma predisposição para o desenvolvimento da dengue e de seus sintomas combinando os genótipos C/T e A/A dos SNPs dos genes *IL-10* (-819 C/T) e *TNF- α* (-308 A/G), respectivamente em uma população brasileira do Estado do Ceará ($p= 0,03$, OR= 8,40). Adicionalmente, no estudo conduzido por Alagarasu e colaboradores (2015) com a população da Índia, observaram que o genótipo C/T do SNP do

gene *IL-10* (-819 C/T) estava associado à proteção contra a FHD ($p= 0,014$, OR= 0,78). Ainda, Santos e colaboradores (2017) observaram uma associação protetora do alelo C do SNP do gene *IL-10* (-819 C/T) contra a FHD ($p= 0,028$, OR= 0,56), enquanto os genótipos C/T e T/T foram associados à FHD ($p= 0,047$, OR= 2,10) e à FD ($p= 0,008$, OR= 3,82), respectivamente em uma população brasileira do Estado do Alagoas.

No que se refere ao SNP -1082 A/G, sabe-se que o alelo “A” tem mostrado estar associado a baixos níveis de expressão da IL-10 quando comparado ao alelo “G” (TURNER et al., 1997; LOPEZ-MADERUELO et al., 2003). Níveis mais baixos podem contribuir com o desenvolvimento do processo inflamatório na dengue, enquanto níveis mais altos podem levar à diminuição da depuração viral, por meio da inibição de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ . Deste modo, o equilíbrio entre os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias pode atuar reduzindo a inflamação com subsequente depuração viral, enquanto o aumento de citocinas pró-inflamatórias e a diminuição das anti-inflamatórias, ou vice-versa, pode implicar no aumento da inflamação e conduzir a falha no processo de eliminação viral (ALAGARASU et al., 2015).

Considerando os resultados obtidos nesta pesquisa para o SNP -1082 A/G, hipotetiza-se que a presença do alelo G, dos genótipos A/G e G/G, e da combinação de genótipos A/G + G/G em pacientes com dengue os predispõem ao desenvolvimento da doença sintomática. Tais achados podem estar atrelados a níveis altos (alelo G e genótipo G/G) ou níveis intermediários (A/G) de expressão da IL-10 e possivelmente a níveis alterados de expressão de mediadores pró-inflamatórios, que conjuntamente promoveram o desequilíbrio da regulação imunológica dos pacientes durante a infecção, com conseqüente falha no processo de eliminação viral. O alelo e os genótipos mencionados podem estar associados com o desenvolvimento dos sintomas e com o agravamento do quadro clínico dos pacientes, visto que mostraram associação com as formas da dengue com ou sem sinais de alarme em relação aos pacientes assintomáticos.

Os resultados alcançados nesta pesquisa para o SNP -1082 A/G corroboram o estudo conduzido por Fernando et al. (2015) com população do Sri Lanka, onde a frequência do genótipo G/G se mostrou maior no grupo FHD do que no grupo controle, no entanto ambos não revelaram significância estatística. Ainda apoiam o estudo realizado por Sam et al. (2015) com população da Malásia, onde a frequência do genótipo G/G e do alelo G se mostrou maior no grupo FD quando comparado ao grupo controle, contudo ambos não exibiram significância estatística. Por outro lado, opõem-se aos estudos coordenados por

Moreira et al. (2008) e Feitosa et al. (2016), que não encontraram nenhuma associação significativa da variante -1082 A/G e a dengue nas populações brasileiras dos Estados do Paraná e Pará, respectivamente. Para confirmar ou contestar os resultados desta pesquisa, a classificação da DCSA foi correlacionada à FHD e a classificação da DSSA à FD.

No estudo de Fernandez-Mestre et al. (2004) com população venezuelana, a combinação de genótipos relacionados com a alta produção de TNF- α (-308; A/A ou A/G) e a baixa produção da IL-10 (-1082; A/A) foi associada significativamente à FHD quando comparada ao grupo controle ($p= 0,013$, OR= 19,5). Ainda, a combinação de genótipos foi associada significativamente à FHD quando comparada ao grupo FD ($p= 0,017$, OR= 17,4). Por outro lado, a combinação de genótipos envolvidos com a baixa produção de TNF- α (-308; G/G) e a baixa produção de IL-10 (-1082; A/A) se mostrou significativamente menor no grupo FHD quando comparada ao grupo FD ($p= 0,023$, OR= 0,0275). No entanto, os valores de p das comparações relatadas não foram significativos após a correção de Bonferroni.

No estudo de Perez et al. (2010) com população cubana foram realizadas combinações de alelos e/ou genótipos entre os polimorfismos dos genes *TNF- α* (-308 A/G), *IL-10* (-1082 A/G, -819 C/T, -592 C/A) e *IFN- γ* (+ 874 A/T) a fim de verificar a influência destes sobre a dengue. A combinação *TNF- α* (A) e *IL-10* (ACC/ATA) foi associada com susceptibilidade à FHD em relação ao grupo controle ($p= 0,003$, OR= 10,0). A combinação *TNF- α* (A) e *IL-10* (ACC ou ATA) conferiu risco à FHD em relação ao grupo controle ($p= 0,001$, OR= 3,92). A combinação *IFN- γ* (TT) e *IL-10* (ACC/ATA) aferiu risco à FHD em relação ao grupo controle ($p= 0,002$, OR= 17,3). Além disso, a combinação *TNF- α* (A), *IFN- γ* (T) e *IL-10* (ATA) revelou associação de risco à FHD em relação ao grupo controle ($p= 0,006$, OR= 9,16).

No estudo de Fernando et al. (2015), a combinação CCA/ATA do gene *IL-10* (-592 C/A, -819 C/T, -1082 A/G) foi associada com o risco à FHD ($p= 0,04$, OR= 2,42), e a combinação ATA/ATG foi associada à proteção contra a FHD ($p= 0,02$, OR= 0,09), ambas em relação ao grupo controle. No estudo de Santos et al. (2017) observaram associação da combinação GTA dos genes *TNF- α* (-308 G/A), *IL-10* (-819 C/T) e *IFN- γ* (+874 A/T) com susceptibilidade à FD ($p= 0,022$, OR= 2,95), e da combinação GCT com proteção contra o desenvolvimento da FHD ($p= 0,035$, OR= 0,28), ambas em relação ao grupo controle. No estudo de SAM et al. (2015), a combinação de haplótipos não-GCC do gene *IL-10* (-1082 A/G, -819 C/T, -592 C/A) e genótipos do gene *TNF- α* (-308; G/A + A/A) foi correlacionada

com efeitos protetores contra o desenvolvimento da FHD em relação ao grupo controle ($p=0,002$, OR= 0,3).

Tendo em vista as associações significativas de proteção ou risco à FHD descritas nos estudos acima, pode-se evidenciar a importância de pesquisas que avaliam a interação entre polimorfismos no gene da citocina anti-inflamatória IL-10 e polimorfismos em genes de citocinas pró-inflamatórias. A análise da interação entre diferentes genes pode ser útil para o entendimento de que uma resposta pró-inflamatória demasiada sem uma regulação satisfatória e oportuna relaciona-se com o desenvolvimento da dengue grave (PEREZ et al., 2010). Contudo, vale apontar que, os estudos reportados anteriormente encontraram associação com a dengue combinando genótipos do SNP -1082 A/G entre si ou com outros abordados na literatura, e apresentaram significância em relação ao grupo controle. Nenhum avaliou um grupo de pacientes assintomáticos e o impacto dos seus genótipos/alelo na manifestação dos sintomas da dengue, o que destaca o ineditismo do presente estudo caso-controle.

