

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Tatiane Ribeiro de Siqueira

**INVESTIGAÇÃO DE FATORES SOROLÓGICOS E GENÉTICOS
RELACIONADOS COM A PREDISPOSIÇÃO AO
DESENVOLVIMENTO DAS FORMAS GRAVES DA DENGUE EM JUIZ
DE FORA**

Juiz de Fora

2015

TATIANE RIBEIRO DE SIQUEIRA

**INVESTIGAÇÃO DE FATORES SOROLÓGICOS E GENÉTICOS
RELACIONADOS COM A PREDISPOSIÇÃO AO
DESENVOLVIMENTO DAS FORMAS GRAVES DA DENGUE EM JUIZ
DE FORA, MG**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Ciências Biológicas, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências
Biológicas, área de concentração:
Imunologia e Doenças Infecto-
parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Co-orientador: Dr. Guilherme Cortes Fernandes

Juiz de Fora

2015

TATIANE RIBEIRO DE SIQUEIRA

"Investigação de fatores sorológicos e genéticos relacionados com a predisposição ao desenvolvimento de formas graves da Dengue em Juiz de Fora "

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 26/02/2015.

BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Betânia Paiva Drumond

Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Maria Luzia da Rosa e Silva

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. José Carlos de Magalhães

Universidade Federal de São João del Rei



Prof. Dr. Guilherme Côrtes Fernandes

Co-orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Dedico o Mestrado ao meu
sempre amado pai H3lio .**

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo apoio financeiro, que permitiu a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação, à sua coordenação e ao seu corpo docente pelo aprendizado.

À Deus pela perseverança e proteção concedidas nos momentos difíceis da execução deste trabalho.

À minha orientadora, Betânia, pelos ensinamentos que muito contribuíram para minha formação científica e, principalmente, pela oportunidade desta conquista.

Aos meus co-orientadores Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho e Dr. Guilherme Cortes Fernandes, pelo auxílio para realização dos experimentos, análise e discussão de resultados.

Aos membros examinadores da banca pela disponibilidade em avaliar este trabalho, Dra. Maria Luzia Rosa e Silva, Dr. José Carlos de Magalhães, Dra Alessandra Barbosa Ferreira Machado e Dr. Danilo Bretas.

Aos companheiros do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia e do Laboratório de Virologia, em especial à Izabela, Lorena, Andrêssa, e principalmente à Lívia por toda a ajuda nessa reta final. Obrigada meninas pela amizade e parceria!

A técnica do laboratório de pesquisa da Pós Graduação, Bárbara, pela atenção e disponibilidade durante os meus experimentos.

À Coordenação e equipe do Laboratório Lawall, que foram essenciais para a realização desta pesquisa.

A todos os participantes, que voluntariamente, aceitaram participar desta pesquisa.

Aos meus pais, meu infinito agradecimento! Ao meu pai Hélio (*in memoriam*), que em vida, sempre me incentivou e sempre me fez acreditar que eu era nota “dez”. E que agora, está sempre ao meu lado nos momentos felizes e de conflito, me dando forças pra seguir sempre em frente! À minha mãe Célia, que sempre respeitou a minha decisão, agradeço o amor, os conselhos, o carinho e o acolhimento não só durante o mestrado, mas em todos os momentos da minha vida. Essa vitória é nossa!

A minha irmã Eliane, meu agradecimento especial. Que vibrou comigo quando fui aprovada na seleção. Obrigada pelo apoio, incentivo e por acreditar sempre no meu potencial, até quando nem eu acreditava.

Ao meu querido namorado Samuel Vieira Pinto, por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, me colocando para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Obrigada pelo companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria, amor e principalmente por ter feito do meu sonho o nosso sonho. Te amo!

À amiga Alessandra Caiafa que foi grande companheira durante esta fase. Agradeço o auxílio nos momentos de dificuldade e insegurança.

Aos meus amigos, que mesmo distante fazem parte da minha vida: Thais Knop, Marina Domingos, Pamella Ramos, Alan Fernandes, Nayara Souza, Sávio Vieira, Delmárcio Gomes, Pedro Oliveira e Horácio Gruppi.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Ninguém vence sozinho! Obrigada por tudo!

RESUMO

A infecção por dengue vírus (DENV) tem sido considerada atualmente a mais importante arbovirose no mundo. Até o presente momento foram descritos quatro diferentes sorotipos do DENV: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. A infecção pelo DENV pode produzir uma ampla variedade de distúrbios a febre do dengue ou formas graves da doença, como a febre hemorrágica do dengue (FHD) e síndrome do choque do dengue (SCD), onde os quatro sorotipos de DENV podem causar desde uma infecção assintomática até FHD e SCD. A patogênese da FHD/SCD é multifatorial e vários estudos mostram algumas hipóteses para explicar as manifestações mais graves na infecção por DENV: (i) fatores virais, (ii) associação entre FHD/SCD em casos de infecção heterotípica pelo DENV e (iii) fatores do próprio hospedeiro, que poderiam estar relacionados à resposta imune. Estudos que buscam entender o porquê de pacientes com dengue apresentarem diferentes prognósticos são de grande importância para a Saúde Pública. Embora a doença causada por DENV seja considerada um grande problema de saúde pública, ainda não estão disponíveis drogas antivirais e vacinas a fim de tratar ou prevenir a infecção. O combate do vetor tem sido ineficiente, permitindo o aparecimento de novas epidemias. A cidade de Juiz de Fora vem passando por diversas epidemias de dengue nos últimos anos, com o registro de casos graves e óbitos. Diante deste contexto, este trabalho visou investigar os fatores sorológicos e genéticos relacionados com a predisposição ao desenvolvimento das formas graves de dengue em Juiz de Fora. Em setembro e outubro de 2013 e fevereiro e maio de 2014, amostras de sangue total foram coletadas. As amostras foram estudadas para estudos de SNPs, pesquisa de anticorpos e do DENV. No grupo estudado, foi observada uma soroprevalência de 16,1%. Foram detectados genótipos predisponentes e genótipos protetores de FHD, nos genes FC γ R11a, JAK-1 e DCSIGN, em moradores de Juiz de Fora, entretanto, não foi observada associação desses genótipos individualmente e/ou em combinação com a distribuição de gênero, diferentes regiões de Juiz de Fora onde os participantes residiam e relato de apresentação de sintomas de dengue pelos pacientes. Foram detectados três pacientes que apresentaram material genético de DENV. O conhecimento de áreas e pessoas predispostas à FHD constituem informações valiosas do ponto de vista epidemiológico e na estruturação de políticas públicas que visem o controle da dengue.

Palavras-chaves: Dengue vírus. Fatores predisponentes à dengue grave. SNPs. Detecção molecular de DENV.

ABSTRACT

Dengue virus infection (DENV) is considered the most important arbovirose in the world and the greatest impact on public health. Four different serotypes of DENV: DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 have been described. DENV infection may produce a wide variety of disorders, dengue fever or severe disease, such as dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (SCD). Any of the four DENV can cause asymptomatic infection from one to DHF and DSS. The pathogenesis of DHF / DSS is multifactorial and several studies showed some hypotheses to explain the most serious manifestations of infection by DENV: (i) viral factors (ii) secondary infection DENV and (iii) the host factors could be related to exaggerated immune response. Studies trying to understand why dengue patients have different prognoses are of great importance for public health. Although dengue is considered one major public health problem, there are not available antiviral drugs and vaccines to treat or prevent the infection. The vector control has been inefficient, allowing the emergence of new outbreaks. The city of Juiz de Fora has experienced several dengue epidemics in recent years, with the record of serious cases and deaths. Given this context, this study aimed to investigate the serological and genetic factors related to the predisposition to severe forms of dengue in Juiz de Fora. In September/ October 2013 and February to May 14 342 samples of whole blood were collected were collected. Samples were used to investigate the immune response do dengue, SNPs and DENV. In the study group, a seroprevalence of 16.1% was observed. Predisponent and protector genotypes were detected genes FCyRIIa, JAK-1 and DCSIGN in Juiz de Fora residents, however, there was no association of these genotypes individually and / or in combination with the gender distribution, different Juiz de Fora regions where the participants lived and report presentation of dengue symptoms by patients. Three patients were detected with DENV infection, by the time of sample collection. The knowledge of areas and persons who are more prone to have FHD is a valuable information from the epidemiological point of view and the structuring of public policies aimed at controlling dengue.

Keywords: Dengue virus. Factors predisposing to severe dengue. SNPs. Molecular detection of DENV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da partícula viral dos <i>Flavivirus</i>	14
Figura 2 - Diagrama esquemático do ciclo de multiplicação dos vírus do gênero <i>Flavivirus</i>	15
Figura 3 - Representação esquemática do genoma do Dengue vírus.....	17
Figura 4 - Mapa da distribuição mundial dos países ou áreas onde a dengue tem sido reportada.	27
Figura 5 - Fluxograma da estratégia de estudo	33
Figura 6 - Teste imunocromatográfico PanBio..	35
Figura 7 - Esquema de reação da sonda TaqMan.	37
Figura 8 - Gráfico ilustrando o resultado de genotipagem com a distribuição alélica de FCRIIa - região promotora -336.	38
Figura 9 - Caracterização amostral dos participantes deste estudo.....	40
Figura 10 - Distribuições das frequências relativas dos participantes que apresentaram anticorpos anti-DENV.....	41
Figura 11 - Gel de poliacrilamida mostrando a separação de amplicons após semi-nested PCR para detecção molecular de DENV.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfis sintomatológico, sorológico, genético e estado de infecção por DENV dos 55 participantes já infectados por DENV.....	43
Tabela 2 - Distribuição das frequências absoluta e relativa dos alelos e genótipos do polimorfismo FC γ RIIa (rs1801274)	45
Tabela 3 - Distribuição das frequências absoluta e relativa dos alelos e genótipos do polimorfismo JAK-1 (rs11208534)	46
Tabela 4 - Distribuição das frequências absoluta e relativa dos alelos e genótipos do polimorfismo DCSIGN (rs4804803)	47
Tabela 5 - Frequência absoluta e relativa de combinações de polimorfismos predisponentes e de proteção à FHD, apresentados pelos participantes deste estudo	48
Tabela 6 - Frequência absoluta e relativa dos resultados de genotipagem para detecção de polimorfismos predisponentes e de proteção à FHD	49
Tabela 7 - Distribuição da frequência dos genótipos e dos alelos do polimorfismo de FC γ RIIa, em indivíduos apresentando ou não anticorpos IgM e/ou IgG anti - DENV	50
Tabela 8 - Distribuição da frequência dos genótipos e dos alelos do polimorfismo de JAK-1(rs11208534) em indivíduos apresentando ou não anticorpos IgM e/ou IgG anti-DENV	51
Tabela 9 - Distribuição da frequência dos genótipos e dos alelos do polimorfismo de DCSIGN (rs4804803) em indivíduos apresentando ou não anticorpos IgM e/ou IgG anti-DENV.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	“Antibody dependent enhancement” aumento da infecção mediada por anticorpo
C	Capsídeo
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de ética em pesquisa humana
CTLA-4	Antígeno Linfócito T Citotóxico
DC-SIGN	Ligante de ICAM-3 específico de células dendríticas
DENV	<i>Dengue vírus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Envelope
FCγRIIa	Receptores de superfície celular onde se ligam a porção Fc de anticorpos IgG
FD	Febre do dengue ou dengue clássica
FHD	Febre hemorrágica da dengue
IFNγ	Interferon gama
IG	Imunoglobulina
IL	Interleucina
JAK-1	Proteína tirosina janus quinase
JEV	Vírus da encefalite japonesa
MMLV	“Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase”
NS	Proteína não estrutural
ORF	“ <i>Open reading frame</i> ” janela de leitura aberta
Pb	Par de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RE	Retículo endoplasmático

RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase precedida de Transcriptase reversa
SCD	Síndrome do choque da dengue
SNPs	“ <i>Single nucleotide polymorphism</i> ” – polimorfismo de base única
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TBEV	Vírus da encefalite transmitida por carrapato
TGF-β	Fator de crescimento de transformação beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TYK2	Tirosina quinase 2
UTRs	“ <i>untranslated regio</i> ” região não traduzida
VDR	Receptor de Vitamina D
WHO	Organização Mundial da Saúde
WNV	Vírus do oeste do Nilo
YFV	Vírus da febre amarela

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	DENGUE VÍRUS	14
1.2	TRANSMISSÃO DO DENV	17
1.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	18
1.4	IMUNOPATOGENESE DO DENV	19
1.4.1	Fatores virais	20
1.4.2	Associação entre FHD/SCD em casos de infecção heterotípica pelo DENV	20
1.4.3	Possíveis fatores do hospedeiro relacionados à resposta imune exacerbada	22
1.5	DIAGNÓSTICO	24
1.6	PREVENÇÃO, CONTROLE E EPIDEMIOLOGIA DO DENV	26
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVO	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	IMPLICAÇÕES ÉTICAS	33
4.2	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	34
4.3	ESTUDO SOROLÓGICO PARA DETECÇÃO DE IgM e IgG TOTAL	34
4.4	DETECÇÃO MOLECULAR DO GENOMA DO DENV	35
4.5	INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS SNPs RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO E PROTEÇÃO DE FHD/SCD	36
4.6	TESTES ESTATÍSTICOS	38
5	RESULTADOS	39
5.1	CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL	39
5.2	TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO DETECÇÃO DE IGM E IGG TOTAL	39
5.3	GENOTIPAGEM DETECÇÃO DE SNPs QUE PODEM ESTAR RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO E À PROTEÇÃO DE FHD/SCD	44
5.4	DETECÇÃO MOLECULAR DO DENV EM PACIENTES SUSPEITA CLÍNICA	53
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÕES	60
8	PERSPECTIVAS	61
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	72
APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE INVESTIGAÇÃO	74
APÊNDICE C- INFORMAÇÕES SOBRE OS PARTICIPANTES DO ESTUDO	76
ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 DENGUE VÍRUS

5

Atualmente, a Dengue é a mais importante arbovirose no mundo, causada pelos arbovírus, que vem de uma abreviação do inglês *arthropod-borne virus*, que são vírus transmitidos a um hospedeiro vertebrado através de um artrópode hematófago. Este vírus exige um mínimo de dois hospedeiros, para que seja possível concluir seu ciclo de transmissão (OCHIENGET al., 2013). No catálogo internacional dos arbovírus estão catalogados 534 vírus, dos quais, 134 são conhecidos por causar doenças em humanos (GUBLER, 2002). No Brasil, os arbovírus considerados de importância para a saúde pública são pertencentes às famílias *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*) e *Bunyaviridae* (GUBLER, 1998).

O gênero *Flavivirus* consiste de mais de 70 espécies de vírus, muitas delas consideradas patogênicas para os humanos, causando uma grande diversidade de doenças (GUBLER, 1998). Entre estes o vírus da febre amarela (YFV), o vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV), o vírus da encefalite japonesa (JEV), o vírus do oeste do Nilo (WNV) e DENV (FIGUEIREDO, 2007). Os flavívirus são vírus envelopados, com genoma RNA fita simples, de polaridade positiva (FIGURA 1).

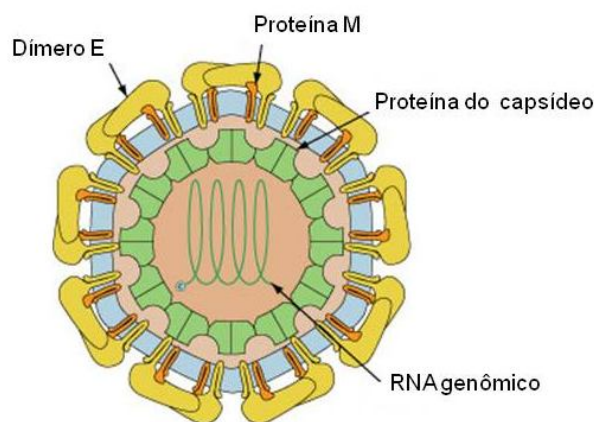


Figura 1 - Representação esquemática da partícula viral dos *Flavivirus*. Indicação das proteínas estruturais na partícula (Proteína M: proteína da membrana, Proteína E: envelope e Proteína do capsídeo). Fonte: Adaptado de VIRAL ZONE - SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS

25

O ciclo de multiplicação dos *Flavivirus* é iniciado com a ligação da partícula viral à célula permissiva no citoplasma da célula infectada (FIGURA 2). Após a adsorção, os vírus penetram nas células por endocitose ou fusão direta com a membrana. A acidificação do ambiente do endossoma desencadeia a trimerização irreversível da proteína E, o que resulta na fusão do envelope viral com a membrana do endossoma. Após a fusão, o nucleocapsídeo é liberado para o citoplasma, a proteína do capsídeo e o RNA dissociam, iniciando a replicação do genoma (FIGURA 2) (LINDENBACH et al., 2007; revisado por MUKHOPADHYAY et al., 2005; revisado por CLYDE et al., 2006).

10

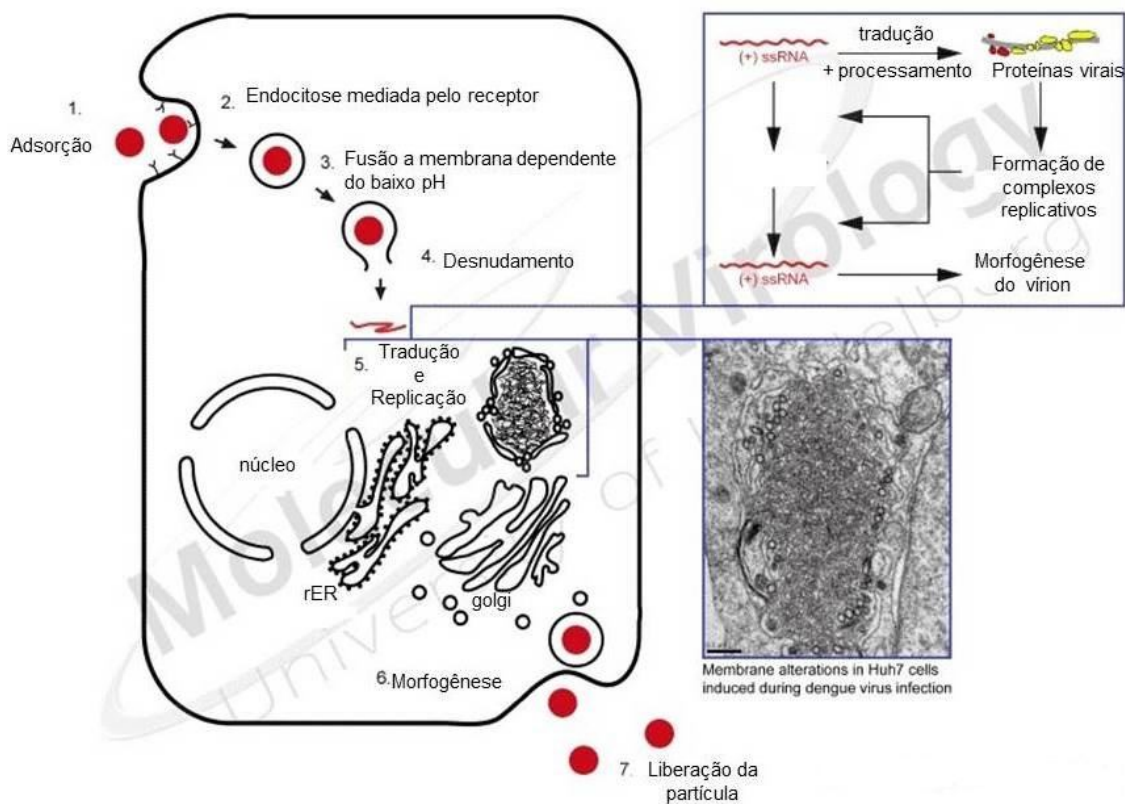


Figura 2 - Diagrama esquemático do ciclo de multiplicação dos vírus do gênero *Flavivirus*. Etapas do ciclo replicativo: (1) adsorção da partícula viral à célula hospedeira; (2) e (3) endocitose mediada por receptor, fusão do envelope viral com a membrana do endossoma e liberação do nucleocapsídeo viral; (5) tradução, replicação do RNA associado à membrana e processamento da poliproteína; (6) morfogênese do vírus em vesículas intracelulares do RE e transporte do virion (7) liberação da partícula por exocitose no meio extracelular. Fonte: adaptado (Molecular Virology University of Heidelberg).

