

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS APLICADAS À  
FARMÁCIA

LETÍCIA MARIA BELTRAME

Influência de polimorfismos de genes *KIR* e de seus ligantes HLA na  
susceptibilidade ao dengue

Maringá  
2010

LETÍCIA MARIA BELTRAME

Influência de polimorfismos de genes *KIR* e de seus ligantes HLA na  
susceptibilidade ao dengue

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jeane Eliete Laguila Visentainer

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno

Maringá  
2010

# FOLHA DE APROVAÇÃO

LETÍCIA MARIA BELTRAME

Influência de polimorfismos de genes *KIR* e de seus ligantes HLA na susceptibilidade ao dengue

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela comissão julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jeane Eliete Laguila Visentainer  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Dênnis Armando Bertolini  
Universidade Estadual de Maringá

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luíza Tamie Tsuneto  
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Milton Ozório Moraes  
Fundação Oswaldo Cruz

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sofia Rocha Lieber  
Universidade Estadual de Campinas

Aprovada em: 15 de dezembro de 2010.

Local de defesa: Sala 109, Bloco I-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado forças para conseguir superar os momentos de dificuldades que com certeza não me faltaram nestes dois anos de mestrado.

Aos meus pais, Joba e Cida, meu irmão Pepê e minhas irmãs Guida, Marina e Mayra, por todo apoio prestado e por sempre acreditarem e depositarem em mim toda confiança de que sou capaz.

Agradeço à minha orientadora, professora Jeane pela oportunidade que me foi dada e por toda orientação no desenvolvimento deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos às professoras Ana Sell, pra quem eu pedia socorro na ausência da minha orientadora, e Márcia que “botou a mão na massa” para me ajudar na execução de um teste sorológico. Aos demais professores do programa por todo conhecimento que foi compartilhado.

À toda equipe do Laboratório de Imunogenética da UEM que de muitas maneiras contribuíram para realização desta pesquisa. E também à toda equipe do Hemocentro Regional de Maringá que permitiu a coleta de amostras nas campanhas de doação de sangue e medula óssea.

Às minhas amigas do peito, Ana, Mari, Nii, Fran, Dri e Ellen que literalmente “deram o sangue” pra me ajudar, à Rosana que me ajudou nas coletas em domicílio e finalmente, a minha parceira de laboratório Samaia que me ensinou muito nesses quase dois anos de convivência e que ajudou a colocar esse trabalho no papel!

## EPÍGRAFE

“Pois a vida não recua, e não  
se retarda no ontem...”  
(Kahlil Gibran)

# Influência de polimorfismos de genes *KIR* e de seus ligantes HLA na susceptibilidade ao dengue

## RESUMO

Os genes *KIR* (*killer cell immunoglobulin-like receptor*) codificam moléculas ativadoras e inibidoras da função das células NK (*natural killer*) e possuem como ligantes moléculas HLA (*human leucocyte antigen*) de classe I. A proposta deste estudo foi investigar a influência dos genes *KIR* e de seus ligantes HLA de classe I, na susceptibilidade ao dengue em uma população da região sul do Brasil, por meio de um estudo caso-controle. Participaram desta pesquisa 95 indivíduos com diagnóstico confirmado de dengue e um grupo controle de 172 indivíduos, cujo exame sorológico para detecção de anticorpos IgG contra dengue resultou em negativo. A genotipagem de *HLA* e *KIR* foi realizada pelas técnicas PCR-SSOP (*polymerase chain reaction - sequence specific of oligonucleotides probes*) e PCR-SSP (*polymerase chain reaction - sequence specific primers*), respectivamente. A análise dos dados mostrou diferenças significativas para os genes *KIR2DS1* (55,8% vs 40,7%;  $P = 0,02$ ), *KIR2DS3* (47,4% vs 33,7%;  $P = 0,03$ ), *KIR2DS5* (50,5% vs 36,0%;  $P = 0,02$ ) e *KIR2DL5* (77,9% vs 56,4%;  $P = 0,0007$ ). Em relação ao par KIR-ligante, associações positivas com o dengue foram observadas nas interações *KIR3DS1-Bw4* (38,9% vs 26,1%;  $P = 0,04$ ), *KIR2DL1-C2* (75,8% vs 62,2%;  $P = 0,03$ ) *KIR2DL1-C2* (42,1% vs 25,6%;  $P = 0,0081$ ) e uma associação negativa para *KIR2DL3-C1/C1* (16,8% vs 33,1%;  $P = 0,0066$ ). A análise dos haplótipos de *KIR* revelou um possível fator de proteção contra dengue nos portadores do genótipo AA. Estes resultados sugerem a existência de predisposição genética para o dengue clássico na população do sul do Brasil.

**Palavras-chave:** dengue · HLA · genes *KIR* · polimorfismo genético

## Influence of *KIR* gene polymorphisms and their HLA ligands on susceptibility to dengue

### ***ABSTRACT***

Killer cell immunoglobulin-like receptor (*KIR*) genes encode activating and inhibitory molecules present on natural killer (NK) cells and have as binding human leukocyte antigen (HLA) class I molecules. The purpose of this study was to investigate the influence of *KIR* genes and their class I HLA ligands in susceptibility to dengue fever in a population from South Brazil through a case-control study. Ninety-five subjects with confirmed diagnoses of dengue participated in this study, along with a control group of 172 individuals, whose serologic tests for the detection of IgG antibodies against dengue were negative. *HLA* and *KIR* genotyping was performed by polymerase chain reaction with sequence-specific oligonucleotides probes (PCR-SSOP) and polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) techniques, respectively. Data analysis showed significant differences for *KIR2DS1* (55.8% vs 40.7%,  $P = 0.02$ ), *KIR2DS3* (47.4% vs 33.7%,  $P = 0.03$ ), *KIR2DS5* (50.5% vs 36.0%,  $P = 0.02$ ) and *KIR2DL5* (77.9% vs 56.4%,  $P = 0.0007$ ) genes. With regard to *KIR*-ligand pairs, positive associations with dengue were observed in *KIR3DS1-Bw4* (38.9% vs 26.1%,  $P = 0.04$ ), *KIR2DL1-C2* (75.8% vs 62.2%,  $P = 0.03$ ) and *KIR2DS1-C2* (42.1% vs 25.6%,  $P = 0.0081$ ) interactions, and a negative association in *KIR2DL3-C1/C1* (16.8% vs 33.1%,  $P = 0.0066$ ). The analysis of *KIR* haplotypes revealed a possible protective factor against dengue fever in individuals with the AA genotype. These results suggest the existence of genetic predisposition to dengue fever in the population from South Brazil.

**Keywords:** dengue · HLA · *KIR* genes · genetic polymorphisms

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura do vírus do dengue .....	12
Figura 2. Genoma do vírus causador do dengue .....	12
Figura 3. <i>Aedes aegypti</i> – vetor do dengue.....	15
Figura 4. Distribuição do dengue no mundo .....	18
Figura 5. Estrutura gênica do Complexo Principal de Histocompatibilidade humano. ....	31
Figura 6. Complexo de Receptores Leucocitários e os genes <i>KIR</i> .....	34
Figura 7. Especificidades KIR-ligante HLA de classe I.....	35

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>DENGUE</b> .....	<b>10</b>
<b>Etiologia</b> .....	<b>10</b>
<b>Transmissão do dengue e o agente vetor</b> .....	<b>13</b>
<b>EPIDEMIOLOGIA DO DENGUE</b> .....	<b>16</b>
<b>Dengue nas Américas</b> .....	<b>18</b>
<b>Dengue no Brasil</b> .....	<b>19</b>
<b>MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS</b> .....	<b>22</b>
<b>Dengue clássico</b> .....	<b>22</b>
<b>Febre hemorrágica do dengue e Síndrome de choque do dengue</b> .....	<b>24</b>
<b>PATOGENIA E RESPOSTA IMUNE</b> .....	<b>26</b>
<b>FATORES DO HOSPEDEIRO E SUA INFLUÊNCIA NO DENGUE</b> .....	<b>29</b>
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>37</b>
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>37</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>46</b>
<b>Influência de genes <i>KIR</i> e seus ligantes <i>HLA</i> na susceptibilidade ao dengue em uma população da região sul do brasil</b> .....	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>70</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>70</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>71</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>72</b>

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

Dengue é uma doença infecciosa de etiologia viral transmitida ao homem pela picada de mosquitos infectados, principalmente do gênero *Aedes*, tais como o *Aedes aegypti*, e menos frequentemente pelas espécies *A. albopictus* e *A. scutellaris* (Pinheiro & Rosa, 1996). A incidência da febre do dengue (FD) e febre hemorrágica do dengue (FHD) tem aumentado significativamente nas últimas décadas. Estimativas apontam que, anualmente, cerca de 50-100 milhões de casos de dengue e 250.000-500.000 casos de dengue hemorrágico ocorrem em todo o mundo; além disso, cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência do dengue (*World Health Organization [WHO]*, 1997; Gubler, 2006). Com isso, o dengue é considerado a mais importante e difundida arbovirose que acomete o mundo em termos de morbidade e mortalidade (Guzman & Kouri, 2003).

O dengue, em suas variantes clássica e hemorrágica, tem sido considerado um problema global de saúde pública, uma vez que dois terços da população mundial, isto é, cerca de 2,5 bilhões de pessoas, vivem em zonas infestadas por mosquitos transmissores desta virose (Ferreira & Rocha, 2006). As áreas de risco são constituídas, na grande maioria, de países tropicais e subtropicais em desenvolvimento, onde precárias condições sanitárias, econômicas e médico-sociais são a regra. Presentemente, o vírus do dengue se encontra amplamente distribuído em quatro dos cinco continentes. À exceção da Europa, o dengue clássico ocorre de forma endêmica ou endemo-epidêmica nos demais continentes, sendo mais incidente nos países asiáticos e nas Américas (Halstead, 1982; Guzman *et al.*, 1984; Henchal & Putnak, 1990). As epidemias de dengue têm um impacto econômico na comunidade da mesma ordem de grandeza que a malária e outras doenças infecciosas importantes (Gubler, 2006).

No Brasil, o dengue se tornou um grave problema de saúde pública. A reintrodução do vírus do dengue no país ocorreu na década de 1980. Desde então, mais de 60% dos casos de dengue notificados na região das Américas ocorrem neste país (Nogueira *et al.*, 2007), onde a doença já é registrada em todos os estados da Federação (Câmara *et al.*, 2007). Além das condições climáticas favoráveis, a expansão das áreas de ocorrência de dengue no Brasil está associada tanto à urbanização, sem estrutura adequada de saneamento, quanto à globalização da economia que levou a um aumento acentuado no intercâmbio comercial entre múltiplos países, aumentando o número de viagens aéreas, marítimas e fluviais. Tais fatores contribuem

favorecendo o aumento do número de criadouros, o desenvolvimento do vetor e também a disseminação do vírus (Depradine & Lovell, 2004).

A patogênese do dengue é multifatorial e depende tanto de fatores virais quanto do hospedeiro. Uma compreensão mais integrada da patogênese desta doença se faz necessária a fim de aprimorar o desenvolvimento de ferramentas eficientes para o controle, diagnóstico e tratamento da doença. No momento, ainda não existem vacinas ou medicamentos antivirais disponíveis para combater o vírus do dengue; a única forma realmente eficaz para evitar epidemias desta doença tem sido o controle do mosquito vetor, o *Aedes aegypti*.

## **DENGUE**

Em 1780, Benjamin Rush fez a primeira descrição clínica dessa enfermidade, uma epidemia de febre “quebra-ossos”, ocorrida na Filadélfia, na qual os doentes apresentavam quadro febril, cefaléia, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos, astenia e manifestações hemorrágicas. Em Madri, em 1801, ocorreu uma epidemia de síndrome semelhante, denominada, à ocasião, *dengue* — palavra de origem espanhola que quer dizer “melindre”, “manha” — fazendo referência ao estado de moleza e comportamento queixoso e lamentoso dos doentes (Rocha & Borges, 2009).

Doença febril aguda, caracterizada por um amplo espectro clínico que pode ser de curso benigno ou grave, dependendo da forma como se apresenta: infecção inaparente, Dengue Clássico (DC), Febre Hemorrágica do Dengue (FHD), ou Síndrome do Choque do Dengue (SCD) (Pontes & Ruffino-Netto, 1994; Malavige *et al.*, 2004). Em decorrência do crescente número de casos graves da doença, atualmente é a mais importante arbovirose que afeta o ser humano, e constitui-se em sério problema de saúde pública no mundo. A doença ocorre e dissemina-se especialmente nos países tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor. São bem conhecidas sua etiologia e seus mecanismos de transmissão (Tauil, 2002).

### **Etiologia**

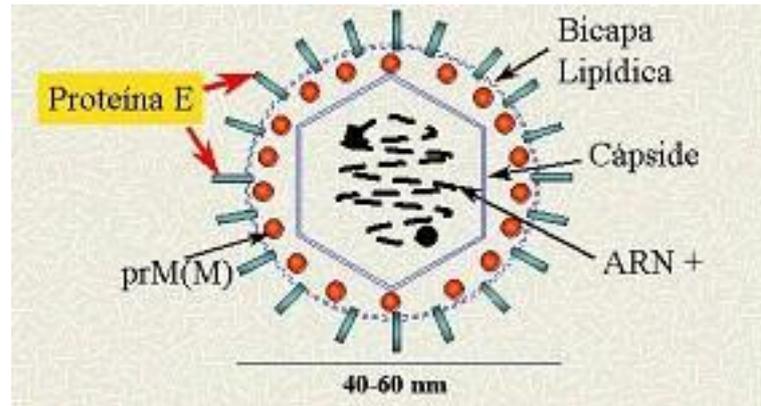
São conhecidos atualmente quatro sorotipos diferentes do vírus do dengue (DENV), todos classificados como arbovírus membro da família *Flaviviridae* (do latim *flavus*, que significa amarelo, referindo-se ao vírus da febre amarela, considerado protótipo desta

família), subgênero *Stegomyia*, gênero *Flavivirus* (Figueiredo & Fonseca, 2002; Rocha & Borges, 2009). É considerada a arbovirose mais comum que atinge o homem (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). As arboviroses representam um grupo de doenças causadas por diversos vírus ecologicamente bem definidos, os arbovírus (o termo arbovírus deriva da expressão inglesa “arthropod-borne virus” — vírus oriundo dos artrópodes).

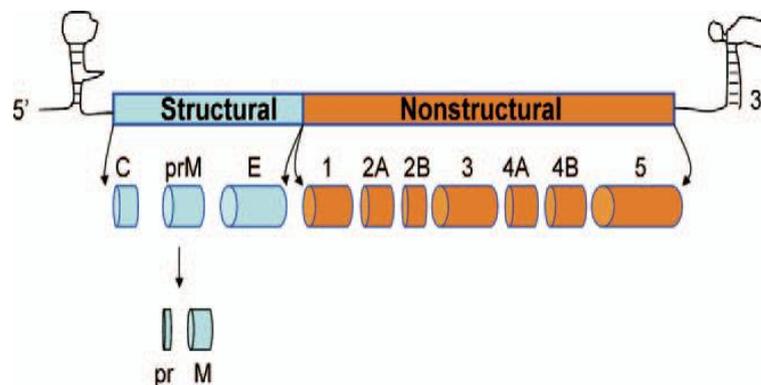
Os arbovírus, segundo definição da OMS em seu *Who Technical Report Series* nº 719, de 1985, “são vírus transmitidos em natureza, mediante transmissão biológica entre hospedeiros suscetíveis por meio de artrópodes hematófagos ou de hospedeiro artrópode a hospedeiro artrópode, através da via transovariana e, possivelmente, da via venérea. São repassados a novos vertebrados suscetíveis através da picada do inseto, após um período de incubação extrínseca” (Vasconcelos *et al.*, 2003).

A família *Flaviviridae* é composta por mais de 70 membros e aproximadamente metade deles podem causar doenças em humanos, algumas de grande relevância epidemiológica, como é o caso do dengue, que hoje é um problema global de saúde pública (Solomon & Mallewa, 2001). O gênero *Flavivirus* inclui importantes patógenos humanos. Além do agente etiológico do dengue, estão incluídos nesse grupo os agentes causadores da febre amarela, encefalite japonesa, Rocio, entre outros. Assim como o vírus da febre amarela, o vírus do dengue pertence ao grupo B dos arbovírus de acordo com a classificação de Casals, que se baseia em critérios sorológicos (Vasconcelos *et al.*, 2003).

Os flavivírus são relativamente pequenos (40-60 nm) e esféricos com um envoltório lipídico (Gubler, 1998). O genoma destes vírus é composto por uma fita de RNA de cadeia simples com comprimento de aproximadamente 11kb (kilobases) e possui polaridade positiva (Chambers *et al.*, 1990; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010) (Figura 1). Esse material genético possui uma única região codificante que expressa a síntese de três proteínas estruturais, antigênicas — PrM precursor da proteína M da membrana viral, proteína E do envelope viral e proteína C do nucleocapsídeo viral — e sete não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (Figura 2) responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão viral, inclusive virulência, patogenicidade e replicação (Rocha & Borges, 2009). A síntese das proteínas e do RNA viral ocorre predominantemente no citoplasma da célula hospedeira. A replicação é lenta e começa dentro de 15 horas após a infecção. A replicação do vírus do dengue não parece afetar significativamente a função metabólica da célula do hospedeiro, visto que a síntese protéica das células do hospedeiro infectado se mantém em níveis normais (Noisakran & Perng, 2008).