No que diz respeito às análises das frequências haplotípicas e do desequilíbrio de ligação entre os SNPs -819 C/T e -1082 A/G do gene *IL-10*, este foi o primeiro estudo a avaliar o provável efeito da interação entre tais variantes e os casos de dengue em relação a pacientes assintomáticos. Sabendo que o alelo “C” do SNP -819 C/T tem mostrado estar associado a altos níveis de expressão da IL-10 quando comparado ao alelo “T” (TURNER et al., 1997; PEREIRA et al., 2009; SALHI et al., 2008) e considerando os resultados obtidos neste estudo, sugere-se que o haplótipo C-G pode estar relacionado com altos níveis de expressão da IL-10 (-819C e -1082G) e supostamente com níveis alterados de expressão de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que mostrou associação significativa com a dengue com ou sem sinais de alarme quando comparado a dengue assintomática. Com relação ao haplótipo C-A, sugere-se que este pode estar relacionado possivelmente com níveis intermediários de expressão da IL-10 (-819C e -1082A) e com níveis ligeiramente alterados de expressão de citocinas pró-inflamatórias, tendo em vista que mostrou associação significativa com a dengue assintomática quando comparado a dengue com sinais de alarme.

Em referência ainda aos resultados das análises haplotípicas deste estudo, os haplótipos C-G (-819C e -1082G; $p=0,0045$) e C-A (-819C e -1082A; $p=0,0265$) do gene *IL-10* mostraram associação com a FHD, ambos em relação ao grupo assintomático. Por outro lado, no estudo de Perez et al. (2010), o haplótipo ACC/ATA do gene *IL-10* (-1082 A/G, -819 C/T, -592 C/A) foi associado com a FHD em relação ao grupo controle ($p=0,02$).

Tal haplótipo foi previamente estudado e relacionado com a baixa expressão da IL-10 (TURNER et al., 1997). Com base nos seus achados, Perez et al. (2010) hipotetizaram que uma expressão insuficiente da IL-10 poderia ser responsável pela regulação imunológica ineficiente da dengue no hospedeiro.

Conforme observado nesta pesquisa, os SNPs -819 C/T e -1082 A/G do gene *IL-10* apresentaram forte desequilíbrio de ligação entre si. Os estudos conduzidos por Xia et al. (2018) com população chinesa exibindo paralisia cerebral, Qaddourah et al. (2014) com população árabe exibindo condição de perda de gravidez recorrente, e Zidi et al. (2015) com população da Tunísia exibindo câncer cervical, corroboraram os resultados encontrados aqui, uma vez que detectaram também um forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos. Por outro lado, outros estudos encontraram forte desequilíbrio de ligação apenas entre as três variantes do gene *IL-10* (-1082 A/G, -819 C/T, -592 C/A) (TURNER et al., 1997; ATEs et al., 2008; LIMA et al., 2009; POOJA et al., 2012) ou entre as variantes -819 C/T e -1082 A/G e outros polimorfismos em genes candidatos (MYHR et al., 2002; SCARPELLI et al., 2006; AMRE et al., 2009, FIGUEIREDO et al., 2013).

No que se refere a investigação da associação dos SNPs do gene *IL-10* com as manifestações clínicas da dengue, os resultados deste estudo mostraram que os pacientes do grupo DEN portadores do alelo T do SNP -819 C/T apresentaram maior ocorrência das manifestações clínicas da dengue do que os portadores não-T, sendo encontradas associações significativas de susceptibilidade para o desenvolvimento da cefaleia ($p^*= 0,0264$) e de proteção contra o desenvolvimento de edemas ($p^*= 0,0323$) e calafrios ($p^*= 0,0478$). Considerando tais achados, os quais constituem os primeiros relatos sobre a associação do SNP -819 C/T com a modulação da sintomatologia de pacientes com dengue, sugere-se que o alelo T mutante apresenta influência sobre a patogênese do DENV durante a infecção.

No estudo de Sam e colaboradores (2015), os pacientes com dengue foram estratificados, baseados nas suas apresentações clínicas, e analisados quanto a distribuição dos polimorfismos dos genes *TNF- α* , *IL-12B* e *IL-10*. Os achados revelaram associações significativas das combinações dos SNPs *TNF- α* -308GA+AA/ *IL-10* não-GCC ($p= 0,001$, OR= 0,10), *IL12B*-3UTR (AC+CC)/*IL-10* não-GCC ($p= 0,007$, OR= 0,10), e *IL12B* (pro1+pro2)/*IL-10* não-GCC ($p= 0,014$, OR= 0,20) com trombocitopenia, sendo associadas como fator de proteção contra esta característica clínica. Além disso, a combinação dos SNPs *TNF- α* -308GA+AA/*IL-10* não-GCC ($p= 0,046$, OR= 0,38) mostrou relevância estatística

com AST aumentada, sendo associada também como fator de proteção contra esta característica clínica.

Ao comparar os diferentes resultados obtidos na análise da frequência dos alelos T e G dos respectivos SNPs -819 C/T e -1082 A/G deste estudo com a encontrada nas populações do mundo, observou-se que é importante levar em consideração a influência da etnia/raça, uma vez que esta pode induzir à heterogeneidade na distribuição dos alelos mutantes, influenciando diretamente os estudos genômicos de associação (FEITOSA et al., 2016; XAVIER-CARVALHO et al., 2017). Vale ressaltar que, em relação a outras populações brasileiras, foram detectadas diferenças significativas apenas na frequência do alelo T do SNP -819 C/T nos estudos conduzidos com as populações dos Estados do Ceará e Alagoas. Tais achados podem decorrer da alta miscigenação da população brasileira, formada principalmente por imigrantes europeus, indígenas nativos e escravos africanos (CARVALHO-SILVA et al., 2001; COSTA et al., 2015; KEHDY et al. 2015; PEREIRA et al., 2017). Comprovando o relato anterior, Lopes et al. (2014) ao avaliarem o grau de miscigenação da população residente no Estado do Piauí utilizando 46 marcadores informativos de ancestralidade, encontraram que a população mencionada era composta por descendências europeia (60%), africana (21,5%) e ameríndia (18,5%). Devido ao país possuir uma grande extensão territorial e estar ligado a diferentes aspectos históricos, estudos realizados em outras regiões do Brasil podem apresentar influência sobre os polimorfismos genéticos, e conseqüentemente sobre a distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos mesmos (MOREIRA et al., 2008; COSTA et al., 2015; FERREIRA-FERNANDES et al., 2015).

Estudos do tipo caso-controle para a dengue compreendem limitações que levam a diferentes resultados de associação com as mais variadas populações. E, por conseguinte, induzem ao baixo grau de replicação dos estudos, uma vez que vários fatores prejudicam a detecção de associações dos polimorfismos com a doença (CHAPMAN; HILL, 2012, XAVIER-CARVALHO et al., 2017). Como fatores limitantes, pode-se apontar: tamanho amostral pequeno e estratificação populacional duvidosa. Adicionalmente, tem-se a definição errônea de casos e controles, a variabilidade genética populacional e as variações não observadas nas interações gene-ambiente ou patógeno-hospedeiro (COFFEY et al., 2009; LAN; HIRAYAMA, 2011; CHAPMAN; HILL, 2012). Tais obstáculos podem dificultar o entendimento verdadeiro do papel da genética de polimorfismos na dinâmica das populações com infecção por dengue ou outras doenças.

Os dados desta pesquisa apontam uma possível relação do alelo G e dos genótipos A/G e G/G do SNP -1082 A/G, bem como do haplótipo C-G com a dengue sintomática. Além disso, indicam uma provável relação do haplótipo C-A com a dengue assintomática. Contudo, vale enfatizar que, os resultados aqui descritos são peculiares de uma população do Nordeste do Brasil. Estudos abrangentes que envolvam a combinação de polimorfismos de diferentes citocinas são convenientes e necessários para a compreensão do efeito dos genes sobre o aumento do risco à doença e de sua severidade na população estudada. Além disso, estudos funcionais que avaliem o perfil sérico de citocinas nos pacientes com dengue podem fornecer dados complementares potenciais para a investigação do panorama imunológico do hospedeiro.