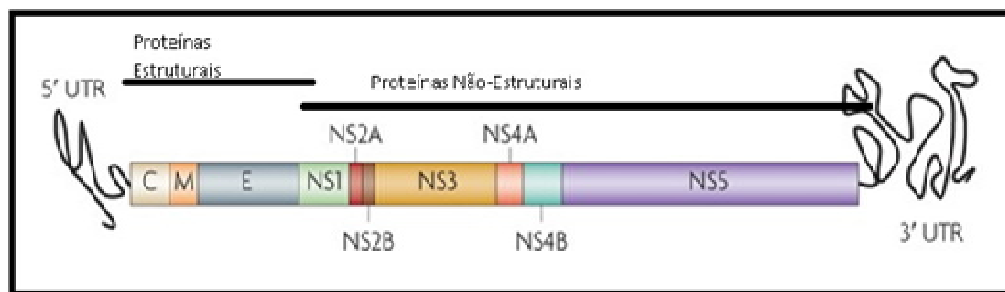
20

A tradução dos genes contidos na ORF inicia-se no códon AUG, ocorrendo no retículo endoplasmático rugoso. Em seguida, a poliproteína codificada pela ORF é clivada co-traducionalmente e pós-traducionalmente por proteases virais e celulares para produzir componentes virais e replicativos (BARTENSCHLAGER & MILLER, 5 2008). Após a tradução do mRNA genômico, a replicação é iniciada com a síntese de fitas complementares negativas, as quais são usadas como moldes para a produção de fitas positivas adicionais. As fitas positivas podem ser usadas para a tradução das proteínas estruturais e não estruturais, para a síntese de fitas negativas ou podem ser encapsidadas, formando o vírus. As fitas positivas de RNA 10 são sintetizadas a partir de fitas moldes negativas por um processo semiconservativo (FIGURA 2) (LINDENBACH et al., 2007). Por apresentar uma fita de RNA como seu material genético e fazer a replicação do mesmo pela atividade da RNA polimerase dependente de RNA viral, que não possui uma função corretora, o DENV tem uma alta taxa de mutação, resultando em uma população 15 geneticamente diversa (CHEN & VASILAKIS, 2011). A proteína C é essencial para a montagem da partícula garantindo uma encapsidação específica. O mecanismo pelo qual a encapsidação ocorre não é totalmente compreendido, mas requer a participação de proteínas não estruturais (FIGURA 2) (MA et al., 2004). Acredita-se que a morfogênese dos vírus ocorre em associação com membranas intracelulares 20 no RE, onde sofrem brotamento para dentro do lúmen desta organela. Durante este processo, os nucleocapsídeos adquirem envelopes com proteínas estruturais do vírus, previamente ancoradas à membrana do RE e dão origem às partículas imaturas. Durante a maturação das partículas, no transporte pelo Golgi, as proteínas prM, E e NS1 são glicosiladas. A proteína prM é clivada pela protease furina, 25 produzindo proteína M madura. A proliferação rápida de estruturas membranosas intracelulares é sinal de infecção pelo vírus do gênero *Flavivirus* e o transporte vesicular pela via secretória do hospedeiro parece estar envolvido na migração das partículas virais recém-formadas do retículo endoplasmático para a superfície celular, onde ocorre a exocitose (FIGURA 2) (LINDENBACH et al., 2007).

30 Até o presente momento foram descritos quatro diferentes sorotipos do DENV: DENV-1 (genótipos I, II, III, IV e V), DENV-2 (genótipos I, II, III, IV, V e VI), DENV-3 (genótipos I, II, III, IV e V) e DENV-4 (genótipos I, II, III e IV) (RICO-HESSE, 2011). O genoma do DENV tem aproximadamente 11kb, contendo uma única janela aberta de leitura (ORF, do inglês "*open reading frame*") que codifica uma

poliproteína precursora de cerca de 3.400 resíduos de aminoácidos. A ORF é ladeada por duas regiões não codificadoras denominadas UTRs (do inglês “*untranslated region*”) de tamanhos variáveis, a 3’UTR e a 5’UTR (FIGURA 3) (CHAMBERS, RICE & HAHN, 1990; GEBHARD, FILOMATORI e GAMARNIK, 2011).

- 5 As proteínas virais estruturais e não estruturais são originadas a partir da clivagem da poliproteína por ação de proteases celulares e virais. O DENV possui três proteínas estruturais: a proteína C, localizada no nucleocapsídeo; a proteína M, que está associada com a membrana e a proteína E do envelope, que interage com receptores celulares e é a principal proteína que induz a resposta de anticorpos
- 10 neutralizantes. O genoma do DENV codifica para outras sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5, que estão relacionadas com a multiplicação viral (Figura 3) (TSAI et al., 2013).



15

Figura 3 - Representação esquemática do genoma do Dengue vírus. O genoma inclui as regiões não codificadoras 5’UTR e 3’UTR, os genes C, M e E que codificam as proteínas estruturais do capsídeo, membrana e envelope, respectivamente e os genes NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 que dão origem as proteínas não estruturais. Fonte: GUZMAN et al., 2010.

20

1.2 TRANSMISSÃO DO DENV

Os diferentes sorotipos do DENV são mantidos em dois ciclos de

25 transmissão, o silvestre e o urbano. No ciclo silvestre estão envolvidas espécies de mosquitos como *Aedes furcifer*, *Aedes luteocephalus*, *Haemagogus leucolaenus* e primatas não humanos constituem os principais reservatórios. As áreas rurais são consideradas a ponte de ligação entre os dois ciclos e nelas predominam o *Aedes albopictus* e *Aedes furcifer*. O mosquito *A. aegypti* pertence à Família *Culicidae*, do

gênero *Aedes* e foi introduzido nas Américas a partir do continente africano, atualmente podendo ser encontrado em todos os estados do Brasil (VASILAKIS et al., 2012). Trata-se de um vetor caracterizado por possuir hábitos urbanos, sendo raro encontrar ovos ou larvas desta espécie, em reservatórios de mata (GUBLER, 5 1998). Em condições climáticas adequadas ocorre a eclosão dos ovos em criadouros com água limpa e parada, onde os ovos depositados são aderidos às paredes do recipiente, bem próximo à superfície da água, porém não diretamente sobre o líquido. Os ovos, após a eclosão, darão origem às formas imaturas, a larva, seguida pela pupa e posteriormente, o mosquito. Esse processo dura em média dez 10 dias e o tempo de vida do mosquito adulto varia de poucas semanas até 45 dias (PONTES & RUFFINO-NETTO, 1994).

O início do ciclo de transmissão do DENV se dá a partir da picada durante o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito em um hospedeiro infectado. O vírus presente na circulação sanguínea é então ingerido pelo artrópode, multiplicando-se 15 no intestino médio. Após alguns dias, os vírus são encontrados no ovário, sistema nervoso e nas glândulas salivares, local este, relacionado à transmissão para outros hospedeiros vertebrados, dando continuidade ao ciclo de transmissão do vírus. Este período de incubação extrínseco, que ocorre no mosquito, tem duração aproximada de 10-14 dias (PONTES e RUFFINO-NETTO, 1994).

20

1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A primeira descrição clínica da dengue foi realizada por Benjamin Rush, que 25 introduziu a expressão "*break bone fever*" devido aos sintomas de artralgia, mialgia intensa e febre associada à doença (ZOMPI et al., 2012). A infecção pelo DENV pode produzir uma ampla gama de distúrbios, desde a forma mais leve, a febre do dengue ou dengue clássica (FD), até as formas graves da doença, como a febre hemorrágica do dengue (FHD) e síndrome do choque do dengue (SCD) (AZEVEDO 30 et al., 2011). Contudo, durante períodos epidêmicos, até 40% dos infectados podem apresentar a forma assintomática (TAVARES & MARINHO, 2005).

No caso da febre da dengue, a doença se inicia após um período de incubação viral de dois a sete dias. Os sintomas iniciais são febre, dor de cabeça, dores oculares, manchas na pele, linfadenopatia e leucopenia, mialgia ou dor

óssea generalizada, seguidos por anorexia, náuseas, vômitos, fraqueza e prostração. Podem aparecer sintomas respiratórios, especialmente em crianças. Do terceiro ao quinto dia do início dos sintomas podem aparecer manchas e erupção maculopapulosa ou morbiliforme, semelhantes ao sarampo, no tórax e membros superiores (BURKE & MONATH, 2001). Podem acontecer fenômenos hemorrágicos em alguns casos, incluindo sangramento intestinal, hemorragia subconjuntival bilateral e intensa, petéquias, equimose extensa em membro superior (LUPI et al., 2007). Distúrbios neurológicos centrais são mais comuns em casos de pessoas com FHD.

10 Em caso de FHD, o recomendado é a hidratação oral abundante, caso não seja suficiente, deve-se proceder com a utilização de hidratação intravenosa em casos mais graves. Quando os pacientes apresentam hipotensão e coagulação intravascular disseminada há indicação para internação em unidade de tratamento intensivo (LUPI et al., 2007).

15

1.4 IMUNOPATOGÊNESE DO DENV

No homem, após a picada do vetor infectado, ocorre a penetração do DENV, que infecta principalmente as células dendríticas da pele, que posteriormente migram para os linfonodos, a fim de executar a apresentação dos antígenos. Nos linfonodos, ocorre a multiplicação do DENV e o recrutamento dos monócitos e macrófagos. Posteriormente, o vírus é disseminado por meio do sistema linfático para outras regiões do organismo hospedeiro, onde várias células como derivados de monócitos, células dendríticas e mielóides, macrófagos do fígado e baço são infectadas. Os macrófagos e células dendríticas já infectadas são responsáveis pela produção de citocinas e ativação dos linfócitos TCD4+ e TCD8+. A liberação do interferon tipo I é realizada pelos linfócitos, causando a redução da atividade da medula óssea e também diminuição da produção de células sanguíneas, o que pode estar relacionado à detecção de leucopenia e trombocitopenia em pacientes com dengue. A fase aguda da doença, que vai até o quinto dia após o início dos sintomas, é caracterizada pela elevada carga viral (viremia) (ROMANOS, 2008).

A patogênese da FHD/SCD é multifatorial e existem várias hipóteses que podem explicar estas manifestações mais graves na infecção por DENV: (i) fatores virais (WANG, 2013), (ii) associação entre FHD/SCD em casos de infecção heterotípica pelo DENV (ALAGARASU et al., 2012) (iii) fatores do próprio hospedeiro, 5 que poderiam estar relacionados à resposta imune exacerbada (FANG et al., 2012).

1.4.1 Fatores virais

10 As diferenças genéticas e estruturais do vírus podem influenciar na gravidade da doença humana. Um fator determinante pode ser a afinidade do DENV com os receptores do hospedeiro, podendo afetar na infecciosidade e virulência. Estudos relatam que mutações nas proteínas do envelope (E) e NS3 podem alterar a virulência de DENV, melhorando a atividade de ligação com a célula hospedeira e 15 aumentando a multiplicação viral (WAN et al., 2013). A proteína E é fundamental para a ligação e fusão viral no processo de entrada do vírus na célula, além de participar da montagem da partícula viral. Essa proteína apresenta atividade hemoaglutinante e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes e, por isso, é o maior determinante antigênico da partícula viral (LINDENBACH et al., 2007). NS3 é 20 a segunda maior proteína não estrutural, multifuncional, contendo 619 aminoácidos que funcionam como serino-protease na extremidade N-terminal e a RNA helicase na extremidade C-terminal. Está envolvida tanto na replicação do RNA quanto na regulação do processamento de poliproteínas. Devido aos seus domínios e seu papel na replicação viral, a NS3 é considerada um alvo terapêutico importante contra 25 a infecção pelo DENV (IDREES et al., 2012). Esta proteína é considerada o principal alvo de respostas para células T CD4+ e CD8+ durante a infecção do DENV, que pode estar envolvida na proteção (COSTA et al., 2011).

30 1.4.2 Associação entre FHD/SCD em casos de infecção heterotípica pelo DENV

A imunopatogênese da infecção por DENV envolve respostas imunológicas específicas incluindo a ativação de células imunes, a liberação de citocinas, interleucinas (IL) 1, 2, 6, 10, 13 e 18, fator de crescimento de transformação beta

(TGF- β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN γ), a produção de mediadores inflamatórios e autoimunidade (CLYDE, KYLE, & HARRIS, 2006). Algumas dessas respostas são responsáveis pelo extravasamento do plasma através da parede dos vasos capilares e estão presentes em níveis elevados durante o quadro de dengue hemorrágica. Monócitos e macrófagos são considerados as células alvo na infecção. A produção de citocinas pelos macrófagos é estimulada pela multiplicação viral. A liberação do fator de TNF- α e IL 6 está provavelmente relacionada ao desenvolvimento do quadro febril (HALSTEAD, 1980).

5
10 Durante a primeira semana, o sistema imune começa a responder ao processo infeccioso. As células T CD8+ citotóxicas desempenham um papel essencial na patogênese da infecção pelo DENV e com a ajuda de anticorpos específicos, podem destruir as células infectadas pelo vírus, num processo chamado de citotoxicidade dependente de anticorpos (LUPI et al., 2007). Os anticorpos IgM podem ser encontrados a partir do quarto dia de infecção, apresentando um pico no final da primeira semana, podendo permanecer durante meses. Os anticorpos IgG estão presentes na primeira semana, mas o pico ocorre no final da segunda semana, podendo ficar presentes no sangue durante anos e são responsáveis pela imunidade a determinado sorotipo do vírus (ENDY et al., 2004; LUPI et al., 2007).

15
20 Entretanto, as infecções heterotípicas estão associadas com uma maior incidência de FHD/SCD. Segundo a teoria de amplificação imunológica (HALSTEAD, 1970), relacionada à gênese da dengue hemorrágica, um indivíduo previamente infectado com um dos quatro sorotipos da dengue tem anticorpos antivirais circulantes. Quando o mesmo indivíduo é infectado com um sorotipo diferente, o vírus é reconhecido por estes anticorpos, que não são neutralizantes em infecção heterotípica (LUPI et al., 2007). Os anticorpos não neutralizantes produzidos na infecção primária podem favorecer a infecção de células que possuem receptor para Imunoglobulina, do tipo FCyRII (receptores de superfície celular onde se ligam a porção Fc de anticorpos IgG). O aumento da multiplicação do DENV contribui para o aumento da viremia, o que leva a uma extensa injúria tecidual, ativação de complemento, secreção de citocinas, aumento da permeabilidade vascular e apoptose (LUPI et al., 2007).

1.4.3 Possíveis fatores do hospedeiro relacionados à resposta imune exacerbada

Os fatores genéticos do hospedeiro constituem outro elemento importante na susceptibilidade a doenças. As variações genéticas mais frequentes em qualquer genoma, inclusive no humano, são chamados de polimorfismos de base única (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism*), que correspondem a substituições de uma única base em determinada região do genoma. Para que esta substituição seja considerada SNP, deve apresentar uma frequência acima de 1% na população estudada. Estas substituições podem estar presentes em regiões promotoras, éxons e íntrons podendo alterar a expressão gênica, o fenômeno de processamento (*splicing*) dos éxons, a estabilidade do mRNA ou até produzir uma modificação estrutural e funcional da proteína (BOTSTEIN & RISCH, 2003).

Estudos indicam que determinados SNPs estão correlacionados com o desenvolvimento da FHD, mesmo em infecções primárias ou secundárias homotípicas (WANG et al., 2011; LOKE et al., 2002; SOUDRAVALLY & HOTI, 2007; CHEN et al., 2009; GARCIA et al., 2010 PEREZ et al., 2010; GARCIA - TREJO et al., 2011). Dentre estes SNPs estão os polimorfismos presentes nas regiões promotoras/codificadoras dos genes que codificam a molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular 3, específica das células dendríticas (DC-SIGN); os receptores de superfície celular que se ligam à porção Fc de anticorpos IgG (FC γ RIIa); os transportadores associados ao processamento de antígenos (TAP); a proteína tirosina janus quinase 1 (JAK-1), o receptor de Vitamina D (VDR); o antígeno Linfócito T Citotóxico (CTLA-4); o TGF- β ; a IL-10 e o TNF- α (FANG et al., 2012).

De acordo com a função e afinidade de subclasses de IgG, os FC γ R podem ser divididos, geralmente, em três classes principais: FC γ RI (CD64), FC γ RII (CD32) e FC γ RIII (CD16) (BOURNAZOS et al., 2009). As células dendríticas maduras apresentam uma maior proporção de FC γ RIIa e FC γ RIIb quando comparadas com as imaturas. Acredita-se que essas mudanças podem influenciar na regulação de função das células dendríticas controlando as respostas celulares. Essas duas formas de FC γ RII desempenham diferentes papéis na ADE (antibody dependent enhancement – aumento da infecção mediada por anticorpo): FC γ RIIa com função ativadora e FC γ RIIb com função inibitória (FANG et al., 2012).

O FC γ R1IIa é um receptor de superfície celular que se liga à porção Fc de anticorpos IgG. Assume um importante papel na resposta imune, humoral e celular. Expresso em células dendríticas, o FC γ R1IIa contribui para patogenicidade por ADE na infecção por DENV (GREEN & ROTHMAN, 2006). O gene codificado de FC γ R1IIa é um locus no cromossomo 1q23. A alteração de um único aminoácido na posição 131 histidina para arginina (His/Arg) no segundo domínio de ligação Ig de Fc γ R1IIa é crítica para a ligação de IgG2 humana (LOKE et al., 2002). A forma homozigota de His, que é o tipo selvagem, tem sido associada a FHD. Loke e colaboradores (2002) relataram uma possível associação do homozigoto Arg, com a proteção contra FHD.

A Janus quinase (JAK) faz parte de uma família de proteínas quinase que possui características e funções essenciais, dentre elas, ser efetora na sinalização intracelular de receptores de citocinas. Esta família é composta de JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2 (tirosina quinase 2), descrita pela primeira vez há mais de 20 anos, mas as complexidades subjacentes às suas funções de ativação, de regulação e de sinalização pleiotrópica ainda estão sendo exploradas. Suas funções fisiológicas e seu papel na ativação e inativação de mutações influenciam em doenças humanas, incluindo neoplasias hematopoiéticas, imunodeficiência e doenças inflamatórias. Estes estudos recentes destacam a diversidade de mecanismos de regulação utilizados pela família JAK para manter a fidelidade de sinalização e sugerir estratégias terapêuticas alternativas usando inibidores competitivos da ATP quinase (BABON et al., 2014).

Polimorfismos nos genes de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) podem afetar a entrada do vírus, a replicação e a imunidade. Entre os PRRs, a molécula CD209, também conhecida como molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular 3 (DC-SIGN), desempenha um papel importante na interação precoce de um agente patogênico com uma célula dendrítica. DC-SIGN é responsável por mediar a entrada do vírus na célula, o que permite uma subsequente infecção viral, levando a liberação de vírions dentro da célula. A migração de células de Langerhans (células dendríticas de epiderme) para os nódulos linfóides permite a apresentação do vírus à célula T (RAPPOCCIOLO et al., 2006). DC-SIGN é codificado pelo gene CD209 localizado no cromossomo 19p13.3. Polimorfismos nesse gene podem influenciar tanto no desenvolvimento de FHD, quanto à proteção contra FHD (SAKUNTABHAI, 2005; WANG et al., 2011). Uma

variante do polimorfismo 336- A/G foi associado com infecção de DENV em indivíduos tailandeses (DESPRÈS et al., 2005).

1.5 DIAGNÓSTICO

5

O diagnóstico preciso e eficiente de DENV é de grande importância devido ao amplo espectro de sintomas, que são muito inespecíficos (BARROS et al., 2008). O paciente infectado com DENV pode desenvolver alterações bioquímicas e hematológicas a partir do terceiro dia após o início das infecções, podendo apresentar quadros de trombocitopenia, leucopenia, que podem ser diagnosticados em laboratório, usando-se diversos exames inespecíficos tais como: contagem de plaquetas; hemograma; testes de função hepática e a dosagem de albumina sérica (COHEN & HALSTEAD, 1966; BARROS et al., 2008).

Durante a fase de viremia da doença, geralmente até o quinto dia após o início da manifestação dos sintomas, o diagnóstico da dengue é facilitado por exames específicos como a pesquisa de NS1, o isolamento do vírus em cultura de células e a detecção molecular do genoma do DENV (PAULA & FONSECA, 2004; BARROS et al., 2008). Para a detecção de NS1 utiliza-se um método sorológico, no qual o antígeno pode ser detectado a partir de um dia antes do início dos sintomas até cinco dias após a fase aguda da infecção, que pode ser realizado por teste imunocromatográfico ou por ELISA (BISORDI et al., 2011).

O isolamento viral é mais utilizado em laboratórios de pesquisa, por se tratar de uma técnica mais complexa, exigindo melhores condições e tempo. Entre as linhagens de células utilizadas no isolamento do DENV, os clones de células C6/36 de *Aedes albopictus* são os mais amplamente empregados, devido a sua alta sensibilidade e estabilidade (SAMUEL e TYAGI, 2006). Contudo, como os outros testes, o isolamento viral apresenta vantagens e desvantagens. Entre as vantagens, está o fato de ser um método de amplificação permitindo a investigação futura de características genéticas e biológicas do vírus (MELO, 2010). Entre as desvantagens da técnica destaca-se o tempo requerido, o que pode exceder sete dias para observação do resultado (JARMAN et al., 2011).

A detecção do genoma é realizada com técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR) ou

PCR em tempo real, que vem mostrando grande utilidade para o diagnóstico de DENV, fornecendo um resultado com altos níveis de precisão, sensibilidade e rapidez, além de permitir a detecção viral, de difícil isolamento em outras técnicas empregadas (CHEN et al., 2010; SAMUEL & TYAGI, 2006).

5 A PCR em tempo real é a mais nova tecnologia de PCR aplicada no estudo do DENV. Em contraste com a PCR convencional, a detecção do DNA amplificado pode ser observada durante o processo de amplificação pelo monitoramento do acúmulo de fluorescência. Algumas das vantagens da PCR em tempo real são a redução no número de ciclos, a remoção dos procedimentos pós-PCR como a eletroforese e a utilização de sondas fluorogênicas, o que resulta num aumento da
10 especificidade da reação, capacidade de amplificação simultânea de vários vírus em reações multiplex e da quantificação desses (QI et al., 2008; SHMITTGEN, 2011).