**Figura 1.** Estrutura do vírus do dengue (disponível em: <http://drashirleydecampos.com.br/noticias/23196>).



**Figura 2.** Genoma do vírus causador do dengue (Noisakran & Perng, 2008).

A etiologia viral do dengue foi determinada em 1906, quando Ashburn e Craig encontraram um agente infeccioso filtrável em sangue humano. No mesmo ano, Bancroft descreveu a transmissão do dengue pelo *Aedes aegypti*. Posteriormente, Siler e col. (1926) e Simmons e col. (1931) conseguiram transmitir a doença em voluntários (Pontes & Ruffino-Netto, 1994). O isolamento do vírus, por sua vez, só ocorreu na década de quarenta, em 1943 por Kimura, e em 1944 por Hotta, sendo a cepa denominada Moshizuki. Importantes investigações realizadas por Sabin e Schlesinger, durante a Segunda Guerra Mundial, resultaram no isolamento dos dois primeiros sorotipos do vírus do dengue, os sorotipos 1 e 2. Em 1945, Sabin e Schlesinger isolaram a cepa Havaí e nesse mesmo ano Sabin havia isolado outro vírus em Nova Guiné. Observando que essas cepas possuíam características diferentes, passou-se a considerar a existência de sorotipos distintos do mesmo vírus. Na década de 50, Hammon e col. isolaram mais dois sorotipos (os sorotipos 3 e 4) quando estudavam a

epidemia de dengue hemorrágico ocorrida em Manila (Filipinas) na região Sudeste do continente Asiático, em 1956. A partir destas descobertas, considerou-se que o complexo vírus do dengue é formado por quatro sorotipos antígenicamente distintos (Pontes & Ruffino-Netto, 1994; Teixeira e col., 1999).

O agente etiológico do dengue é representado pelos seguintes sorotipos do vírus: Dengue-1 (DEN-1), Dengue-2 (DEN-2), Dengue-3 (DEN-3) e Dengue-4 (DEN-4), todos causando a mesma síndrome clínica (Pontes & Ruffino-Netto, 1994). Estes sorotipos do vírus são fortemente relacionados, mas antígenicamente distintos. A comparação entre suas sequências genômicas revelou em torno de 67 a 75% de homologia na sequência de aminoácidos (Zeng, 1996). Cada um desses sorotipos possui várias cepas diferentes difundidas na mesma região ou em diversas partes do mundo (Pontes & Ruffino-Netto, 1994).

A infecção por um dos sorotipos do vírus do dengue confere ao indivíduo uma proteção imunológica completa contra aquele sorotipo, provavelmente pelo resto da vida, mas não há imunidade cruzada para os outros sorotipos, portanto, pessoas que vivem em áreas endêmicas podem ser infectadas pelos quatro sorotipos do dengue ao longo de suas vidas (Gubler, 1998). Outros autores ainda mencionam a possibilidade de imunidade cruzada entre os diferentes sorotipos, mas de maneira transitória, com duração de aproximadamente 12 semanas (Pontes & Ruffino-Netto, 1994; Tauil, 2001; Noisakran & Perng, 2008).

### **Transmissão do dengue e o agente vetor**

As primeiras evidências do ciclo de transmissão do dengue foram publicadas por Bancroft em 1906, levantando a hipótese de o *Aedes aegypti* ser o vetor da infecção, o que, logo depois, foi confirmado por Agramonte e outros pesquisadores (Teixeira e cols., 1999). Com isto, foi possível estabelecer os elos epidemiológicos envolvidos no ciclo de transmissão do dengue, que inclui o homem doente, qualquer dos quatro sorotipos do vírus do dengue, o mosquito vetor do gênero *Aedes* e o homem suscetível (Pontes & Ruffino-Netto, 1994; Teixeira e col., 1999).

A transmissão do dengue ao homem se dá pela picada de insetos — fêmeas hematófagas — do gênero *Aedes* spp. infectados pelo vírus (Rocha & Borges, 2009). Por se tratar de uma espécie fortemente relacionada com a habitação humana, o *Aedes aegypti* é o mosquito vetor mais eficiente na transmissão desta arbovirose. Contudo, surtos de dengue têm sido atribuídos às espécies *A. albopictus*, *A. polynesiensis* e várias espécies do complexo *A.*

*scutellaris*. Cada uma dessas espécies tem sua distribuição geográfica particular, embora sejam vetores epidêmicos menos eficientes que o *A. aegypti* (WHO, 1997).

Nas Américas, o *Aedes aegypti* é o único transmissor desses vírus com importância epidemiológica. Esta espécie de mosquito é originária da África subsahariana, e acredita-se que ela tenha sido introduzida no continente americano durante o período da colonização, por meio das embarcações que traziam escravos provenientes daquele continente. Da África, o *A. aegypti* se dispersou para todo o hemisfério ocidental no século XVII, para o Mediterrâneo no século XVIII, para a Ásia tropical no século XIX e para as Ilhas do Pacífico no final do século XIX e início do século XX (Teixeira e col., 1999).

Distribui-se amplamente nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, principalmente entre os paralelos 45° de latitude norte e 35° de latitude sul, não se adaptando bem a grandes altitudes. Trata-se de um mosquito de hábitos essencialmente domésticos e dotado de grande antropofilia, embora existam subespécies com alguma afinidade por ambientes silvestres. Seu habitat está intimamente ligado às condições domiciliares e peridomiciliares a ele ofertadas pelo modo de vida das populações humanas. Sua preferência pelos depósitos artificiais de água como locais de oviposição (vasos de plantas, pneus de carro e entulhos em geral) faz com que a concentração populacional advinda com a urbanização, ao lado da larga utilização moderna de recipientes artificiais, sejam fatores determinantes na sua crescente proliferação nos centros urbanos das regiões tropicais e subtropicais do planeta. Várias outras características biológicas do *Aedes aegypti* têm importância na densidade populacional desse vetor. Dentre as principais delas está a influência favorável das temperaturas mais elevadas e das precipitações pluviométricas abundantes. Os ovos constituem-se na principal forma de resistência do *Aedes aegypti*, eles podem permanecer viáveis por cerca de um ano em ambiente seco e podem ser transportados por longas distâncias, grudados nas bordas dos recipientes. Essa é uma das razões para a difícil erradicação do mosquito (Gadelha & Toda, 1985; Forattini, 2002).

O mosquito *Aedes aegypti* mede menos de um centímetro, apresenta cor preta e listras brancas no corpo e nas pernas (Figura 3). A fêmea coloca os ovos em condições adequadas para o desenvolvimento das fases imaturas e em 48 horas o embrião se desenvolve. Para passar da fase do ovo até a fase adulta, o *Aedes* demora em média dez dias e o período de vida do mosquito adulto é de poucas semanas, podendo chegar a 45 dias. Os mosquitos acasalam no primeiro ou no segundo dia após se tornarem adultos. Depois deste acasalamento, as fêmeas passam a se alimentar de sangue, que possui as proteínas necessárias para o desenvolvimento dos ovos. Apesar da vida curta, o *Aedes* é voraz: pode picar uma pessoa a

cada 20 ou 30 minutos (Brasil, 2010). Além disso, ao contrário do que se pensava anteriormente, o *A. aegypti* tem a capacidade de fazer ingestões múltiplas de sangue durante um único ciclo gonadotrófico, o que amplia a sua possibilidade de infectar-se e de transmitir os vírus (Teixeira e col., 1999).



**Figura 3.** *Aedes aegypti* – vetor do dengue (disponível em: <http://enfermagemparatodos.wordpress.com/2010/03/08/dengue/>).

A transmissão da doença raramente ocorre em temperaturas abaixo de 16° C, sendo que a mais propícia gira em torno de 30° a 32° C. O mosquito costuma picar nas primeiras horas da manhã e nas últimas da tarde, evitando o sol forte, mas, mesmo nas horas quentes, ele pode atacar à sombra, dentro ou fora de casa. Há suspeitas de que alguns ataquem durante a noite (Brasil, 2010).

Assim que um indivíduo susceptível é picado por um mosquito infectado, o vírus passa por um período de incubação intrínseco que pode durar até 15 dias, com média variando entre 4 e 7 dias, após o qual a pessoa começa a apresentar o início dos sintomas agudos. O período de viremia no hospedeiro humano, quando o repasto sangüíneo torna o mosquito infectado, inicia-se um dia antes do aparecimento da febre e pode permanecer até o oitavo dia da enfermidade. Se outros mosquitos *A. aegypti* picarem a pessoa doente durante esta fase febril virêmica, o vírus passa por um período de incubação no mosquito (incubação extrínseca) que varia de 8 a 12 dias, onde se multiplica no intestino do inseto, passando para as glândulas salivares e a partir do qual os mosquitos se tornam infectantes, assim permanecendo pelo resto da vida podendo transmitir o vírus a outras pessoas não infectadas (Gubler & Rosen, 1976; WHO, 1997; Gubler, 1998; Pontes & Ruffino-Neto, 1994). Uma vez que o período de transmissibilidade ou de viremia é longo, com duração de quase oito dias, isso facilita a disseminação do vírus pelo mosquito vetor (Gubler, 1998; Tauil, 2001).

A circulação e a perpetuação do vírus do dengue na natureza se devem ao hospedeiro humano infectado e ao vetor da enfermidade, especialmente nos grandes centros urbanos onde a doença se mantém de forma endemo-epidêmica (Pontes & Ruffino-Neto, 1994). Rodhain (1991) cita os trabalhos de Rudnick e colaboradores, os quais sugeririam a existência de ciclo silvestre do dengue entre macacos em florestas tropicais da Malásia e de países do oeste africano. Os macacos infectados representariam verdadeiros reservatórios naturais da doença. É possível que a transmissão vertical transovariana — quando o vírus infecta o ovo ou o óvulo — represente outra forma de manutenção do vírus do dengue em algumas situações muito específicas em zonas rurais ou florestas, nos períodos inter-epidêmicos ou de ausência de chuvas (Henchal & Putnak, 1990; Monath, 1994). O *Aedes aegypti* pode transmitir verticalmente o vírus do dengue por mais de dez gerações (Rocha & Borges, 2009). Pelo exposto acima, fica bem clara a importância dos insetos na manutenção, amplificação e propagação do vírus. Logo, deduz-se que uma das medidas mais relevantes no combate à dengue está no controle do vetor.

O *A. aegypti* foi erradicado do Mediterrâneo, na década de 50, e de grande parte das Américas, nos anos 50 e 60. No entanto, houve reinfestação na maioria das áreas de onde havia sido erradicado, sendo que, hoje, este vetor já é considerado uma espécie “cosmotropical”, uma vez que sua capacidade de adaptação em condições consideradas desfavoráveis está se ampliando, pois em 1987 foi registrada a sua sobrevivência em áreas situadas a 1.200 metros acima do nível do mar (Teixeira e col., 1999) e formas larvais do inseto foram encontradas em águas poluídas (Tauil, 2002).

## **EPIDEMIOLOGIA DO DENGUE**

O registro mais antigo de relatos clínicos e epidemiológicos potencialmente compatíveis com dengue são encontrados em uma enciclopédia chinesa datada de 610 d.C. São descritos, também, surtos de uma doença febril aguda no oeste da Índia Francesa, em 1635, e no Panamá, em 1699, que podem ter sido causados pelo vírus do dengue. Contudo, os eventos de melhor documentação na literatura, neste período anterior à identificação dos agentes da doença, são os da ilha de Java, em Jacarta na Indonésia, e os do Egito, ambos em 1779, além da epidemia na Filadélfia (EUA) no ano seguinte (Pontes & Ruffino-Neto, 1994; Gubler, 1998; Teixeira e col., 1999). A ocorrência quase simultânea de surtos da doença em três

continentes indica que este vírus e seu mosquito vetor já estavam amplamente distribuídos na região dos trópicos há mais de 200 anos (Gubler & Clark, 1995).

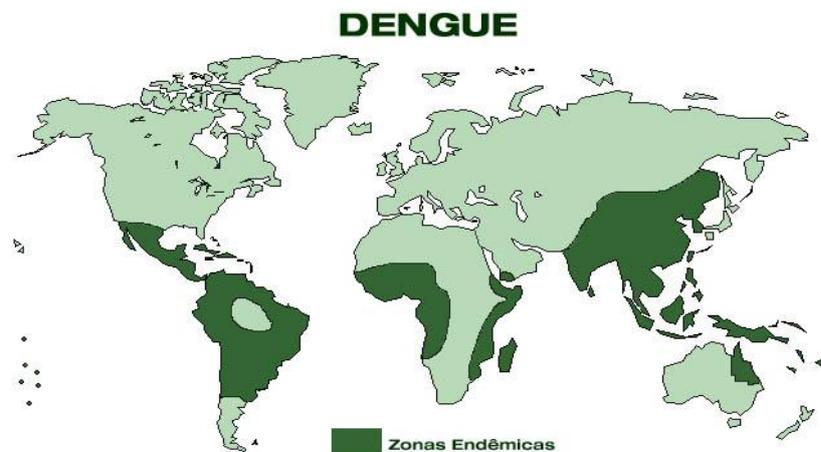
Durante muito tempo, o dengue foi considerado uma doença benigna, não-fatal. Existem algumas evidências de que no século XIX e primeiras décadas do século XX, quando os meios de transporte ainda não eram tão rápidos, um único sorotipo do vírus persistia circulando em determinadas regiões, por alguns anos, causando surtos epidêmicos periódicos, devido a alterações na coorte de susceptíveis. Geralmente, havia longos intervalos (10-40 anos) entre as grandes epidemias, isso porque o vírus e seu vetor só poderiam ser transportados entre os centros de população por meio de navios (Gubler & Clark, 1995; Gubler, 1997).

Esse padrão mudou drasticamente durante e depois da II Guerra Mundial que criou as condições ideais para o aumento da incidência de doenças transmitidas por mosquitos, e foi nesse cenário que uma pandemia global de dengue começou. A disseminação do vírus e do vetor foi reforçada após a guerra pelo rápido crescimento populacional e urbanização sem planejamentos. As péssimas condições sanitárias das cidades asiáticas e a necessidade de armazenamento de água doméstica favoreceram sobremaneira a reprodução do *A. Aegypti* (Monath, 1994). Além disso, o vírus do dengue teve sua propagação grandemente facilitada pelo aumento espetacular da intensidade e velocidade do tráfego aéreo e terrestre. Rapidamente, o vírus é transportado de uma cidade à outra, de um país a outro, de um continente a outro, no sangue de pessoas portadoras da infecção (Gubler, 1997).

Estes fatores levaram ao estabelecimento do dengue na forma hiperendêmica no sudeste asiático, um padrão de surtos anuais causado pela co-circulação de múltiplos sorotipos virais, e uma crescente frequência de infecções sequenciais. É nesta configuração que ocorreram surtos de uma febre hemorrágica severa que, posteriormente, seria identificada como uma forma do dengue. A primeira epidemia conhecida de dengue hemorrágico ocorreu em Manila, nas Filipinas, entre 1953 e 1954 (Martizez-Torres, 1990). De acordo com Gubler (1997), esta forma clínica já ocorria antes do século XX, pois, desde 1780, há relatos de uma doença hemorrágica associada a severas epidemias de dengue. Na Grécia, em 1927-28, por meio de estudos retrospectivos, identificou-se a ocorrência de uma grave epidemia de dengue hemorrágico de alta letalidade. A investigação de soros de sobreviventes indicou a circulação dos vírus DEN-1 e DEN-2 (Halstead, 1980).

O reconhecimento desta nova síndrome foi seguido por uma progressiva disseminação de casos semelhantes que envolveu muitas partes da Ásia e do Pacífico, com uma média de 30.000 casos anuais. Na década de 1970, após uma ausência de mais de 25 anos, o vírus do

dengue foi reintroduzido nas ilhas do Pacífico, intensificando a atividade epidêmica e se dispersando para a região das Américas. Atualmente o dengue acomete a cada ano milhares de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Américas, Austrália e Oceania (Figura 4). Tem-se observado que novas regiões e diversos países, antes não atingidos, vêm apresentando atividade epidêmica, com a circulação simultânea ou sucessiva de vários sorotipos virais, indicando crescente disseminação do dengue no mundo (Halstead, 1990; Rigau-Pérez *et al.* 1998).



**Figura 4.** Distribuição do dengue no mundo (disponível em: [http://www.soma.conexaopitagoras.com.br/cf//salaaula/estudosp/biologia/331\\_dengue/distribuicao.htm](http://www.soma.conexaopitagoras.com.br/cf//salaaula/estudosp/biologia/331_dengue/distribuicao.htm)).

### Dengue nas Américas

O surgimento do dengue e dengue hemorrágico como um grande problema de saúde pública tem sido mais dramático na região das Américas. Em um esforço para evitar febre amarela que também é transmitida por *A. aegypti*, a Organização Panamericana de Saúde organizou uma campanha que erradicou esta espécie de mosquito da maioria dos países e sul-americanos e da América Central na década de 1950 e 1960. Como resultado, a epidemia de dengue ocorreu apenas esporadicamente em algumas ilhas do Caribe, durante este período. O programa de erradicação do *Aedes* foi interrompido no início de 1970, com isso, os mosquitos começaram a re-infestar os países de onde haviam sido erradicados. Em 1995, a distribuição geográfica do *A. aegypti* já era similar à sua distribuição antes do programa de erradicação (Gubler & Clark, 1995; Gubler, 1997).

Até a década de 70 apenas os sorotipos DEN-2 e DEN-3 tinham circulado na região americana. O sorotipo I foi introduzido em 1977 na Jamaica, quando ocorreu uma pandemia de grandes proporções em vários países das Antilhas, com elevado número de casos e extensa área geográfica envolvida. O sorotipo DEN-4 foi identificado pela primeira vez em 1981, causando epidemias nas Antilhas, América Central continental, México e norte da América do Sul. Contudo, o acontecimento epidemiológico mais relevante na história do dengue nas Américas foi a ocorrência do primeiro processo epidêmico de dengue hemorrágico e síndrome de choque do dengue em Cuba, no ano de 1981, quando foram notificados 344.203 casos, com 116.143 hospitalizações. Dentre os 10.312 casos considerados graves, 158 resultaram em óbitos e, destes, 101 foram em crianças. O vírus DEN-2 é associado a esta epidemia, que foi precedida por outra, causada pelo vírus DEN-1, em 1977 (Kouri, 1987; Pinheiro, 1989). Finalmente, foram observadas epidemias de FHD/SCD na Venezuela em 1989-90 (WHO, 1990) e no Brasil, em 1990-91 (Nogueira *et al.*, 2007).