Considerando que os polimorfismos genéticos regulam a produção de citocinas, e que estes têm sido associados à fenótipos distintos da dengue, torna-se de grande importância o estudo das variantes -819 C/T e -1082 A/G do gene *IL-10* como fator genético do hospedeiro para o entendimento de mecanismos envolvidos na complexa patogênese da dengue grave, compreensão da relação hospedeiro-doença, e para um melhor direcionamento de medidas terapêuticas e preventivas contra a patologia, considerando o impacto global da doença para a população.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados neste estudo, pode-se concluir que:

- O genótipo A/G do SNP -1082 A/G foi associado com susceptibilidade à dengue, à DSSA e à DCSA em relação ao grupo assintomático;
- O genótipo G/G do SNP -1082 A/G foi associado com susceptibilidade à dengue e à DCSA em relação ao grupo assintomático;
- A combinação de genótipos A/G + G/G do SNP -1082 A/G foi associada com susceptibilidade à dengue, à DSSA e à DCSA em relação ao grupo assintomático;
- O alelo G do SNP -1082 A/G foi associado com susceptibilidade à dengue, à DSSA e à DCSA em relação ao grupo assintomático;
- O haplótipo C-G foi associado com a dengue, a DSSA e a DCSA em relação ao grupo assintomático;
- O haplótipo C-A foi associado com a dengue assintomática em relação ao grupo DCSA;
- O alelo mutante T do SNP -819 C/T revelou associação de predisposição para o desenvolvimento da cefaleia e de proteção contra o desenvolvimento de edemas e calafrios, quando analisado de forma individual com as manifestações clínicas;
- Na análise da distribuição do alelo mutante do SNP -819 C/T nas populações do mundo, a frequência obtida neste estudo diferiu significativamente da encontrada nas populações do Brasil (Ceará e Alagoas), Sri Lanka, Ucrânia, Romênia, Índia e Tunísia;
- Na análise da distribuição do alelo mutante do SNP -1082 A/G nas populações do mundo, a frequência obtida neste estudo diferiu significativamente da encontrada nas populações da Turquia, Peru e Malásia.

8 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brazil, 2008.
- ABUBAKAR, S.; WONG, P. F.; CHAN, Y. F. Emergence of dengue virus type 4 genotype IIA in Malaysia. **The Journal of General Virology**, v. 83, n.10, p. 2437–42, 2002.
- ALAGARASU, K.; BACHAL, R. V.; TILLU, H. Association of combinations of interleukin-10 and proinflammatory cytokine gene polymorphisms with dengue hemorrhagic fever. **Cytokine**, v. 74, p. 130–136, 2015.
- ALCARAZ-ESTRADA, S. L.; et al. Construction of a dengue virus type 4 reporter replicon and analysis of temperature-sensitive mutations in non-structural proteins 3 and 5. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 11, p. 2713-2718, 2010.
- ALEXANDER, N.; et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. **Tropical medicine & international health**, v. 16, n. 8, p. 936-948, 2011.
- ALMEIDA, N. P.; et al. Polymorphisms of the cytokine genes TGFB1 and IL10 in a mixed-race population with Crohn's disease. **BMC research notes**, v. 6, n. 1, p. 387, 2013.
- AL-MOHAYA, M. A.; et al. TNF- α , TNF- β and IL-10 gene polymorphism and association with oral lichen planus risk in Saudi patients. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 3, p. 295-301, 2015.
- ALVARADO-ARNEZ, L. E.; et al. Association of IL10 polymorphisms and leprosy: A meta-analysis. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0136282, 2015.
- ALVA-URCIA, C.; et al. Emerging and reemerging arboviruses: A new threat in Eastern Peru. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0187897, 2017.
- AMRE, D. K.; et al. Interleukin 10 (IL-10) gene variants and susceptibility for paediatric onset Crohn's disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 29, n. 9, p. 1025-1031, 2009.
- AN, Y.; et al. IL-10 genetic polymorphisms were associated with valvular calcification in Han, Uygur and Kazak populations in Xinjiang, China. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128965, 2015.
- AÑEZ, G.; et al. Circulation of different lineages of dengue virus type 2 in Central America, their evolutionary time-scale and selection pressure analysis. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e27459, 2011.
- ANDERS, K. L.; et al. Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 1, p. 127-134, 2011.

- ANDRADE, G. C.; et al. Arboviruses and the eye. **International Journal of Retina and Vitreous**, v. 3, n. 1, p. 4, 2017.
- ATES, Ö.; et al. Association between ‘interleukin’10 gene (IL10) polymorphisms and systemic sclerosis with interstitial lung involvement. **Rheumatology international**, v. 28, n. 11, p. 1123, 2008.
- AVIRUTNAN, P.; et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 8, p. 1078-1088, 2006.
- AZEREDO, E. L.; et al. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 143, n. 2, p. 345-356, 2006.
- AZEREDO, E. L.; et al. Characterization of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. **Immunobiology**, v.204, p.494–507, 2001.
- BACK, A. T.; LUNDKVIST, A. Dengue viroses, an overview. **Infection and Epidemiology**, v. 3, n. 19839, p. 1-21, ago. 2013.
- BANCHEREAU, J.; et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 767-811, 2000.
- BARNIOL, J.; et al. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. **BMC infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 106, 2011.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. L. C. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. 2008.
- BARROS, E. L. T. **Caracterização molecular de *Chikungunya virus* e investigação dos arbovírus *Dengue virus* e *Mayaro virus* no Estado do Piauí**. 2018. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2018.
- BASUKI, P. S.; et al. Application of revised dengue classification criteria as a severity marker of dengue viral infection in Indonesia. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 41, n. 5, p. 1088, 2010.
- BATISTA, W. C.; et al. Notification of the first isolation of Cacipacore virus in a human in the State of Rondônia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 528-530, 2011.
- BHATT, S.; et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n.7446, p.504-507, 2013.
- BICHAUD, L.; et al. Arthropods as a source of new RNA viruses. **Microbial pathogenesis**, v. 77, p. 136-141, 2014.

BLACKSELL, S. D.; et al. Evaluation of six commercial point-of-care tests for diagnosis of acute dengue infections: the need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 12, p. 2095-2101, 2011.

BOONNAK, K.; et al. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Journal of Virology**, v. 82, n. 8, p. 3939-3951, 2008.

BOONNAK, K.; et al. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Journal of virology**, v. 85, n. 4, p. 1671-1683, 2011.

BOURNAZOS, S.; et al. Association of FcγRIIa (CD32a) with lipid rafts regulates ligand binding activity. **The Journal of Immunology**, 182, p. 8026–8036, 2009.

BRASIER, A. R.; et al. Three-component biomarker panel for prediction of dengue hemorrhagic fever. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n.2, p. 341–348, 2012.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 35. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n. 30, p. 1-14, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico adulto e criança**. 4ª edição. Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota técnica N.º 110 / 2010 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS: Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil. Brasília, 2010. 2 p.

BRONZONI, R. V.; 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.

BROOKS, D. G.; et al. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. **Nature medicine**, v. 12, p.1301-9, 2006.

BRUHNS, P.; et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. **Blood**. v.113, n.16, p.3716–3725, 2009.

BURADA, F.; et al. IL-10 -1082 A/G polymorphism and risk of the gastric cancer. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology**, v. 15, n. 1, 2010.