No final da fase aguda da infecção, testes sorológicos são os métodos de escolha para o diagnóstico. Os anticorpos do tipo imunoglobulina M (IgM) são os
15 que primeiro aparecem nos testes sorológicos, sendo detectáveis em até 50% dos pacientes, durante o período de três a cinco dias após o início da doença, podendo aumentar para até 80% no dia cinco e 99% no dia dez. É possível observar o pico de IgM em cerca de duas semanas após o início dos sintomas, desaparecendo de três a seis meses após a infecção. A imunoglobulina G (IgG) é detectada em níveis
20 baixos no final da primeira semana da doença e vai aumentando aos poucos, podendo permanecer detectável durante vários meses, provavelmente pelo resto da vida (WHO, 2009).

Atualmente, na rotina laboratorial, os métodos mais utilizados na detecção dos anticorpos anti-DENV são o imunoenzimático para IgM e IgG (ELISA) e o
25 imunocromatográfico para detecção de anticorpos (PAULA & FONSECA, 2004; LIMA et al., 2012). Tais testes caracterizam-se por sua maior rapidez, praticidade, simplicidade e por não exigirem equipamentos sofisticados e técnicos extremamente qualificados contribuindo também para o monitoramento de regiões endêmicas e notificação às autoridades competentes (BISORDI et al., 2011). No entanto,
30 apresentam limitações, devido à possibilidade da ocorrência de reações cruzadas entre os anticorpos dos quatro DENV e até mesmo entre os flavivírus e do fato dos anticorpos serem detectados geralmente somente após o quinto dia do início dos sintomas (PAULA & FONSECA, 2004).

O teste de neutralização viral é utilizado para detectar anticorpos que possuem capacidade de neutralizar o agente infeccioso. O teste é mais utilizado com soro, mas podem também ser usados outros fluidos corporais que possuam anticorpos. Examina-se a amostra de soro frente ao vírus e/ou toxina suspeitos de causar a infecção ou lesão celular. O presente teste não visa apenas o diagnóstico como objetivo, mas também levantamento epidemiológico, almejando determinar a prevalência e distribuição de anticorpos contra determinado agente (QUIN et al., 2005; STRECK et al., 2007).

10

1.6 PREVENÇÃO, CONTROLE E EPIDEMIOLOGIA DO DENV

Apesar da doença causada por DENV ser considerada um grande problema de saúde pública, ainda não estão disponíveis drogas antivirais e vacinas a fim de tratar ou prevenir a infecção. O combate ao vetor tem sido ineficiente, permitindo o aparecimento de novas epidemias (FARRAR et al., 2007). No momento, um estudo de vacina tetravalente de vírus vivo atenuado recombinante, se encontra em fase III de teste, que apresenta 60% de eficácia contra os quatro tipos da doença, podendo reduzir em mais de 95% o risco de a doença evoluir para a forma mais grave e reduzir em 80% o número de internações (VILLAR et al., 2014).

20

O DENV se espalhou amplamente em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Atualmente, o vírus é endêmico em 112 países da África, Américas, Mediterrâneo, Sudeste Asiático e Pacífico Oeste (FIGURA 4) e estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que 40% da população mundial vivem em áreas de risco de infecção pelo DENV (AZEVEDO et al., 2011).

25



Figura 4 - Mapa da distribuição mundial dos países ou áreas onde a dengue tem sido reportada. Fonte: Adaptado de WHO, 2012.

5

O primeiro relato de epidemia de DENV no Brasil ocorreu no ano de 1981 na cidade de Boa Vista em Roraima, na região Norte do Brasil, confirmada em laboratório, a circulação de DENV1 e DENV4 (CORDEIRO, 2010). No ano de 1986, a cidade do Rio de Janeiro passou por um grande surto, no qual foi detectado o DENV-1. Acredita-se que a partir desse estado, o vírus se propagou para as regiões centro-oeste e nordeste. Na década de 80, o DENV-1 foi o tipo predominante (ARAÚJO et al., 2006). A partir do sequenciamento e análise do genoma de amostras de DENV-1 obtidas no Brasil, foi possível verificar que todos os isolados pertenciam ao genótipo V e que houve a co-circulação de algumas linhagens (DRUMOND et al., 2012).

O primeiro relato de DENV-2 no Brasil ocorreu no ano de 1990, no Rio de Janeiro, posteriormente, este foi detectado em diversos estados brasileiros. A introdução de DENV-2 foi seguida do aumento do número de epidemias e dos quadros graves de dengue, FHD e SCD (CUNHA et al., 1997; CRUZ et al., 2010; DRUMOND et al., 2012). A introdução, a propagação e também a circulação do DENV-2 já foram observadas no Brasil em diferentes momentos, sendo o Caribe sua provável origem (DRUMOND et al., 2013).

Em 2000, no Rio de Janeiro, ocorreu a primeira identificação de DENV-3, que foi responsabilizado por uma das maiores epidemias no estado. Nesse período ocorreu um elevado número de casos de FHD levando a óbito. Posteriormente, o DENV-3 se propagou para outros estados brasileiros (ARAÚJO et al., 2012). A

25

reintrodução de DENV-4 no Brasil foi primeiramente relatada no ano de 2008, em Manaus (FIGUEIREDO et al., 2008).

No Brasil, o número de casos e mortes relacionadas à dengue vem aumentando ao longo do tempo devido a introdução ou reintrodução de sorotipos do vírus e a circulação simultânea dos quatro sorotipos (FIGUEIREDO et al., 2008; DRUMOND et al., 2012, 2013; TEIXEIRA et al., 2005, 2013). O Brasil apresenta um alto índice de casos de dengue, com quadros graves e óbitos, por exemplo, em 2013, foram notificados 1.476.917 casos suspeitos de dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). No período de 28/12/14 a 03/01/15 foram registrados 591.080 prováveis casos de dengue em todo país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Foram confirmados, no ano de 2014, 689 casos de dengue grave e 8.150 casos críticos com sinais de alerta. Devido ao fato de a partir de 2014 ter entrado em vigor uma nova classificação de casos de dengue da Organização Mundial de Saúde (OMS), não é possível uma comparação direta dos casos graves com o ano de 2013 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Em um balanço realizado entre os anos de 2010 a 2013, a região Sudeste apresentou o maior número de casos de dengue notificados, casos graves e óbito. Entre os estados do Sudeste, Minas Gerais apresentou o maior índice de notificação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). No ano de 2014, a região sudeste continuou apresentando o maior número de casos prováveis (312.318 casos; 52,8%) em relação ao total do país, seguida das regiões Centro-Oeste (114.814 casos; 19,4%), Nordeste (90.192 casos; 15,3%), Norte (49.534 casos; 8,4%) e Sul (24.222 casos; 4,1%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). A região sudeste apresentou o maior número de casos graves e sinais de alerta (285 casos graves e 6.042 casos com sinais de alerta). O estado com maior incidência foi São Paulo (191 casos graves; 4.975 casos com sinais de alarme), seguido de Minas Gerais (45 casos graves; 666 casos com sinais de alarme), Espírito Santo (29 casos graves; 313 casos com sinais de alarme) e Rio de Janeiro (20 casos graves; 88 casos com sinais de alarme). Houve também confirmação de 410 óbitos, o que representa uma redução no país de 39,0% em comparação com o mesmo período de 2013, quando foram confirmados 674 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Em 2013, o estado de Minas Gerais registrou 193 mil casos de dengue, número inferior apenas a 2010, quando o estado viveu uma epidemia da doença e registrou 194.636 casos. Em 2013, 89 pessoas morreram de dengue. No ano de

2014, ocorreu uma redução em comparação a 2013, agora com 59.222 possíveis casos de dengue (SECRETARIA DA SAÚDE DE MINAS GERAIS, 2014) Entre as cidades mais afetadas no Estado, está Juiz de Fora, que é o maior município e considerada a capital da Zona da Mata mineira e o principal polo de atendimento à

5 saúde desta região. Trata-se de uma cidade próxima a duas importantes capitais brasileiras, Belo Horizonte e Rio de Janeiro entre as quais ocorre um intenso fluxo de pessoas, facilitando a introdução e co-circulação de diferentes tipos e genótipos de DENV na região. Juiz de Fora passou por uma grande epidemia de dengue no

10 ano de 2010, quando foram notificados 8.816 casos, dos quais, 16 evoluíram para o óbito. Em 2013, foram notificados até o mês de Julho 5.258 novos casos (ACESSA, 2013). Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que nos anos de 2011 e 2012 foi detectada a co-circulação de pelo menos, dois sorotipos (DENV-1 e DENV- 2), na cidade de Juiz de Fora e que pacientes da cidade já foram infectados por mais de um sorotipo viral. Todos estes dados, em conjunto, colocam a cidade de

15 Juiz de Fora em um panorama epidemiológico de alto risco para ocorrência de casos graves e óbitos, relacionados à infecção por DENV (BOTELHO, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil tem apresentado nos últimos anos um aumento considerável no número de casos de FD e FHD. Apesar da importância da doença, ainda existem muitos desafios a serem contornados. Drogas antivirais e vacinas a fim de tratar ou prevenir as infecções pelo DENV ainda não estão disponíveis e os esforços para combater o vetor não são eficientes o bastante, para conter o surgimento de novas epidemias. Por isso se faz necessário uma eficiente vigilância epidemiológica, envolvendo estratégias entomológicas, clínicas e laboratoriais que forneçam dados consistentes para o direcionamento das políticas públicas de saúde de combate à dengue.

Embora existam vários trabalhos publicados e apesar dos recursos financeiros que são destinados ao estudo da dengue, sua epidemiologia e patogênese ainda continuam pouco esclarecidas. Estudos locais feitos de forma isolada estão sendo realizados na tentativa de esclarecer essas dúvidas em torno da doença. A grande maioria dos estudos, de caracterização de perfil genético e sorológico, foca apenas em indivíduos sintomáticos, com a doença detectável, seja febre do dengue ou febre hemorrágica do dengue, os quais representam uma pequena parte dos indivíduos infectados, deixando de lado, os indivíduos assintomáticos. O pouco esclarecimento sobre fatores de predisposição relacionados às formas graves da doença pode ser justificado pela carência de estudos abrangendo de forma sistemática a população que é exposta à infecção pelo DENV.

Ainda não se sabe quais são os determinantes para os diferentes prognósticos da dengue. Uma importante sugestão é que o sistema imune, dentre outros fatores, tem influência nesse prognóstico, uma vez que a resposta imune inata apresenta importante papel na resposta antiviral. A compreensão dos fatores que influenciam no prognóstico da dengue é de grande importância para a saúde pública, já que os pacientes que apresentam um maior risco de evoluírem para a forma grave merecem atenção e cuidados especiais. A associação entre a gravidade da doença e os marcadores de ativação imune em diferentes células tem sido interpretada por pesquisadores, sugerindo que a resposta imune aos componentes do vírus poderia contribuir para o processo autoimune, que resulta na forma grave

da dengue. Diante disso, é de extrema importância o estudo de genes relacionados com a resposta imune, que são expressos nas diferentes formas clínicas da dengue.

5 Este estudo faz parte de um grande projeto, desenvolvido em diferentes cidades de Minas Gerais. Neste trabalho, o estudo foca a análise de fatores sorológicos e genéticos envolvidos na predisposição às formas graves da dengue, em moradores de Juiz de Fora, visando assim à obtenção de informações que possam ser revertidas para o controle da dengue, não só em Juiz de Fora, mas no estado de Minas Gerais.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

5

Investigar fatores de risco - sorológicos e genéticos para o desenvolvimento das formas mais graves de dengue, em habitantes de Juiz de Fora, Minas Gerais.

10 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar no grupo de indivíduos estudado pessoas infectadas ou que já foram infectadas por DENV, em Juiz de Fora;

15 - Investigar a ocorrência de polimorfismos de base única (SNPs) nos genes FC γ R1Ia, DCSIGN e JAK-1 que possam estar relacionados ao favorecimento ou à proteção do desenvolvimento de FHD, em habitantes de Juiz de Fora.

20 - Realizar detecção molecular de DENV nos participantes que apresentarem sintomas clínicos da doença no momento da coleta do material biológico.

4 METODOLOGIA

As etapas de realização do presente trabalho seguiram o fluxograma abaixo (FIGURA 5).

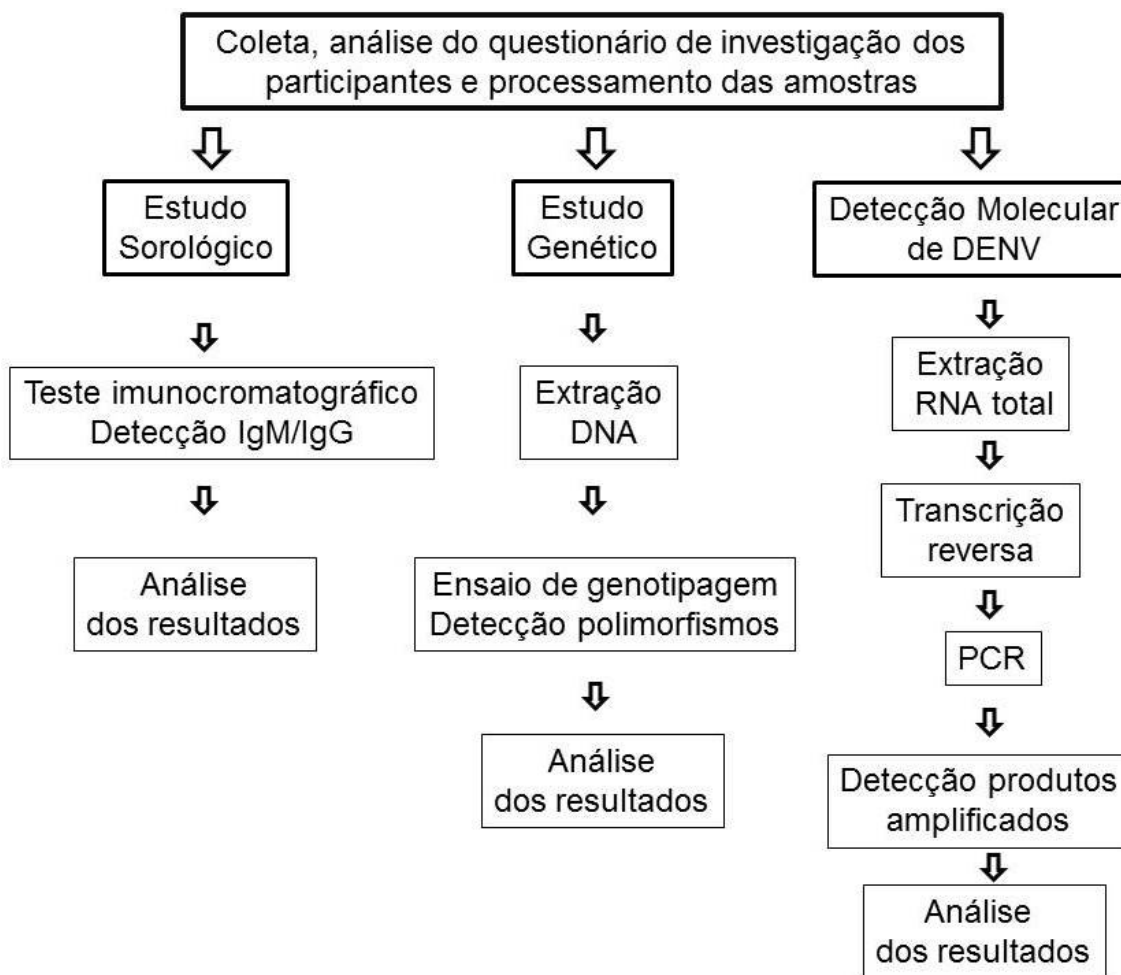


Figura 5 - Fluxograma da estratégia de estudo

10

4.1 IMPLICAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho possui implicações éticas envolvendo seres humanos, pois envolve a coleta, armazenamento e uso de material biológico humano. A presente pesquisa foi desenvolvida segundo as normas e leis que regem o uso de material animal e humano, segundo critérios da resolução 196/96 MS/CNS/CONEP e suas

15

normas e resoluções complementares. A pesquisa foi aprovada pelo Consubstancial do CEP (Comitê de ética em pesquisa humana) (Parecer nº 525.846), data da Relatoria em três de dezembro de 2013 (ANEXO A).

5 4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Este estudo foi conduzido na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais. Um total de 342 pessoas participou do projeto. Foram coletadas amostras de sangue dos participantes, em períodos não epidêmico (setembro a outubro de 2013) e epidêmico (fevereiro a maio de 2014) em duas unidades do Laboratório Lawall de Análises Clínicas, localizadas nos bairros São Mateus e Morro da Glória, na região Central.

Os pacientes foram informados da pesquisa e após seu consentimento, assinaram o Termo de Consentimento e Livre Esclarecido (Apêndice A) e responderam a um formulário de investigação, informando questões como a data da última viagem, se no momento da coleta apresentavam suspeita de infecção, sintomatologia (Apêndice B). De cada participante foram retirados dez mililitros de sangue por punção venosa. Cinco mililitros foram coletados em tubos com gel separador (Labor Import Gel), e foram processados para separação do soro (usado na detecção de anticorpos anti-DENV). Cinco ml foram coletados em outro tubo de coleta a vácuo com anticoagulante (K3EDTA), que foram usados para separação de leucócitos e extração de DNA dos indivíduos participantes da pesquisa.

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde foram realizadas as análises. O transporte foi realizado de acordo com as normas de biossegurança, em caixa térmica com trava, mantendo também a temperatura adequada de transporte. As amostras de soro e sangue foram devidamente identificadas, aliquotadas em tubos de 1,5mL e armazenadas a -20°C.

30 4.3 ESTUDO SOROLÓGICO PARA DETECÇÃO DE IgM e IgG TOTAL

Para identificação de pessoas que foram infectadas com DENV, foi realizado um teste imunocromatográfico, para detecção de IgM e IgG anti-DENV. O teste foi realizado em todas as amostras de soro coletadas, usando o Kit Dengue Duo

Cassete PanBio. Foram depositados dez microlitros do soro de cada paciente no cassete do teste e após a absorção da amostra, duas gotas de solução tampão, fornecidas no kit, foram depositadas ao poço quadrado na base do cassete (FIGURA 6). O resultado foi observado após exatamente quinze minutos da adição do tampão.

- 5 O aparecimento de uma linha cor de rosa na área do teste indicou um resultado positivo (PANBIO DIAGNÓSTICOS) (FIGURA 6).

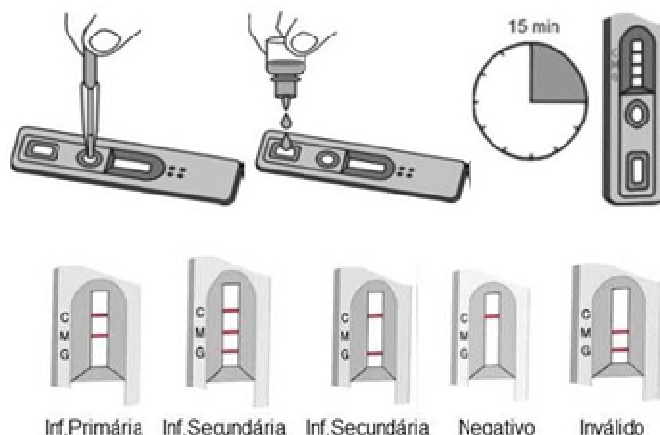


Figura 6 - Teste imunocromatográfico PanBio. C= Linha de controle; M= Linha do teste para IgM e G= Linha do teste para IgG. Catálogo R-DEN03D. Dengue Duo Cassete-PanBio.

10

4.4 DETECÇÃO MOLECULAR DO GENOMA DO DENV

O RNA total das amostras de soro dos pacientes que apresentaram sintomas característicos de dengue no momento da coleta foi obtido pelo método de trizol (SIGMA ALDRICH). Foram empregados 150 µl de soro no processo de extração. Em todas as amostras, o RNA extraído foi alíquotado em quantidades de 20 µl e armazenados no freezer -70°C até o momento de ser utilizado na transcrição reversa.

20 O cDNA foi sintetizado usando iniciador anti-senso descrito por Lanciotti e colaboradores (1992) e a enzima MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), seguindo as instruções do fabricante (Promega®). A presença de material genético de DENV foi investigada usando uma semi-nested PCR, e nestas reações foram utilizados iniciadores para detecção de DENV descritos por Lanciotti

e colaboradores (1992) e Vilela e colaboradores (2010). Estas reações visam a amplificação de um produto final de 490 pb a partir da região do genoma do DENV compreendida pelos genes C e prM. Ao final, os produtos da reação foram armazenados a -20°. O produto obtido após a semi-nested PCR, foi separado em gel de poliacrilamida a 8% por eletroforese. Foi utilizado o padrão de tamanho de DNA de 100 pb (Ludwig®Biotec). Após a separação eletroforética, o gel foi corado com o nitrato de prata e visualizado em negatoscópio (Tele-panorâmico, Blue equipamentos®) (BASSAN, CAETANO-ANOLLÉS & GRESSHOFF, 1991)

10 **4.5 INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS SNPs RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO E PROTEÇÃO DE FHD/SCD**

Para a genotipagem, o DNA genômico dos participantes foi extraído a partir de 300 µl de sangue periférico utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) de acordo com as orientações do fabricante. Após a extração, o material foi quantificado em equipamento Nanodrop (ThermoScientific - GE), com leitura da absorvância nos comprimentos de ondas 260 nm e 280 nm. As amostras foram estocadas em freezer a -20°C.