Nas últimas duas décadas, a incidência de dengue nas Américas tem apresentado uma tendência ascendente, com mais de 30 países informando casos da doença. Os picos epidêmicos têm sido cada vez maiores, em períodos que se repetem a cada 3-5 anos, quase de maneira regular. Entre 2001 e 2005, foram notificados 2.879.926 casos de dengue na região, sendo 65.235 de dengue hemorrágica, com 789 óbitos. As maiores incidências nesse período foram reportadas pelo Brasil, Colômbia, Venezuela, Costa Rica e Honduras (82% do total) (Brasil, 2009).

### **Dengue no Brasil**

Os primeiros casos de dengue no Brasil foram relatados, baseados em critérios clínicos, em Niterói, Rio de Janeiro, em 1923 (Teixeira e col., 1999). Durante quase 60 anos, de 1923 a 1982, o Brasil não apresentou registro de casos de dengue em seu território. É possível que a doença tenha passado despercebida, mas o fato é que nesse período a luta contra o mosquito foi intensa, particularmente com a finalidade de eliminar a forma urbana da febre amarela, também transmitida por este inseto. Nas décadas de 1950 e 1960, o Brasil e mais 17 países das Américas conseguiram eliminá-lo de seus territórios. Porém, a partir de uns poucos países que não obtiveram o mesmo êxito, o Brasil enfrentou centenas de re-infestações, sendo que nos anos de 1976-77, foi detectada uma infestação que não pôde ser eliminada (Tauil, 2002). Assim, o alto nível de atividade do vírus do dengue no continente

americano e a reinfestação do Brasil pelo vetor *A. aegypti* em 1977 contribuíram para a reintrodução do vírus no país na década de 1980 (Nogueira *et al.*, 2007).

A primeira epidemia de dengue com confirmação laboratorial aconteceu em 1982, na cidade de Boa Vista, capital do Estado de Roraima (região norte da Amazônia Brasileira), na qual foram isolados os sorotipos DEN-1 e o DEN-4. Estes agentes estavam circulando em diversos países do Caribe e no norte da América do Sul e sua introdução, possivelmente, se deu por via terrestre, pela fronteira da Venezuela. Este surto foi contido por medidas de controle vetorial local e com isso, não foram registrados novos eventos relacionados ao dengue durante os próximos quatro anos no Brasil (Osanaí, 1998). Então, no ano de 1986, acontece uma nova epidemia de dengue, agora em uma região de grande concentração populacional, com graves problemas de infra-estrutura urbana, localizada no eixo de maior concentração de atividades econômicas e de fluxo populacional (tanto migratório como turístico) do país, a região metropolitana do Rio de Janeiro. Iniciada em abril de 1986, somente apresentou redução dos níveis de incidência a partir de julho de 1987, tendo sido isolado naquela ocasião, o sorotipo DEN-1 (Schatzmayr *et al.*, 1986; Nogueira *et al.*, 1988).

A partir deste episódio, as infecções por dengue tornaram-se um problema de saúde pública de âmbito nacional, com a disseminação do mesmo sorotipo viral para diversos Estados brasileiros, como Alagoas, Ceará, Pernambuco, São Paulo, Bahia e Minas Gerais (Pontes & Ruffino-Neto, 1994). Desde então, a doença vem ocorrendo no Brasil de forma continuada, intercalando-se com a ocorrência de epidemias, geralmente associadas com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indenes ou alteração do sorotipo predominante (Brasil, 2009).

Merece referência especial pelo seu significado epidemiológico, o isolamento em 1990, pela primeira vez no Brasil, do sorotipo DEN-2, também no Estado do Rio de Janeiro. A introdução desse sorotipo provocou a primeira epidemia de dengue hemorrágico no país, em 1990-91 (Nogueira *et al.*, 2007), com 462 casos confirmados e oito óbitos. Nos anos subsequentes, a circulação viral (DEN-1 e DEN-2) se expande rapidamente para outras áreas do território brasileiro (Teixeira e col., 1999).

Entre os anos de 1990 e 2000, várias epidemias foram registradas, sobretudo nos grandes centros urbanos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, responsáveis pela maior parte dos casos notificados. As regiões Centro-Oeste e Norte foram acometidas mais tardiamente, com epidemias registradas a partir da segunda metade da década de 90 (Brasil, 2009).

A circulação do sorotipo DEN-3 foi identificada, pela primeira vez, em dezembro de 2000, novamente no Estado do Rio de Janeiro e, posteriormente, no Estado de Roraima, em novembro de 2001. Em 2002, foi observada a maior incidência da doença, quando foram confirmados cerca de 697.000 casos, refletindo a introdução deste sorotipo viral. Essa epidemia levou a uma rápida dispersão do DENV-3 para outros estados, sendo que, em 2004, 23 dos 27 estados do país já apresentavam a circulação simultânea dos sorotipos DEN-1, DEN-2 e DEN-3 do vírus do dengue (Nogueira *et al.*, 2007).

Em 2007, o estado do Paraná registrou uma das maiores taxas de incidência da doença no país. Conforme informações dos municípios e regionais de saúde deste estado, foram notificados aproximadamente 50.000 casos suspeitos de dengue, dos quais foram confirmados mais de 25.000 casos autóctones (casos cuja infecção aconteceu dentro do estado), sendo Maringá um dos municípios mais afetados, com quase 6.000 casos confirmados (Paraná, 2008). No ano seguinte, foram notificados 585.769 casos em todo o país e novas epidemias causadas pelo sorotipo DEN-2 ocorreram em diversos estados, marcando o pior cenário da doença no Brasil, em relação ao total de internações e óbitos até o momento (Brasil, 2009).

Durante o primeiro semestre de 2010 já foram notificados no Sistema Nacional de Agravos de Notificação-SINAN, 942.153 casos suspeitos de dengue. Desse total, 482.284 (51,2%) foram confirmados e 306.771 (32,6%) permanecem em investigação. Os estados com maior incidência da doença durante esse período foram o Acre, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, São Paulo e Minas Gerais, concentrando 75% dos casos. O número de casos de dengue registrados nesse primeiro semestre revelou que 20 das 27 unidades federadas apresentaram aumento no total de casos quando comparados ao mesmo período de 2009. Nessa comparação, a variação total para o Brasil foi de 158,7% (Brasil, 2010). As altas temperaturas, grande volume de chuvas e o retorno do sorotipo 1 do vírus explicam parte desta epidemia. Com isso, pode-se constatar que nos últimos 20 anos, o país enfrentou quatro grandes epidemias: 1998 (sorotipo 1), 2002 (sorotipo 3), 2008 (sorotipo 2), e a mais recente neste ano de 2010 (sorotipo 1), todas associadas à mudança do sorotipo viral predominante.

O dengue encontra-se hoje presente em todas as Unidades da Federação, distribuída por quase 4.000 municípios, sendo responsável por cerca de 60% das notificações nas Américas (Câmara, 2007). O quadro epidemiológico atual caracteriza-se pela ampla distribuição do *Aedes aegypti* em todas as regiões, com uma complexa dinâmica de dispersão do vírus, circulação simultânea de três sorotipos virais (DEN-1, DEN-2 e DEN-3) e grande preocupação com a reintrodução do sorotipo DEN-4 que esteve ausente no país por 29 anos e

para o qual a maioria da população não possui imunidade, podendo ocasionar uma grande epidemia da doença nos próximos anos. Na ausência de uma vacina eficaz, o controle da transmissão do vírus requer o esforço conjunto de toda a sociedade no combate ao mosquito vetor.

## MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O vírus do dengue pode causar infecções na forma assintomática, representando a maioria dos casos, ou pode resultar em um amplo espectro de sintomas clínicos, que vão desde uma leve síndrome gripal (Febre do Dengue [DF] ou dengue clássico) até as formas mais graves da doença, que são caracterizadas por coagulopatia e aumento da permeabilidade e fragilidade vascular (Febre Hemorrágica do Dengue [FHD]). Este último quadro de sintomas pode evoluir para choque hipovolêmico (Síndrome de Choque do Dengue [SCD]) e levar o paciente a óbito (Martina *et al.*, 2009). A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos causa uma síndrome clínica similar que pode variar em grau de gravidade, dependendo de uma série de fatores de risco relacionados às características da cepa viral e fatores individuais do hospedeiro (Gubler, 1998). O período de incubação da doença costuma ser de 4 a 7 dias embora possa variar de 2 a 15 dias (Rocha & Borges, 2009). Os casos típicos da doença podem ser agrupados em duas categorias principais: febre do dengue ou dengue clássico e febre hemorrágica do dengue/síndrome de choque do dengue.

### Dengue clássico

A febre do dengue se manifesta como uma doença incapacitante em crianças maiores, adolescentes e adultos. Caracteriza-se pelo início súbito de febre alta em combinação com uma variedade de sintomas, incluindo cefaléia intensa, dor retro-orbital, dores no corpo e nas articulações, náuseas e vômitos, fraqueza e desconforto gastrointestinal. A constipação intestinal é relatada ocasionalmente, diarreia e sintomas respiratórios são frequentemente relatados e podem ser devido a infecções simultâneas. Após 3 ou 4 dias de doença e com o término da febre, pode ocorrer exantema maculopapular, frequentemente pruriginoso, que assume aspecto escarlatiniforme nas áreas de confluência. Posteriormente, à medida que o exantema vai desaparecendo ou descamando, podem surgir fenômenos hemorrágicos leves — petéquias e púrpura são os mais comuns, juntamente com sangramento gengival, epistaxe e

em alguns casos hemorragia gastrointestinal — ocorrendo nova elevação da temperatura, com recrudescência dos sintomas, o que caracteriza o padrão bifásico da doença (Gubler, 1998; Rocha & Borges, 2009).

No exame físico, chamam a atenção a prostração, a astenia e a adinamia do paciente. O hemograma mostra leucopenia e neutropenia na fase inicial, seguida por uma linfocitose, muitas vezes marcada por linfócitos atípicos. Trombocitopenia ocasionalmente pode ser observada no dengue clássico especialmente naqueles com manifestações hemorrágicas. As enzimas hepáticas podem estar discretamente elevadas (Rocha & Borges, 2009).

Esta forma da doença é geralmente auto-limitada e raramente é fatal. A fase aguda dura em média 6 ou 7 dias, mas o período de convalescença pode ser prolongado por semanas, podendo persistir a astenia e a depressão (Gubler, 1998).

Quanto ao diagnóstico, a confirmação laboratorial dos casos suspeitos é feita por métodos virológicos e sorológicos. Os métodos virológicos, que identificam o sorotipo viral, devem ser realizados durante o período de viremia e compreendem o isolamento viral e a detecção de antígenos virais e/ou ácido nucléico viral no sangue, soro ou fragmento de órgão, sendo realizado por meio de cultura de células e tecnologias de PCR (RT-PCR) e hibridação molecular. Os testes sorológicos têm como objetivo detectar a presença de anticorpos específicos contra o vírus no sangue periférico. O teste imunoenzimático de captura de IgM (MAC-ELISA) é altamente específico, demonstrando a infecção recente ou ativa, pois anticorpos da classe IgM são detectáveis a partir do sexto dia de doença e perduram por até 90 dias. Já os anticorpos IgG são menos específicos, sendo produzidos tanto na infecção primária quanto na secundária. Porém, seus níveis são mais altos na secundária, quando inclusive podem ser detectados nos primeiros dias de doença, persistindo por vários anos após a infecção (Rocha & Borges, 2009).

Não existe medicamento eficaz contra o vírus do dengue. Assim, nos casos de dengue clássico, deve-se proceder ao tratamento sintomático, ambulatorial, com recomendações de repouso e hidratação oral. Para o controle da febre e da dor devem ser utilizados analgésicos, antitérmicos, preferencialmente a base de paracetamol, mas nos casos de pouca resposta terapêutica podem ser usados dipirona, tramadal e até morfina. Salicilatos são contraindicados devido ao risco de potencializar a tendência hemorrágica do dengue. Além disso, é importante a orientação para reconhecer os sinais de alarme que podem preceder os quadros de dengue hemorrágico, como dor abdominal, vômitos persistentes e sangramentos (Branco, 2003; Rocha & Borges, 2009) .

## Febre hemorrágica do dengue e Síndrome de choque do dengue

Trata-se das formas mais graves do dengue que acomete principalmente crianças, embora no Brasil ocorra com mais frequência em adultos de todas as idades. A febre hemorrágica do dengue se distingue da febre do dengue não por fenômenos hemorrágicos como sugere o nome, mas pelo aumento da permeabilidade vascular com extravasamento plasmático podendo evoluir insidiosa ou rapidamente para a síndrome de choque do dengue. Os sintomas iniciais são idênticos aos que ocorrem no dengue clássico, porém no segundo ou terceiro dia de doença surgem os fenômenos hemorrágicos, inicialmente leves, com a presença de petéquias na face, nas axilas e extremidades. A prova do laço (torniquete) é positiva (indicando aumento da fragilidade capilar) e podem surgir hemorragias mais significativas em superfícies mucosas, no trato digestivo e nos locais de punção venosa. Em alguns pacientes, grandes lesões equimóticas desenvolvem-se no tronco e extremidades (Rocha & Borges, 2009).

O exame físico revela hepatomegalia discreta e dolorosa e, eventualmente, esplenomegalia. Prova do torniquete positiva, trombocitopenia (número de plaquetas igual ou menor que  $100.000/\text{mm}^3$ ) e hemoconcentração (aumento de 20% ou mais no hematócrito) são achados laboratoriais característicos dos quadros de FHD/SCD (Pontes & Ruffino-Netto, 1994).

O período crítico ocorre entre 3 e 7 dias de doença, quando concomitantemente ao desaparecimento da febre podem surgir as manifestações hemorrágicas espontâneas ou provocadas, e derrames cavitários, seguidos de instabilidade hemodinâmica e choque (Rigau-Pérez *et al.*, 1998; Halstead, 2007). Um terço dos pacientes com FHD pode evoluir para o quadro de choque e o risco de desenvolver choque nas primeiras 24 horas após o término da febre é de 4 a 5 vezes maior que durante o período febril (Rocha & Borges, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza uma série de critérios clínico/laboratoriais para o diagnóstico da FHD/SCD, e, tomando por base esses critérios, estabelece diferentes estágios de gravidade que corresponderiam a graus evolutivos da doença – dengue hemorrágico grau I, II, III e IV. DH graus I e II representam casos relativamente simples, sem choques, enquanto que Grau III e IV são casos mais graves e acompanhados de choque (Pontes & Ruffino-Netto, 1994; Martina *et al.*, 2009).

A FHD pode ou não se associar à síndrome de choque do dengue. O choque nessa situação é consequência do grande aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de plasma. Em alguns casos a SCD ocorre antes ou mesmo sem a instalação dos fenômenos

hemorrágicos. Consideram-se como sinais e sintomas preditores de SCD a dor abdominal contínua, vômitos persistentes, hepatomegalia dolorosa, presença de derrames cavitários, sangramentos importantes e elevação súbita do hematócrito ( $> 20\%$  no período de 24 horas). A insuficiência circulatória manifesta-se pela presença de agitação ou letargia, taquicardia, pulso rápido e fraco ( $\leq 20\text{mmHg}$ ) ou hipotensão arterial, com pele fria e pegajosa, além de sudorese profusa, caracterizando a fase inicial de choque (grau III). Nesta situação, Se os pacientes não recebem tratamento rápido e adequado, um quadro grave de choque profundo pode se instalar, no qual ocorre ausência de pulso e a pressão arterial torna-se indetectável (grau IV). Podem instalar-se acidose metabólica e coagulação intravascular disseminada. Se o tratamento não for iniciado prontamente o óbito ocorre em 4 a 6 horas. Entretanto, quando o choque é superado, a recuperação do paciente ocorre em 2 a 3 dias (*WHO*, 1997; Serufo *et al.*, 2000; Martina *et al.*, 2009).

Nos casos de FHD/SCD o diagnóstico laboratorial é feito através de uma série de exames. São necessários hemograma, gasometria, ionograma, função renal, função hepática e coagulograma. Além disso, os derrames abdominais, pericárdicos e pleurais acima de 600ml podem ser evidenciados nos raios X. A ultra-sonografia abdominal também tem ajudado a detectar essas alterações, mais precocemente (Branco, 2003; Rocha & Borges, 2009).

Com relação ao tratamento, pacientes com sinais e sintomas de dengue grave, especialmente náuseas, vômitos, diarreia e sangramentos devem ser tratados em hospitais, uma vez que poderão ser necessárias internação em unidades de tratamento intensivo e hemotransfusões. A saída de fluidos do leito vascular para os espaços intersticiais e cavidades serosas resulta na diminuição do volume plasmático, e não havendo reposição imediata desse volume ocorrerá evolução para o choque. Por isso, não se deve esperar a internação hospitalar para iniciar o tratamento, a hidratação venosa deve ser iniciada de imediato (Rocha & Borges, 2009). Vale a pena ressaltar que alcançar sucesso no tratamento do dengue depende não só da atenção médica, mas também da organização dos serviços de saúde.

Há na literatura uma controvérsia a respeito dos mecanismos patogênicos que determinariam a evolução do dengue na direção da forma clássica ou da síndrome hemorrágica/choque. Estes mecanismos ainda não foram completamente elucidados e por isso, muitas hipóteses têm sido propostas. Estudos epidemiológicos têm mostrado que a maioria dos casos de FHD/SCD ocorre após segunda infecção por sorotipo viral diferente da primeira infecção, especialmente se houver intervalo menor que cinco anos entre os dois episódios da doença (Rocha & Borges, 2009). Assim, infecções sequenciais de dengue foram muito bem definidas como importantes fatores de risco para as formas graves da doença

(Sangkawibha *et al.*, 1984; Thein *et al.*, 1997). Contudo, manifestações de FHD pode ocorrer em infecções primárias, e além disso, a maioria das infecções secundárias não resultam em casos graves de dengue, indicando a importância de outros fatores na evolução desta virose.