- BUTTHEP, P.; et al. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 31, p. 232–238, 2012.
- CAFFERATA, M. L.; et al. Dengue Epidemiology and Burden of Disease in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. **Value In Health Regional Issues**, v. 2, n. 3, p. 347-356, dez. 2013.
- CÂMARA, F. P.; et al. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 192-196, mar-abr. 2007.
- CANSANÇÃO, I. F.; et al. Association of genetic polymorphisms of IL1b -511 C>T, IL1RN, VNTR 86 bp, IL6 -174 G>C, IL10 -819 C>T and TNFa -308 G>A, involved in symptomatic patients with dengue in Brazil. **Inflammation Research**, v.65, p. 925–932, 2016.
- CARDONA-CASTRO, N.; et al. IL-10 gene promoter polymorphisms and leprosy in a Colombian population sample. **Biomédica**, v. 32, n. 1, p. 71-76, 2012.
- CARNEIRO, A. R.; et al. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 805–812, 2012.
- CARVALHO-SILVA, D. R.; et al. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 1, p. 281-286, 2001.
- CASSEB, A. D. R.; et al. Arbovírus: Importante zoonose na Amazônia Brasileira. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, 2013.
- CAVALCANTI, L. P. G.; et al. Evaluation of the WHO classification of dengue disease severity during an epidemic in 2011 in the state of Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 93-98, 2014.
- CEDILLO-BARRÓN, L.; et al. Antibody response to dengue virus. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 9, p. 711-720, set. 2014.
- CERWENKA, A.; LANIER, L. L. Natural killer cells, viruses and cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 1, p. 41-49, 2001.
- CHAMBERS, T. J.; et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 649-688, 1990.
- CHAN, C.Y.Y; OOI, E. E. Dengue: an update on treatment options. **Future microbiology**, v. 10, n. 12, p. 2017-2031, 2015.
- CHANG, G. J. Molecular biology of dengue viruses. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**, 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, 2007.
- CHAPMAN, S. J.; HILL, A. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nature Reviews Genetics*, v. 13, n. 3, p. 175, 2012.
- CHATURVEDI, U.; NAGAR, R.; SHRIVASTAVA, R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. **Pathogens and Disease**, v. 47, n.2, p. 155-166, 2006.
- CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue—quo tu et quo vadis? **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1562-1608, 2011.
- CHEN, R.F.; et al. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.101, p.1106-1113, 2007.
- CHUANSUMRIT, A.; et al. Tumour necrosis factor gene polymorphism in dengue infection: association with risk of bleeding. *Paediatrics and international child health*, v. 33, n. 2, p. 97-101, 2013.
- CLETON, N.; et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191-203, 2012.
- CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.
- COFFEY, L.L; et al. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 2, p. 143-156, 2009.
- 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.
- COX; BROWN; RICO-HESSE. Variation in vector competence for dengue viruses does not depend on mosquito midgut binding affinity. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 5, p. e1172, 2011.
- CRUVINEL, W. M.; et al. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.
- DA CUNHA PEREIRA, A. C. T.; et al. High prevalence of dengue antibodies and the arginine variant of the FcγRIIa polymorphism in asymptomatic individuals in a population of Minas Gerais State, Southeast Brazil. **Immunogenetics**, v. 70, n. 6, p. 355-362, 2018.
- DE CARVALHO, C. X.; et al. Host genetics and dengue fever. *Infection, Genetics and Evolution*, 2017.

- DEJNIRATTISAI, W.; et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 745-748, 2010.
- DELGADO, J C.; et al. Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 10, p. 1463-1468, 2002.
- DE LIMA, T. H. B.; et al. Cytokine gene polymorphisms in preeclampsia and eclampsia. **Hypertension Research**, v. 32, n. 7, p. 565, 2009.
- DETTOGNI, R.S.; et al. Polymorphic genetic variation in immune system genes: a study of two populations of Espirito Santo, Brazil. **Molecular biology reports**. v. 40, p. 4843–4849, 2013.
- DIAMOND, M. S.; PIERSON, T. C. Molecular insight into dengue virus pathogenesis and its implications for disease control. **Cell**, v. 162, n. 3, p. 488-492, 2015.
- DICK, O. B.; et al. The history of dengue outbreaks in the Americas. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584-593, 2012.
- DONALISIO, M.R.C. O enfrentamento de epidemias: as estratégias e perspectivas do controle do dengue. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Médicas. Campinas: Universidade de Campinas, 1995.
- DONALISIO, M. R.; et al. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saude publica**, v. 51, 2017.
- DOS SANTOS, A. C. M.; et al. Association of TNFA (– 308G/A), IFNG (+ 874 A/T) and IL-10 (– 819 C/T) polymorphisms with protection and susceptibility to dengue in Brazilian population. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 10, n. 11, p. 1065-1071, 2017.
- DUELL, B. L.; et al. Recent insights into microbial triggers of interleukin-10 production in the host and the impact on infectious disease pathogenesis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 295-313, 2012.
- DUSSART, P.; et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. **Clinical and vaccine immunology**, v. 13, n. 11, p. 1185-1189, 2006.
- Ensembl. **rs1800871 SNP**. Disponível em: <
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:206772789-206773789;v=rs1800871;vdb=variation;vf=1242988 >. Acesso em: 02 de nov. 2017.
- FAGUNDES, C. T.; et al. Therapeutic opportunities in dengue infection. **Drug Development Research**, v. 72, n. 6, p. 480-500, 2011.
- FANG, X.; et al. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. **Immunology & Medical Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 134-146, nov. 2012.

FARIA, N. R.; et al. Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 3, p. e2095, 2013.

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

FERNANDES-MESTRE, M. T.; et al. TNF α -308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens**, v. 64, p. 469–472, 2004.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D.; et al. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 4, p. 318-328, 2009.

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, 2015.

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

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

FERREIRA, R. A. X.; et al. Circulating cytokines and chemokines associated with plasma leakage and hepatic dysfunction in Brazilian children with dengue fever. **Acta tropica**, v. 149, p. 138-147, 2015.

FIGUEIREDO, C. A.; et al. Coassociations between IL10 polymorphisms, IL-10 production, helminth infection, and asthma/wheeze in an urban tropical population in Brazil. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 6, p. 1683-1690, 2013.

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, 2014.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil I: history, epidemiology and research. **Virus Reviews & Research**, v. 1, n. 1-2 p. 9-16, 1996.

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

FIGUEIREDO, L.T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v.2, n.13, p.1643-91, 2000.

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

FIGUEIREDO, M.L.G; FIGUEIREDO, L.T.M. Review on Infections of the Central Nervous System by St. Louis Encephalitis, Rocio and West Nile Flaviviruses in Brazil, 2004-2014. **Advances in Microbiology**, v. 4, p. 955-961, 2014.

FITNESS, J.; et al. Large-scale candidate gene study of tuberculosis susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, n. 3, p. 341-349, 2004.

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

FLORES-MENDOZA, L. K.; et al. IL-10 and socs3 Are Predictive Biomarkers of Dengue Hemorrhagic Fever. **Mediators of inflammation**, v. 2017, 2017.

FORMENTI, L. Casos de Chikungunya no Brasil aumentam 65% em um mês e meio. Disponível em: info.abril.com.br/noticias/ciencia/2015/01/casos-de-chikungunya-no-brasil-aumentam-65-em-um-mes-e-meio.shtml. 2015.

FRANCO, L.; et al. Recent expansion of dengue virus serotype 3 in West Africa. **Euro Surveill**, v. 15, n. 7, p. 578-583, 2010.

FRIED, J. R.; et al. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 3, p. e617, 2010.

GAMBLE, J.; et al. Age-related changes in microvascular permeability: a significant factor in the susceptibility of children to shock? **Clinical Science**, v. 98, n. 2, p. 211-216, 2000.