A genotipagem foi realizada utilizando-se ensaios validados TaqMan genotyping assay (AppliedBiosystems, Inc, Foster City, CA, USA) para os genes: FC γ R11a (rs1801274, assay Id: C_9077561-20); JAK-1 (rs11208534) e DCSIGN (rs4804803). Cada ensaio inclui dois iniciadores (senso e anti-senso) para a amplificação das regiões de interesse e duas sondas para detecção dos alelos. As sondas possuem um corante repórter fluorescente na extremidade 5' (VIC para um alelo e FAM para o outro alelo); um "minor groove binder" (MGB) que aumenta a temperatura de pareamento da sonda sem aumentar o seu comprimento, permitindo uma discriminação mais precisa e um "quencher" não fluorescente (NFQ) na terminação 3'da sonda. As reações de amplificação e genotipagem do DNA foram realizadas em placas de 96 poços, no equipamento Step One Plus (AppliedBiosystems, Inc, Foster City, CA, USA).

Para a detecção do polimorfismo FC γ R11a (rs1801274), o protocolo foi otimizado utilizando 0,125 µl do ensaio TaqMan SNP Genotyping (40X), 2,5 µl do mastermix (2X), 1,375 µl de água ultra pura e 1,0 µl de DNA (as amostras de DNA foram

agrupadas de acordo com sua concentração : 5 a 20 ng; 21 a 40 ng; 41 a 60 ng; 61 a 80 ng; 81 a 100 ng) totalizando um volume de 5,0 µl. As reações seguiram o ciclo de amplificação: 60°C por 30 segundos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e finalizando com 60°C por 30 segundos. Durante a PCR (FIGURA 7) cada sonda se liga especificamente à sequência complementar, entre os sítios dos iniciadores. Quando a sonda está intacta, a proximidade do corante repórter com o NFQ resulta em supressão da fluorescência. A clivagem da sonda pela DNA polimerase Amplitaq Gold® separa o corante repórter do NFQ, o que resulta na fluorescência do corante repórter. Sendo que, a Amplitaq Gold cliva somente as sondas que estão hibridizadas. O sinal de fluorescência ocorre somente se a sequência alvo for complementar à sonda. Então o sinal gerado pela PCR indica que o alelo está presente na amostra. Em cada ensaio foram incluídos dois controles negativos e um controle positivo para cada genótipo.

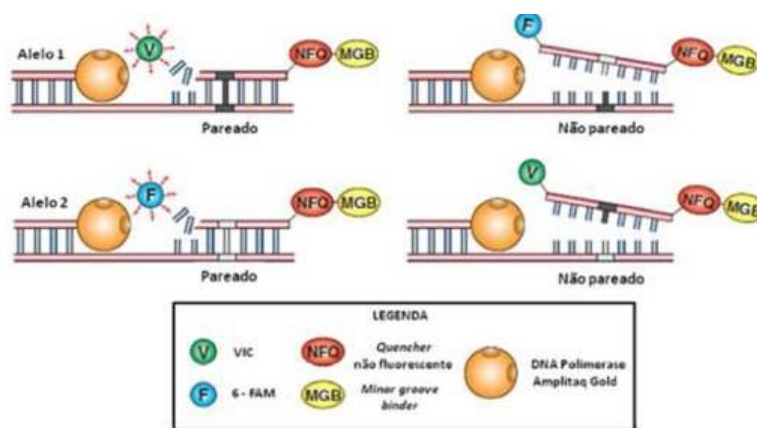


Figura 7 - Esquema de reação da sonda TaqMan. Fonte: Applied Biosystems

20 A discriminação e plotagem dos genótipos foram realizadas pelo TaqMan®Genotyper Software (AppliedBiosystems) (FIGURA 8).

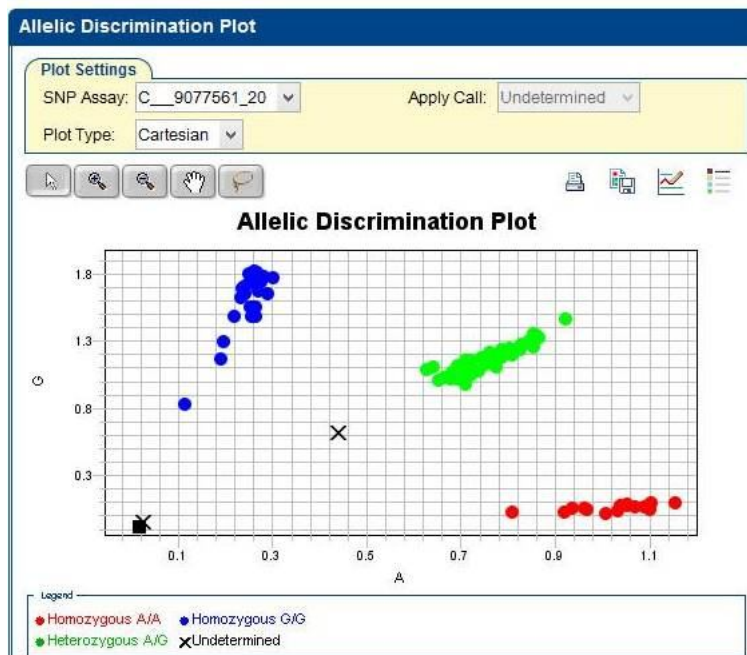


Figura 8 - Gráfico ilustrando o resultado de genotipagem com a distribuição alélica de FCRIIa - região promotora -336. Fonte: Applied Biosystems

5

4.6 TESTES ESTATÍSTICOS

A significância estatística de cada variável analisada (presença de anticorpos anti-DENV, sintomatologia, gênero dos participantes, genótipos/haplótipos presentes e os dados epidemiológicos) foi verificada usando o teste qui-quadrado e de Fisher. Para todas as variáveis, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas no programa Statistical Package for Social Sciences, versão 22 (SPSS Inc., Chicago, IL).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL

5

Nesse estudo, foram analisadas 342 amostras de sangue e soro provenientes de moradores da cidade de Juiz de Fora (APÊNDICE C). Do total de 342 participantes adultos, 246 indivíduos (71,5%) foram do gênero feminino e 96 indivíduos (28,5%) do gênero masculino (FIGURA 9). A média de idade do grupo amostral foi de 51,13 anos com desvio padrão de 18,63.

10

Os indivíduos participantes da pesquisa residiam em diferentes regiões de Juiz de Fora, sendo 276 indivíduos (79,9%) moradores da área central, cinco indivíduos (1,6%) da área sul, 26 indivíduos (7,6%) da região noroeste, 19 indivíduos (5,8%) da região oeste, 13 indivíduos (3,9%) da região leste, dois indivíduos (0,8%) da nordeste e um indivíduo (0,4%) da região sudeste (FIGURA 9) (APÊNDICE C).

15

Dos 342 participantes deste estudo, cinco indivíduos (1,46%) relataram sintomas de dengue, no momento da coleta. Desses, quatro participantes relataram febre, todos relataram dor no corpo, dor atrás dos olhos e dores fortes de cabeça e dois participantes, além desses sintomas, relataram presença de petéquias. Do total dos participantes, 41 relataram anteriormente ter apresentado algum dos sintomas questionados (observados em pessoas infectadas com DENV) (FIGURA 9) (APÊNDICE C). Desses 41 participantes, sete tiveram a infecção por DENV confirmada em laboratório e os outros 34 relataram que tiveram diagnóstico clínico de dengue.

20

25

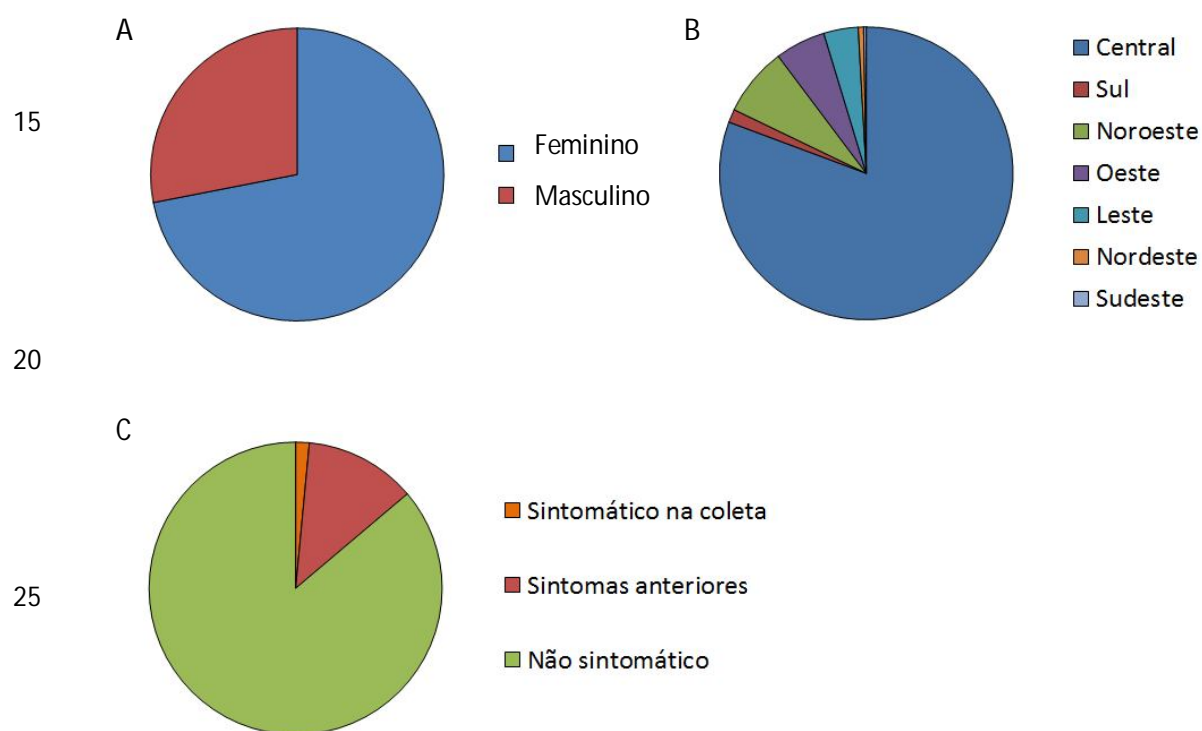
5.2 TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA DETECÇÃO DE IGM E IGG TOTAL

As amostras de soro de todos os participantes do estudo foram submetidas a um teste de detecção de anticorpos anti-DENV no qual, 55 indivíduos (16,1%) apresentaram anticorpos anti-DENV e 287 (83,9%) não apresentaram anticorpos anti-DENV. Destes 55 indivíduos, previamente infectados por DENV, 38 eram do gênero feminino e 17 do gênero masculino e residiam nas regiões central, noroeste, leste e nordeste (FIGURA 10).

30

Dos 55 participantes com resultado positivo no teste imunocromatográfico anti-DENV, 19 indivíduos (34,5%) apresentaram resultado IgM reagente/IgG não reagente (IgM⁺/IgG⁻); 13 indivíduos (23,6%) apresentaram resultado IgM não reagente/IgG reagente (IgM⁻/IgG⁺) e 23 indivíduos (41,9%) apresentaram resultado IgM/IgG reagente (IgM⁺/IgG⁺) (FIGURA 10). De acordo com os valores obtidos, não foi observada diferença nos números de participantes que apresentaram IgM, IgG e IgM/IgG (χ^2 p=0,373).

10



15

20

25

30

Figura 9 - Caracterização amostral dos participantes deste estudo. Frequências relativas dos participantes do estudo com relação à distribuição de gênero (A), região de Juiz de Fora, onde habitam (B) e de acordo com o relato da manifestação de sintomas de dengue anteriormente ou no momento da coleta de material (C).

35

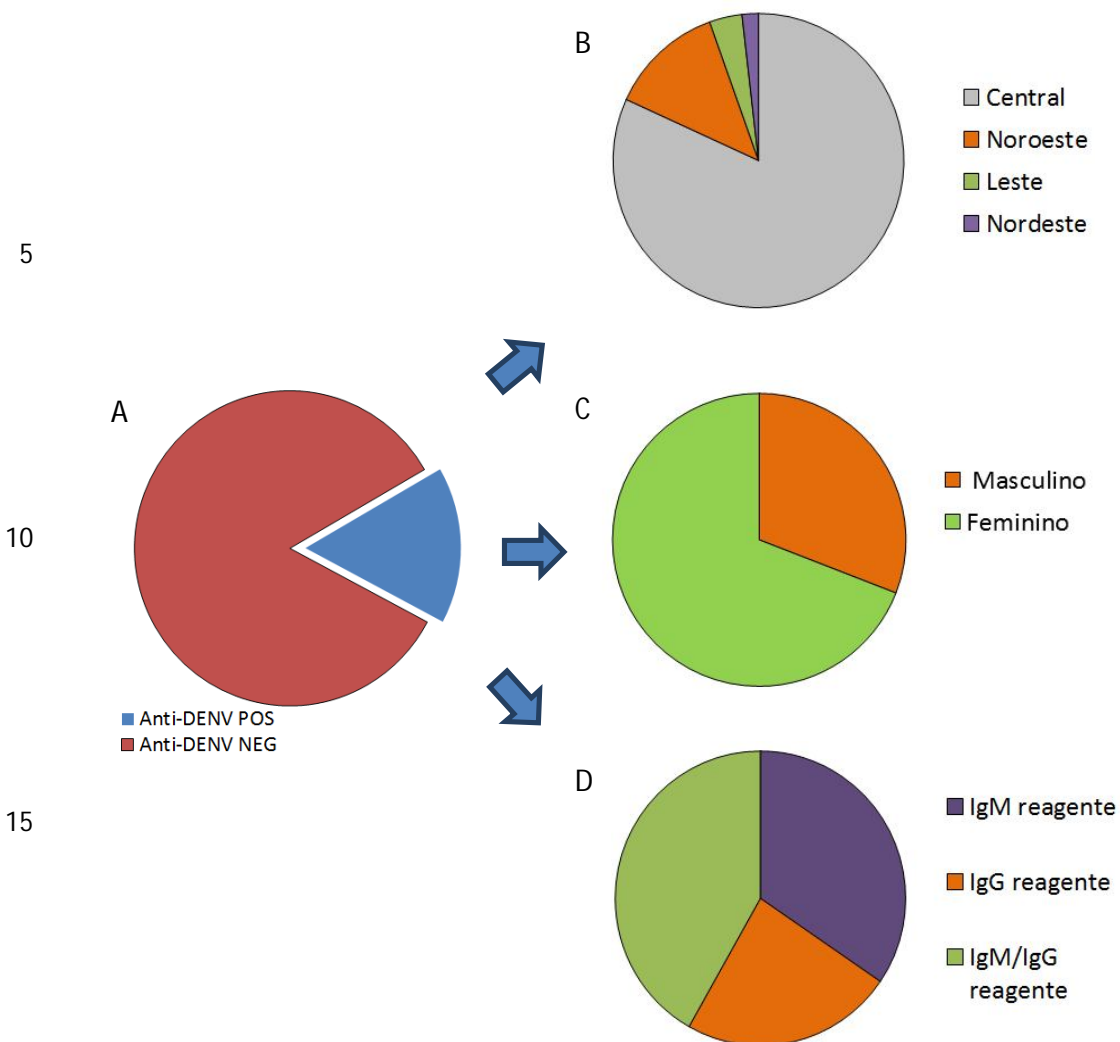


Figura 10 - Distribuições das frequências relativas dos participantes que apresentaram anticorpos anti-DENV. (A): Frequência de participantes que apresentaram anticorpos anti-DENV, no teste imunocromatográfico (Panbio). (B): Distribuição dos participantes que apresentaram anticorpos anti-DENV de acordo com a região onde habitam em Juiz de Fora. (C): Distribuição dos participantes que apresentaram anticorpos anti-DENV de acordo com o gênero. (D): Distribuição dos participantes que apresentaram anticorpos anti-DENV de acordo com o tipo de anticorpo apresentado.

25

Dos cinco indivíduos, que relataram apresentar sintomas característicos de dengue, ao responder o questionário, quatro apresentaram anticorpos anti-DENV (um indivíduo apresentou anticorpos somente do tipo IgM, dois indivíduos apresentaram anticorpos somente do tipo IgG e um indivíduo apresentou anticorpos dos tipos IgM e IgG) (TABELA 1).

30

Dos 41 participantes que já haviam apresentado sinais clínicos em algum momento, tais como febre, dores no corpo, dor nas articulações, dores fortes de

cabeça, 18 indivíduos apresentaram anticorpos anti-DENV (um indivíduo apresentou anticorpos somente do tipo IgM, nove indivíduos apresentaram anticorpos somente do tipo IgG e oito indivíduos apresentaram anticorpos dos tipos IgM e IgG) (TABELA 1). Dos indivíduos que relataram sintomas anteriores característicos de dengue, três apresentavam sintomas no momento da coleta.

Dos 296 participantes que relataram nunca ter apresentado sintomas de dengue, 36 apresentaram anticorpos anti-DENV (17 indivíduos apresentaram anticorpos somente do tipo IgM, três indivíduos apresentaram anticorpos somente do tipo IgG e 16 indivíduos apresentaram anticorpos dos tipos IgM e IgG). Dos 287 indivíduos que não apresentaram anticorpos anti-DENV, um indivíduo relatou sintomas no momento da coleta e outros 29 indivíduos (10,10%) relataram que já haviam apresentado sinais clínicos de dengue, anteriormente.

Tabela 1 - Perfis sintomatológico, sorológico, genético e estado de infecção por DENV dos 55 participantes já infectados por DENV

ID	Sintomas de dengue		Tipos de anticorpos anti-DENV			Genótipos (genes)					PCR
	Coleta	Anterior	IgM	IgG	IgM/IgG	TT * (JAK-1)	AA* (FC γ RIIa)	AG/GG* (DCSIGN)	AA ** (DCSIGN)	GG** (FC γ RIIa)	
180	P	P	-	P	-	ND	-	ND	ND	-	pos
387	P	P	P	-	-	P	-	P	-	-	pos
396	P	P	-	-	P	P	-	P	-	-	neg
281	P	-	-	P	-	P	-	P	-	-	pos
342	-	P	P	-	-	P	-	-	P	-	nr
221	-	P	-	P	-	-	-	-	P	P	nr
247	-	P	-	P	-	P	-	-	P	-	nr
257	-	P	-	P	-	P	-	ND	ND	-	nr
423	-	P	-	P	-	P	-	P	-	-	nr
262	-	P	-	P	-	P	-	P	-	P	nr
362	-	P	-	P	-	P	P	P	-	-	nr
361	-	P	-	P	-	P	-	-	P	-	nr
474	-	P	-	P	-	-	-	-	P	P	nr
320	-	P	-	-	P	P	-	P	-	-	nr
418	-	P	-	-	P	P	-	-	P	-	nr
431	-	P	-	-	P	P	-	-	P	-	nr
443	-	P	-	-	P	P	-	-	P	-	nr
373	-	P	-	-	P	-	-	-	P	P	nr
424	-	P	-	-	P	-	-	-	P	P	nr
190	-	-	P	-	-	P	-	P	-	P	nr
193	-	-	P	-	-	P	-	-	P	P	nr
234	-	-	P	-	-	P	-	-	P	-	nr
237	-	-	P	-	-	P	-	P	-	-	nr
297	-	-	P	-	-	P	-	ND	ND	-	nr
274	-	-	P	-	-	P	-	P	-	P	nr
300	-	-	P	-	-	P	-	P	-	P	nr
312	-	-	P	-	-	P	P	-	P	-	nr
319	-	-	P	-	-	P	-	-	P	P	nr
370	-	-	P	-	-	P	-	-	P	-	nr
467	-	-	P	-	-	P	-	P	-	-	nr
375	-	-	P	-	-	P	-	P	-	-	nr
210	-	-	P	-	-	-	-	P	-	-	nr
204	-	-	P	-	-	-	-	-	P	-	nr
432	-	-	P	-	-	-	-	P	-	P	nr
405	-	-	P	-	-	ND	P	-	P	-	nr
332	-	-	-	P	-	ND	P	P	-	-	nr
206	-	-	-	P	-	P	-	-	P	-	nr
392	-	-	-	P	-	P	P	P	-	-	nr

Tabela 1. Continuação

ID	Sintomas de dengue		Tipos de anticorpos anti-DENV			Genótipos (genes)					PCR
	Coleta	Anterior	IgM	IgG	IgM/IgG	TT* (JAK-1)	AA* (FC γ R11a)	AG/GG* (DCSIGN)	AA** (DCSIGN)	GG** (FC γ R11a)	
273	-	-	-	-	P	P	-	ND	ND	-	nr
224	-	-	-	-	P	-	-	-	P	P	nr
275	-	-	-	-	P	P	P	P	-	-	nr
285	-	-	-	-	P	P	-	-	P	-	nr
249	-	-	P	-	-	-	P	-	P	-	nr
292	-	-	-	-	P	P	-	P	-	-	nr
306	-	-	-	-	P	P	-	P	-	-	nr
388	-	-	-	-	P	P	-	P	-	-	nr
416	-	-	-	-	P	P	-	P	-	-	nr
331	-	-	-	-	P	P	-	-	P	-	nr
410	-	-	-	-	P	P	-	-	P	-	nr
446	-	-	-	-	P	P	-	-	P	P	nr
495	-	-	-	-	P	P	-	-	P	-	nr
307	-	-	-	-	P	-	P	-	P	-	nr
336	-	-	-	-	P	-	-	-	P	P	nr
310	-	-	-	-	P	P	-	ND	ND	-	nr
504	-	-	-	-	P	ND	-	-	P	P	nr

(ID) identificação do participante; (*) genótipos predisponentes à febre hemorrágica do dengue; (**) genótipo protetor da febre hemorrágica do dengue; (PCR) reação em cadeia pela polimerase; (P) presente; (-) ausente; (ND) não determinado; (nr) não realizado. (neg) negativo. (pos) positivo (em reação de semi-nested PCR).