## **PATOGENIA E RESPOSTA IMUNE**

Após a inoculação do vírus do dengue pela picada do mosquito, durante dois a três dias, os vírus multiplicam-se nos linfonodos locais e a seguir, disseminam-se por todos os tecidos por via hematogênica. A viremia dura em média cinco dias e tem a febre como correspondente clínico. O vírus tem grande tropismo pelo tecido muscular, instalando-se nas células musculares estriadas, lisas e em fibroblastos, onde se multiplica, causando mialgia, muitas vezes acompanhadas de elevação dos níveis séricos de creatinofosfoquinase. O comprometimento do músculo oculomotor é responsável pela dor retrocular (Rocha & Borges, 2009). Os vírus podem circular livres, no plasma ou no interior de monócitos/macrófagos. Essas células fagocitárias representam grandes sítios de replicação viral. Os sintomas gripais e o mal-estar geral provavelmente refletem a resposta imunocelular, com níveis séricos elevados de citocinas e de fatores da inflamação liberados por macrófagos ao interagirem com linfócitos T (LT) auxiliares ativados. Observam-se altos teores séricos de interleucina-2 (IL-2), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) que se mantêm elevado até a convalescença, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o fator de ativação de plaquetas (PAF) (Figueiredo, 1999). O comprometimento da medula óssea que se traduz pelas citopenias periféricas e pelas dores musculoesqueléticas, inclusive a dor lombar, também, relacionam-se aos altos teores de citocinas macrofágicas (Kurane & Ennis, 1992). O exantema encontra correspondência em uma vasculite dérmica (Rocha & Borges, 2009).

Acredita-se que existam duas formas opostas de resposta imune ao dengue. A primeira controla a infecção e promove a recuperação do indivíduo. A segunda relaciona-se à imunopatologia do dengue hemorrágico.

A febre do dengue, nas formas indiferenciada e clássica é auto-limitada e o desaparecimento da doença coincide com o aparecimento de vigorosa resposta imune. Os anticorpos, principalmente os que se ligam a epítomos da proteína E, promovem lise do envelope ou bloqueio de seus receptores com conseqüente neutralização viral. A proteína E é fundamental para a ligação viral ao receptor de membrana e possui os mais importantes domínios antigênicos desses microorganismos. Anticorpos, produzidos contra NS1,

promovem lise viral fixando o complemento. Tais anticorpos atuam como mediadores de fenômenos de citotoxicidade por linfócitos, através de seus receptores para a porção Fc de imunoglobulinas. A NS3 também possui capacidade imunogênica. A presença de NS3 estimula a destruição das células infectadas por LT citotóxicos. LT auxiliares e citotóxicos de pacientes com dengue apresentam capacidade de reconhecer epítomos de E, NS1 e NS3 (Kurane & Ennis, 1992; Barbosa, 1996; Henchal *et al.*, 1998).

Nos pacientes com dengue, a resposta humoral, produzida por plasmócitos resultantes da ativação de linfócitos B costuma ser vigorosa. Os anticorpos IgM específicos são detectáveis a partir do quarto dia, após o início dos sintomas, atingindo os níveis mais elevados por volta do sétimo ou oitavo dia e declinando lentamente, passando a não ser detectáveis após alguns meses. As IgG específicas são observadas, em níveis baixos, a partir do quarto dia após o início dos sintomas, elevam-se gradualmente, atingindo altos teores em duas semanas e mantêm-se detectáveis por vários anos, conferindo imunidade contra o tipo infectante, provavelmente, por toda a vida. Infecções por dengue, em indivíduos que já tiveram contato com outros sorotipos do vírus ou, mesmo, outros *Flavivirus* (como os vacinados contra a febre amarela), podem alterar o perfil da resposta imune, que passa a ser do tipo anamnésico ou de infecção secundária (reinfecção), com baixa produção de IgM e liberação intensa e precoce de IgG (Figueiredo, 1989).

A resposta imune celular citotóxica mediada por LT ocorre sob estímulo das proteínas NS1, NS3 e E dos vírus do dengue (Chambers *et al.*, 1990). Linfócitos T auxiliares (CD4) atuam na presença das células infectadas com dengue que expressam na superfície receptores HLA de classe II, produzindo IFN- $\gamma$ , IL-2 e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos. Os linfócitos T citotóxicos (CD8) atacam diretamente as células infectadas pelo vírus do dengue, que expressam receptores HLA de classe I, provocando a lise celular. Portanto, as células T participam ativamente na resposta imune, reduzindo o número de células infectadas com o vírus, e conferindo proteção contra reinfecção (Figueiredo, 1999).

A segunda forma de resposta imune aos vírus do dengue é paradoxal, ou seja, prejudica o hospedeiro infectado e é responsável pela imunopatologia do dengue hemorrágico/síndrome de choque do dengue (Figueiredo, 1999).

Halstead propôs, em 1970, uma teoria para tentar explicar a imunopatogênese da FHD/SCD, chamada Teoria das Infecções Sequenciais. Esta teoria propõe que a primeira infecção causada por um sorotipo do vírus gera o aparecimento de anticorpos neutralizantes capazes de reação cruzada com outros sorotipos. Assim, quando ocorre uma segunda infecção por um sorotipo heterólogo, aumenta-se o risco de desenvolver as formas graves da doença.

Os anticorpos heterólogos preexistentes reconhecem o segundo sorotipo viral, formando com ele, imunocomplexos que se acoplam a receptores Fc presentes na membrana celular de macrófagos, invadindo estas células. Como os anticorpos são heterólogos, o vírus não é neutralizado, passando então a replicar-se livremente no meio intracelular. Este fenômeno é conhecido como “exacerbação mediada por anticorpos” (Antibody-Dependent Enhancement - ADE), pois as imunoglobulinas facilitam a entrada do vírus nas células mononucleadas que são ativadas, passando a produzir citocinas e mediadores da inflamação, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6 e fator ativador de plaquetas que causam aumento da permeabilidade vascular, com a conseqüente efusão de plasma para o espaço extra-vascular, levando à hipovolemia e ao choque (Rhotman & Ennis, 1999; Martina *et al.*, 2009).

A infecção viral maciça dos macrófagos induz ativação de linfócitos T auxiliares, a qual também resulta na produção de diversas citocinas (INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10) e linfotoxinas. A cascata do complemento é ativada, e as frações C3a e C5a parecem ter papel relevante no processo. Desta forma, o vírus desencadeia uma complexa indução de citocinas e de outros mediadores químicos que atuam sinergicamente no aumento da permeabilidade vascular, conseqüente à disfunção endotelial, e no consumo dos fatores de coagulação que geram coagulação intravascular disseminada, resultando nos quadros hemorrágicos (Ferreira & Rocha, 2006).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na evolução da infecção pelo vírus do dengue aos quadros de FHD/SCD, sem dúvida, não operam sozinhos. Dados de epidemiologia molecular fornecem uma evidência crescente de que as diferenças entre as cepas virais são importantes na determinação da incidência global do dengue hemorrágico (Rhotman & Ennis, 1999). Foi sugerido que diferenças estruturais nas cepas virais levam a diferenças na capacidade de infectar diferentes tipos celulares e causar a doença em suas formas mais severas (Whitehorn & Farrar, 2010).

Rosen (1986) considera que a evolução desfavorável resultaria da infecção por cepas mais virulentas do vírus do dengue. Tais cepas teriam origem em circunstâncias de hiperendemicidade e circulação concomitante de múltiplos sorotipos virais, de mutações gênicas decorrentes de sucessivas replicações em hospedeiros filogeneticamente tão distintos como o homem e o artrópode vetor (ou mesmo, em reservatórios silvestres residuais, representados por macacos). Outra possibilidade seria a ocorrência de recombinação gênica, resultante de infecções simultâneas por sorotipos virais diferentes, tanto no hospedeiro humano como no vetor. Segundo esta hipótese, não seria necessária a infecção prévia para

desenvolver o DH/SCD, como mostra os exemplos de casos isolados e epidemias de dengue hemorrágico em populações primoinfectadas (Pontes & Ruffino-Netto, 1994).

Contudo, dado que apenas uma pequena percentagem de doentes infectados com dengue evoluem para os casos graves da doença, é evidente que os fatores do hospedeiro desempenham um importante papel na patogênese do dengue. Muitas das características clínicas da infecção por dengue se devem à resposta imune do paciente (Whitehorn & Farrar, 2010) que é extremamente variável entre os indivíduos.

A patogênese do dengue é complexa e multifatorial. Nenhuma hipótese isoladamente é suficiente para explicar o desenvolvimento da doença grave. É a interação entre fatores virais e fatores geneticamente determinados do hospedeiro que vão interferir na evolução da doença em cada indivíduo.

## **FATORES DO HOSPEDEIRO E SUA INFLUÊNCIA NO DENGUE**

A interação entre o vetor, o vírus e o hospedeiro em um adequado ecossistema e contexto epidemiológico pode determinar a incidência e a gravidade das infecções por dengue.

Entre os fatores individuais de risco para a ocorrência das formas graves do dengue estão: gênero feminino, raça branca, estado nutricional, presença de anticorpos contra dengue de infecção anterior, intensidade da resposta imunológica e a co-existência de doenças crônicas como diabetes melitus, asma brônquica, doenças do tecido conjuntivo e hipertensão arterial (Rocha & Borges, 2009). Além disso, fatores genéticos do hospedeiro parecem ter importância na manifestação da doença, pois mesmo em áreas endêmicas somente uma pequena proporção de pessoas desenvolve os sintomas clínicos da virose ou evoluem para as formas mais graves.

No evento “Dia D contra a Dengue” realizado em 31 de março de 2008 na UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil) o professor Malouri Cabral, do Instituto de Microbiologia da UFRJ, afirmou que o dengue é uma doença de cunho genético. Segundo palavras dele: “só tem dengue quem pode”. Muitos indivíduos podem ser picados a vida inteira pelo vetor transmissor do vírus, mas nunca desenvolverão a doença. O professor ainda comentou que existem estimativas de que a cada dez pessoas picadas, apenas uma ou duas desenvolvem a enfermidade (Carvalho, 2008), evidenciando a interferência de características individuais na predisposição à infecção.

Nesse sentido, muitos fatores genéticos têm sido estudados, buscando seu envolvimento no curso das infecções pelo vírus do dengue, além de outras doenças, pois um maior entendimento sobre a contribuição destes fatores no desenvolvimento da doença poderia ajudar a definir mais claramente as populações de risco. Os pesquisadores já identificaram uma série de genes que podem predispor ou proteger um indivíduo de desenvolver FHD/SCD. A maioria dessas pesquisas envolve os genes que codificam moléculas HLA (do inglês, *Human Leucocyte Antigen*) e genes polimórficos não-HLA, como genes reguladores de citocinas.

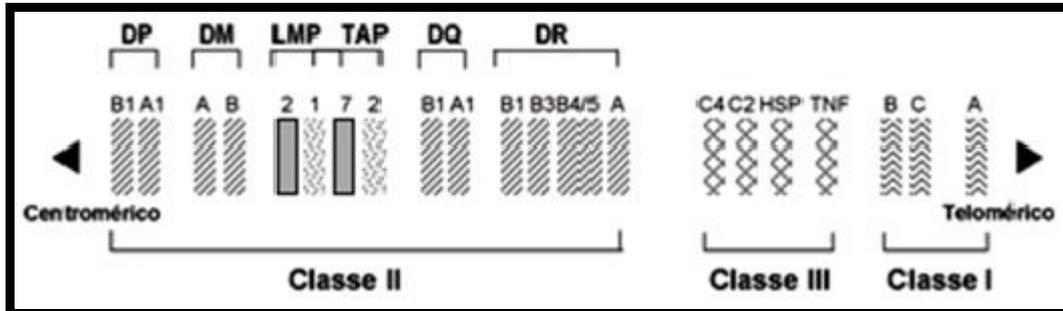
A presença de certos alelos em regiões reguladoras de citocinas tem mostrado associação no curso de infecções virais (Ribeiro *et al.*, 2007) e micobacterianas (Franceschi *et al.*, 2009). Fernandez-Mestre *et al.* (2004) sugeriram a presença do alelo -308 A para o gene *TNF* como possível fator de risco para as manifestações hemorrágicas em pacientes com dengue. Esse mesmo tipo de associação foi observado estudando polimorfismos no gene do receptor da vitamina D (VDR) e no gene da lectina de ligação à manose (MBL) (Acioli-Santos *et al.*, 2008). O genótipo  $IL6^{-174}GC$  se apresentou como um marcador de resistência ao dengue clássico em uma população do Norte do Paraná (Moreira *et al.*, 2008).

Muitos estudos têm investigado se genes de resistência ou susceptibilidade às doenças pertencem ao complexo gênico HLA, que codifica moléculas HLA de classe I e II, as quais participam efetivamente na indução da resposta imune promovendo a interação entre epítomos de um dado patógeno e o repertório de células T (linfócitos T CD4 e CD8) do hospedeiro. Desta forma, as respostas geradas para um mesmo antígeno se diferenciam entre os indivíduos, dependendo das moléculas HLA que estão sendo expressas em suas células.

As moléculas HLA são codificadas por genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH). A identificação do CPH humano ocorreu na década de 50, quando pesquisadores descobriram que alguns anticorpos, presentes no soro de indivíduos politransfundidos, eram reativos a antígenos presentes em leucócitos. Estudos genéticos relacionados a esses aloantígenos, permitiram a identificação de vários locos gênicos polimórficos e polialélicos situados em uma região do braço curto do cromossomo 6, na banda 6p21.31 (Figura 5). Estes genes codificam aloantígenos expressos na superfície de leucócitos, e na espécie humana receberam a designação HLA (Bell, 1989; Christiansen *et al.*, 1994; Abbas *et al.*, 2003).

Os genes do CPH humano estão reunidos em três grupos, denominados genes de classe I, II e III. Os genes de classe I codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade HLA-A, B e C, os de classe II as moléculas clássicas HLA-DR, DQ e DP. Os genes de classe

III, embora estejam incluídos dentro do CPH, não codificam moléculas de histocompatibilidade, e sim outras moléculas, algumas delas fazendo parte do sistema imune outras não (Fernandes *et al.*, 2003).



**Figura 5.** Estrutura gênica do Complexo Principal de Histocompatibilidade humano (Fernandes *et al.*, 2003).

O CPH é o conjunto de genes mais polimórfico entre os mamíferos. É possível que o polimorfismo exista para garantir a sobrevivência das espécies, sendo que a herança de um haplótipo materno e paterno em co-dominância faz com que cada indivíduo possa expressar em suas células diferentes moléculas HLA, o que confere a vantagem de apresentar mais peptídeos antigênicos às células T, podendo assim, combater um número maior de infecções. Quanto maior o polimorfismo HLA em uma população, maior será a possibilidade de herdar haplótipos diferentes e, portanto, ser heterozigoto para todos os locos (Turner, 2004).

A susceptibilidade a doenças infecciosas pode acontecer devido a falhas em alguns estágios da resposta imunológica. As moléculas HLA específicas de indivíduo podem provocar uma ligação inadequada ao peptídeo ou o complexo HLA-peptídeo pode gerar uma resposta ineficaz de linfócitos, levando a uma baixa resistência do indivíduo à invasão do agente infeccioso (Klein, 2000). Por outro lado, pacientes cujas moléculas HLA conferem proteção contra uma determinada doença, possuem genes que provavelmente estimulam a multiplicação de linfócitos T que eliminam o agente invasor através da produção de citocinas inflamatórias, ou destruindo diretamente as células infectadas (Mack *et al.*, 1999).

A importância do sistema HLA na susceptibilidade a doenças já está bem determinada. Moléculas HLA de classe I e II têm sido associadas a mais de 100 doenças, principalmente as de natureza infecciosa (Thio *et al.*, 2002; Paranjape, 2005) e auto-imune (Fernandes *et al.*, 2003), sendo que um ou mais alelos encontram-se aumentados ou diminuídos em pacientes

em relação a um grupo controle, formado por indivíduos saudáveis (Shiina, 2004; Alves, 2005).

Com relação a doenças causadas por vírus, o alelo HLA-B\*35 foi associado à progressão da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Enquanto os alelos HLA-B\*27, B\*57, B\*14 e C\*04 foram identificados como fatores de proteção à infecção pelo HIV (Gao, 2001; Paranjape, 2005). Outros estudos revelaram que os vários estágios da evolução da hepatite C podem estar associados com determinados alelos HLA (Kryczka, 2001; Thio *et al.*, 2002; McKiernan *et al.*, 2004).

No caso da influência exercida pelos genes HLA na infecção pelo vírus do dengue, resultados relevantes também já foram observados. Nishimura *et al.* (1991) sugeriram um papel imunossupressor de HLA-DQ1 na resposta imune ao vírus do dengue, enquanto LaFleur *et al.* (2002) sugeriram que HLA-DRB1\*04 poderia ser um fator protetor contra o dengue hemorrágico. No Brasil, em um estudo realizado na região Norte/Nordeste do Paraná, Polizel *et al.* (2004) encontraram forte associação de genes HLA-DQ1 em pacientes que tiveram dengue clássico em uma epidemia ocorrida em 1995 caracterizada pela presença do sorotipo DEN-1. Contudo, apesar dos inúmeros trabalhos que vêm sendo realizados nessa área, os resultados ainda se apresentam bastante variados e algumas vezes incompletos devido às limitações desse tipo de estudo. Por isso, mais pesquisas devem ser feitas a fim de elucidar questões referentes à influência deste e de outros genes de resposta imune em doenças virais como o dengue.

Atualmente, novos genes de resposta imune já estão sendo estudados no intuito de esclarecer sua possível participação na ocorrência ou gravidade de uma doença. Dentre eles, chama a atenção dos pesquisadores o polimorfismo dos genes que codificam receptores KIR (do inglês, *Killer cell Immunoglobulin-like Receptor*) das células *Natural Killer* (NK).