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.

GARCIA, C. C.; et al. The development of anti-inflammatory drugs for infectious diseases. **Discovery medicine**, v. 10, n. 55, p. 479-488, 2010.

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

GESSNER, J. E.; et al. The IgG Fc receptor family. **Annals of hematology**, v. 76, n. 6, p. 231-248, 1998.

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.

- GONÇALVEZ, A.; et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. **Virology**, v. 303, n. 1, p. 110–119, 2002.
- GONZALEZ-HORMAZABAL, P.; et al. Role of cytokine gene polymorphisms in gastric cancer risk in Chile. **Anticancer research**, v. 34, n. 7, p. 3523-3530, 2014.
- GOULD, E.A; HIGGS, S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.130, n.2, p.109–121, 2009.
- GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **The Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500-509, 2008.
- GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Current opinion in infectious diseases**, v. 19, n. 5, p. 429-436, 2006.
- GUBLER, D. J. Human behaviour and cultural context in disease control. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, v. 2, n. 11, p. A1-2, 1997.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.
- GUBLER, D. J.; et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 1, p. 158-165, 1984.
- GUBLER, D. J.; et al. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. CABI, 2014.
- GUBLER, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n.1, p.13-24, 2001.
- GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. **Tropical medicine and health**, v. 4, n. 39, p. 3-11, 2011.
- GUBLER, D. J. The global resurgence of arboviral diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n.5, p.449-51, 1996.
- GUPTA, N.; CHATURVEDI, U. C. Can helper T-17 cells play a role in dengue haemorrhagic fever. **Indian J Med Res**, v.130, pp 5-8, 2009.
- GUZMAN, M. G.; et al. Dengue infection. **Nature reviews**, v. 2, 2016.
- GUZMAN, M. G.; et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, n.120, p. 7-16, 2010.
- GUZMAN, A.; ISTÚRIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 1, p. 40-42, nov. 2010.

GUZMAN, M. G.; VAZQUEZ, S.. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Viruses**, v. 2, n. 12, p. 2649-2662, 2010.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International journal of infectious diseases**, v. 8, n. 2, p. 69-80, 2004.

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

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

HADINEGORO, S. R. S. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? **Paediatrics and international child health**, v. 32, n. sup1, p. 33-38, 2012.

HALSTEAD, S. B.; et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 3, p. 180-183, 2001.

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

HALSTEAD, S. B. Dengue haemorrhagic fever—a public health problem and a field for research. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 1, p. 1, 1980.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypothesis and discussion. **Yale Journal of Biology and Medicine** 1970, v. 42, p. 350-360, 1970.

HAMMOND, S. N.; et al. Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 73, n. 6, p. 1063-1070, 2005.

HANA EI, S. et al. Association of NLRP3 single nucleotide polymorphisms with ulcerative colitis: A case-control study. **Clinics and research in hepatology and gastroenterology**, 2017.

HARAPAN, H.; et al. Genetic polymorphisms of HLA and HLA-related proteins: Implications on dengue virus infection. **Journal of Mosquito Research**, v. 3, n. 1, 2013.

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

HOLSTER, A.; et al. IL-17A gene polymorphism rs2275913 is associated with the development of asthma after bronchiolitis in infancy. **Allergology International**, v. 67, n. 1, p. 109-113, 2018.

HORSTICK, O.; TOZAN, Y.; WILDER-SMITH, A. Reviewing dengue: still a neglected tropical disease? **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003632, 2015.

HOWE, G. M.; et al. **A world geography of human diseases**. Academic Press Inc.(London) Ltd., 24/28 Oval Road, London NW1 7DX., 1977.

HSIA, T. C.; et al. Interleukin-10 (IL-10) promoter genotypes are associated with lung cancer risk in Taiwan males and smokers. **Anticancer research**, v. 34, n. 12, p. 7039-7044, 2014.

HU, M.; et al. IL-10 and PRKDC polymorphisms are associated with glioma patient survival. **Oncotarget**, v. 7, n. 49, p. 80680, 2016.

HUANG, J.; et al. Serum Cytokine Profiles in Patients with Dengue Fever at the Acute Infection Phase. **Disease markers**, v. 2018, 2018.

HULETT, M.D.; HOGARTH, P.M. Molecular basis of Fc receptor function. **Advances in immunology**, v.57, p.1-127. 1994.

HUNG, N. Thanh et al. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 4, p. 370-374, 2005.

INDHUMATHI, S.; et al. Pharmacogenetic markers to predict the clinical response to methotrexate in south Indian Tamil patients with psoriasis. **European journal of clinical pharmacology**, v. 73, n. 8, p. 965-971, 2017.

ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 41-51, 2001.

JAENISCH, T.; et al. Clinical evaluation of dengue and identification of risk factors for severe disease: protocol for a multicentre study in 8 countries. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 120, 2016.

JALILY, Q. A.; PAVANI, G.; NANDESHWAR, A. J. Screening for dengue infection in clinically suspected cases in a rural teaching hospital. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 3, n. 2, p. 26-29, 2017.

JANEWAY, C. A. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 13, p. 7461-7468, 2001.

JIANG, S.; et al. Association of IL-10 polymorphisms with acute pancreatitis. **Int J Clin Exp Med**, v. 9, n. 12, p. 23702-23706, 2016.

JIN, L.; et al. Interleukin-10 promoter variants predict HPV-positive tumors and survival of squamous cell carcinoma of the oropharynx. **The FASEB Journal**, v. 27, n. 6, p. 2496-2503, 2013.

- JUNG, M.; et al. Expression profiling of IL-10 -regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy. **European journal of immunology**, v. 34, p. 481–493, 2004.
- KAMANGAR, F.; et al. Polymorphisms in inflammation-related genes and risk of gastric cancer (Finland). **Cancer Causes & Control**, v. 17, n. 1, p. 117-125, 2006.
- KALAYANAROOJ, S. Clinical Manifestations and Management of Dengue/DHF/DSS. **Tropical Medicine and International Health**, v. 39, p. 83-87, 2011.
- KARABATSOS, N. International catalogue of arthropod-borne viruses. San Antonio, TX: **American Society for Tropical Medicine and Hygiene**, p. 3, 1985.
- KEHDY, F.; et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 28, p. 8696-8701, 2015.
- KHAIB DIT NAIB, O.; et al. Association analysis of IL10, TNF- α , and IL23R-IL12RB2 SNPs with Behçet's disease risk in Western Algeria. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 342, 2013.
- KE, Z.; et al. IL-10 Polymorphisms and Tuberculosis Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. **Yansei Medical Journal**, v. 56, n. 5, p. 1274-1287, 2015.
- KEHDY, F. S. G; et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 28, p. 8696-8701, 2015.
- KELSALL, B. L.; et al. Dendritic cells at the host-pathogen interface. **Nature immunology**, v. 3, n. 8, p. 699, 2002.
- KIMURA, T.; OHYAMA, A. Association between the pH-dependent conformational change of West Nile flavivirus E protein and virus-mediated membrane fusion. **Journal of general virology**, v. 69, n. 6, p. 1247-1254, 1988.
- KOURI, G. P.; et al. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 67, n. 4, p. 375, 1989.
- KUBERSKI, T. T.; ROSEN, L. A simple technique for the detection of dengue antigen in mosquitoes by immunofluorescence. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 26, p. 533–537, 1997.
- KUMARI, R.; et al. Promoter variants of TNF- α rs1800629 and IL-10 rs1800871 are independently associated with the susceptibility of coronary artery disease in north Indian. **Cytokine**, v. 110, p. 131-136, 2018.

- KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases.**, v. 30, n. 5, p. 329-340, 2007.
- LAN, N. T. P.; HIRAYAMA, K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. **Tropical medicine and health**, v. 39, n. 4SUPPLEMENT, p. S73-S81, 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.
- LANCIOTTI, R. S.; et al. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. **The Journal of General Virology**, v. 75, n. 1, p. 65-75, 1994.
- LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **The Journal of General Virology**, v. 78, n. 9, p. 2279-2286, 1997.
- LANCIOTTI, R.S.; et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the Northeastern United States. **Science**, v. 286, n. 5448, p.2333-2337, 1999.
- LEWIS, J.A.; CHANG, G.J.; LANCIOTTI, R.S.; et al. - Phylogenetic relationship of dengue-2 viruses. **Virology**, 197: 216-224, 1993.
- LIANG, B.; GUO, Y.; LI, Y.; KONG, H. Association between IL-10 Gene Polymorphisms and Susceptibility of Tuberculosis: Evidence Based on a Meta-Analysis. **PLOS one**, v. 9, n. 2, p. 1-10, 2014.
- 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. 18, p. 1-5, 2015.
- LIBRATY, D. H.; et al. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 3501-3508, 2001.
- LIMON-FLORES, A.Y.; et al. Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. **International journal of experimental pathology**, v. 86, n. 5, p. 323-334, 2005.
- LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. **Fields Virology**, p. 1101- 1152, 2007.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, v. 59, p. 23-61, 2003.

LITTAUA, R.; KURANE, I.; ENNIS, F. A. Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 8, p. 3183–3186, 1990.

LOBO, F. P.; et al. Draft genome sequence of the D-xylose-fermenting yeast *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19. 1AT. **Genome announcements**, v. 2, n. 1, p. 1163-13, 2014.

LOKE, H.; et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 1, p. 102-106, 2002.

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

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

LOPEZ-MADERUELO, D.; et al. Interferon- γ and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 167, n. 7, p. 970-975, 2003.

LOUIS, V. R.; et al. Modeling tools for dengue risk mapping-a systematic review. **International journal of health geographics**, v. 13, n. 1, p. 50, 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.

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

MACKENZIE, J. S.; et al. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature medicine**, v. 10, p. 98-109, 2004.

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

MARINHO, P. S.; et al. A review of selected Arboviruses during pregnancy. **Maternal Health, Neonatology and Perinatology**, v. 3, n. 1, p. 17, 2017.

MARTINA, B.E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clinical microbiology reviews**, v.22, n. 4, p. 564-81, 2009.

MARTINEZ-TORRES, M. E. Dengue hemorrágico em crianças: editorial. Havana: José Martí, 1990. 180p.

MARTÍNEZ TORRES, E. Dengue. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 33-52, 2008.

- MARTINS, V. E. P.; et al. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. **PLoS one**, v. 7, n. 7, p. 41386, 2012.
- MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Receptores para Imunoglobulina G (FcγR). **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 38, n. 1, p. 82-95, 2005.
- MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunological reviews**, v. 225, n. 1, p. 300-313, 2008.
- MCBRIDE, W. J.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and infection**, v. 2, n. 9, p. 1041-1050, 2000.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. J. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunological reviews**, v. 137, p. 89-97, 2000.
- MEIRA, R. "Urucubaca" gripe ou dengue? Dengue. In: _____. **Clínica médica. São Paulo: Gráfica O Estado de S. Paulo**, 1916. p.273-85.
- MHMOUD, N. A.; FAHAL, A H.; VAN DE SANDE, W. The association between the interleukin-10 cytokine and CC chemokine ligand 5 polymorphisms and mycetoma granuloma formation. **Medical mycology**, v. 51, n. 5, p. 527-533, 2013.
- MIHAILOVA, S.; et al. Pro-and anti-inflammatory cytokine gene polymorphism profiles in Bulgarian multiple sclerosis patients. **Journal of neuroimmunology**, v. 168, n. 1, p. 138-143, 2005.
- MOHSIN, S. N.; et al. Association of FcγRIIa 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.
- MONGKOLSAPAYA, J.; et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature medicine**, v. 9, n. 7, p. 921-927, 2003.
- 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, Brasília, 2009.
- MOREIRA, S.T.; et al. The possible protective role of IL-6 -174 GC genotype of dengue fever. **The Open Tropical Medicine Journal**, v.1, p. 87-91, 2008.
- MÖRMANN, M.; et al. Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. **Genes and immunity**, v. 5, n. 4, p. 246, 2004
- MORGAN, D. R.; et al. Gastric cancer and the high combination prevalence of host cytokine genotypes and *Helicobacter pylori* in Honduras. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, n. 9, p. 1103-1111, 2006.

MORITA, K.; TANAKA, M.; IGARASHI, A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 29, n. 10, p. 2107-2110, 1991.

MOSSER, D.M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine **Immunological reviews**, v.226, p. 205–218, 2008.

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.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral research**, v. 98, n. 2, p. 192-208, 2013.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 587-619, 2011.

MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v. 20, n. 5, p. 299-309, 2013.

MUSTAFA, M. S.; et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67-70, 2015.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; DESPRÈS, P.; CEDILLO-BARRÓN, L. Innate immune response to dengue virus. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 5, p. 425-435, 2005.

NEDJADI, T.; et al. Tackling dengue fever: Current status and challenges. **Virology journal**, v. 12, n. 1, p. 212, 2015.

NIMMERJAHN, F., RAVETCH, J.V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. **Nature Reviews Immunology**. v.8, n.1, p.34-47, 2008.

NOBUCHI, H. The symptoms of a dengue-like illness recorded in a Chinese medical encyclopedia. **Kanpo Rinsho**, v. 26, p. 422-425, 1979.

NOECKER, C. A.; et al. Contrasting associations of polymorphisms in FcγRIIa 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.; et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.

NOGUEIRA, R. M. R.; et al. Dengue Virus type3, Brazil, 2002. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.9, p.1376-81, 2005.

NOGUEIRA, R. M. R.; et al. Dengue viruses in Brazil, 1986–2006. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 22, n. 5, p. 358–63, 2007.

- NOGUEIRA, R. M. R.; et al. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 205-211, 2000.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, n. 1, p. 10-13, jul-dez. 2004.
- NUNES, M. R. T.; et al. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010–2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1858–1864, 2012.
- OHAINLE, M.; et al. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. **Science Translational Medicine**, v.3, n. 114, p. 114-128, 2011.
- OSANAI, C. H.; et al. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima. **Revista do Instituto de Medicina tropical**, n. 25, p. 53-54. 1984.
- PALACIOS SERRANO, H.; VARGAS CABALLERO, M. E.; AGUIRRE PORTUONDO, T. M. Dengue hemorrágico en dengue primario. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 53, p. 59-62, 2001.
- PANDEY, M.; et al. Association of IL-10 Gene Polymorphism (– 819C> T,– 592C> A and– 1082G> A) with Preterm Birth. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 85, n. 2, p. 93-101, 2018.
- PAUPY, C.; et al. Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of Dengue and Chikungunya in central Africa. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 3, p. 259-266, 2010.
- PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **The Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777-1789, 2001.
- PASTORINO, B.; et al. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. **Antiviral research**, v. 87, n. 3, p. 281-294, 2010.
- PEDRO, A. O dengue em Nictheroy. **Brazil-Médico**, v.1, n.13, p.173-7, 1923.
- PEELING, R. W.; et al. Evolution of diagnostic tests: dengue. **Nature**, 2010.
- PEREIRA, A. C.; et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for– 819C/T in leprosy susceptibility. **Genes and immunity**, v. 10, n. 2, p. 174, 2009.
- PEREZ, A. B.; et al. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-β1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. **Human immunology**, v. 71, p. 1135–40, 2010.