5

5.3 GENOTIPAGEM PARA DETECÇÃO DE SNPS QUE PODEM ESTAR RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO E À PROTEÇÃO DE FHD/SCD

10

As amostras de DNA dos participantes foram genotipadas para detecção dos polimorfismos predisponentes ou protetores à FHD. Nas amostras analisadas para detecção do polimorfismo FC γ R11a (rs1801274), foram obtidos resultados válidos para 342 indivíduos. Destes, foram observadas as seguintes frequências alélicas: 46% dos indivíduos apresentaram o alelo A e 54% dos indivíduos apresentaram alelo G (TABELA 2).

15

Com relação aos genótipos foi observado que 71 indivíduos (20,88%) apresentaram o genótipo de predisposição AA, 171 indivíduos (49,7%) apresentaram o genótipo AG e 100 indivíduos (29,42%) apresentaram o genótipo de proteção GG (TABELA 2). Não houve diferença entre as frequências dos genótipos observados (χ^2 : p=46,439).

20

O genótipo AA, predisponente para FHD foi detectado em 54 indivíduos (77,1%) do gênero feminino e 17 indivíduos (22,9%) do gênero masculino. De acordo com os valores obtidos, não foi observada diferença na distribuição do genótipo AA entre participantes dos gêneros feminino e masculino (χ^2 : $p=0,295$ e Fisher: $p= 0,185$). O genótipo AA, foi detectado em indivíduos moradores das regiões central (83,2%), noroeste (4,2%), oeste (5,6%), leste (4,2%) e na região nordeste (2,8%), não havendo também diferença da frequência deste genótipo de acordo com as regiões de Juiz de Fora (χ^2 : $p= 0,100$).

10 **Tabela 2** - Distribuição das frequências absoluta e relativa dos alelos e genótipos do polimorfismo FC γ R11a (rs1801274)

Alelos e Genótipos	n indivíduos	% indivíduos
Alelo A	NC	46%
Alelo G	NC	54%
Genótipo AA*	71	20,88
Genótipo AG	171	49,7
Genótipo GG**	100	29,42
Total:	342	100

*Genótipo predisponente às formas graves de dengue. **Genótipo protetor às formas graves de dengue n: Frequência absoluta. NC: não calculado

%; Frequência relativa

O genótipo GG, que tem sido caracterizado como protetor contra formas graves de dengue, foi detectado em 66 indivíduos (66%) do gênero feminino e 34 indivíduos (34%) do gênero masculino e em indivíduos moradores das regiões central (78,3%), sul (1,6%), noroeste (9%), oeste (6,3%), leste (3,7%) e região nordeste (1,1%) . De acordo com os valores obtidos, não foi observada diferença na distribuição deste genótipo com relação ao gênero (χ^2 : $p= 0,112$, Fisher: $p= 0,68$) ou região de Juiz de Fora (χ^2 : $p= 0,715$).

20 Para o gene JAK1 (rs11208534) foi obtido resultado válido na PCR de genotipagem para 317 indivíduos. Para 25 indivíduos o resultado foi indeterminado e os experimentos serão repetidos. Para os 317 indivíduos, com resultado de genotipagem, foi observada a predominância do alelo T, que foi observado em 86% dos indivíduos e 14% dos indivíduos apresentaram alelo C ($p=0, 001$) (TABELA 3).

Para as amostras válidas foram verificadas as seguintes frequências de genótipos: 236 indivíduos (74,4%) apresentaram o genótipo TT, 76 indivíduos (24%) apresentaram o genótipo TC e cinco indivíduos (1,6%) apresentaram o genótipo CC (TABELA 3). Não houve diferença entre as frequências dos genótipos observados
5 (χ^2 : $p=264,991$).

Tabela 3 - Distribuição das frequências absoluta e relativa dos alelos e genótipos do polimorfismo JAK-1 (rs11208534)

Alelos e Genótipos	n indivíduos	% indivíduos
Alelo T	NC	86%
Alelo C	NC	14%
Genótipo TT*	236	74,4
Genótipo TC	76	24
Genótipo CC	5	1,6
Total:	317	100

*Genótipo predisponentes às formas graves de dengue. n: Frequência absoluta. NC: não calculado

%: Frequência relativa

10 O genótipo TT, predisponente para FHD, foi detectado em 168 indivíduos (71,1%) do gênero feminino e 68 indivíduos (28,9%) do gênero masculino, não sendo observada diferença da distribuição deste genótipo entre os gêneros (χ^2 : $p=0,509$, Fisher= 0,300). O genótipo TT foi observado nos indivíduos moradores das regiões central (80,9%), sul (0,9%), noroeste (8,9%), oeste (5,7%), leste (3%) e
15 região nordeste (0,9%), sem diferença na distribuição deste genótipo entre as regiões (χ^2 : $p=0,349$).

Para o polimorfismo DCSIGN (rs4804803) foi obtido resultado válido para 317 indivíduos. Para 25 indivíduos o resultado foi indeterminado. Das amostras com resultado válido, foram observadas as seguintes frequências alélicas: 77% dos
20 indivíduos apresentaram o alelo A e 23% dos indivíduos apresentaram alelo G (TABELA 4). Não foi observada diferença na frequência entre os alelos (χ^2 : $p=0,542$ e Fisher: $p=0,418$).

Para as amostras válidas foram verificadas as seguintes frequências genotípicas: 189 indivíduos (59,6%) apresentaram genótipo AA, 115 indivíduos
25 (36,3%) apresentaram genótipo AG e 13 indivíduos (4,1%) apresentaram genótipo

GG (TABELA 4), não sendo observada diferença nas frequências entre os genótipos (χ^2 : $p=147,811$).

5 **Tabela 4** - Distribuição das frequências absoluta e relativa dos alelos e genótipos do polimorfismo DCSIGN (rs4804803)

Alelos e Genótipos	n indivíduos	% indivíduos
Alelo A	NC	77%
Alelo G	NC	23%
Genótipo AA**	189	59,6
Genótipo AG*	115	36,3
Genótipo GG*	13	4,1
Total:	317	100

*Genótipos predisponentes às formas graves de dengue

**Genótipo proteção às formas graves de dengue

n: Frequência absoluta. NC: não calculado

?: Frequência relativa

Os genótipos AG e GG, predisponentes para FHD, foram detectados em 81 (70,4%) e oito indivíduos (61,5%) do gênero feminino, respectivamente. E foram observados em 34 (29,6%) e cinco indivíduos (38,5%) do gênero masculino, respectivamente. Indivíduos que apresentaram o genótipo AG e GG são moradores das regiões central (AG: 99 86,1% e GG:10 76,9%), região sul (AG: 0,9%), região noroeste (AG: 6,1% e GG: 7,7%), região oeste (AG: 4,3% e GG: 7,7%), região leste (AG: 1,7% e GG: 7,7%) região sudeste (AG: 0,9%). Não houve diferença nas distribuições dos genótipos predisponentes com relação ao gênero (χ^2 : $p=0,751$, Fisher: $p=0,422$) e (χ^2 : $p=0,385$, Fisher: $p=0,280$) ou região onde o participante mora em Juiz de Fora (χ^2 : $p=0,342$) e (χ^2 : $p=0,986$).

O genótipo AA, protetor contra formas graves de dengue, foi detectado em 141 indivíduos (74,5%) do gênero feminino e 48 indivíduos (25,5%) do gênero masculino e em indivíduos moradores das regiões central (78,3%), sul (1,6%), noroeste (9%), oeste (6,3%), leste (3,7%) e região nordeste (1,1%). De acordo com os valores obtidos, não foi observada diferença na distribuição deste genótipo com relação ao gênero (χ^2 : $p=0,620$, Fisher: $p=0,504$) ou região de Juiz de Fora (χ^2 : $p=0,715$).

A partir desses resultados, foram avaliados quantos indivíduos possuíam mais de um genótipo de proteção e predisponente à FHD. Um total 56 indivíduos (16,37%) apresentaram os dois genótipos de proteção (AA- DCSIGN e GG- FC γ RIIa) (TABELA 5). Um total de 42 indivíduos (13,24%) apresentaram os três genótipos (X^2 : $p= 0,452$) predisponentes à dengue grave. Um total de 236 indivíduos apresentou dois genótipos predisponentes para dengue grave.

Dentre os indivíduos que apresentaram dois genótipos predisponentes a FHD, 66 indivíduos (21,7%) apresentaram os genótipos predisponentes nos genes DCSIGN (AG/GG) e FC γ RIIA (AA), respectivamente. Não foi observada associação entre a ocorrência dos dois genótipos (X^2 : $p=0,191$, Fisher: $p= 0,166$). Um total de 208 indivíduos (68,4%) apresentaram os genótipos predisponentes nos genes JAK-1 (TT) e DCSIGN (AG/GG), respectivamente. Também não foi observada associação entre a ocorrência destes dois genótipos (X^2 : $p= 0,813$,Fisher: $p= 0,536$). Outros 46 indivíduos (14,5%) apresentaram os genótipos nos genes JAK-1 (TT) e FC γ RIIa (AA), sem existência de associação destes genótipos (X^2 : $p= 0,388$,Fisher: $p= 0,235$).

Tabela 5 - Frequência absoluta e relativa de combinações de polimorfismos predisponentes e de proteção à FHD, apresentados pelos participantes deste estudo

Genótipos (genes)	n	%
	indivíduos	indivíduos
AG/GG* (DCSIGN) + AA* (FC γ RIIa)	66	20,8
TT*(JAK-1) +AG/GG* (DCSIGN)	208	68,4
TT (JAK-1) +AA (FC γ RIIa)	46	14,51
TT* (JAK-1) +AG/GG* (DCSIGN) +AA* (FC γ RIIa)	42	13,24
AA** (DCSIGN) + GG** (FC γ RIIa)	56	16,37

* Genótipos predisponente às formas graves de dengue

** Genótipos de proteção às formas graves de dengue

n: frequência absoluta. %: frequência relativa.

FHD: Febre hemorrágica da dengue

Posteriormente, foram avaliados quantos participantes apresentavam genótipos predisponentes à FHD, que apresentavam também o genótipo (AA DCSIGN) protetor de FHD (TABELA 6). Um total de 50 indivíduos (15,78%) e 128 indivíduos (40,37%) apresentavam SNPs predisponentes à FHD, nos genes FC γ RIIa

e JAK-1, respectivamente e que apresentavam o genótipo protetor no gene DCSIGN. Não foi observada associação entre a ocorrência destes dois genótipos (X^2 : $p= 0,388$ Fisher: $p= 0,235$). Um total de 30 indivíduos apresentou dois genótipos (TT + AA) predisponentes à dengue grave nos genes JAK-1 e FC γ RIIa e apresentaram também o genótipo protetor AA, no gene DCSIGN, não sendo observada associação destes genótipos (X^2 : $p= 0,195$).

Foi também calculado o número de participantes que apresentaram o genótipo protetor GG (FC γ RIIa) com os genótipos predisponentes nos genes JAK-1 e DCSIGN (TABELA 6). Um total de 64 indivíduos (18,71%) e 94 indivíduos (27,48%) apresentavam SNPs predisponentes à FHD, nos genes JAK-1 e DCSIGN, respectivamente e que apresentavam o genótipo protetor no gene FC γ RIIa. Um total de 59 indivíduos (17,25%) que tiveram dois genótipos (TT + AG/GG) predisponentes à dengue grave nos genes JAK-1 e DCSIGN, apresentaram também o genótipo protetor GG, no gene FC γ RIIa, não sendo observada associação destes genótipos (X^2 : $p= 0,204$). Finalmente, 34 indivíduos (9,94%), apresentaram os dois genótipos protetores (AA+GG) dos genes DCSIGN e FC γ RIIa e apresentaram o genótipo TT no gene JAK-1. Não foi observada associação destes genótipos (X^2 : $p= 0,128$) (TABELA 6).

20

Tabela 6 - Frequência absoluta e relativa dos resultados de genotipagem para detecção de polimorfismos predisponentes e de proteção à FHD

Genótipos de predisposição à FHD (genes)	Genótipos de proteção à FHD (genes)	n	%
AA (FC γ RIIa)	AA (DCSIGN)	50	15,78
TT (JAK-1)	AA (DCSIGN)	128	40,37
TT (JAK-1) +AA (FC γ RIIa)	AA (DCSIGN)	30	9,46
TT (JAK-1)	GG (FC γ RIIa)	64	18,71
AG/GG (DCSIGN)	GG (FC γ RIIa)	94	27,48
TT (JAK-1) + AG/GG (DCSIGN)	GG (FC γ RIIa)	59	17,25
TT (JAK-1)	GG (FC γ RIIa) e AA (DCSIGN)	34	9,94

n =Frequência absoluta. %: Frequência relativa. FHD: Febre hemorrágica da dengue.

25

Para os participantes que já haviam sido infectados por DENV (participantes com sorologia positiva, n= 55), a distribuição dos genótipos para o polimorfismo FC γ R11a(rs 1801274) foi de oito indivíduos (14,5%) para o genótipo AA (predisponente); 31 indivíduos (56,4%) para o genótipo AG e 16 indivíduos (29,1%) para o genótipo GG (TABELA 1 e TABELA 7). Dos 36 participantes assintomáticos, dezoito indivíduos possuíam o genótipo de proteção AA (DCSIGN), não houve associação da presença do genótipo de proteção com o quadro assintomático (X^2 : p= 0, 450 Fisher: p= 0,318). Dos 18 participantes sintomáticos apenas um apresentou o genótipo de predisposição AA e não foi observada associação entre o genótipo e sintomatologia (X^2 : p= 0,87, Fisher: p= 0,66).

Tabela 7 - Distribuição da frequência dos genótipos e dos alelos do polimorfismo de FC γ R11a, em indivíduos apresentando ou não anticorpos IgM e/ou IgG anti - DENV

Alelos e Genótipos	Sorologia Positiva		Sorologia Negativa	
	n indivíduos	% indivíduos	n indivíduos	% indivíduos
Alelo A		43%		46%
Alelo G		57%		54%
Genótipo AA*	8	14,5	63	22
Genótipo AG	31	56,4	140	48,8
Genótipo GG**	16	29,1	84	29,2
Total:	55	100	287	100

* Genótipo predisponente às formas graves de dengue

** Genótipo proteção às formas graves de dengue

n:Frequência absoluta. %: Frequência relativa

15

A distribuição dos genótipos para o polimorfismo JAK-1(rs11208534), em participantes que apresentaram anticorpos anti-DENV (n= 51), foi de 40 indivíduos (78,4%) para o genótipo TT, dez indivíduos (19,6%) para o genótipo TC e um indivíduo (2%) para o genótipo CC (TABELA 1 e TABELA 8). Dos participantes com genótipo TT de predisposição à FHD que apresentaram anticorpos anti-DENV e não apresentaram sintomas, nove indivíduos também apresentaram o genótipo AA (DCSIGN), outros três indivíduos apresentaram o genótipo protetor GG (FC γ R11a) e três apresentaram os dois genótipos AA- DCSIGN de proteção à FHD e TT- FC γ R11a de predisposição à FHD. Dos 36 participantes assintomáticos, 18 indivíduos apresentaram o genótipo de proteção AA (DCSIGN), não houve associação entre a

25

presença do genótipo protetor e a ocorrência de infecção assintomática (X^2 : $p=0,450$ Fisher: $p=0,318$) e dez apresentaram o genótipo de proteção GG (FC γ R11a), não havendo também associação significativa da presença deste último genótipo com ausência de sintomas na infecção por DENV (X^2 : $p=0,109$ Fisher: $p=0,94$). Dos 18 participantes sintomáticos, 14 indivíduos apresentaram o genótipo de predisposição TT não sendo observada uma associação entre o genótipo predisponente e sintomatologia (X^2 : $p=0,650$ Fisher: $p=0,433$).

Tabela 8 - Distribuição da frequência dos genótipos e dos alelos do polimorfismo de JAK-1(rs11208534) em indivíduos apresentando ou não anticorpos IgM e/ou IgG anti-DENV

Alelos e Genótipos	Sorologia Positiva		Sorologia Negativa	
	n	%	n	%
	indivíduos		indivíduos	
Alelo T		86%		87%
Alelo C		14%		13%
Genótipo TT*	40	78,4	196	73,7
Genótipo TC	10	19,6	66	24,8
Genótipo CC	1	2	4	1,5
Total:	51	100	266	100

* Genótipo predisponente às formas graves de dengue
n: Frequência absoluta. %: Frequência relativa

A frequência dos genótipos para o polimorfismo DCSIGN (rs4804803), em indivíduos positivos no teste de detecção de anticorpos anti-DENV ($n=50$) foi de 28 indivíduos (56%) para o genótipo de proteção à FHD AA; 19 indivíduos (38%) para o genótipo de predisposição à FHD AG e três indivíduos (6%) para o genótipo de predisposição à FHD GG (TABELA 1 e TABELA 9). Dos 18 pacientes com resultado positivo no teste imunocromatográfico e que relataram já terem apresentado sintomas anteriormente, sete apresentaram os genótipos de predisposição à FHD AG/GG, dez tinham o genótipo de proteção à FHD AA, no gene DCSIGN e cinco indivíduos apresentaram o genótipo de proteção à FHD GG, no gene FC γ R11a. Dos outros 36 participantes que apresentaram os anticorpos anti-DENV e não apresentaram sintomas, 18 e 15 indivíduos possuíam os genótipos de proteção à

FHD AA (DCSIGN) e GG (FC γ RIIa), respectivamente. Dos 36 participantes assintomáticos, dez apresentaram o genótipo protetor GG no gene FC γ RIIa. Não houve associação significativa da presença de genótipo protetor com a infecção assintomática (X^2 : $p= 0,109$ Fisher: $p= 0,94$). Dos 18 participantes sintomáticos, 16 apresentaram os genótipos de predisposição AG/GG, não sendo também observada associação entre a presença dos genótipos predisponentes e sintomatologia (X^2 : $p= 0,760$ Fisher: $p= 0,544$).

Tabela 9 - Distribuição da frequência dos genótipos e dos alelos do polimorfismo de DCSIGN (rs4804803) em indivíduos apresentando ou não anticorpos IgM e/ou IgG anti- DENV

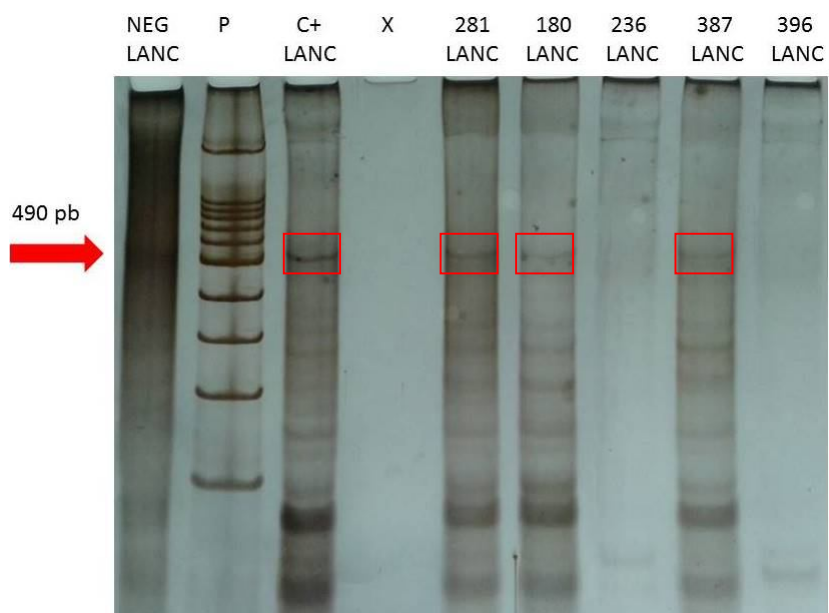
Alelos e Genótipos	Sorologia Positiva		Sorologia Negativa	
	n	%	n	%
	indivíduos	indivíduos	indivíduos	indivíduos
Alelo A		75%		78%
Alelo G		25%		22%
Genótipo AA*	28	56	161	60,3
Genótipo AG**	19	38	96	36
Genótipo GG**	3	6	10	3,7
Total:	50	100	267	100

* Genótipo predisponente às formas graves de dengue
n: Frequência absoluta. %: Frequência relativa

Ao fazer a análise da presença de dois ou três genótipos predisponentes com o relato de sintomas de dengue pelos participantes, que já haviam sido infectados com DENV, não foi observada associação significativa (X^2 : $p>0,10$, Fisher: $p> 0,10$). Da mesma forma, não foi observada associação significativa entre a presença de dois genótipos protetores e o relato de ausência de sintomas (X^2 : $p= 0,202$; Fisher: $p= 0,135$).

5.4 DETECÇÃO MOLECULAR DO DENV EM PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA

Após a semi-nested PCR, as amostras dos participantes 180, 281 e 387 apresentaram uma banda amplificada do tamanho esperado (490 pb) (FIGURA 11), indicando que estes pacientes que estavam com sintomas de dengue no momento da coleta de material estavam infectados com DENV.



10 **Figura 11** - Gel de poliacrilamida mostrando a separação de amplicons após semi-nested PCR para
 15 detecção molecular de DENV. Canaleta 1: controle negativo. Canaleta 2: Padrão de tamanho
 molecular 100pb. Canaleta 3: controle positivo (DENV-2). Canaleta 5: Produtos da semi-nested PCR
 usando cDNA da amostra 281 como molde. Canaleta 6: Produtos da semi-nested PCR usando cDNA
 da amostra 180 como molde. Canaleta 7: Produtos da semi-nested PCR usando cDNA da amostra
 236 como molde. Canaleta 8: Produtos da semi-nested PCR usando cDNA da amostra 387 como
 molde. Canaleta 9: Produtos da semi-nested PCR usando cDNA da amostra 396. Os fragmentos de
 tamanho esperado estão destacados em vermelho.