As células NK são derivadas de precursores da medula óssea e apresentam-se como grandes linfócitos com numerosos grânulos citoplasmáticos. Essas células têm função crucial na resposta imune inata, especialmente contra infecções virais e células tumorais, pela sua capacidade de lise celular, sem sensibilização prévia, e pela produção de citocinas e quimiocinas que mediam a resposta inflamatória. As células NK são expandidas e ativadas pelas citocinas da imunidade inata, tais como IL-12 e a IL-15 (Abbas *et al.*, 2003).

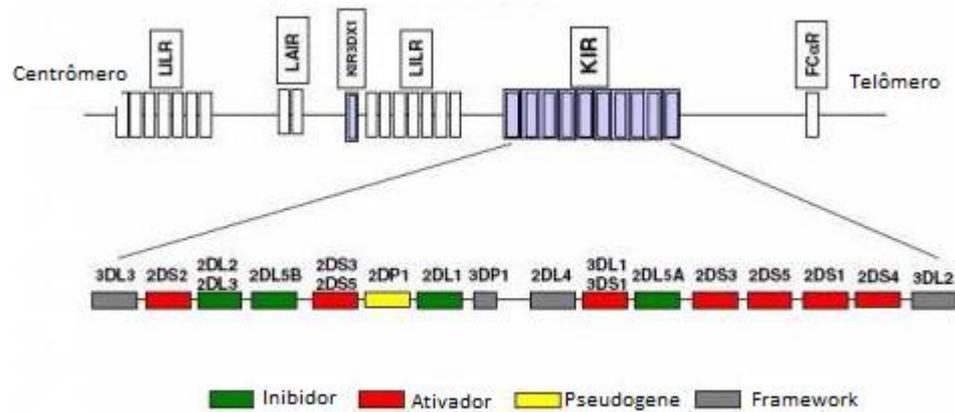
Para uma ação efetiva sobre as células-alvo, células infectadas, tumorais e alogênicas, as células NK dependem de sua habilidade em reconhecer a expressão anormal (diminuição ou ausência) de moléculas HLA na superfície dessas células, diferenciando-as das células normais ou próprias do organismo que expressam normalmente as moléculas HLA. Esse

mecanismo é conhecido como teoria do *missing self* (reconhecimento do próprio) e depende dos receptores de células NK, capazes de detectar a variabilidade de expressão das moléculas HLA (Lanier, 2005; Vivier & Romagne, 2007).

As células NK possuem vários tipos de receptores em sua superfície, entre os quais estão os receptores KIR, glicoproteínas pertencentes a superfamília das imunoglobulinas, sendo encontrados também em algumas subpopulações de células T (Rajagopalan & Long, 2005). Os receptores KIR foram primeiramente identificados por sua habilidade de conferir alguma especificidade na citólise mediada por células NK (Harel-Bellan *et al.*, 1986; Moretta *et al.*, 1990). Esta especificidade se dá através da interação dos receptores KIR das células NK com moléculas HLA de classe I, que estão presentes em todas as células nucleadas do organismo. Para que as células NK consigam distinguir alvos desprovidos ou não de moléculas HLA de classe I, é necessária a ligação simultânea nestes receptores. Essa interação protege células saudáveis da destruição espontânea causada pela citólise mediada por células NK. Entretanto, alguns repertórios de KIR podem estimular esta atividade (Carrington & Norman, 2003).

Análises de clones NK revelaram que células clones expressam diferentes grupos de KIR, havendo uma seleção combinatória de receptores a serem expressos por uma célula e seus clones, entretanto cada clone expressa pelo menos um receptor inibidor (Moretta *et al.*, 2003; Vivier & Anfossi, 2004). Portanto, em um indivíduo, os clones de células NK são distinguidos pela combinação de genes *KIR* que expressam, sendo que esses padrões são estabelecidos durante o desenvolvimento da célula NK e permanecem estáveis (Parham, 2004).

O grupo de genes *KIR* compreende uma região de aproximadamente 150Kb localizada no braço longo do cromossomo 19 humano (19q13.4), em um complexo gênico de 1Mb denominado Complexo de Receptores Leucocitários (LRC - *Leukocyte Receptor Complex*). Atualmente, 15 genes e dois pseudogenes *KIR* foram identificados: *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DS1*, *KIR2DP1* e *KIR3DP1* (Figura 6). Até janeiro de 2009 foram descritos 335 alelos distribuídos nos diferentes *locus* (Rudnick, *et al.*, 2010), evidenciando o extenso polimorfismo dos genes *KIR*.

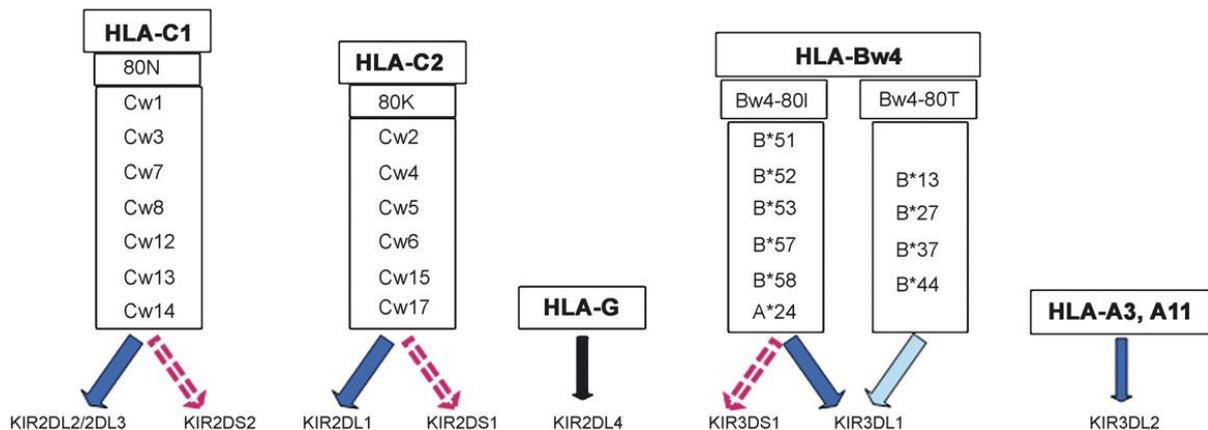


**Figura 6.** Complexo de Receptores Leucocitários e os genes *KIR* localizados no braço longo do cromossomo 19 humano (19q13.4) (disponível em: [http://ecologia.ib.usp.br/bie5782/doku.php?id=bie5782:01\\_curso\\_atual:alunos:trabalho\\_final:mariahtmaia:start](http://ecologia.ib.usp.br/bie5782/doku.php?id=bie5782:01_curso_atual:alunos:trabalho_final:mariahtmaia:start)).

Dependendo da composição e estrutura das moléculas codificadas por esses genes, os receptores KIR podem ser ativadores ou inibidores da função das células NK. As moléculas podem ter dois ou três domínios semelhantes à imunoglobulina, sendo que aquelas com cauda citoplasmática longa (2DL e 3DL) são do tipo inibidoras em virtude da presença de ITIMs (Motivos Inibidores baseados em Tirosina) responsáveis pela transdução de sinais para inibição de funções efetoras. As moléculas com cauda citoplasmática curta (2DS e 3DS) possuem um aminoácido na região transmembrana que permite associação com uma determinada proteína (DAP12) que libera sinais ativadores por meio de ITAMs (Motivos Ativadores baseados em Tirosina). A molécula KIR2DL4 contém sequências de ambos receptores ativadores e inibidores (Carrington & Norman, 2003).

Com base no conteúdo dos genes, dois tipos de haplótipos *KIR* foram descritos e são designados A e B. A principal distinção entre eles é o número de genes que codificam receptores ativadores presentes. O haplótipo A é definido pela presença dos genes inibidores *KIR2DL1*, *2DL3*, *2DL4*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3* e apenas um gene ativador, o *KIR2DS4*, além de dois pseudogenes. Este haplótipo não varia em conteúdo de genes, mas têm grande variação no nível alélico. Por outro lado, o haplótipo B possui uma grande variabilidade no número e combinações de genes *KIR*, mas possui polimorfismo alélico apenas moderado. Apresenta mais genes que o do grupo A, incluindo o *KIR2DL5* e possui de um a cinco *KIR* ativadores (Uhrberg *et al.*, 2002). *KIR3DL3*, *KIR3DL2*, *KIR3DP1* e *KIR2DL4* estão presentes em todos os haplótipos e são chamados frameworks (Vilches *et al.*, 2002).

A composição desses receptores confere alta especificidade a determinadas moléculas HLA de classe I. Alguns desses pares KIR-ligantes foram identificados. KIR2DL1 e KIR2DS1 se ligam a moléculas HLA-C do grupo 2 (HLA-C2), as quais incluem HLA-C\*02, C\*04, C\*05, C\*06, C\*15 e C\*17. KIR2DL2, KIR2DL3 e KIR2DS2 se ligam a moléculas HLA-C do grupo 1 (HLA-C1), ou seja, HLA-C\*01, C\*03, C\*07, C\*08, C\*12, C\*13, C\*14 e C\*16. As moléculas HLA-C1 e HLA-C2 distinguem-se por um dimorfismo na posição 80 da hélice  $\alpha 1$  de HLA-C. KIR3DL1 interage com HLA-B do grupo de Bw4, e incluem HLA-B\*13, B\*27, B\*44, B\*51, B\*52, B\*53, B\*57 e B\*58. KIR3DL2 interage com HLA-A3 e HLA-A11. Enquanto KIR2DL4 se liga ao HLA-G, uma molécula HLA de classe I não-clássica, com pouco polimorfismo. Ligantes para KIR2DL5, KIR2DS3, KIR2DS5 e KIR3DL3 permanecem indefinidos (Carrington & Norman, 2003; Boyton & Altmann, 2007) (Figura 7).



**Figura 7.** Especificidades KIR-ligante HLA de classe I. Os receptores de ativação KIR2DS2, KIR2DS1 e KIR3DS1 exibem especificidades similares às contrapartes inibidoras correspondentes, embora suas interações sejam muito mais fracas (descrito como setas vermelhas pontilhadas). A interação de KIR3DL1 com Bw4 80I (seta azul escura) é provavelmente mais forte do que aquela com Bw4 80T (seta azul clara) (Kulkarni *et al.*, 2008).

Algumas pesquisas demonstraram o envolvimento de determinados receptores KIR e seus ligantes HLA no curso clínico de uma série de doenças como processos inflamatórios, doenças auto-imunes e infecções virais (Khakoo & Carrington, 2006). Martin *et al.* (2002) observaram que a interação entre KIR3DS1 e HLA-Bw4 leva à uma progressão tardia da AIDS em pacientes soropositivos, evidenciando como o polimorfismo na molécula HLA-B pode mudar a especificidade de ligação nos receptores KIR e com isso influenciar na

evolução da infecção pelo vírus HIV. López-Vazquez *et al.* (2005), em um estudo realizado com indivíduos portadores de HIV na Zâmbia, encontraram que a presença KIR3DL1 em combinação com alelos de *HLA-B\*57* confere um efeito protetor contra a progressão da doença. Ainda com relação a AIDS, no estudo de Guadieri *et al.* (2005), a presença de KIR2DS2 foi associada especificamente com o declínio mais rápido na contagem de células T CD4 e consequente progressão da AIDS.

Com relação à infecção pelo HCV, vírus causador da hepatite C, a ligação KIR3DS1/HLA-Bw4 promove proteção contra a evolução da hepatite-C e, conseqüentemente, contra o possível desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (López-Vazquez *et al.*, 2005). Kakhoo *et al.* (2004) encontraram o gene *KIR2DL3* com seu ligante HLA-C1 influenciando diretamente a resolução da infecção pelo HCV, sugerindo que a inibição das células NK é importante na determinação da imunidade antiviral e que respostas inibidoras diminuídas podem conferir proteção contra a doença. A esse respeito, Bashirova *et al.* (2006) comentaram que afinidade de ligação do receptor KIR2DL3 por alótipos *HLA-C1* é menor do que a do 2DL2 e 2DL1 para seus respectivos ligantes, resultando na transmissão de sinais inibidores mais fracos à célula efetora que pode ser ativada para combater células infectadas. Em pacientes com hepatite C persistente, Montes-Cano *et al.* (2005), demonstraram uma diminuição significativa da frequência do gene *KIR2DL2* e do genótipo *KIR2DL2/KIR2DL2* e um aumento de *KIR2DL3* em relação a pacientes que apresentavam resolução da infecção.

Além destas patologias citadas, a interação KIR/HLA e o polimorfismo de ambas, podem influenciar no desenvolvimento de uma série de outras enfermidades como: reumatoide vascular, escleroderma, diabetes melitus insulino-dependente, câncer cervical, leucemia mieloide crônica, infecção por citomegalovírus e até em aborto espontâneo recorrente, além de muitas outras doenças (Rajagopalan & Long *et al.*, 2005).

Teoricamente, a ativação de células NK e células T pode ser regulada por um dos dois mecanismos seguintes: a presença de sinalização através dos receptores de ativação em uma grande proporção de células efectoras (por exemplo, haplótipos *KIR* que contêm muitos receptores ativadores) ou presença da combinação receptor inibidor-ligante que emite sinais inibidores relativamente fracos. Os receptores KIR fornecem sinais de ativação ou inibição que regulam a função das células NK e células T. Desse modo, possuem um papel importante na imunidade antiviral e anti-tumoral (Vilches *et al.*, 2002).

Embora a proteção contra parasitos intracelulares, como o vírus do dengue, seja dependente da função das células NK, em estágios iniciais da resposta imune contra a infecção, não existem relatos na literatura consultada demonstrando a participação de KIR no

desenvolvimento do dengue. Desta forma, este estudo tem por objetivo investigar a influência de genes *KIR* e de seus ligantes HLA na susceptibilidade e/ou resistência ao dengue, em uma população da região sul do Brasil.

## **JUSTIFICATIVA**

A caracterização genética do polimorfismo de *KIR* e de seus ligantes HLA de classe I em uma população que desenvolveu dengue em comparação com um grupo controle (indivíduos saudáveis) permitirá investigar a influência destes genes na susceptibilidade ou resistência à doença. Muitas das características clínicas da infecção pelo vírus do dengue se devem à resposta imune do paciente que é extremamente variável entre os indivíduos. Assim, este estudo justifica-se pelo fato de que os genes *KIR* e *HLA* podem interferir no curso da resposta imune do hospedeiro frente à infecção por este vírus.

A patogênese do dengue é complexa e multifatorial. Contudo, visto que mesmo em áreas endêmicas apenas uma pequena proporção de indivíduos desenvolve os sintomas clínicos da virose ou evoluem para as formas mais graves da doença, é evidente que fatores relativos ao hospedeiro desempenham um importante papel na patogênese desta doença. Existem estimativas de que a cada dez pessoas picadas pelo mosquito infectado, apenas uma ou duas desenvolvem a enfermidade, fortalecendo as evidências da interferência de características individuais na predisposição à infecção. Desta forma, este estudo poderá servir de referência para futuras investigações da resposta imunológica em casos de dengue hemorrágico e síndrome de choque do dengue, pois um maior entendimento sobre a contribuição destes fatores genéticos no desenvolvimento da doença poderia ajudar a definir mais claramente as populações de risco.

## **OBJETIVO GERAL**

Este estudo tem por objetivo investigar a influência de genes *KIR* e seus ligantes HLA na susceptibilidade e/ou resistência ao dengue, numa população da região sul do Brasil.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar grupos alélicos de *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* que são ligantes de receptores KIR e determinar as frequências de 15 genes *KIR*: *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DS1*, *KIR3DL3*, *KIR2DL5*, *KIR2DP1* e *KIR2DS5*, em uma população de indivíduos que teve diagnóstico confirmado de dengue e em uma população de indivíduos cujo exame sorológico resultou em negativo para esta infecção, todos provenientes da região sul do Brasil;
- 2) Estimar as frequências gênicas e genóticas para estes genes polimórficos nestas populações;
- 3) Verificar a conformidade das proporções genóticas, com respeito às expectativas em equilíbrio de Hardy-Weinberg,
- 4) Avaliar, por meio de uma análise estatística adequada, possíveis associações entre estes genes e o desenvolvimento do dengue.

## REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (2003) Imunidade inata. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds) *Imunologia celular e molecular*. Revinter, Rio de Janeiro, pp 270-290.
- Acioli-Santos B, Segat L, Dhália R, Brito CAA, Braga-Neto UM, Marques ETA, Crovella S (2008) *MBL2* gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. *Hum Immunol* 69: 122-128.
- Alves C, Souza T, Veiga S, Alves C, Toralles MB, Lemaire D (2005) Importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. *Pediatria (São Paulo)* 27: 274-286.
- Barbosa ML (1996) Dengue: Revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz* 56: 27-45.
- Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW, Carrington M (2006) The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7: 277-300.
- Bell J (1989) Chromosome crawling in the MHC. *Trends in Genetics* 5: 289-290.

Boyton RJ, Altmann DM (2007) Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. *Clin Exp Immunol* 149: 1-8.

Branco IC (2003) Dengue. In: Cimerman S, Cimerman B et al (eds) *Medicina Tropical*. Atheneu, São Paulo, pp 435-443.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: Ministério da Saúde, 2009 (Serie A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes\\_epidemias\\_dengue\\_11\\_02\\_10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes_epidemias_dengue_11_02_10.pdf). Acessado em 15 de maio de 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Portal da saúde. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=23620&janela=1](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23620&janela=1). Acessado em 13 de julho de 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue. Análise de situação e tendências – 2010. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_dengue\\_se\\_26\\_final\\_11\\_8\\_10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se_26_final_11_8_10.pdf). Acessado em 10 de julho de 2010.

Câmara FP, Theophilo RLG, Santos GT, Pereira SRFG, Câmara DCP, Matos RRC (2007) Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 192-196.