PFEFFER, M; DOBLER, G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. **Parasit Vectors**, v.35, n.3, p. 1-15, 2010.

PICHAINARONG, N.; et al. Relationship between body size and severity of dengue hemorrhagic fever among children aged 0-14 years. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 37, n. 2, p. 283, 2006.

PINHO, A. C.O. Diagnóstico e caracterização molecular do vírus dengue circulante na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. 2013.

PIRRI, A.; et al. A study of HLA-G polymorphism and linkage disequilibrium in renal transplant patients and their donors. **Transplant immunology**, v. 20, n. 3, p. 143-149, 2009.

POOJA, S.; et al. Polymorphic variations in IL-1 β , IL-6 and IL-10 genes, their circulating serum levels and breast cancer risk in Indian women. **Cytokine**, v. 60, n. 1, p. 122-128, 2012.

POWELL, E. E.; et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 31, n. 4, p. 828-833, 2000.

POZZETTO, B.; MEMMI, M.; GARRAUD, O. Is transfusion-transmitted dengue fever a potential public health threat? **World journal of virology**, v. 4, n. 2, p. 113, 2015.

PRAVICA, V.; et al. In vitro production of IFN- γ correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- γ gene. **European Journal of Immunogenetics**, v. 26, n. 1, p. 1-3, 1999.

QADDOURAH, R. H.; et al. IL-10 Gene promoter and intron polymorphisms and changes in IL-10 secretion in women with idiopathic recurrent miscarriage. **Human reproduction**, v. 29, n. 5, p. 1025-1034, 2014.

RAVETCH, J. V.; KINET, J. P. Fc receptors. Annu. **Annual review of immunology**. v.9, p.457-492, 1991.

RAVETCH, J. V.; BOLLAND, S. Igg fc receptors. **Annual review of immunology**, v. 19, n. 1, p. 275-290, 2001.

REZZA, G. Dengue and chikungunya: long-distance spread and outbreaks in naive areas. **Pathogens and global health**, v.108, n. 8, p.349-55, 2014.

RICO-HESSE, R. Dengue virus virulence and transmission determinants. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 338, p. 45-55, 2010.

RICO-HESSE, R.; et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 244-251, 1997.

- ROCHA, E. S. O.; 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, 2013.
- ROMANO, C. M.; et al. Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. **PloS one**, v. 5, n. 7, p. e11811, 2010.
- ROSA, T.; et al. An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries, Belém. **Instituto Evandro Chagas**, p.85, 1998.
- ROSS, T. M. Dengue virus. **Clinics in laboratory medicine**, v. 30, n. 1, p. 149-160, 2010.
- ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 946-951, 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.
- RUSH, B. An account of the bilious remitting fever: As it appeared in philadelphia, in the summer and autumn of the year 1780. **The American Journal of Medicine**, v. 11, n. 5, p. 546-550, 1951.
- SADOCK, B. J.; SADOCK, V. A.; RUIZ, P. **Compêndio de Psiquiatria-: Ciência do Comportamento e Psiquiatria Clínica**. Artmed Editora, 2016.
- SALHI, A.; et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 6139-6148, 2008.
- 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, 2015.
- SAN MARTÍN, J. L.; et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 82, n. 1, p. 128-135, 2010.
- 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, 2016.
- SANTOS, F. B.; et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 387, 2011.
- 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.

SCARPELLI, D.; et al. Variants of the interleukin-10 promoter gene are associated with obesity and insulin resistance but not type 2 diabetes in Caucasian Italian subjects. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1529-1533, 2006.

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

SIERRA, B.; et al. Secondary heterologous dengue infection risk: Disequilibrium between immune regulation and inflammation? **Cellular immunology**, v. 262, n. 2, p. 134-140, 2010.

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

SCHATZMAYR, H.G; NOGUEIRA, R.M.R; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 81, p.245-246, 1986.

SCHNEIDER, J. M. P. H.; DROLL, D. A timeline for dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences. **Division of Disease Prevention and Control**, 2001.

SCOTT, R. M.; et al. Shock syndrome in primary dengue infections. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 25, p. 866-874, 1976.

SENEVIRATNE, S. L.; MALAVIGE, G. N.; DE SILVA, H. J. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 7, p. 608-614, 2006.

SHEPARD, D. S.; et al. Cost-effectiveness of a pediatric dengue vaccine. **Vaccine**, v. 22, n. 9, p. 1275-1280, 2004.

SHU, P.Y.; et al. Molecular characterization of dengue viruses imported into Taiwan during 2003–2007: geographic distribution and genotype shift. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 6, p. 1039-1046, 2009.

SILER, J. F.; et al. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. **Philipp. J. Sci**, v. 29, n. 1-2, 1926.

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

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

SINGH, K. R. P.; PAUL, S D. Multiplication of arboviruses in cell lines from *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Current Science**, v. 37, n. 3, p. 65-67, 1968.

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.

SIQUEIRA, J. B.; et al. Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010. **Saúde Brasil**, p. 157-171, 2010.

SMITH, G. W.; WRIGHT, P.J. Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected vero and *Aedes albopictus* cells. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 3, p. 559-571, 1985.

SOUTO, R. N. P; SOUTO, R. C. C. Sorologia para arbovírus em população humana da região da Reserva Extrativista do Cajari, Amapá, Brasil. **Biota Amazonia**, v. 2, n. 2, p. 8-14, 2012.

SRIKIATKHACHORN, A; GREEN, S. Markers of dengue disease severity. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 338, p. 67–82, 2010.

STEPHENSON, J. R. The problem with dengue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 9, n. 9, p. 643-646, 2005.

TABACHNICK, W. J. Ecological effects on arbovirus-mosquito cycles of transmission. **Current opinion in virology**, v.21, p.124-131. 2016.

TALAAT, R. M.; et al. Polymorphisms of interleukin 6 and interleukin 10 in Egyptian people with Behcet's disease. **Immunobiology**, v. 219, n. 8, p. 573-582, 2014.

TALAAT, R. M.; et al. Interleukin 10 (– 1082 G/A) and (– 819 C/T) gene polymorphisms in Egyptian women with polycystic ovary syndrome (PCOS). **Meta gene**, v. 9, p. 254-258, 2016.

TANG, K. F.; OOI, E.E. Diagnosis of dengue: an update. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 10, n. 8, p. 895-907, 2012.

TANTRACHEEWATHORN, T.; TANTRACHEEWATHORN, S. Risk factors of dengue shock syndrome in children. **JOURNAL-MEDICAL ASSOCIATION OF THAILAND**, v. 90, n. 2, p. 272, 2007.

TAVARES, W.; MARINHO, L. A. C. **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. São Paulo: Editora Atheneu; 2005.

TAUSEEF, A.; et al. Interleukin-10 as a Marker of Disease Progression in Dengue Hemorrhagic Fever. **J Coll Physicians Surg Pak**, v. 26, p. 187-90, 2016.

TAYPE, C. A.; et al. Genetic susceptibility to different clinical forms of tuberculosis in the Peruvian population. **Infection, genetics and evolution**, v. 10, n. 4, p. 495-504, 2010.