6 DISCUSSÃO

A dengue tem se destacado como a arbovirose de maior relevância para a
5 saúde pública no Brasil e no mundo, principalmente pelo número de pessoas que
estão nas áreas de transmissão da doença e pelas complicações que podem surgir,
em decorrência da infecção. O país tem passado por muitas epidemias de dengue,
nos últimos anos. Em 2010 e 2011, por exemplo, foram notificados números
expressivos de casos no Brasil, 984.425 e 730.292, respectivamente, o que exige
10 maior atenção por parte das autoridades sanitárias. Em 2014, foram registrados
586.182 casos prováveis de dengue no país até a semana epidemiológica (SE) 50
(07/12 a 13/12) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). O município de Juiz de Fora vem
enfrentando grandes epidemias de dengue nos últimos anos, com a ocorrência de
quadros graves e óbitos, como por exemplo, em 2010, quando foram notificados
15 8.816 casos e 16 evoluíram para óbito. As atividades de vigilância epidemiológica
são de grande importância para o prognóstico de epidemias e para o controle da
dengue. Informações a respeito da circulação do vírus, bem como do estado
imunológico, características genéticas da população e verificação de uma exposição
prévia ao vírus auxiliam no conhecimento panorâmico epidemiológico de uma dada
20 região. De acordo com a circulação prévia de sorotipos virais e seus genótipos em
certas áreas e pessoas apresentando genótipos predisponentes às formas graves
de dengue, medidas de vigilância e controle diferenciados podem ser necessárias
para prevenir a ocorrência de surtos e de casos graves da doença.

O presente estudo faz parte de um projeto desenvolvido em diferentes regiões
25 de Minas Gerais, com intuito de investigar fatores sorológicos e genéticos que
podem influenciar no desenvolvimento das formas graves de dengue. Este estudo
justifica-se dada a importância para se tentar estabelecer um perfil sorológico e
genético em diferentes regiões de Minas Gerais, incluindo Juiz de Fora, que
merecem uma maior atenção, com atendimento prioritário quando houver a
30 liberação da vacina contra os DENV, além de ser útil no estabelecimento de
medidas de controle da dengue.

A partir da análise do teste imunocromatográfico, foi detectado que 16,1% dos
participantes já haviam sido infectados com dengue, uma vez que estes
apresentaram algum tipo de anticorpo contra o DENV. Apesar da maioria dos

indivíduos que fazem parte do grupo amostral serem moradores da região central, foram detectados participantes já infectados com DENV em diferentes regiões de Juiz de Fora, como as regiões central, noroeste, leste e nordeste. Botelho (2014), investigando a presença de DENV em *pools* de larvas de *Aedes aegypti* e em soro de pacientes de Juiz de Fora, detectou a circulação de DENV em diferentes regiões da cidade, nos anos de 2011 a 2013. Juiz de Fora vem apresentando epidemias de dengue desde 2010, e as regiões que são caracterizadas pela alta infestação do vetor são as regiões Norte, Centro e Sul. No dia 21 de janeiro de 2015, a Secretaria de Saúde da Prefeitura de Juiz de Fora, apresentou os dados do primeiro Levantamento Rápido do Índice de Infestação do *Aedes aegypti* (LIRAA), com índice de 4,16. A região com maior LIRAA foi a centro-sul, com índice de 6,88, seguido da zona nordeste, com LIRAA de 6,55 e em terceiro a região oeste com LIRAA de 6,26 (PREFEITURA DE JUIZ DE FORA, 2015). Estes dados em conjunto apontam para a necessidade de uma maior vigilância e controle nestas regiões da cidade.

Do total de participantes que não apresentaram anticorpos anti-DENV, ou seja, indivíduos que aparentemente não haviam sido infectados com DENV anteriormente, um indivíduo (participante 236) relatou sintomas no momento da coleta, o que poderia indicar a infecção aguda, contudo, pela detecção molecular de DENV, pela semi-nested PCR, este participante não estava infectado com DENV. Da mesma forma, um indivíduo, embora tenha apresentado anticorpos anti-DENV e sintomas no momento da coleta de sangue (participante 396) não apresentou material genético dos DENV pesquisados. Estes participantes poderiam estar com outra doença, com quadro clínico semelhante ao causado por DENV. Três dos participantes que apresentavam sinais de dengue no momento da coleta, que apresentavam anticorpos anti-DENV (participante 180, 281 e 387), tiveram a amplificação de um fragmento correspondente ao esperado para DENV. Estas amostras serão usadas para isolamento viral e amplificação e sequenciamento para confirmação dos resultados e determinação do tipo e genótipo viral.

Um total de 29 indivíduos, que não apresentaram anticorpos anti-DENV, relataram que já haviam apresentado sinais clínicos de dengue anteriormente e que haviam sido diagnosticados clinicamente com dengue. Isso pode ser explicado, devido à existência de outras doenças, incluindo as arboviroses, que estão associadas com quadros febris e agudos como acontece na infecção por DENV. Essas características comuns contribuem para o diagnóstico errado, sendo que,

muitas vezes, o paciente pode ser diagnosticado clinicamente com dengue, ou mesmo não ter diagnóstico definido (SOUZA, 2010). Estes dados, mais uma vez, reforçam a necessidade de realização de testes laboratoriais para confirmação do diagnóstico clínico de dengue e mesmo para detecção de outros patógenos, o que
5 além da importância clínica, tem também grande relevância epidemiológica.

Dentre os arbovírus que causam doença com sintomatologia semelhante ao DENV, o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) pode causar desde infecções assintomáticas a doenças febris e encefalite (SOUZA, 2010). No Brasil o vírus já foi detectado em pacientes na região amazônica (PINHEIRO et al., 1981,
10 VASCONCELOS et al., 1991) e Sudeste (ROCCO et al., 2005, MONDINI et al., 2007; TERZIAN et al., 2011, ROSA et al., 2013), sendo que em alguns destes casos os pacientes foram inicialmente diagnosticados com dengue pela análise clínica (FIGUEIREDO, 2014). Outro vírus que tem se tornado um grande problema de saúde pública é o Chikungunya, pertencente à família *Togaviridae*, foi recentemente
15 introduzido no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). No ano de 2014, foram notificados até o dia 11 de outubro, 337 casos de infecção no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Em Minas Gerais, já foram relatados 39 casos suspeitos até o momento (SECRETARIA DE ESTADO DE MINAS GERAIS, 2014). O vírus da febre amarela, apesar da existência de vacina, ainda é responsável por surtos que
20 acontecem, eventualmente, no Brasil (FIOCRUZ, 2014).

No presente trabalho, foram identificados indivíduos com diferentes perfis sorológicos, com relação à resposta humoral ao DENV. Alguns indivíduos apresentaram apenas anticorpos do tipo IgM, o que poderia indicar a ocorrência de uma infecção primária recente, pois o anticorpo IgM permanece por um curto
25 período de tempo, desaparecendo de três a seis meses após a infecção. Dentro deste grupo estão participantes que tiveram amostras coletadas em período não epidêmico (setembro e outubro de 2013) e que não haviam viajado para outras regiões indicando assim, que estas pessoas haviam sido infectadas recentemente ou que apresentavam anticorpos do tipo IgM por mais tempo. Estes anticorpos
30 denominados residuais, geralmente podem ser detectados em condições mais baixas. Estes dados indicam que a circulação do DENV possa estar ocorrendo em um período maior do ano e não somente nos períodos epidêmicos, coincidindo com meses de chuva, geralmente de novembro a março, reforçando a necessidade de campanhas de controle e prevenção da dengue durante todo o ano, na cidade.

Alguns dos participantes apresentaram apenas anticorpos do tipo IgG, o que poderia indicar que o participante estava no fim da fase convalescente da doença como também já ter apresentado uma infecção passada. Outros indivíduos apresentaram anticorpos tanto do tipo IgM, como do tipo IgG, estes dados podem 5 indicar que estes participantes poderiam estar na fase convalescente da doença, quando os níveis de IgM ainda podem ser detectados, ou em uma infecção secundária (LIMA et al., 2012). A co-circulação de DENV-1 e DENV-2 já foi demonstrada, nos anos de 2011 a 2013, em Juiz de Fora, por Botelho (2014) e a circulação de DENV-4 também já foi relatada, em 2014 na cidade. A co-circulação 10 de diferentes sorotipos de DENV é um fator agravante das epidemias uma vez que infecções secundárias são eventos relacionados a casos de FHD (SECRETARIA DE SAÚDE DE JUIZ DE FORA, comunicação pessoal).

Para o polimorfismo FC γ R11a (rs1801274), o genótipo AA é caracterizado como predisponente à FHD e de acordo com os valores encontrados no presente 15 estudo, pode-se considerar que este genótipo encontra-se distribuído de maneira aleatória, nos participantes. O mesmo foi observado por Loke e colaboradores (2002) quando compararam os genótipos entre os pacientes com quadros de dengue grave e pessoas assintomáticas no Vietnã. Garcia e colaboradores (2010) fizeram um estudo em indivíduos adultos de Cuba, comparando o genótipo AA de 20 FC γ R11a em pacientes FD e FHD e foi observado que este genótipo estava associado com o desenvolvimento de FHD. No presente estudo não foi observada associação entre a presença do genótipo AA e o fato do participante ter tido infecção sintomática, ou mesmo casos mais graves, uma vez, que nenhum relatou a presença de sintomas relacionados à FHD.

Loke e colaboradores (2002) investigaram também a associação do genótipo 25 GG de FC γ R11a em relação à proteção contra FHD. Frequências deste genótipo foram verificadas em pacientes da Europa, África, América do Norte e Sul, as quais foram semelhantes (de 23 a 37%) e variando significativamente em relação a frequências encontradas em pacientes da Ásia (de 6 a 10%). Estes autores 30 sugeriram que o alto índice de FHD na Ásia poderia estar relacionado à baixa frequência do genótipo GG, que poderia ter características de proteção contra FHD. Frequências similares do genótipo GG no gene FC γ R11a, foram observadas neste

estudo (29,42%) quando comparadas às frequências deste genótipo encontradas na América do Norte e Sul.

Para o estudo do polimorfismo JAK1 (rs11208534) quando os alelos T e C foram comparados entre si foi observada diferença entre suas frequências, sendo o alelo T predominante. Contudo, quando as frequências dos diferentes genótipos foram testadas, não foi observada diferença entre elas, sugerindo que estes genótipos estão distribuídos, nestes indivíduos, ao acaso. Silva e colaboradores (2010) realizaram um estudo em indivíduos com quadros graves de dengue, na cidade de Salvador, Bahia e observaram uma forte associação entre a presença do polimorfismo TT (JAK -rs11208534) e casos de FHD. Por outro lado, no presente estudo, não foi observada associação da presença deste genótipo com pacientes que relataram ter apresentado sintomas de dengue, e que apresentavam ou não genótipos protetores nos genes DCSIGN e/ou FC γ RIIa.

As frequências genótípicas detectadas para o polimorfismo DCSIGN (rs4804803) não foram diferentes entre os indivíduos testados, como também não foi observada diferença entre as frequências dos alelos A e G. Wang e colaboradores (2011), em um estudo na população de Taiwan, onde foi demonstrado que os genótipos AG/GG de rs4804803 foram associados à susceptibilidade à dengue hemorrágica, em comparação com FD, o mesmo também foi observado por Sakuntabhai (2005). No presente estudo, apesar da maioria dos participantes, que relataram sintomas de dengue e apresentavam anticorpos anti-DENV, terem também apresentado genótipos predisponentes, AG ou GG, nenhum deles relatou sintomas graves da doença ou mesmo houve associação da presença destes genótipos predisponentes com a apresentação de sintomas de dengue pelos mesmos. Já em relação ao genótipo protetor AA, no gene DCSIGN (rs4804803), no presente estudo, este genótipo foi observado em dez indivíduos com sintomas característicos de DENV, contudo não foi observada associação entre o genótipo protetor e ausência de sintomas nos participantes.

Do total dos participantes desse estudo, mais da metade apresentou dois genótipos e um quinto apresentou três genótipos predisponentes à FHD. Dos participantes que apresentaram anticorpos anti-DENV e a presença de dois ou três genótipos de predisposição à FHD, não foi observada diferença no número de indivíduos sintomáticos e indivíduos assintomáticos. O mesmo foi observado quando os participantes apresentavam os dois genótipos de proteção. Embora nenhum

participante tenha relatado sintomas de FHD, a presença de dois ou mais genótipos relacionados às formas graves de DENV, em habitantes de Juiz de Fora, ainda é preocupante, principalmente por se tratar de uma cidade que já vem passando por epidemias com muitos casos da doença registrados.

5 No presente estudo, não foram observadas associações entre os genótipos de predisposição e proteção à FHD em relação aos sintomas e também ao local de residência dos participantes. Contudo, é importante salientar que o mesmo foi encontrado no presente grupo estudado, não podendo ser considerado para toda a população de Juiz de Fora. Visto que, a distribuição geográfica para as coletas das
10 amostras biológicas não foi realizada de maneira homogênea, no qual obtivemos maior número de participantes residentes na região central.

Além dos polimorfismos predisponentes ou protetores, vários outros fatores, podem ser determinantes para um indivíduo ter ou não quadros graves de dengue. Características genéticas do vírus podem estar relacionadas a estes casos
15 (GUBLER, 1998) e estudos já verificaram que a introdução de um novo tipo viral em uma dada região geralmente é acompanhada da ocorrência de casos mais graves de dengue. Somado a isso, outro fator importante na patogênese da dengue grave é a pré-existência de anticorpos heterotípicos sub-neutralizantes, que podem atuar como facilitadores de infecção em uma infecção por DENV (GUBLER, 1998;
20 NOGUEIRA et al., 2005). As amostras de soro, nas quais foram detectados anticorpos, passarão por testes de soroneutralização a fim de detectar anticorpos neutralizantes e um teste para pesquisar anticorpos facilitadores de infecção. Os resultados permitirão o conhecimento mais completo do perfil sorológico que pode ser predisponente à dengue grave, em habitantes de Juiz de Fora. Além disso, com
25 os resultados obtidos, será possível também ampliar o conhecimento sobre os tipos virais do DENV circulantes na cidade.

Finalmente, o presente trabalho realizado na cidade de Juiz de Fora e em paralelo em outras cidades de Minas Gerais, como Ouro Preto, Ouro Branco, Divinópolis e Alfenas, contribuirá para o conhecimento de áreas de maior risco de
30 ocorrência de casos de dengue grave, no Estado, o que poderá contribuir para o controle e prevenção desta doença.

7 CONCLUSÕES

- 5 - Foi observada soroprevalência de 16,1% indivíduos apresentando anticorpos anti- DENV;
- Foram detectados genótipos predisponentes e protetores de FHD;
- Não houve associação de genótipos de proteção e predisponentes à FHD quando associados com a distribuição de gênero e relato de apresentação de sintomas;
- 10 - O genoma do DENV foi detectado em moradores de Juiz de Fora, no período de setembro a outubro de 2013 e fevereiro a maio de 2014.

8 PERSPECTIVAS

5 -Fazer teste de soroneutralização com as amostras positivas, para busca de anticorpos neutralizantes ou anticorpos facilitadores da infecção por DENV..

-Realizar o sequenciamento dos amplicons obtidos para confirmação e identificação de DENV.

-Realizar o isolamento e caracterização dos DENVs detectados.

10 -Verificar a presença de polimorfismos nos genes TAP; VDR; CTLA-4 TGF- β ; IL-10 e TNF- α , que podem ser predisponentes ou protetores à FHD.

-Fazer análise dos resultados de caracterização sorológica e genética, comparativamente com os mesmos estudos realizados nas demais cidades mineiras, como Ouro Branco, Ouro Preto, Divinópolis e Alfenas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 5 ACESSA. Juiz de Fora tem 53 novos casos de dengue confirmados. Disponível em:<
<http://www.acesa.com/saude/arquivo/noticias/2013/07/26-juiz-de-fora-tem-53-novos-casos-de-dengue-confirmados/>>. Acesso em: 19 dez. 2013.
- 10 ALAGARASU, K.; BACHAL, R. V.;BHAGAT, A. B.; SHAH, P. S.; &DAYARAJ, C. (2012).Elevated levels of vitamin D and deficiency of mannose binding lectin in dengue hemorrhagic fever.**Virology journal**, 9, 86.
- 15 AppliedBiosystems, Inc, Foster City, CA, USA. Disponível em:
 <<https://www.lifetechnologies.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/snp-genotyping-taqman-assays> >.Acesso em dez 2014.
- 20 ARAÚJO, F.M. de C.; NOGUEIRA, R.M.R.; ARAÚJO, J.M.G. de; RAMALHO, I.L.C.; RORIZ, M.L.F. de S.; MELO, M.E.L. de; COELHO, I.C.B. Concurrent infection with Dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **101**, n. 8, p. 925-928, dez. 2006.
- 25 ARAÚJO, J.M.G. de; BELLO, G.; ROMERO, H.; NOGUEIRA, R.M.R. OriginandEvolutionof Dengue virustype 3 in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. **6**, n. 9, p. 1-10, set. 2012.
- 30 AZEVEDO, A. S.; YAMAMURA, A. M. Y.; FREIRE, M. S.; TRINDADE, G. F.; BONALDO, M.; GALLER, R., & ALVES, A. M. B. (2011). DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. **PloSone**, 6(7), e20528.
- 35 BABON,J.;LUCET,I.S.;MURPHY,J.M.;NICOLA,N.A.; VARGHESE,L.N. The molecular regulationof Janus kinase (JAK) activation. **BiochemicalJournal** **462** (1–13) (2014). (Printed in GreatBritain) doi:10.1042/BJ20140712.
- 40 BARROS, L. P. S.; IGAWA, S.E.S.; JOCUNDO, S. Y; BRITO JUNIOR, L. C. Análise crítica dos achados hematológicos e sorológicos de pacientes com suspeita de Dengue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. **30**, n. 5, p. 363 - 366, 2008.
- 45 BARTENSCHLAGER, R & MILLER, S. Molecular aspectsof Dengue virusreplication. **Future Medicine**, v.**3**, p.155-165, 2008.

- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 196, p. 80-83. 1991.
- 5
BISORDI, I.; ROCCO, I.M.; SUZUKI, A.; KATZ, G.; SILVEIRA, V.R.; MAEDA, A.; SOUZA, R.P.de; BASSI, M.G.; DEL TEDESCO, E.F.; FREITAS, R.; BESSA, T.A.F. Evaluation of dengue NS1 antigen detection for diagnosis in public health laboratories, São Paulo State, 2009. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.53, n.6, p. 315-320, nov-dez. 2011.
- 10
BOTELHO, J. Detecção e caracterização molecular de dengue virus circulantes em Juiz de Fora - MG. 2014. folhas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Imunologia/DIP) – Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2014.
- 15
BOTSTEIN, D., & RISCH, N. (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. **Nature genetics**, 33 Suppl(march), 228–37.
- 20
BOURNAZOS, S.; WOOLF, J.M.; HART, S.P. & DRANSFIELD, I. (2009) Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants. **Clinical & Experimental Immunology** 157: 244–254.
- 25
BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses. In: FIELDS, B.N.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E.; KNIPE, D.M. **Virology**. 4^a ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001, cap. 33. p. 852-922.
- 30
CHAMBERS, T.J.; RICE, C. M.; HAHN, C. S. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Reviews Microbiology**, v. 44, p. 649 - 688, 1990
- 35
CHEN, R.F.; WANG, L.; CHENG, J.T.; CHUANG, H.; CHANG, J.C.; LIU, J.W.; Lin IC & Yang KD (2009). Combination of CTLA-4 and TGFb1 gene polymorphisms associated with dengue hemorrhagic fever and virus load in a dengue-2 outbreak. **Clinical Immunol** 131: 404–409.
- 40
CHEN, C.-F.; SHU, P.-Y.; TENG, H.-J.; SU, C.-L.; WU, J.-W.; WANG, J.-H.; LIN, T.-H.; HUANG, J.-H.; WU, H.-S. Screening of Dengue virus in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by one-step SYBR Green-based Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction assay during 2004–2007 in Southern Taiwan. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1017-1025. 2010.
- 45
50

- CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue--quo tu et quo vadis? **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1562–608, out. 2011.
- 5 CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of Dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, dez. 2006.
- 10 COHEN, S.N.; HALSTEAD, S.B. Shock associated with dengue infection. **Tropical pediatrics**, v. 68, n. 3, p. 448-456. 1966.
- COSTA, S.M.; et al. Induction of a Protective Response in Mice by the Dengue Virus NS3 Protein Using DNA Vaccines. **PLOS ONE, California**, 6(10): e25685. doi:10.1371/journal.pone.0025685, 2011.
- 15 CORDEIRO, J.D.S. **Caracterização molecular e análise filogenética dos vírus dengue circulantes na cidade de Boa Vista, Roraima, Brasil. 2010.** 59 folhas. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva)- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Ministério da Ciência e Tecnologia, Manaus, 2010.
- 20 CRUZ, A. C. R.; CRUZ, A.C.R.; GALLER, R.; SILVA, E.V.P. da; SILVA, M. de O. e; CARNEIRO, A.R.; ROSA, E.S.T. da; VASCONCELOS, H.B.; SÁ, E.L.R. de; VASCONCELOS, P.F. da C. Molecular epidemiology of Dengue virus serotypes 2 and 3 isolated in Brazil from 1991 to 2008. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 3, p. 25-34, set. 2010.
- 25 CUNHA, R.V. da CUNHA, R.V. da; MASPERO, R.C.; MIAGOSTOVICH, M.P.; ARAÚJO, E.S. de LUZ, D. da C.; NOGUEIRA, R.M.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue infection in Paracambi, State of Rio de Janeiro, 1990-1995. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 5, p. 379-83, 1997.
- 30 DESPRÉS, P.; SAKUNTABHAI, A. & JULIER, C. (2005) A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **International Journal of Medical Sciences** (Paris) 21: 905–906.
- 35 DRUMOND, B.P.; MONDINI, A.; SCHMIDT, D.J.; BRONZONI, R.V. DE M.; BOSCH, I.; NOGUEIRA, M.L. Circulation of different lineages of Dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil: dynamics and molecular and phylogenetic characterization. **Plos one**, in press. 2012.
- 40 DRUMOND, B.P.; MONDINI, A.; SCHMIDT, D.J.; BRONZONI, R.V.M.; BOSCH, I.; NOGUEIRA, M.L. Circulation of Different Lineages of Dengue Virus 2, Genotype American/Asian in Brazil: Dynamics and Molecular and Phylogenetic Characterization. **PLOS ONE** | www.plosone.org March 2013 | Volume 8 | Issue 3 | e59422.
- 45
50

- 5 ENDY, T. P.; NISALAK, A.; CHUNSUTTITWAT, S.; VAUGHN, D. W.; GREEN, S.; ENNIS, F.; LIBRATY, D. H. (2004). Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. **The Journal of infectious diseases**, **189(6)**, 990–1000.
- 10 FANG X.; HU Z.; SHANG W.; ZHU J.; XU C.; RAO X. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. **FEMS Immunol Medic Microbiol**. 2012 Nov; **66(2)**:134-46
- 15 FARRAR, J.; FOCKS, D.; GUBLER, D.; BARRERA, R.; GUZMAN, M. G.; SIMMONS, C.; KROEGER, a. (2007). Towards a global dengue research agenda. **Tropical medicine & international health** : TM & IH, 12(6), 695–9.
- 20 FIGUEIREDO, L. T. M. Emergente arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. **40**, n. 2, p. 224–229, 2007.
- 25 FIGUEIREDO, R.M.P. de; NAVECA, F.G.; BASTOS, M. de S.; MELO, M. do N.; VIANA, S. de S.; MOURÃO, M.P.G.; COSTA, C.A.; FARIAS, I.P. Dengue virus Type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. **14**, n. 4, p. 667-669, abr. 2008.
- 30 FIGUEIREDO, L.T.M. Saint Louis encephalitis virus and other arboviruses in the differential diagnosis for dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **47(5)**:541-542, Sep-Oct, 2014 <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0197-2014>.
- 35 FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ. Incidência de Febre Amarela. Disponível em: <<http://portal.fiocruz.br/>> Acesso em fev.2015.
- 40 GARCÍA, G.; SIERRA, B.; PE´REZ, AB (2010) Asymptomatic dengue infection in a Cuban population confirms the protective role of the RR variant of the FccRIIa polymorphism. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **82**: 1153–1156.
- 45 GARCIA-TREJO AR, FALCO´ N-LEZAMA JA, JUA´REZ-PALMA L, GRANADOS J, ZU´NIGA-RAMOS J, RANGEL I H, BaARQUERA R, Vargas-ALARCO´N G & RAMOS C (2011) Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with dengue fever. **Acta Tropica** **120**: 67–71.
- 50 GEBHARD, L.G.; FILOMATORI, C.V; GAMARNIK, A.V. Functional RNA elements in the dengue virus genome. **Viruses**, v. **3**, n. 9, p. 1739-56, set. 2011.

- GREEN S & ROTHMAN, A (2006) Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Current Opinion in Infectious Disease** **19**: 429–436.
- 5 GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever Dengue. **Clinical microbiology reviews**, v. **11**, n. 3, p. 480-496, 1998.
- GUBLER, D. J. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of medical research**, **33(4)**, 330–42.
- 10 GUZMAN, M.G.; HALSTEAD, S.B; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D.J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H.S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M.B.; PELEGRINO, J.L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R.W. Dengue: a continuing global threat. **Nature reviews - Microbiology**, v. **8**, n. 12, p. 7-16, dez. 2010.
- 20 HALSTEAD, S.B.; UDOMSAKDI, S.; SIMASTHIEN, P.; SINGHARAJ, P.; SUKHAVACHANA, P.; NISALAK, A. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. 1. Experience with classification of dengue viruses. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. **42**, p. 261-275, abr. 1970.
- 25 HALSTEAD, S. B. Enhancement of dengue virus infection in monocytes by *flavivirus* antisera. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.**29**, n.4, Jul, p.638-42. 1980.
- 30 IDRESS, S.; ASHFAQ, U.A. A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. **Genetic Vaccines and Therapy**, Pakistan, **10:6**, 2012.
- 35 JARMAN, R.G.; NISALAK, A.; ANDERSON, K.B.; KLUNGTHONG, C.; THAISOMBOONSUK, B.; KANEECHIT, W.; KALAYANAROOJ, S.; GIBBONS, R.V. Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **84**, n. 2, p. 218-23, fev. 2011.
- 40 LANCIOTTI, R.S.; CALISHER, C.H.; GUBLER, D.J.; CHANG, G.J.; VORNDAM, A.V. 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. 545-51, mar. 1992.
- 45 LIMA; J.R.C.; ROUQUAYROL, M.Z.; CALLADO, M.R.M.; GUEDES, M.I.F.; PESSOA, C. Interpretation of the presence of IgM and IgG antibodies in a rapid test for dengue : analysis of dengue antibody prevalence in Fortaleza City in the 20 th year of the epidemic. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. **45**, n. 2, p. 163-167, 2012.
- 50

LINDENBACH, B.D.; THIEL, H.J. & RICE, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. IN: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). *Virology*. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers, p. 1101-1154, 2007.

5

LOKE, H.; BETHELL, D.; PHUONG, C. X. T.; DAY, N.; WHITE, N.; FARRAR, J. & HILL, A. (2002). Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor Ila genes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**,**67(1)**,102-6.

10

LUPI, O.; CARNEIRO,G.C.;COELHO,I.C.B.Mucocutaneous manifestations of dengue.**An Bras Dermatol**. 2007; **82(4)**:291-305.

15

MA, I., CHRISTOPHER, T. J., TERESA, D. G., RICHARD, J. K. . & CAROL, B. P. solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA**,v. **101**, p.3414-3419, 2004.

20

MELO, W. A. O papel do diagnóstico laboratorial da influenza. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.1, p. 191-193. 2010.

25

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Mapa da dengue aponta 157 municípios em situação de risco e 525 em alerta. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-gestor/vigilancia/noticias-vigilancia/7716->>. Acesso em 05 jan. 2014.

30

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico Volume 46** Nº 1 – 2015. ISSN 2358-9450. Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2014-042-ok-50.pdf>>. Acesso em 06 fev 2015.

35

MONDINI, A. et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, v. **40**, n. 1, p. 84–6, set. 2007.

40

MURPHY, B.R.; WHITEHEAD, S.S. Imune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annual Review Immunology**, v.**29**,p.587-619, Apr.2011.

45

MUKHOPADHYAY, S., KUHN, R. J.& ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v.**3**, p. 13-22, 2005.

50

NOGUEIRA, R. M., SHATZMAYR, H.G., FILIPIS, A. M.B., SANTOS, F.B., CUNHA, R.
V. N., COELHO, J. O, SOUZA, L. J., GUIMARÃES, F.R., ARAÚJO, E. S. M.,

- SIMONE, T. S., BARAN, M., TEIXEIRA, G. & MIAGOSTOVICH, M. P. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerging Infectious Disease Journal**, v.11, p. 1376-1381, 2005.
- 5
OCHIENG, C.; LUTOMIAH, J.; MAKIO, A.; KOKA, H.; CHEPKORIR, E.; YALWALA, S.; MUTISYA, J.; MUSILA, L.; KHAMADI, S.; RICHARDSON, J.; BAST, J.; SCHNABEL, D.; WURAPA, E.; SANG, R. Mosquito-borne arbovirus surveillance at selected sites in diverse ecological zones of Kenya; 2007 - 2012. **VirologyJournal**,
10 v. 10, n. 140. 2013.
- PAULA, S. O. de; FONSECA, B. A. L. da. Dengue : A review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 390-398, 2004.
15
- PEREZ, AB.; SIERRA, B.; GARCIA, G.; AGUIRRE, E.; BABEL, N.; ALVAREZ ,M.; SANCHEZ, L.; VALDES, L.; VOLK, HD & GUZMAN, MG (2010) .Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-b1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. **Human Immunology** 71: 1135–1140.
20
- PINHEIRO F.P., et al. (1981). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**30: 145–148.
25
- PONTES, R. J. S.; RUFFINO-NETTO, A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil : aspectos epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 218-227, 1994.
30
- PREFEITURA DE JUIZ DE FORA. Disponível em:
35 <http://www.pjf.mg.gov.br/dengue/viewnoticias.php?modo=link2&idnoticia2=48343>. Acesso em fev 2015.
- QI, R.F.; ZHANG, L. & CHI, C.W. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. **Acta BiochimicaBiophysica Sinica**, v.40, p.91-101, 2008
40
- QUIN, P.L. et al. **Microbiologia veterinária e Doenças Infeciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.512p.
45
- RAPPOCILO, G.; JENKINS F. J.; HEATHER, R.; PIAZZA, P.; JAIS, M., BOROWSKI, L.;WATKINS S. C. (2006). DC-SIGN is a Receptor for Human Herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages. **Journal Immunology** 176: 1741–1749.
50

RICO-HESSE, R. (2011). NIH Public Access.

5 ROCCO, I. M. et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. **47**, n. 5, p. 281–5, 2005.

10 ROCHA ES.; DE OLIVEIRA JG.; DOS SANTOS JR.; RODRIGUES GO.; FIGUEIREDO LB.; PESSANHA JE.;PROIETTI FA.; DA FONSECA FG.; BONJARDIM CA.; FERREIRA PC, KROON EG. Recombinant envelope protein-based enzyme immunoassay for IgG antibodies is comparable to neutralization tests for epidemiological studies of dengue infection. **Journal of Virological Methods**. 2012 **(24)**.

15

ROMANOS, M.T.V. Febre amarela e dengue. In: SANTOS, N.S. de O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. Introdução à Virologia Humana. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, cap. 13, p. 399-409.

20

ROSA, R, et al. Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil DOI: 10.1371/journal.pntd.0002537. 2013.

25

SAMUEL, P. P.; TYAGI, B. K. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. **The Indian journal of medical research**, v. **123**, n. 5, p. 615-28, maio, 2006.

30

SAKUNTABHAI A.; TURBPAIBOON C.; CASADEMONT I.; CHUANSUMRITH A.; LOWHNOO T, et al. (2005) A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nature Genetics** **37**: 507–513.

35

SILVA, L.K.; BLANTON, R.E.; PARRADO A.R.; MELO, P.S.; MORATO, V.M.; REIS, A.G.; DIAS, J.P.; CASTRO, J.M.; VASCONCELO S, F.C.; GODDARD, K.A.B.; BARRETO, M.L.; REIS, M.G.; TEIXEIRA, G. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK. *European Journal of Human Genetics* (2010) **18**, 1221–1227 & 2010 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 1018-4813/10.

40

45 SHIMITTGEN T. D. Real-Time quantitative PCR. **Methods**, v. **25**, p.383-385, 2001. SMIT, J. M.; MOESKER, B.; RODENHUIS-ZYBERT, I.; WILSCHUT, J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. **Viruses**, v. **3**, n. 2, p. 160-71, fev. 2011.

50 SOUZA, W. Doenças Negligenciadas. Academia Brasileira de Ciências. Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento Nacional, 2010.

- SOUNDRAVALLY,R & HOTI, SL (2007) Immunopathogenesisof dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: Role of TAP and HPA gene polymorphism. **Human Immunology** **68**:973–979.
- 5
STRECK, A.F.; GAVA, D.; RECH, H.; CANAL, C.W. Técnicas de diagnóstico imunológico. **Acta Scientiae Veterinarie**. **35** (Supl): S125-S130, 2007.
- 10 TAVARES W.; MARINHO L.A.C. **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. São Paulo: Editora Atheneu; 2005
- TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.; BARRETO, M.L.; MOTA, E. 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Caderno. Saúde Pública** **21**, 1307–1315, <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2005000500002>.
- 15
- 20 TEIXEIRA, M.G.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.B.; FERREIRA, G.L.C.; BRICKS, L.; JOINT, G. 2013. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000–2010): a systematic literature search and analysis. **PLoS Neglected Tropical Disease**. **7** (12), e2520, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002520>.
- 25
- TERZIAN, A. C. B. et al. Detection of Saint Louis encephalitis virus in Dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. **11**, n. 3, p. 291–300, mar. 2011.
- 30
- TSAI, T.-T.; CHUANG, Y.-J.; LIN, Y.-S.; WAN, S.-W.; CHEN, C.-L.; & LIN, C.-F. (2013). An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. **Journal of biomedical science**, **20**(1), 40.
- 35
- VASCONCELOS P.F., et al. (1991) **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** **33**: 465–476.
- 40
- VILLAR, L.M.D., ET AL. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. **The new england journal o f medicine**. DOI: 10.1056/NEJMoa1411037, 2014.
- VIRAL ZONE - Swiss Institute of Bioinformatics. Flavivirus. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/24.html>. Acesso em 17 jan. 2014
- 45
- ZOMPI, S.; MONTOYA, M.; POHL, M. O.; BALMASEDA, A. & HARRIS, E. (2012). Dominant cross-reactive B cell response during secondary acute dengue virus infection in humans. **PLoS neglected tropical diseases**, **6**(3), e1568.
- 50

WAN, S.-W., LIN, C.-F., WANG, S., CHEN, Y.-H., YEH, T.-M., LIU, H.-S., LIN, Y.-S. (2013). Current progress in dengue vaccines. **Journal of Biomedical Science**, **20(1)**, 37.

5

WANG, L.; CHEN, R.-F.; LIU, J.-W.; LEE, I.-K.; LEE, C.-P.; KUO, H.-C.; YANG, K. D. (2011). DC-SIGN (CD209) Promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **5(1)**, e934.

10

WHO Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control (2009)

15

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue, countries or areas at risk, 2011. Geneva: 2012. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png>. Acesso em 20 Jan. 2015.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) no projeto de pesquisa
5 **“Investigação de fatores sorológicos e genéticos relacionados com a predisposição
ao desenvolvimento das formas graves da Dengue em Minas Gerais”**. Os avanços na
área de controle de doenças como a dengue ocorrem através de estudos como este, por
isso a sua participação é importante. O objetivo do estudo é investigar se existe associação
entre a variação encontrada nas manifestações clínicas da dengue com as variações
(mutações) que podem existir no vírus da dengue e em entre os indivíduos (pacientes).
10 Desta forma, esta pesquisa poderá auxiliar no controle da dengue e, futuramente, no
tratamento dos pacientes.

Caso você aceite participar desta pesquisa, será necessária a coleta de uma amostra de
sangue, feita por equipe devidamente especializada. A sua amostra de sangue será levada
ao laboratório e utilizada para o presente estudo que pesquisará anticorpos contra os quatro
15 tipos de vírus da dengue. Também investigará alguns genes que possam estar envolvidos
com o desenvolvimento da doença.

Sua participação não é obrigatória. Cabe a você decidir se deseja participar ou não da
pesquisa. Não há riscos para sua saúde, e o único desconforto é a picada da agulha. Para
participar deste estudo, você não terá nenhum custo, e nem receberá qualquer ajuda
20 financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e
estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou
interromper a participação a qualquer momento. Sua participação é voluntária e a recusa em
participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido
(a) pelo pesquisador. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de
25 sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.
Apesar disso, você tem assegurado o direito a ressarcimento ou indenização no caso de
quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o
material que indique sua participação não serão liberados sem asua permissão. Os dados e
30 instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por
um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de
consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada
pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

35 Eu, _____, portador (a) do
documento de Identidade _____, fui informado (a) dos objetivos do

presente estudo, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

5

Juiz de Fora, 01 de agosto de 2013.

10

15

Assinatura do (a) participante

Assinatura do (a) pesquisador (a)

APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE INVESTIGAÇÃO

Projeto “Investigação de fatores sorológicos e genéticos relacionados com a predisposição ao desenvolvimento das formas graves da Dengue em Minas Gerais: Estudo em cidades com perfis epidemiológicos distintos”

5

Número de Identificação:

Data:

Nome do paciente:

10 **Sexo:** () Masculino () Feminino

Data de Nascimento: ____/____/____

Gestante: () não () ignorado () Sim – qual trimestre? _____

Motivo médico para realização da coleta de sangue: _____

15 **Endereço:** Rua _____
Bairro _____ Cidade _____

Endereço de Trabalho: Rua _____
Bairro _____ Cidade _____

Viajou para algum lugar recentemente: () Sim () Não

20 Caso sim, quando e onde: _____

Entrou em alguma região de mata, floresta? () Sim () Não Quando? _____

Teve dengue antes? () Sim – Quantas vezes (anos) _____ () Não

() Foi confirmado o diagnóstico laboratorial ou () Foi apenas suspeita Clínica?

Está com sintomas de Dengue no momento? () Sim () Não

25 **Início dos sintomas (quantos dias atrás?):**

Já se consultou antes com estes sintomas? () Não () Sim – quando? _____

Caso sim, foi passado algum tratamento: () Não () Sim

Qual tratamento? _____

Pressão arterial _____ **Temperatura** _____

30

Sintomatologia: Marque com X os sintomas você sentiu ou está sentindo?

() Febre. Início: _____ dias atrás	() Dor de cabeça intensa
() Dor atrás dos olhos	() Dor no corpo
() Dor nas “juntas”	() Desânimo / Cansaço
() Manchas vermelhas pelo corpo	() Dor na barriga muito forte e o tempo todo
() Vômito	() Sente tontura quando fica de pé
() Sensação de desmaio	() Sente-se com muito sono
() Sente-se irritado	() Sente-se agitado
() Sai sangue da boca, nariz ou olhos	() Inchaço em alguma parte do corpo
() Diminuiu a vontade de urinar	() Sai sangue no vômito
() Fezes têm sangue e são bem escuras	() Dificuldade de respirar
() Mãos e pés frios	() Diarreia
() Queda abrupta da pressão arterial	() Coração disparado

Outro(s) sintoma(s). Qual (is)?
Mudança na sensibilidade. Que tipo?
Mudança no movimento. Que tipo?
Houve melhora de algum sintoma. Qual/is? Quando?
Prova do laço ()positiva ()negativa () não realizada

Caso o paciente não se oponha a responder perguntas sobre raça e escolaridade

Raça/Cor: ()Branca ()Negra ()Amarela ()Parda () Indígena () Ignorado

5

Escolaridade: () Analfabeto ()1 a 4 série incompleta ()4 série completa

() 5 a 8 série incompleta () Ensino fundamental completo

() Ensino médio incompleto () Ensino médio completo

() Educação superior incompleta () Educação superior completa

10

() Ignorado () Não se aplica

APÊNDICE C- INFORMAÇÕES SOBRE OS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Identificação da amostra	Regiões Juiz de Fora	Data da coleta	Período	Idade	Gênero	Sintomas momento coleta	Sintomas anteriores
180	Centro	10.09.2013	N.E	15	M	P	P
181	Centro	10.09.2013	N.E	80	F	AS	AS
182	Centro	10.09.2013	N.E	70	F	AS	AS
183	Centro	10.09.2013	N.E	39	F	AS	AS
184	Sul	10.09.2013	N.E	22	F	AS	AS
185	Centro	10.09.2013	N.E	46	M	AS	AS
186	Centro	11.09.2013	N.E	70	F	AS	AS
187	Centro	11.09.2013	N.E	86	F	AS	AS
188	Centro	11.09.2013	N.E	52	M	AS	AS
189	Centro	11.09.2013	N.E	42	F	AS	AS
190	Noroeste	11.09.2013	N.E	0	F	AS	AS
191	Centro	11.09.2013	N.E	58	F	AS	AS
192	Centro	12.09.2013	N.E	17	F	AS	AS
193	Noroeste	12.09.2013	N.E	43	F	AS	AS
194	Sul	12.09.2013	N.E	67	M	AS	AS
195	Centro	12.09.2013	N.E	35	F	AS	AS
196	Centro	12.09.2013	N.E	51	M	AS	AS
197	Centro	12.09.2013	N.E	78	F	AS	AS
198	Centro	16.09.2013	N.E	82	F	AS	AS
199	Centro	16.09.2013	N.E	50	F	AS	AS
200	Centro	16.09.2013	N.E	89	F	AS	AS
201	Centro	16.09.2013	N.E	60	M	AS	AS
202	Centro	16.09.2013	N.E	32	F	AS	AS
203	Centro	17.09.2013	N.E	83	F	AS	AS
204	Centro	17.09.2013	N.E	88	F	AS	AS
205	Centro	17.09.2013	N.E	86	M	AS	AS
206	Centro	17.09.2013	N.E	31	F	AS	AS
207	Centro	17.09.2013	N.E	86	F	AS	AS
208	Centro	17.09.2013	N.E	38	F	AS	AS
209	Centro	17.09.2013	N.E	59	F	AS	AS
210	Centro	17.09.2013	N.E	58	F	AS	AS
211	Oeste	17.09.2013	N.E	44	F	AS	AS
212	Centro	17.09.2013	N.E	70	F	AS	AS
213	Centro	18.09.2013	N.E	56	F	AS	AS
214	Centro	18.09.2013	N.E	46	F	AS	AS
215	Centro	18.09.2013	N.E	47	M	AS	AS
216	Centro	18.09.2013	N.E	56	F	AS	AS
217	Centro	18.09.2013	N.E	56	M	AS	AS
218	Centro	18.09.2013	N.E	54	M	AS	AS