Carrington M, Norman P (2003) The KIR gene cluster. *US Natl Library Med*. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono\\_003/ch1d1.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono_003/ch1d1.pdf). Acessado em 26 de março de 2010.

Carvalho F (2008) Dengue, uma questão de educação e conscientização. Disponível em: [www.ufrj.br/detalha\\_noticia.php?codnoticia=5250](http://www.ufrj.br/detalha_noticia.php?codnoticia=5250). Acesso em 05 de junho de 2010.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM (1990) Flavivirus genome, organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44: 649-688.

Christansen OB, Rasmussen KL, Jersil C, Grunnet N (1994) HLA class II alleles confer susceptibility to recurrent fetal losses in Danish women. *Tissue Antigens* 44: 225-233.

Depradine CA, Lovell EH (2004) Climatological variables and the incidence of dengue fever in Barbados. *Int J Environ Health Res* 14: 429-441.

Fernandes APM, Maciel LMZ, Foss MC, Donadi EA (2003) Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 47: 601-611.

Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z (2004) TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens* 64: 469-472.

Ferreira MS, Rocha A (2006) Síndrome da febre hemorrágica de etiologia viral. In: Bogliolo L, Brasileiro Filho G (eds) *Bogliolo patologia*, 7 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 1414-1418.

Figueiredo LTM, Simões MC, Cavalcante SMB (1989) Study on an enzyme immunoassay for dengue IgG and IgM antibodies detection using infected mosquito cells as antigen. *Trans R Acad Trop Med Hyg* 83: 702-707.

Figueiredo LTM (1999) Patogenia das infecções pelos vírus do Dengue. *Medicina, Ribeirão Preto, Simpósio: Virologia Médica I* 32: 15-20.

Figueiredo LTM, Fonseca BAL (2002) Dengue. In: Veronesi R, Foccacia R (eds) *Tratado de infectologia*, 2 ed. Atheneu, Rio de Janeiro, pp 204-217.

Forattini OP (2002) *Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia*, vol 2. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 860 p.

Franceschi DAS, Mazini PS, Rudnick CCC, Sell AM, Tsuneto LT, Melo FC, Braga MA, Peixoto PRF, Visentainer JEL (2008) Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotypes and leprosy in Brazil. *Tissue Antigens* 72: 478-482.

Franceschi DSA, Mazini PS, Rudnick CCC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas MS, Peixoto PR, Visentainer JEL (2009) Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int J Infect Dis* 13: 493-498.

Gadelha DP, Toda AT (1985) *Biológica e comportamento do Aedes Aegypti*. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 37: 29-36.

Gao X, Nelson GW, Karacki P, Martin MP, Phair J, Kaslow R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, O'Brien SJ, Carrington M (2001) Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med* 344: 1668-1675.

Gaudieri S, DeSantis D, McKinnon E, Moore C, Nolan D, Witt CS, Mallal SA, Christiansen FT (2005) Killer immunoglobulin-like receptors and HLA act both independently and synergistically to modify HIV disease progression. *Genes Immun* 6: 683-690.

Gubler DJ, Clark GG (1995) Dengue/Dengue hemorrhagic fever: The emergence of a global health problem. *Emerg infect dis* 1: 55-57.

Gubler DJ, Rosen L (1976) A simple technique for demonstrating transmission of dengue viruses by mosquitoes without the use of vertebrate hosts. *Am J Trop Med Hyg* 25: 146-150.

Gubler DJ (1997) Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global health problem. In: Gubler DJ, Kuno G (eds) *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York, CAB International, pp 1-22.

Gubler DJ (1998) Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496.

Gubler DJ (2006) Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp* 277: 3-16.

Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Santos M, Villaescusa R, Basanta P, Indan G, Ballester JM (1984) Dengue haemorrhagic fever in Cuba. II. Clinical Observations. *Trans Roy Soc Med Hyg* 78: 239-241.

Guzman MG, Kouri G (2003) Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Lessons and challenges. *J Clin Virol* 27: 1-13.

Halstead SB (1970) Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Yale J Biol Med* 42: 350-360.

Halstead SB, Papavangelou G (1980) Transmission of dengue 1 and 2 viruses in Greece in 1928. *Am J Med Trop Hyg* 29: 635-637.

Halstead HB (1982) Dengue Haemorrhagic Fever – a public health problem and a field for research. *Bull Wld Hlth Org* 58: 1-21.

Halstead SP (1990) Global epidemiology of dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 21: 636-641.

Halstead SB (2007) Dengue. *Lancet* 370: 1644-1652.

Harel-Bellan A, Quillet A, Marchiol C, DeMars R, Tursz T, Fradelizi D (1986) Natural Killer susceptibility of human cells may be regulated by genes in the HLA region on chromosome 6. *Proc Natl Acad Sci* 83: 5688-5692.

Henchal EA, Putnak, R (1990) The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 3: 376-396.

Henchal EA, Henchal LS, Schlesinger JJ (1998) Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice lethal challenge with dengue 2 virus. *J Gen Virol* 69: 2101-2107.

Khakoo SI, Carrington M (2006) KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev* 214: 186-201.

Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M (2004) HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305: 872-874.

Klein JSA (2000) The HLA System: Second of two parts. *N Engl J Med* 343: 782-786.

Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR (1987) Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? II. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 821-823.

Kryczka W, Brojer E, Kalinska A, Urbaniak A, Zarebska-Michaluk D (2001) DRB1 alleles in relation to severity of liver disease in patients with chronic hepatitis C. *Med Sci Monit* 1: 217-220.

Kulkarni S, Martin MP, Carrington M (2008) The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol* 20: 343-352.

Kurane I, Ennis FA (1992) Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol* 4: 121-127.

La Fleur C, Granados J, Alarcon GV, Morales JR, Garza CV, Higuera L, Pacheco GH, Moguel TC, Rangel H, Figueroa R, Acosta M, Lazcano E, Ramos C (2002) HLA-DR Antigen Frequencies in Mexican Patients with Dengue virus infection: HLA-DR4 as a Possible Genetic Resistance Factor for Dengue Hemorrhagic Fever. *Hum Immunol* 63: 1039-1044.

Lanier LL (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23: 225-274.

López-Vázquez A, Rodrigo L, Martínez-Borra J, Pérez R, Rodríguez M, Fdez-Morera JL, Fuentes D, Rodríguez-Rodero S, González S, López-Larrea C (2005) Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with Hepatitis C Virus infection. *J Infect Dis* 192: 162-165.

Mack DG, Jonhson JJ, Roberts F, Roberts CW, Estes RG, David C, Grumet FC, McLeod R (1999) HLA-classe II genes modify outcome of *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol* 29: 1351-1358.

Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL (2004) Dengue viral infections. *Postgrad Med J* 80: 588-601.

Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M (2002) Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Gen* 31: 429-434.

Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME (2009) Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clin Microbiol Rev* 22: 564-581.

Martinez-Torres ME. Dengue hemorrágico em crianças: editorial. Havana, José Marti, 1990.

McKierman SM, Hagan R, Curry M, McDonald GS, Kelly A, Nolan N, Walsh A, Hegarty J, Lawlor E, Kelleher D (2004) Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology* 40: 108-114.

Monath TP (1994) Dengue: The risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci* 91: 2395-2400.

Montes-Cano MA, Caro-Oleas JL, Romero-Gómez M, Diago M, Andrade R, Carmona I, Aguilar Reina J, Nunez-Roldan A, Gonzalez-Escribano MF (2005) HLA-C and KIR genes in hepatitis C virus infection. *Hum immunol* 66: 1106-1109.

Moreira ST, Cardoso DM, Visentainer JE, Fonzar UJV, Moliterno RA (2008) The possible protective role of the Il6-174GC genotype in dengue fever. *Open Trop Med J* 1: 87-91.

Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, Pantaleo G, Moretta L (1990) A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic. *J Exp Med* 171: 695-714.

Moretta L, Romagnani C, Pietra G, Moretta A, Mingari MC (2003) NK-CTL, a novel HLA-E-restricted T cell subset. *Trends Immunol* 24: 136-143.

Nishimura Y, Kamikawaji N, Fujisawa K, Yoshizumi H, Yasunami M, Kimura A, Sasazuki T (1991) Genetic control of immune response and disease susceptibility by HLA-DQ gene. *Res Immunol* 142: 559-566.

Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias MFDB, Farias Filho JC (1988) Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 219-225.

Nogueira RMR, Araujo JMG, Schatzmayr HG (2007) Dengue viruses in Brazil, 1986–2006. *Rev Panam Salud Publica* 22: 358-363.

Noisakran S, Perng GC (2008) Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/ dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Exp Biol Med* 233: 401-408.

Osanai CH, Travassos da Rosa APA, Tang AT, Amaral RS, Passos AD, Tauil PL (1998) Surto de dengue em Boa Vista em Roraima. *Rev Inst Med Trop* 25: 53-54.

Paraná. Secretaria de Estado da Saúde – SESA. Superintendência de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Ambiental. Divisão de Doenças Transmitidas por Vetores. Dengue: casos notificados e confirmados autóctones e importados Paraná – 2002 a 2008. Boletim Informativo Dengue 2008: n.12. Disponível em [http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/boletimdengue/BoletimDengue12\\_2008.pdf](http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/boletimdengue/BoletimDengue12_2008.pdf) Acessado em 30 de junho de 2010.

Paranjape RS (2005) Immunopathogenesis of HIV infection. *J Med Res* 121: 240-255.

Parham P (2004) Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunol Lett* 1-2: 11-13.

Pinheiro FP, Rosa JT (1996) Dengue. In: Veronesi R, Focaccia R (eds) *Tratado de Infectologia*. Atheneu, São Paulo, pp 201-214.

Pinheiro PP (1989) Dengue in the Americas: 1980-1987. *Epidemiol Bull* 10: 1-8.

Polizel JR, Bueno D, Visentainer JEL, Sell AM, Borelli SD, Tsuneto LT, Dalalio MMO, Coimbra MTM, Moliterno RA (2004) Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in white southern Brazilian population. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 559-562.

Pontes RJS, Ruffino-Netto A (1994) Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. *Rev Saúde Pública* 28: 218-227.

Rajagopalan S, Long EO (2005) Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med* 201: 1025-1029.

- Ribeiro CSS, Visentainer JEL, Moliterno RA (2007) Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 435-440.
- Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sandres EJ, Vorndam AV (1998) Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet* 352: 971-977.
- Rocha RL, Borges AHD (2009) Dengue. In: Rocha MOC e col. (eds) *Fundamentos em infectologia*. Rio de Janeiro, Editora Rubio.
- Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM (2010) Cellular and molecular life sciences dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci* 67: 2773-2786.
- Rodhain F (1991) The role of monkeys in the biology of dengue and yellow fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 14: 9-19.
- Rosen L (1986) La pathogénèse de la dengue hémorragique: Discussion critique des hypothèses Actuelles. *Bull Soc Pathol* 79: 342-349.
- Rothman AL, Ennis FA (1999) Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology* 257: 1-6.
- Rudnick CCC, Guelsin GAS, Marangon AV, Franceschi DAS, Sell AM, Visentainer JEL (2010) Otimização de metodologia para o estudo de genes KIR. *J Bras Patol Med Lab* 46: 215-224.
- Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S (1984) Risk factors for dengue shock syndrome: A prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 120: 653-669.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Travassos da Rosa APA (1986) An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 245-246.
- Serufo JC, Nobre V, Rayes A, Marcial TM, Lambertucci JR (2000) Dengue: uma nova abordagem. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 465-476.
- Shiina T, Inoko H, Kulski JK (2004) An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations. *Tissue Antigens* 64: 631-649.
- Solomon T, Mallewa M (2001) Dengue and other emerging flaviviruses. *J Infect* 42: 104-115.
- Tauil PL (2001) Urbanização e ecologia do dengue. *Cad Saúde Pública* [online] 17: 99-102.
- Tauil PL (2002) Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad Saúde Pública* 18: 867-871.
- Teixeira GM, Barreto ML, Guerra Z (1999) Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. *Informe epidemiológico do SUS* 8: 5-33.

Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, Aye KM, Aaskov J (1997) Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 56: 566-572.

Thio CL, Gao X, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, O'Brien SJ, Karacki P, Astemborski J, Carrington M, Thomas DL (2002) HLA-Cw\*04 and hepatitis C virus persistence. *J Virol* 76: 4792-4797.

Turner D (2004) The human leucocyte antigen (HLA) system. *Vox Sanguinis* 87: 87-89.

Uhrberg M, Parham P, Wernet P (2002) Definition of content for nine common group B haplotypes of the Caucoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 54: 221-229.

Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES (2003) Arboviroses. In: Cimerman S, Cimerman B (eds) *Medicina Tropical*. São Paulo, Atheneu, pp 435-443.

Vilches C, Parham P (2002) KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 20: 217-251.

Vivier E, Anfossi N (2004) Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nat Rev Immunol* 4: 190-198.

Vivier E, Romagne F (2007) Good news, bad news for missing-self recognition by NK cells: autoimmune control but viral evasion. *Immunity* 26: 549-551.

Zeng L, Kurane I, Okamoto Y, Ennis FA, Brinton MA (1996) Identification of Amino Acids involved in recognition by dengue virus NS3-specific HLA-DR15-restricted Cytotoxic CD4+ TCell clones. *J Virol* 70: 3108-3117.

Whitehorn J, Farrar J (2010) Dengue. *Br Med Bull* 95: 161-173.

WHO. World Health Organization (1990) Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol Bull* 11: 7-9.

WHO. World Health Organization (1997) Dengue and dengue Haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control. Geneva, WHO.

## CAPÍTULO II

**Artigo: “INFLUÊNCIA DE GENES *KIR* E SEUS LIGANTES HLA NA  
SUSCEPTIBILIDADE AO DENGUE EM UMA POPULAÇÃO DA REGIÃO SUL DO  
BRASIL”**

Artigo completo elaborado segundo normas da  
revista: *Immunogenetics* (Disponível em:  
[http://www.springer.com/biomed/immunology  
/journal/251](http://www.springer.com/biomed/immunology/journal/251)).

## INFLUÊNCIA DE GENES *KIR* E SEUS LIGANTES HLA NA SUSCEPTIBILIDADE AO DENGUE EM UMA POPULAÇÃO DA REGIÃO SUL DO BRASIL

Leticia M. Beltrame · Samaia L. Clementino · Daniela M. Cardozo · Márcia M.O. Dalalio · Ricardo A. Moliterno · Udelys J.V. Fonzar · Jeane E.L. Visentainer

**Resumo:** Os genes *KIR* (*killer cell immunoglobulin-like receptor*) codificam moléculas ativadoras e inibidoras da função das células NK (*natural killer*) e possuem como ligantes moléculas HLA (*human leucocyte antigen*) de classe I. A proposta deste estudo foi investigar a influência dos genes *KIR* e de seus ligantes HLA de classe I, na susceptibilidade ao dengue em uma população da região sul do Brasil, por meio de um estudo caso-controle. Participaram desta pesquisa 95 indivíduos com diagnóstico confirmado de dengue e um grupo controle de 172 indivíduos, cujo exame sorológico para detecção de anticorpos IgG contra dengue resultou em negativo. A genotipagem de *HLA* e *KIR* foi realizada pelas técnicas PCR-SSOP (*polymerase chain reaction - sequence specific of oligonucleotides probes*) e PCR-SSP (*polymerase chain reaction - sequence specific primers*), respectivamente. A análise dos dados mostrou diferenças significativas para os genes *KIR2DS1* (55,8% vs 40,7%;  $P = 0,02$ ), *KIR2DS3* (47,4% vs 33,7%;  $P = 0,03$ ), *KIR2DS5* (50,5% vs 36,0%;  $P = 0,02$ ) e *KIR2DL5* (77,9% vs 56,4%;  $P = 0,0007$ ). Em relação ao par KIR-ligante, associações positivas com o dengue foram observadas nas interações *KIR3DS1-Bw4* (38,9% vs 26,1%;  $P = 0,04$ ), *KIR2DL1-C2* (75,8% vs 62,2%;  $P = 0,03$ ) *KIR2DL1-C2* (42,1% vs 25,6%;  $P = 0,0081$ ) e uma associação negativa para *KIR2DL3-C1/C1* (16,8% vs 33,1%;  $P = 0,0066$ ). A análise dos haplótipos de *KIR* revelou um possível fator de proteção contra dengue nos portadores do genótipo AA. Estes resultados sugerem a existência de predisposição genética para o dengue clássico na população do sul do Brasil.

**Palavras-chave:** dengue · HLA · genes *KIR* · polimorfismo genético

**Abstract:** Killer cell immunoglobulin-like receptor (*KIR*) genes encode activating and inhibitory molecules present on natural killer (NK) cells and have as binding human leukocyte antigen (HLA) class I molecules. The purpose of this study was to investigate the influence of *KIR* genes and their class I HLA ligands in susceptibility to dengue fever in a population from South Brazil through a case-control study. Ninety-five subjects with confirmed diagnoses of dengue participated in this study, along with a control group of 172 individuals, whose serologic tests for the detection of IgG antibodies against dengue were negative. *HLA* and *KIR* genotyping was performed by polymerase chain reaction with sequence-specific oligonucleotides probes (PCR-SSOP) and

polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) techniques, respectively. Data analysis showed significant differences for *KIR2DS1* (55.8% vs 40.7%,  $P = 0.02$ ), *KIR2DS3* (47.4% vs 33.7%,  $P = 0.03$ ), *KIR2DS5* (50.5% vs 36.0%,  $P = 0.02$ ) and *KIR2DL5* (77.9% vs 56.4%,  $P = 0.0007$ ) genes. With regard to *KIR*-ligand pairs, positive associations with dengue were observed in *KIR3DS1-Bw4* (38.9% vs 26.1%,  $P = 0.04$ ), *KIR2DL1-C2* (75.8% vs 62.2%,  $P = 0.03$ ) and *KIR2DS1-C2* (42.1% vs 25.6%,  $P = 0.0081$ ) interactions, and a negative association in *KIR2DL3-C1/C1* (16.8% vs 33.1%,  $P = 0.0066$ ). The analysis of *KIR* haplotypes revealed a possible protective factor against dengue fever in individuals with the AA genotype. These results suggest the existence of genetic predisposition to dengue fever in the population from South Brazil.