- TEIXEIRA, M. G.; et al. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v.8, n.4, p.5-33, 1999.
- TEIXEIRA, M. G.; et al. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 10, p. 1663-1663, 2008.
- TEIXEIRA, M.G.; et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 5, p. 1307-1315, 2005.
- TEIXEIRA, M. G.; et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p. S7-S18, 2009.
- TELES, F. S. R. R. Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 687, n. 1, p. 28-42, 2011.
- THISYAKORN, U.; NIMMANNITYA, S. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 295-297, 1993.
- THYE, T.; et al. IL10 haplotype associated with tuberculin skin test response but not with pulmonary TB. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5420, 2009.
- TRAJKOV, D.; et al. Association of 22 cytokine gene polymorphisms with tuberculosis in Macedonians. 2009.
- TRANG, N. T. H.; et al. Association between nutritional status and dengue infection: a systematic review and meta-analysis. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 172, 2016.
- TSAI, T.T.; et al. An emerging role for the anti-inflammatory cytokineinterleukin-10 in dengue virus infection. **Journal of biomedical science**, v. 20, n.1, p. 40, 2013.
- TUNG, Y.C.; et al. Phylogenetic study of dengue-3 virus in Taiwan with sequence analysis of the core gene. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v. 24, n. 2, p. 55-62, 2008.
- TUKASAN, C.; et al. Evaluation of the importance of fever with respect to dengue prognosis according to the 2009 WHO classification: a retrospective study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 6, 2017.
- TWIDDY, S. S.; et al. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. **Virology**, v. 298, n. 1, p. 63-72, 2002.
- ULGER, M.; et al. Determination of the cytokine gene polymorphism and genetic susceptibility in tuberculosis patients. **Mikrobiyoloji bulteni**, v. 47, n. 2, p. 250-264, 2013.
- TURNER, D.; et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European journal of immunogenetics**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 1997.

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

VALLINOTO, A.; et al. IFNG+ 874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis. **Human immunology**, v. 71, n. 7, p. 692-696, 2010.

VAN DE WINKEL, J.G.J; CAPEL, P.J.A. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. **Immunology today**, v. 14, n. 5, p. 215-221, 1993.

VASCONCELOS, P. F. C.; et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 1, p. 155-164, 2001.

VASILAKIS, N. The daemon in the forest-emergence of a new dengue serotype in South East Asia. **3rd International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever**, p. 21-23, 2013.

VERDEAL, J. C. R.; et al. Guidelines for the management of patients with severe forms of dengue. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 23, n. 2, p. 125-133, 2011.

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

VILLABONA-ARENAS, C.J.; et al. Dengue virus type 3 adaptive changes during epidemics in Sao Jose de Rio Preto, Brazil, 2006–2007. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63496, 2013.

WAN, S.W.; et al. Autoimmunity in dengue pathogenesis. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 112, n. 1, p. 3-11, 2013.

WANG, A. H.; et al. The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. **Human immunology**, v. 72, n. 5, p. 431-435, 2011.

WARLÉ, M. C.; et al. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? **Liver Transplantation**, v. 9, n. 2, p. 170-181, 2003.

WARMERDAM, P. A.; et al. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 4, p. 1338-1343, 1991.

WATTS, D. M.; et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v. 354, p. 1431-1433, 1999.

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection Genetics and Evolution**, v.9, p.523-540, 2009.

- WEIR, B. S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, p. 235-254, 1979.
- WILSON, J. N.; et al. Analysis of IL10 haplotypic associations with severe malaria. **Genes and immunity**, v. 6, n. 6, p. 462, 2005.
- WITTKE, V.; et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. **Virology**, v. 301, n. 1, p. 148–56, 2002.
- WHITEHEAD, S. S.; et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.
- WHITEHORN, J.; SIMMONS, C. P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7221-7228, 2011.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva: World Health Organization, 2009. 160 p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Dengue Bulletin. 2016 Dec. Vol-39. 2016.
- WHO. **Dengue Hemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control 2nd edn**. 1997.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Handbook for Clinical Management of Dengue**. Geneva: World Health Organization, 2012. 124 p.
- WILDER-SMITH, A; SCHWARTZ, E. Dengue in travelers. **New England Journal of Medicine**., v. 353, n. 9, p. 924–932, 2005.
- WITTKE, V.; et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. **Virology**, v. 301, n. 1, p. 148–56, 2002.
- XAVIER, A. L. R.; et al. Manifestações clínicas na dengue: Diagnóstico laboratorial. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 102, n. 2, p. 7-14, mar-abr. 2014.
- XAVIER-CARVALHO, C.; et al. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: A case–control, functional and meta-analysis study. **Infection. Genetics and Evolution**, v. 20, p. 197–205, 2013.
- XIA, L.; et al. combined analysis of Interleukin-10 gene Polymorphisms and Protein expression in children With cerebral Palsy. **Frontiers in neurology**, v. 9, p. 182, 2018.
- XUAN, Y.; et al. Association between 3 IL-10 Gene polymorphisms and cardiovascular disease risk: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. **Medicine**, v. 95, n. 6, 2016.
- YAMASHITA, A.; et al. Origin and distribution of divergent dengue virus: novel database construction and phylogenetic analyses. **Future Virology**, v. 8, n. 11, p. 1061–1083, nov. 2013.

YU, T.; et al. Clinical study on gastric cancer susceptibility genes IL-10-1082 and TNF-alpha. **Genet Mol Res**, v. 13, p. 10909-10912, 2014.

ZASTAVNA, D.; et al. Cytogenetic and immunogenetic analysis of recurrent pregnancy loss in women. **Cytology and genetics**, v. 48, n. 4, p. 238-243, 2014.

ZHANG, Y.; et al. Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 11, p. 2604 - 2613, 2003.

ZHANG, Y.; et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure**, v. 12, n. 9, p. 1607-1618, 2004.

ZHANG, G.; et al. IL-10 polymorphisms are associated with IL-10 production and clinical malaria in young children. **Infection and immunity**, p. IAI. 00261-12, 2012.

ZHAO, L.; et al. Slow resolution of inflammation in severe adult dengue patients. **BMC infectious diseases**, v.16, n. 1, p. 291, 2016.

ZIDI, S.; et al. IL-10 Gene promoter and intron polymorphisms as genetic biomarkers of cervical cancer susceptibility among Tunisians. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 343-347, 2015.

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 arboviroses, e caso ocorra a realização de exames em instituição pública de saúde de Parnaíba. Caso você concorde com a participação (ou participação da criança), uma pequena quantidade de sangue será obtida, por punção venosa, e transportada imediatamente para o laboratório. O paciente será atendido no serviço de saúde, mesmo que não concorde com a inclusão no estudo ou desista de participar a qualquer momento. Todos os resultados de exames que estiverem prontos estarão a sua disposição a qualquer momento da pesquisa. Você ou a criança não receberão qualquer remuneração pela participação.

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

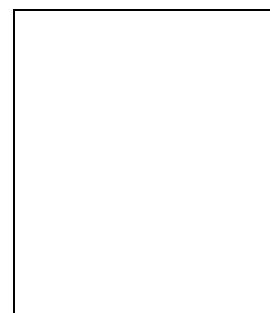
Os resultados desta pesquisa serão úteis para avaliarmos os sorotipos/genótipos virais circulantes na cidade de Parnaíba e estado do Piauí, e quais condições relacionadas ao hospedeiro diante da Dengue que são encontradas na população do Piauí. Por se tratar de um estudo populacional, não há benefício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

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

Eu, _____, portador(a) da cédula de identidade/CPF de número _____, abaixo assinado, declaro que concordo em participar da pesquisa/estudo “Identificação molecular de Dengue vírus 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.cmrv@gmail.com

APÊNDICE II

FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS

DATA DO ATENDIMENTO:

NOME: _____

SEXO:
 Masculino Feminino

DATA DE NASCIMENTO:

NOME NA MÃE: _____

CEP:

ENDEREÇO: _____

NÚMERO: _____

BAIRRO: _____

MUNICÍPIO: _____ UF:

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

Início dos sintomas Febre há dias.

SINAIS E SINTOMAS PRESENTES

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

COMORBIDADES/ DOENÇAS CRÔNICAS COEXISTENTES

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

AVALIAÇÃO QUANTO À PRESENÇA DE SINAIS DE CHOQUE/HEMORRAGIA GRAVE

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

Sinais de choque:

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