219	Centro	18.09.2013	N.E	57	M	AS	AS
220	Centro	18.09.2013	N.E	28	F	AS	AS
221	Centro	18.09.2013	N.E	55	M	AS	P
222	Centro	18.09.2013	N.E	27	F	AS	AS
223	Centro	19.09.2013	N.E	41	F	AS	AS
224	Centro	19.09.2013	N.E	43	M	AS	AS
225	Centro	19.09.2013	N.E	68	M	AS	AS
226	Centro	19.09.2013	N.E	79	M	AS	AS
227	Centro	19.09.2013	N.E	38	F	AS	P
228	Centro	19.09.2013	N.E	41	F	AS	AS
229	Centro	20.09.2013	N.E	61	F	AS	AS
230	Centro	20.09.2013	N.E	50	M	AS	AS
231	Centro	20.09.2013	N.E	49	F	AS	AS
232	Oeste	23.09.2013	N.E	16	F	AS	AS
233	Centro	23.09.2013	N.E	82	F	AS	AS
234	Centro	23.09.2013	N.E	81	M	AS	AS
235	Oeste	23.09.2013	N.E	69	F	AS	AS
236	Centro	23.09.2013	N.E	63	F	P	AS
237	Centro	23.09.2013	N.E	78	M	AS	AS
238	Centro	23.09.2013	N.E	60	F	AS	AS
239	Centro	23.09.2013	N.E	52	M	AS	AS
240	Centro	23.09.2013	N.E	51	F	AS	AS
241	Centro	23.09.2013	N.E	70	F	AS	AS
242	Oeste	24.09.2013	N.E	53	F	AS	AS
243	Centro	24.09.2013	N.E	23	M	AS	AS
244	Centro	24.09.2013	N.E	76	F	AS	AS
245	Centro	24.09.2013	N.E	22	F	AS	AS
246	Centro	24.09.2013	N.E	69	F	AS	AS
247	Centro	24.09.2013	N.E	60	F	AS	P
248	Centro	24.09.2013	N.E	70	M	AS	AS
249	Centro	24.09.2013	N.E	92	F	AS	AS
250	Centro	24.09.2013	N.E	24	M	AS	AS
251	Centro	24.09.2013	N.E	48	F	AS	P
252	Centro	26.09.2013	N.E	38	F	AS	AS
253	Centro	26.09.2013	N.E	0	M	AS	AS
254	Centro	26.09.2013	N.E	71	F	AS	AS
255	Centro	26.09.2013	N.E	68	F	AS	AS
256	Centro	26.09.2013	N.E	53	M	AS	AS
257	Centro	27.09.2013	N.E	60	F	AS	P
258	Centro	27.09.2013	N.E	67	F	AS	AS
259	Centro	27.09.2013	N.E	67	M	AS	AS
260	Centro	30.09.2013	N.E	70	F	AS	AS
261	Centro	30.09.2013	N.E	55	F	AS	AS
262	Centro	30.09.2013	N.E	75	F	AS	P
263	Centro	30.09.2013	N.E	24	M	AS	AS
264	Centro	30.09.2013	N.E	66	M	AS	AS

265	Centro	30.09.2013	N.E	27	F	AS	AS
266	Centro	30.09.2013	N.E	64	M	AS	AS
267	Centro	30.09.2013	N.E	27	F	AS	AS
268	Centro	30.09.2013	N.E	80	F	AS	AS
269	Oeste	01.10.2013	N.E	0	F	AS	AS
270	Centro	01.10.2013	N.E	38	F	AS	AS
271	Leste	01.10.2013	N.E	25	F	AS	AS
272	Centro	01.10.2013	N.E	61	F	AS	AS
273	Centro	01.10.2013	N.E	65	F	AS	AS
274	Centro	01.10.2013	N.E	65	F	AS	AS
275	Centro	01.10.2013	N.E	67	F	AS	AS
276	Centro	01.10.2013	N.E	74	F	AS	AS
277	Centro	01.10.2013	N.E	33	F	AS	AS
278	Centro	01.10.2013	N.E	51	F	AS	AS
279	Centro	01.10.2013	N.E	77	F	AS	AS
280	Centro	01.10.2013	N.E	55	F	AS	AS
281	Centro	01.10.2013	N.E	76	F	P	AS
282	Centro	02.10.2013	N.E	55	F	AS	AS
283	Centro	02.10.2013	N.E	56	M	AS	AS
284	Centro	02.10.2013	N.E	65	F	AS	AS
285	Centro	02.10.2013	N.E	65	M	AS	AS
286	Centro	02.10.2013	N.E	48	F	AS	AS
287	Centro	02.10.2013	N.E	62	M	AS	AS
288	Sul	02.10.2013	N.E	61	F	AS	AS
289	Centro	02.10.2013	N.E	57	F	AS	AS
290	Centro	02.10.2013	N.E	40	F	AS	AS
291	Centro	02.10.2013	N.E	68	M	AS	AS
292	Centro	02.10.2013	N.E	60	F	AS	AS
293	Centro	02.10.2013	N.E	72	M	AS	AS
294	Centro	03.10.2013	N.E	65	F	AS	AS
295	Oeste	03.10.2013	N.E	37	F	AS	P
296	Centro	03.10.2013	N.E	18	F	AS	AS
297	Centro	03.10.2013	N.E	69	F	AS	AS
298	Centro	03.10.2013	N.E	29	F	AS	AS
299	Centro	03.10.2013	N.E	28	F	AS	AS
300	Centro	03.10.2013	N.E	87	F	AS	AS
301	Centro	03.10.2013	N.E	32	F	AS	AS
302	Centro	03.10.2013	N.E	30	F	AS	AS
303	Centro	07.10.2013	N.E	75	F	AS	AS
304	Centro	07.10.2013	N.E	59	M	AS	AS
305	Centro	07.10.2013	N.E	24	F	AS	AS
306	Centro	07.10.2013	N.E	39	F	AS	AS
307	Centro	07.10.2013	N.E	72	F	AS	AS
308	Oeste	07.10.2013	N.E	53	F	AS	AS
309	Centro	07.10.2013	N.E	33	F	AS	AS
310	Centro	07.10.2013	N.E	41	F	AS	AS

311	Centro	07.10.2013	N.E	41	F	AS	AS
312	Centro	08.10.2013	N.E	23	F	AS	AS
313	Centro	08.10.2013	N.E	51	M	AS	AS
314	Centro	08.10.2013	N.E	31	F	AS	AS
315	Centro	08.10.2013	N.E	0	F	AS	AS
316	Sul	08.10.2013	N.E	66	F	AS	AS
317	Centro	08.10.2013	N.E	41	M	AS	AS
318	Centro	08.10.2013	N.E	50	F	AS	AS
319	Centro	08.10.2013	N.E	60	M	AS	AS
320	Centro	08.10.2013	N.E	38	F	AS	P
321	Centro	08.10.2013	N.E	25	F	AS	AS
322	Oeste	08.10.2013	N.E	27	F	AS	AS
323	Centro	08.10.2013	N.E	41	F	AS	AS
324	Centro	09.10.2013	N.E	67	M	AS	AS
325	Centro	09.10.2013	N.E	50	M	AS	AS
326	Centro	09.10.2013	N.E	62	F	AS	AS
327	Centro	09.10.2013	N.E	53	F	AS	AS
328	Centro	09.10.2013	N.E	56	F	AS	AS
329	Centro	09.10.2013	N.E	83	F	AS	AS
330	Centro	19.02.2014	E	27	F	AS	AS
331	Centro	19.02.2014	E	83	F	AS	AS
332	Centro	19.02.2014	E	89	M	AS	AS
333	Centro	19.02.2014	E	46	F	AS	AS
334	Centro	19.02.2014	E	60	F	AS	AS
335	Centro	20.02.2014	E	36	F	AS	AS
336	Centro	20.02.2014	E	20	M	AS	AS
337	Centro	20.02.2014	E	25	F	AS	AS
338	Centro	20.02.2014	E	0	F	AS	AS
339	Centro	24.02.2014	E	33	M	AS	AS
340	Centro	24.02.2014	E	60	M	AS	AS
341	Centro	24.02.2014	E	22	F	AS	AS
342	Centro	24.02.2014	E	47	F	AS	P
343	Centro	24.02.2014	E	67	M	AS	AS
344	Centro	24.02.2014	E	50	M	AS	AS
345	Centro	26.02.2014	E	60	M	AS	AS
346	Centro	26.02.2014	E	54	M	AS	P
347	Centro	26.02.2014	E	61	F	AS	AS
348	Centro	26.02.2014	E	23	F	AS	AS
349	Centro	26.02.2014	E	35	F	AS	AS
350	Centro	26.02.2014	E	61	F	AS	AS
351	Centro	26.02.2014	E	49	M	AS	AS
352	Centro	26.02.2014	E	48	F	AS	AS
353	Centro	26.02.2014	E	73	F	AS	AS
354	Centro	26.02.2014	E	51	F	AS	AS
355	Centro	26.02.2014	E	51	F	AS	AS
356	Centro	20.03.2014	E	0		AS	AS

357	Centro	20.03.2014	E	39	F	AS	AS
358	Centro	20.03.2014	E	52	F	AS	AS
359	Centro	27.03.2014	E	53	M	AS	AS
360	Centro	27.03.2014	E	21	F	AS	P
361	Centro	27.03.2014	E	29	F	AS	P
362	Centro	27.03.2014	E	28	F	AS	P
363	Centro	27.03.2014	E	23	M	AS	P
364	Oeste	27.03.2014	E	29	M	AS	AS
365	Centro	27.03.2014	E	22	F	AS	AS
366	Centro	09.04.2014	E	65	M	AS	AS
367	Centro	09.04.2014	E	31	F	AS	AS
368	Noroeste	09.04.2014	E	48	M	AS	AS
369	Centro	09.04.2014	E	76	F	AS	AS
370	Centro	09.04.2014	E	79	M	AS	AS
371	Oeste	09.04.2014	E	67	F	AS	AS
372	Centro	09.04.2014	E	28	F	AS	AS
373	Leste	09.04.2014	E	45	F	AS	P
374	Noroeste	09.04.2014	E	35	F	AS	AS
375	Centro	09.04.2014	E	66	F	AS	AS
376	Centro	09.04.2014	E	48	F	AS	AS
377	Noroeste	09.04.2014	E	54	F	AS	AS
378	Centro	09.04.2014	E	44	F	AS	AS
379	Nordeste	09.04.2014	E	19	F	AS	AS
380	Centro	09.04.2014	E	63	F	AS	AS
381	Centro	09.04.2014	E	28	M	AS	P
382	Centro	10.04.2014	E	54	F	AS	AS
383	Noroeste	10.04.2014	E	26	F	AS	AS
384	Centro	10.04.2014	E	75	M	AS	AS
385	Oeste	10.04.2014	E	59	M	AS	AS
386	Centro	10.04.2014	E	53	F	AS	AS
387	Noroeste	10.04.2014	E	26	F	P	P
388	Noroeste	10.04.2014	E	79	F	AS	AS
389	Leste	10.04.2014	E	84	F	AS	AS
390	Centro	10.04.2014	E	50	M	AS	AS
391	Centro	10.04.2014	E	63	F	AS	AS
392	Leste	10.04.2014	E	26	M	AS	AS
393	Centro	10.04.2014	E	73	F	AS	AS
394	Noroeste	10.04.2014	E	33	F	AS	AS
395	Noroeste	10.04.2014	E	51	F	AS	AS
396	Centro	10.04.2014	E	71	M	P	P
397	Centro	11.04.2014	E	68	F	AS	AS
398	Centro	11.04.2014	E	29	F	AS	AS
399	Leste	11.04.2014	E	78	F	AS	AS
400	Centro	11.04.2014	E	50	M	AS	AS
401	Centro	11.04.2014	E	92	F	AS	AS
402	Centro	11.04.2014	E	34	F	AS	AS

403	Oeste	11.04.2014	E	61	F	AS	AS
404	Noroeste	11.04.2014	E	57	F	AS	P
405	Centro	11.04.2014	E	60	F	AS	AS
406	Centro	11.04.2014	E	28	M	AS	AS
407	Leste	11.04.2014	E	24	F	AS	AS
408	Centro	11.04.2014	E	68	F	AS	AS
409	Noroeste	11.04.2014	E	54	M	AS	AS
410	Noroeste	11.04.2014	E	70	F	AS	AS
411	Centro	11.04.2014	E	58	F	AS	AS
412	Centro	14.04.2014	E	53	M	AS	P
413	Noroeste	14.04.2014	E	52	F	AS	AS
414	Centro	14.04.2014	E	63	F	AS	AS
415	Leste	14.04.2014	E	60	M	AS	AS
416	Centro	14.04.2014	E	86	F	AS	AS
417	Centro	14.04.2014	E	71	F	AS	AS
418	Noroeste	14.04.2014	E	36	F	AS	P
419	Noroeste	14.04.2014	E	24	F	AS	P
420	Centro	14.04.2014	E	62	F	AS	AS
421	Centro	14.04.2014	E	29	F	AS	AS
422	Centro	14.04.2014	E	62	M	AS	AS
423	Centro	14.04.2014	E	58	F	AS	P
424	Centro	14.04.2014	E	62	M	AS	P
425	Centro	14.04.2014	E	27	F	AS	P
426	Noroeste	14.04.2014	E	31	F	AS	AS
427	Centro	15.04.2014	E	85	F	AS	AS
428	Centro	15.04.2014	E	35	M	AS	AS
429	Centro	15.04.2014	E	50	F	AS	AS
430	Centro	15.04.2014	E	24	M	AS	AS
431	Centro	15.04.2014	E	29	M	AS	P
432	Centro	15.04.2014	E	50	F	AS	AS
433	Centro	15.04.2014	E	45	F	AS	AS
434	Centro	15.04.2014	E	65	M	AS	AS
435	Centro	15.04.2014	E	72	M	AS	AS
436	Oeste	15.04.2014	E	32	M	AS	P
437	Centro	15.04.2014	E	47	F	AS	AS
438	Noroeste	15.04.2014	E	30	F	AS	AS
439	Centro	15.04.2014	E	35	F	AS	AS
440	Centro	15.04.2014	E	80	F	AS	AS
441	Centro	30.04.2014	E	34	F	AS	AS
442	Centro	30.04.2014	E	71	F	AS	P
443	Centro	30.04.2014	E	50	M	AS	P
444	Centro	30.04.2014	E	79	F	AS	P
445	Centro	30.04.2014	E	35	F	AS	P
446	Noroeste	30.04.2014	E	36	F	AS	AS
447	Centro	30.04.2014	E	26	F	AS	P
448	Centro	30.04.2014	E	27	M	AS	AS

449	Oeste	30.04.2014	E	58	F	AS	AS
450	Centro	30.04.2014	E	75	M	AS	AS
451	Noroeste	30.04.2014	E	40	F	AS	P
452	Oeste	30.04.2014	E	55	F	AS	AS
453	Centro	30.04.2014	E	54	M	AS	AS
454	Leste	30.04.2014	E	48	F	AS	AS
455	Centro	30.04.2014	E	56	F	AS	AS
456	Leste	06.05.2014	E	29	F	AS	P
457	Centro	07.05.2014	E	76	M	AS	AS
458	Centro	07.05.2014	E	49	M	AS	AS
459	Sul	07.05.2014	E	75	F	AS	AS
460	Centro	07.05.2014	E	61	F	AS	P
461	Centro	07.05.2014	E	0	F	AS	AS
462	Centro	07.05.2014	E	74	F	AS	AS
463	Centro	07.05.2014	E	20	M	AS	AS
464	Centro	07.05.2014	E	38	M	AS	AS
465	Centro	07.05.2014	E	44	F	AS	AS
466	Centro	07.05.2014	E	55	F	AS	AS
467	Centro	07.05.2014	E	39	M	AS	AS
468	Centro	07.05.2014	E	21	M	AS	AS
469	Centro	07.05.2014	E	62	F	AS	AS
470	Centro	07.05.2014	E	35	F	AS	AS
471	Centro	07.05.2014	E	38	F	AS	AS
472	Leste	08.05.2014	E	40	F	AS	AS
473	Centro	08.05.2014	E	48	F	AS	AS
474	Centro	08.05.2014	E	50	F	AS	P
475	Oeste	08.05.2014	E	37	F	AS	AS
476	Centro	08.05.2014	E	74	F	AS	AS
477	Centro	08.05.2014	E	0	F	AS	AS
478	Centro	08.05.2014	E	28	F	AS	AS
479	Centro	08.05.2014	E	65	F	AS	AS
480	Centro	08.05.2014	E	58	F	AS	AS
481	Centro	08.05.2014	E	38	F	AS	AS
482	Oeste	08.05.2014	E	70	M	AS	AS
483	Leste	08.05.2014	E	33	M	AS	AS
484	Centro	08.05.2014	E	23	F	AS	AS
485	Centro	08.05.2014	E	50	M	AS	AS
486	Noroeste	08.05.2014	E	55	M	AS	AS
487	Noroeste	13.05.2014	E	19	F	AS	AS
488	Sudeste	13.05.2014	E	57	M	AS	AS
489	Oeste	13.05.2014	E	72	F	AS	AS
490	Centro	13.05.2014	E	48	M	AS	P
491	Centro	13.05.2014	E	49	F	AS	AS
492	Centro	13.05.2014	E	51	F	AS	AS
493	Oeste	13.05.2014	E	45	F	AS	AS
494	Noroeste	13.05.2014	E	74	M	AS	AS

495	Nordeste	13.05.2014	E	42	F	AS	AS
496	Centro	13.05.2014	E	55	F	AS	AS
497	Leste	13.05.2014	E	67	M	AS	AS
498	Centro	13.05.2014	E	44	F	AS	P
499	Centro	13.05.2014	E	43	F	AS	AS
500	Centro	13.05.2014	E	36	F	AS	P
501	Centro	13.05.2014	E	38	F	AS	AS
502	Centro	14.05.2014	E	34	F	AS	AS
503	Centro	14.05.2014	E	24	F	AS	AS
504	Centro	14.05.2014	E	56	F	AS	AS
505	Centro	14.05.2014	E	20	F	AS	AS
506	Centro	14.05.2014	E	33	F	AS	AS
507	Centro	14.05.2014	E	32	F	AS	AS
508	Centro	14.05.2014	E	31	F	AS	AS
509	Centro	14.05.2014	E	30	F	AS	AS
510	Centro	15.05.2014	E	66	M	AS	AS
511	Centro	15.05.2014	E	55	F	AS	AS
512	Noroeste	15.05.2014	E	29	F	AS	AS
513	Noroeste	15.05.2014	E	42	F	AS	AS
514	Centro	15.05.2014	E	81	M	AS	AS
515	Centro	15.05.2014	E	58	F	AS	AS
516	Noroeste	15.05.2014	E	44	M	AS	AS
517	Centro	15.05.2014	E	64	F	AS	AS
518	Leste	15.05.2014	E	52	M	AS	P
519	Centro	15.05.2014	E	73	F	AS	AS
520	Centro	15.05.2014	E	29	F	AS	AS
521	Centro	15.05.2014	E	71	F	AS	AS

AS : Ausência de sintomas

N.E: Não epidêmico

E: Epidêmico

P:

Presente

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de fatores sorológicos e genéticos relacionados com a predisposição ao desenvolvimento das formas graves da Dengue

Pesquisador: Luiz Felipe Leomil Coelho

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

Versão: 3

CAAE: 13387313.0.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 525.846

Data da Relatoria: 03/12/2013

Apresentação do Projeto:

Aborda a investigação de fatores sorológicos e genéticos relacionados com a predisposição ao desenvolvimento das formas graves da Dengue em Minas Gerais. Foco principal nas variações do hospedeiro.

Objetivo da Pesquisa:

Estabelecer a prevalência de fatores de risco sorológicos e genéticos para o desenvolvimento de dengue e suas formas mais graves na população de quatro regiões do estado de Minas Gerais (Centro, Centro-Oeste, Sul e Zona da Mata) e correlacionar os dados obtidos com dados epidemiológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco: Mínimos inerente a qualquer coleta de sangue. A coleta será feita por profissionais especializados em condições de biosegurança.

Benefícios: Os resultados de testes sorológicos e moleculares poderão ser apresentados aos pacientes, quando poderão ter conhecimento do seu histórico de infecção e resposta imune aos quatro tipo de dengue vírus, bem como da existência de polimorfismos genéticos que podem aumentar a predisposição de quadros mais severos de dengue.

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
Bairro: centro **CEP:** 37.130-000
UF: MG **Município:** ALFENAS
Telefone: (35)3299-1318 **Fax:** (35)3299-1318 **E-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 525.846

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto muito bem estruturado

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE completo, em duas vias, com endereço/telefone do CEP e pesquisador responsável.

Folha de Rosto adequado.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado do CEP acata o parecer do relator.

ALFENAS, 10 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
Maria Betânia Tinti de Andrade
(Coordenador)

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
Bairro: centro **CEP:** 37.130-000
UF: MG **Município:** ALFENAS
Telefone: (35)3299-1318 **Fax:** (35)3299-1318 **E-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br