**Keywords:** dengue · HLA · *KIR* genes · genetic polymorphisms

Correspondence address:

Jeane E.L. Visentainer

Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá,

Laboratório de Imunogenética.

Av. Colombo 5790, Maringá, PR, Brasil – CEP 87020-900

Telephone: (+55 44) 3011-4864 / FAX: (+55 44) 3011-4931

E-mail: jelvisentainer@uem.br

Letícia M. Beltrame · Samaia L. Clementino · Daniela M. Cardozo ·

Márcia M.O. Dalalio · Ricardo A. Moliterno · Jeane E.L. Visentainer

Laboratório de Imunogenética,

Universidade Estadual de Maringá,

Maringá, PR, Brasil.

Udelys J.V. Fonzar

Secretaria de Vigilância Epidemiológica e de Saúde de Maringá,

Av. Prudente de Moraes, 885

Zona 09, Maringá, PR, Brasil.

## Introdução

Dengue é uma doença infecciosa que preocupa as autoridades sanitárias do mundo todo, devido ao aumento significativo de suas taxas de incidência nas últimas décadas (Guzman and Kouri 2003). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram entre 50 e 100 milhões de casos de dengue por ano e que, cerca de 500.000 indivíduos evoluam para as formas mais graves da doença (WHO 2008).

O vírus causador do dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e é transmitido para os seres humanos através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*. O agente etiológico do dengue pode ser representado por um complexo de quatro sorotipos distintos, mas geneticamente relacionados: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (Figueiredo and Fonseca 2002; Martina et al. 2009). A infecção por um determinado sorotipo do dengue estimula a imunidade humoral contra o vírus, com produção de IgM específica na fase aguda da doença. IgG específica aparece em níveis baixos no início dos sintomas e em níveis mais altos após duas semanas, conferindo imunidade completa contra o sorotipo infectante provavelmente por toda a vida (Pontes and Netto 1994; Silva and Richtmann 2006).

Nos últimos 20 anos, o Brasil enfrentou quatro grandes epidemias: 1998 (DEN-1), 2002 (DEN- 3), 2008 (DEN-2), e a mais recente em 2010 (DEN-1), todas associadas à mudança do sorotipo viral predominante. Em 2007, ainda sob forte presença do DEN-3, o estado do Paraná registrou uma das maiores taxas de incidência da doença no país: foram notificados, aproximadamente, 50.000 casos suspeitos de dengue (Disponível em: [http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/boletimdengue/BoletimDengue12\\_2008.pdf](http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/boletimdengue/BoletimDengue12_2008.pdf)).

A infecção por qualquer um dos sorotipos virais do dengue pode resultar em um amplo espectro clínico. A maioria dos indivíduos infectados manifesta a virose na sua forma assintomática ou como uma doença febril inespecífica (Schatzmayer 2000). No entanto, o dengue pode se apresentar com sintomas típicos (dengue clássico) ou ainda nas suas formas mais graves, que são caracterizadas por coagulopatia e aumento da permeabilidade vascular, a febre hemorrágica do dengue (FHD), podendo evoluir para o choque hipovolêmico, conhecido como síndrome de choque do dengue (SCD) e levar o paciente a óbito (Martina et al. 2009).

Os mecanismos que levam à ocorrência das formas graves do dengue ainda não foram completamente esclarecidos. Enquanto, Halstead (1970) associou a ocorrência destas formas clínicas a infecções sequenciais por diferentes sorotipos do vírus, Rosen (1986) relacionou as formas graves à maior virulência de determinadas cepas dos vírus. Contudo, visto que apenas uma porcentagem dos indivíduos infectados manifestam os sintomas típicos do dengue ou evoluem para os quadros mais severos da doença, é evidente que fatores do hospedeiro desempenham um importante papel na patogênese do dengue (Whitehorn and Farrar 2010).

Alguns estudos demonstraram a influência de genes *KIR* (do inglês, *killer cell immunoglobulin-like receptor*) e de seus ligantes HLA (do inglês, *human leucocyte antigen*) na susceptibilidade e resistência do hospedeiro a uma série de doenças infecciosas, como é o caso da AIDS (Martin et al. 2002; Alter et al. 2007), hepatite C (Kakhoo et al. 2004; López-Vazquez et al. 2005; Montes-Cano et al. 2005), tuberculose (Méndez et al. 2006) e hanseníase (Franceschi et al. 2008).

Os genes *KIR* fazem parte do complexo de receptores leucocitários (do inglês, LRC - *leukocyte receptor complex*), que se localiza no cromossomo 19q13.4 (Suto et al. 1996). Esses genes codificam receptores das células NK (do inglês, *natural killer*) e apresentam alto polimorfismo, o qual pode contribuir para a ocorrência de diferentes respostas imunológicas e clínicas a uma mesma doença numa população (Green et al. 1999). Dependendo da composição e estrutura dos receptores *KIR*, eles podem ser inibidores ou ativadores da função das células NK, as quais desempenham um papel essencial na resposta imune inata, lisando células tumorais, infectadas por vírus ou alogênicas (Vilches and Parham 2002).

Até o momento, 15 genes funcionais, além de dois pseudogenes *KIR* foram identificados: *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DS1*, *KIR2DP1*, and *KIR3DP1*. De acordo com Parham (2004), o repertório *KIR* de um indivíduo depende diretamente dos genes herdados. Dois grupos básicos de haplótipos *KIR* foram definidos e são chamados de haplótipos A e B, os quais diferem entre si pela organização e variabilidade do número e tipo de genes que possuem. O haplótipo A contém os genes: *KIR3DL3*, *KIR2DL3*, *KIR2DP1*, *KIR2DL1*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4*, and *KIR3DL2*. Entre esses genes, somente o *KIR2DS4* é ativador e o conteúdo gênico deste haplótipo é uniforme, apresentando elevada variabilidade alélica. O haplótipo B, por sua vez, apresenta grande variação no conteúdo gênico, especialmente em relação aos genes ativadores, mas o polimorfismo alélico é moderado. Os genes *KIR3DL3*, *KIR3DL2*, *KIR3DP1* e *KIR2DL4* são chamados de “frameworks” e estão presentes em todos os haplótipos (Uhrberg et al. 2002; Carrington and Norman 2003).

A ação efetiva das células NK sobre as células-alvo é regulada pela ligação de seus receptores *KIR* com moléculas HLA presentes na superfície das células-alvo, representadas pelas moléculas HLA de classe I (HLA-A, -B e -Cw) que são codificadas por genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) (Long and Rajagopalan 2000; Vales-Gomez et al. 2000).

Alguns ligantes específicos de determinados receptores *KIR* foram identificados. *KIR2DL1* e *KIR2DS1* se ligam a moléculas HLA do grupo C2, que incluem as especificidades HLA-C\*02, \*04, \*05, \*06, \*07, \*15 e \*17. *KIR2DL2*, *KIR2DL3* e *KIR2DS2* interagem com moléculas HLA do grupo C1, entre elas estão HLA-C\*01, \*03,

\*07, \*08, \*12, \*13, \*14 e \*16. As moléculas HLA do grupo C1 e C2 distinguem-se por um dimorfismo na posição 80 da hélice  $\alpha 1$  da molécula HLA-C. KIR3DL1 e KIR3DS1 reconhecem epítomos de HLA-Bw4, enquanto KIR2DL4 é específico para moléculas HLA-G (Carrington and Norman 2003; Kulkarni et al. 2008).

Os receptores KIR exercem um importante papel na resposta imune e devido à sua especificidade de interação com determinados alelos *HLA* de classe I, é concebível que variações nesses genes influenciem na resistência e na suscetibilidade à patogênese de uma série de doenças (Bashirova et al. 2006). Porém, não existem relatos na literatura consultada demonstrando a influência de tais interações no desenvolvimento do dengue. Desta forma, este estudo tem por objetivo investigar a influência de genes *KIR* e de seus ligantes HLA na susceptibilidade e/ou resistência ao dengue, em uma população da região sul do Brasil.

### **Materiais e métodos**

Este estudo caso-controle foi conduzido de acordo com as normas preconizadas pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (COPEP-UEM), conforme Parecer 018/2007.

#### **Pacientes e controles**

O grupo de pacientes foi constituído por 95 indivíduos não aparentados (49 homens e 46 mulheres, com idade média de  $33,8 \pm 14,9$  anos), que desenvolveram dengue durante a epidemia de 2007 em Maringá e região (Paraná, Brasil), caracterizada pela forte presença do DEN-3.

O grupo controle foi composto por 172 indivíduos não aparentados da mesma região e grupo étnico dos pacientes (79 homens e 93 mulheres, com idade média de  $29,0 \pm 13,4$  anos). Somente indivíduos que apresentaram exames sorológicos negativos para dengue foram incluídos nesse grupo. Pacientes e controles foram classificados como uma população de grupo étnico misto, levando em consideração a composição da população do Paraná que é predominantemente de origem europeia (80,6%), com uma contribuição genética pequena, mas significativa de Africanos (12,5%) e Ameríndios (7,0%) (Probst et al. 2000).

#### **Obtenção de amostras**

Após a separação do soro para realização de exames sorológicos, o sangue total coagulado das amostras coletadas sem anticoagulante, foi congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  em tubos do tipo Falcon. Já, as amostras obtidas com

anticoagulante (EDTA) foram centrifugadas por 10 minutos a 1600xg para obtenção da camada leucocitária que foi congelada a -80°C.

#### Sorologia para dengue

O diagnóstico da infecção pelo vírus do dengue no grupo dos pacientes foi determinado pela pesquisa de anticorpos da classe IgM específicos para o vírus, em amostras de soro desses indivíduos, durante o período das coletas, em 2007, com o kit comercial Dengue IgM Capture ELISA (PanBio, Brisbane, Austrália), empregando-se o método imunoenzimático ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

O teste sorológico também foi realizado com as amostras do grupo controle, utilizando-se o kit comercial Dengue IgG ELISA (Bioeasy, Kyonggi-do, Korea) que detecta de maneira qualitativa anticorpos da classe IgG contra os sorotipos virais do dengue, os quais podem ser detectados mesmo após vários anos da ocorrência da infecção. A leitura das microplacas foi realizada em equipamento semi-automatizado (ASYS Expert Plus, Cambrige, UK).

#### Genotipagem *HLA* e *KIR*

As amostras de sangue coagulado foram tratadas com choque térmico para se obter a dissolução dos coágulos (Cardozo et al. 2009). Posteriormente, o DNA de todas as amostras foi extraído por meio de uma adaptação do método caseiro *salting out* descrito por John et al. (1990) e modificado por Lahiri and Nurnberger (1991). A concentração do DNA foi verificada por meio do fluorômetro *Qubit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Para a genotipagem de grupos alélicos *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* dos pacientes e controles, utilizou-se a técnica de PCR-SSOP (*polymerase chain reaction - sequence specific of oligonucleotides probes*) reversa, com a tecnologia Luminex xMAP (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA). Nesta técnica, os fragmentos de DNA amplificados foram hibridizados com microesferas fluorescentes (*beads*) ligadas a oligonucleotídeos específicos para os grupos alélicos. A hibridização foi verificada por meio de um citômetro de fluxo LABScan™ 100 flow analyzer e os dados foram interpretados por um programa computacional.

Para a genotipagem *KIR*, foi utilizada a técnica PCR-SSP (*polymerase chain reaction - sequence specific primers*), descrita por Martin (2004), com modificações (Rudnick et al., 2010) para a tipagem de 14 genes e um pseudogene: *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DS1* e *KIR2DP1*. Os fragmentos de DNA amplificados foram

separados por eletroforese em gel de agarose a 2,0% e visualizados pela coloração com *Sybr Green* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

#### Análise estatística

As frequências gênicas e genótípicas foram obtidas por contagem direta e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo programa Arlequin versão 3.1 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>). As comparações das frequências de genes *KIR* e *HLA* entre pacientes e controles foram realizadas pelo teste do qui-quadrado com correção de Yates ou Teste Exato de Fisher com o programa Graph Pad (San Diego, CA, USA) (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>). O risco dos indivíduos portadores de determinados genes *KIR* e *HLA* desenvolver dengue foi calculado por meio da determinação de OR (*Odds Ratio*) e do intervalo de confiança (IC - 95%), usando-se o programa SISA (<http://home.clara.net/sisa/>). Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos, após correção de Bonferroni para múltiplas comparações, em que o valor de  $P$  é multiplicado pelo número de comparações feitas (15 genes *KIR*).

#### Resultados

A investigação da influência dos genes *KIR* e *HLA* no desenvolvimento do dengue em uma população do sul do Brasil foi realizada pela comparação das frequências desses genes entre um grupo de indivíduos que desenvolveu a doença e um grupo controle composto por indivíduos com sorologia negativa para dengue.

A distribuição das frequências desses genes nas populações estudadas encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências dos genes *KIR* em pacientes com dengue e controles são apresentadas na Tabela 1. Diferenças significativas entre os grupos foram encontradas para os genes ativadores *KIR2DS1*, *KIR2DS3* e *KIR2DS5*, além do inibidor *KIR2DL5*. As frequências dos genes *KIR2DS1* (55,8% vs 40,7%;  $P = 0,0251$ ; OR = 1,84; IC = 1,11 – 3,05; Pc = 0,3765), *KIR2DS3* (47,4% vs 33,7%;  $P = 0,0392$ ; OR = 1,77; IC = 1,06 – 2,95; Pc = 0,588), *KIR2DS5* (50,5% vs 36,0%;  $P = 0,0299$ ; OR = 1,81; IC = 1,09 – 3,01; Pc = 0,4485) e *KIR2DL5* (77,9% vs 56,4%;  $P = 0,0007$ ; OR = 2,72; IC = 1,54 – 4,82; Pc = 0,0105) foram mais elevadas no grupo de pacientes. Contudo, após a correção de Bonferroni para múltiplas comparações, apenas o valor de  $P$  encontrado para o gene *KIR2DL5* se manteve significativo.

A Tabela 2 mostra os dados da distribuição das frequências dos grupos alélicos *HLA* de classe I, que codificam moléculas ligantes dos receptores *KIR*. Houve frequência significativamente aumentada das especificidades *HLA-C2* nos pacientes (76,8% vs 62,2%;  $P = 0,0211$ ; OR = 2,02; IC = 1,14 – 3,56). A

homozigotidade para especificidades do grupo *CI* (*CI/CI*) foi mais frequente no grupo controle (23,1% vs 37,8%;  $P = 0,0211$ ; OR = 0,50; IC = 0,28 – 0,88). Os demais ligantes não apresentaram diferenças significativas na comparação entre os dois grupos de indivíduos.

A Tabela 3 apresenta as frequências dos pares *KIR-HLA*. Nos pacientes, o gene ativador *KIR2DS1* manteve sua frequência aumentada quando analisado na presença do seu respectivo ligante HLA-C do grupo 2 (42,1% vs 25,6%;  $P = 0,0081$ ; OR = 2,12; IC = 1,24 – 3,60). Os pacientes também exibiram frequências mais elevadas dos pares *KIR3DS1-Bw4* (38,9% vs 26,1%;  $P = 0,0424$ ; OR = 1,80; IC = 1,05 – 3,07) e *KIR2DL1-C2* (75,8% vs 62,2%;  $P = 0,0337$ ; OR = 1,90; IC = 1,08 – 3,33). Por outro lado, o gene inibidor *KIR2DL3*, na presença do seu ligante em homozigotidade (*KIR2DL3-C1/CI*), foi observado com maior frequência no grupo controle (16,8% vs 33,1%;  $P = 0,0066$ ; OR = 0,41; IC = 0,22 – 0,76).

Com relação aos genótipos *KIR*, entre os pacientes, verificou-se uma frequência de 14,7% do genótipo AA, contra 85,3% dos genótipos AB/BB. Nos controles, o genótipo AA apareceu em 29,7% dos indivíduos e AB/BB em 70,3%. Esse perfil genético distinto entre os dois grupos foi estatisticamente significativo para o genótipo AA ( $P = 0,0102$ ; OR = 0,41; IC = 0,21 – 0,79) e também para os genótipos AB/BB ( $P = 0,0102$ ; OR = 2,44; IC = 1,27 – 4,69). Estes resultados estão descritos na Tabela 4 e as frequências de todos os genótipos encontrados em pacientes e controles são apresentadas na Figura 1.

## Discussão

Vários estudos já constataram a participação de genes *KIR* e seus ligantes em doenças infecciosas, tais como a AIDS, malária, hepatite C, tuberculose e hanseníase (Martin et al. 2002; Artavanis-Tsakonas et al. 2003; Kakhoo et al. 2004; Méndez et al. 2006; Franceschi et al. 2008), doenças auto-imunes ou inflamatórias como a psoríase, escleroderma e vasculite reumatoide (Luszczek et al. 2004; Momot et al. 2004; Yen et al. 2001) e ainda em muitos tipos de câncer, entre eles, os melanomas, leucemias, linfomas e câncer cervical (Naumova et al. 2005; Verheyden et al. 2004; Carrington et al. 2005). Os receptores *KIR* exercem sua influência na susceptibilidade ou na proteção a determinadas doenças por meio de um balanço entre os sinais de ativação ou inibição que regula a função das células NK, as quais interagem com as células-alvo que apresentam moléculas HLA de classe I ligantes de *KIR*.

O presente estudo revela que quatro genes *KIR* apresentaram frequências mais elevadas nos pacientes com dengue em relação ao grupo controle. Três genes ativadores, sendo eles o *KIR2DS1* (55,8% vs 40,7%), *KIR2DS3* (47,4% vs 33,7%) e o *KIR2DS5* (50,5% vs 36,0%), e ainda um gene inibidor, o *KIR2DL5* (77,9% vs 56,4%). Por

estarem presentes em maior número no grupo dos indivíduos que contraíram a doença, estes dados sugerem que os referidos genes representam possíveis fatores de susceptibilidade à infecção pelo vírus do dengue. Contudo, após a correção de Bonferroni para múltiplas comparações, apenas o valor de  $P$  encontrado para o gene *KIR2DL5* ( $P_c = 0,0105$ ) se manteve significativo, havendo a necessidade de estudos mais amplos para confirmar essas observações.

O estudo de Wauquier et al. (2010) aponta que os genes ativadores *KIR2DS1* e *KIR2DS3* estão associados a casos fatais de indivíduos infectados com o vírus Ebola (*Zaire ebolavirus*), causador de uma severa febre hemorrágica em humanos e primatas. De maneira semelhante, o gene *KIR2DS1* foi relacionado com a susceptibilidade à psoríase vulgar, doença de etiologia auto-imune, mas também foi encontrado exercendo um efeito protetor contra o aborto espontâneo e o desenvolvimento de Linfoma de Hodgkin (Luszczek et al. 2004; Hiby et al. 2008; Besson et al. , 2007). Ainda no que se refere à psoríase, autores japoneses relataram que além do gene *KIR2DS1*, a presença do gene inibidor *KIR2DL5* pode também estar envolvida com o desenvolvimento desta doença (Suzuki et al. 2004). Sobre o gene *KIR2DS3*, sua frequência encontra-se significativamente diminuída entre os pacientes com poliangeíte microscópica, uma forma de vasculite sistêmica de pequenos vasos (Miyashita et al. 2006).

Estes mesmos genes podem ainda ter alguma relação com a susceptibilidade ou proteção ao vírus da hepatite B. Zhi-Ming et al. (2007) sugeriram que o gene *KIR2DS3* favorece a infecção pelo vírus, induzindo uma reação inflamatória persistente e hepatite crônica. Por outro lado, os genes *KIR2DS1* e *KIR2DL5* podem estar contribuindo de alguma forma na proteção contra o vírus causador da hepatite B. O extenso polimorfismo dos genes *KIR* pode sugerir a possibilidade de efeitos pleiotrópicos em diferentes doenças, isto é, um gene *KIR* que confere proteção contra uma doença pode predispor à outra (Carrington and Norman 2003).

Receptores *KIR* ativadores que estimulam secreção de citocinas e lise das células-alvo pelas células NK, geralmente, são benéficos na resposta às doenças infecciosas e tumores. No entanto, estas doenças têm uma variedade de etiologias e, a ativação imune não é necessariamente benéfica em todas as fases do processo da doença. Genótipos *KIR* que conferem forte ativação podem aumentar o risco de desenvolver tumores associados com inflamação localizada, como é o caso do câncer cervical, e também estão relacionados à patogênese das doenças auto-imunes (Bashirova et al. 2006). No dengue, essa forte ativação poderia levar ao desenvolvimento das formas mais graves, pois a resposta imunológica gerada contra o vírus desencadeia uma complexa indução de citocinas e de outros mediadores químicos que atuam sinergicamente no aumento da permeabilidade vascular e no consumo dos fatores de coagulação, resultando nos quadros hemorrágicos.

Os genes *KIR* também foram analisados simultaneamente na presença dos seus respectivos ligantes HLA, pois, os genes *HLA* de classe I estão localizados no cromossomo 6, desvinculados dos genes *KIR* que se encontram no cromossomo 19. Isso significa que a herança e expressão desses dois grupos de genes são fisicamente independentes um do outro. Somando-se a isso, a alta especificidade de *KIR* por determinados alótipos *HLA* pode aumentar a possibilidade de um indivíduo expressar moléculas *KIR* para as quais o ligante não está presente ou vice-versa, resultando em uma situação funcionalmente nula, ou seja, a falta de sinalização (Kulkarni et al. 2008). Neste estudo, o gene ativador *KIR2DS1*, que isoladamente teve sua frequência aumentada em relação aos controles, manteve esta diferença quando analisado na presença de seu ligante HLA-C do grupo 2 (42,1% vs 25,6%), fortalecendo a possibilidade do seu envolvimento no curso da infecção por dengue. Os ligantes de *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR2DL5*, cujos genes também tiveram suas frequências aumentadas entre os pacientes, ainda não foram identificados.

A interação do gene ativador *KIR3DS1* com moléculas HLA-Bw4 também demonstrou associação positiva com o dengue, exibindo maior frequência no grupo de pacientes (38,9 vs 26,1%). *KIR3DL1* e *KIR3DS1* segregam como alelos do mesmo *locus* e compartilham cerca de 97% de similaridade na sequência de seus domínios extracelulares, sugerindo que os receptores codificados por estes genes tenham ligantes semelhantes. Moléculas HLA-Bw4 foram identificadas como ligantes para receptores *KIR3DL1* (Carr et al. 2005). Por este motivo, o gene *KIR3DS1* também foi analisado na presença de *HLA-Bw4*.

Bashirova et al. (2006) relataram que o receptor ativador *KIR3DS1* foi encontrado com uma frequência significativamente maior nos casos de câncer cervical, um tumor fortemente relacionado ao vírus do papiloma humano (HPV), em comparação com controles saudáveis. Estes autores acreditam que os genótipos com um perfil de ativação estejam associados com um risco aumentado de desenvolvimento do câncer de colo do útero, em consequência da vigorosa resposta imune gerada contra a infecção pelo HPV, mediada pelas células NK ativadas. Por outro lado, a presença de *KIR* ativadores têm se mostrado benéfica em uma série de doenças infecciosas (Martin et al. 2002; Kakhoo et al. 2004; López-Vazquez et al. 2005), pois as células NK ativadas atuam no sentido de combater as células infectadas. O par *KIR3DS1*-Bw4 gera efeitos como a progressão tardia da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a resolução da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV).

Os genes inibidores *KIR2DL1* e *KIR2DL3* apresentaram diferenças significativas entre os grupos. *KIR2DL1* é de alta frequência na população com descendência europeia e estava presente em mais de 98% dos indivíduos que participaram deste estudo. Desta forma, a presença ou ausência dos seus ligantes HLA-C do grupo 2 é que

determina o significado funcional desses receptores KIR nesses indivíduos. Esse grupo de ligantes mostrou uma frequência significativamente maior nos indivíduos que desenvolveram dengue (76,8% vs 62,2%), sugerindo associação positiva com o dengue (Tabela 2). A respeito dessa interação, um relato de caso único sugere que a forte inibição exercida pelo par *KIR2DL1-C2*, quando toda a população de células *NK* expressa esse receptor, pode estar ligada a casos de infecção recorrente pelo citomegalovírus (CMV), um vírus pertencente à família do herpesvírus. Neste caso, o sinal inibidor atua incapacitando a atividade das células *NK* e impedindo as células de montarem uma resposta protetora ao citomegalovírus (Gazit et al. 2004).

A homozigotidade para alelos do grupo *C1* na presença do gene inibidor *KIR2DL3* (*KIR2DL3-C1/C1*) mostrou maior frequência no grupo controle (16,8% vs 33,1%), indicando uma associação negativa com o dengue. Essa mesma interação foi observada favorecendo a resolução da infecção nos portadores de hepatite C (Kakhoo et al. 2004). De acordo com Vilches and Parham (2002), a ativação das células *NK* e células T pode ser regulada por um desses dois mecanismos: a presença de sinalização através dos receptores de ativação em uma grande proporção de células efetoras (por exemplo, haplótipos *KIR* que contêm muitos receptores ativadores) ou presença da combinação receptor inibidor-ligante que emite sinais inibidores relativamente fracos. Complementando, Bashirova et al. (2006) relataram que a afinidade de ligação do *KIR2DL3* por alótipos *HLA-C1* é menor do que a do *KIR2DL2* e *KIR2DL1* para seus respectivos ligantes, resultando na transmissão de sinais inibidores mais fracos à célula efetora, sugerindo que a inibição das células *NK* é importante na determinação da imunidade antiviral e que respostas inibidoras diminuídas podem conferir proteção contra a doença.

Os haplótipos *KIR* associam-se aleatoriamente para formar os genótipos *KIR* que são herdados geneticamente (Uhrberg et al. 1997). Quanto aos genótipos de *KIR*, foram observadas frequências significativamente aumentadas do genótipo AA no grupo dos controles (14,7% vs 29,7%) e dos genótipos AB/BB no grupo de pacientes (85,3% vs 70,3%). Estes dados corroboram com os achados do estudo de Wauquier et al. (2010), no qual o perfil AA foi mais frequente no grupo dos sobreviventes e dos controles quando comparados aos casos fatais em consequência da infecção pelo Ebola. Baseado nesses fatos, um repertório de *KIR* inibidor, representado aqui pelo genótipo AA, pode estar conferindo ao indivíduo um efeito protetor contra tais infecções.

Muitas das características clínicas da infecção por dengue se devem à resposta imune do paciente gerada na tentativa de combater a doença, a qual é extremamente variável entre os indivíduos. Desse modo, um indivíduo portador de um repertório *KIR* primordialmente ativador, ou seja, haplótipo B, possivelmente irá desenvolver uma resposta inflamatória mais agressiva, podendo então desenvolver a doença em suas variadas formas clínicas.

Outra observação pertinente diz respeito à diferença significativa encontrada na frequência do gene inibidor *KIR2DL5* entre pacientes e controles. Este gene encontra-se presente apenas no haplótipo B, pois o haplótipo A é fixo em termos de conteúdo genético, o qual não inclui o *KIR2DL5*. Portanto, é possível que a frequência aumentada deste gene nos pacientes ocorra devido à maior quantidade de haplótipos B dentro desse grupo, não apresentando, necessariamente, algum tipo de associação com a doença.

### **Conclusão**

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem a existência de predisposição genética para o dengue clássico na população do sul do Brasil, devido à observação de associações positivas de determinados genes *KIR* e seus ligantes HLA de classe I com o desenvolvimento do dengue. Apesar da patogênese do dengue ser complexa e multifatorial, um maior entendimento dos fatores genéticos que contribuem para desenvolvimento da doença poderia ajudar a definir mais claramente as populações de risco à doença e às formas mais graves do dengue. Assim, sugerimos futuros estudos envolvendo a análise da gravidade da imunopatogênese do dengue com relação aos genes *KIR* e seus ligantes.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a todos os voluntários que fizeram parte desse estudo, ao Professor Rafael Campos Bezerra e também ao Hemocentro Regional de Maringá pelo auxílio nas coletas de amostras dos controles, ao Fabiano Cavalcante de Melo e ao Marco Antônio Braga pela assistência técnica com as genotipagens HLA. Este estudo recebeu suporte financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e do Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá.

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram que não têm conflito de interesses.

### **References**

Alter G, Martin MP, Teigen N, Carr WH, Suscovich TJ, Schneidewind A, Streeck H, Waring M, Meier A, Brander C, Lifson JD, Allen TM, Carrington M, Altfeld M (2007) Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med* 204: 3027-3036.

- Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, Cheng NW, Parham P, Davis DM, Riley EM (2003) Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol* 171: 5396-5405.
- Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW, Carrington M (2006) The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7: 277-300.
- Besson C, Roetynck S, Williams F, Orsi L, Amiel C, Lependeven C, Antoni G, Hermine O, Brice P, Ferme C, Carde P, Canioni D, Brière J, Raphael M, Nicolas JC, Clavel J, Middleton D, Vivier E, Abel L (2007) Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's lymphoma in a familial study. *PLoS One* 2: e406.
- Cardozo DM, Guelsin GA, Clementino SL, Melo FC, Braga MA, Souza C, Moliterno RA, Visentainer JEL (2009) Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 651-656.
- Carr WH, Pando MJ, Parham P (2005) KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol* 175: 5222-5229.
- Carrington M, Norman P (2003) The KIR gene cluster. US Natl Library Med. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono\\_003/ch1d1.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono_003/ch1d1.pdf). Acessado em 26 de março de 2010.
- Carrington M, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M, Cheng J, Herrero R, Rodriguez AC, Kurman R, Mortel R, Schwartz P, Glass A, Hildesheim A (2005) Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med* 201: 1069-1075.
- Figueiredo LTM, Fonseca BAL (2002) Dengue. In: Veronesi R, Focaccia R (eds) *Tratado de infectologia*, 2 ed. Atheneu, Rio de Janeiro, pp 204-217.
- Franceschi DAS, Mazini OS, Rudnick CCC, Sell AM, Tsuneto LT, Melo FC, Braga MA, Peixoto PRF, Visentainer JEL (2008) Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotypes and leprosy in Brazil. *Tissue Antigens* 72: 478-482.
- Gazit R, Garty BZ, Monselise Y, Hoffer V, Finkelstein Y, Markel G, Katz G, Hanna J, Achdout H, Gruda R, Gonen-Gross T, Mandelboim O (2004) Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome. *Blood* 103: 1965-1966.

- Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanarroj S, Nimmannitya S, Nisalak A, Kurane I, Lrothman A, Ennis FA (1999) Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 180: 1429-1435.
- Guzman MG, Kouri G (2003) Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 27: 1-13.
- Halstead SB (1970) Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Yale J Biol Med* 42: 350-360.
- Hiby SE, Regan L, Lo W, Farrell L, Carrington M, Moffett A (2008) Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 23: 972-976.
- John SWM, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR (1990) A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocyte. *Nucleic Acids Res* 19: 408-408.
- Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M (2004) HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305: 872-874.
- Kulkarni S, Martin MP, Carrington M (2008) The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol* 20: 343-352.
- Lahiri DK, Nurnberger JI Jr (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19: 5444-5444.
- Long EO, Rajagopalan S (2000) HLA class I recognition by killer cell Ig-like receptors. *Semin Immunol* 12: 101-108.
- López-Vazqu ez A, Rodrigo L, Martínez-Borra M, Pérez R, Rodríguez M, Fdez-Morera JL, Fuentes D, Rodríguez-Rodero S, Gonzalez S, Lopez-Larrea C (2005) Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with Hepatitis C Virus infection. *J Infect Dis* 192: 162-165.
- Luszczek W, Manczak M, Cislo M, Nockowski P, Wisniewski A, Jasek M, Kusnierczyk P (2004) Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol* 65: 758-766.

- Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M (2002) Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Gen* 31: 429-434.
- Martin MP (2004) Tipagem de genes KIR e sua aplicação em estudos de populações, associação com doenças e transplantes. In: VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea, Curitiba.
- Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME (2009) Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clin Microbiol Rev* 22: 564-581.
- Méndez A, Granda H, Meenagh A, Contreras S, Zavaleta R, Mendoza MF, Izquierdo L, Sarmiento ME, Acosta A, Middleton D (2006) Study of KIR genes in tuberculosis patients. *Tissue Antigens* 68: 386-389.
- Miyashita R, Tsuchiya N, Yabe T, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K (2006) Association of killer cell immunoglobulinlike receptor genotypes with microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum* 54: 992-997.
- Momot T, Koch S, Hunzelmann N, Krieg T, Ulbricht K, Schmidt RE, Witte T (2004) Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum* 50: 1561-1565.
- Montes-Cano MA, Caro-Oleas JL, Romero-Gómez M, Diago M, Andrade R, Carmona I, Aguilar Reina J, Nunez-Roldan A, Gonzalez-Escribano MF (2005) HLA-C and KIR genes in hepatitis C virus infection. *Hum immunol* 66: 1106-1109.
- Naumova E, Mihaylova A, Stoitchkov K, Ivanova M, Quin L, Toneva M (2005) Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients: prevalence of inhibitory over activating signals. *Cancer Immunol Immunother* 54: 172-178.
- Parham P (2004) Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunol Lett* 92: 11-13.
- Pinheiro FP, Rosa JT (1996) Dengue. In: Veronesi R, Focaccia R (eds) *Tratado de Infectologia*. Atheneu, São Paulo, pp 201-214.
- Pontes RJS, Netto AR (1994) Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. *Rev Saúde Publica* 28: 218-227.
- Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, Dalalio MMO, Visentainer JE, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML (2000) HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. *Hum Biol* 72: 597-617.

- Rosen L (1986) La pathogénèse de la dengue hemorrhagique: discussion critique des hypothèses Actuelles. Bull Soc Pathol 79: 342-349.
- Rudnick CCC, Guelsin GAS, Marangon AV, Franceschi DAS, Sell AM, Visentainer JEL (2010) Otimização de metodologia para o estudo de genes KIR. J Bras Patol Med Lab 46: 215-224.
- Schatzmayer HG (2000) Dengue situation in Brazil by year 2000. Mem Inst Oswaldo Cruz 95: 179-181.
- Silva LJ, Richtmann R (2006) Vacinas em desenvolvimento: estreptococo do grupo B, herpes-zóster, HIV, malária e dengue. Jornal de Pediatria 82: 115-124.
- Suto Y, Ishikawa Y, Kasahara M, Kasai F, Yabe T, Akaza T, Juji T (1998) Gene arrangement of the killer cell inhibitory receptor family on human chromosome 19q13.4 detected by fiber-FISH. Immunogenetics 48: 235-241.
- Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y, Ishikawa K, Yoshikawa Y, Sasazuki T, Muto M (2004) Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. J. Invest. Dermatol 122: 1133-1136.
- Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier LL, Parham P (1997) Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. Immunity 7: 753-763.
- Uhrberg M, Parham P, Wernet P (2002) Definition of content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. Immunogenetics 54: 221-229.
- Vales-Gomez M, Reyburn H, Strominger J (2000) Molecular analyses of the interactions between human NK receptors and their HLA ligands. Hum Immunol 61: 28-38.
- Verheyden S, Bernier M, Demanet C (2004) Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukaemia. Leukemia 18: 2002-2007.
- Vilches C, Parham P (2002) KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. Annu Rev Immunol 20: 217-251.
- Zhi-Ming L, Yu-Lian J, Zhao-Lei F, Chun-Xiao W, Zhen-Fang D, Bing-Chang Z, Yue-Ran Z (2007) Polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptor gene: possible association with susceptibility to or clearance of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. Croat Med 6: 800-806.
- Wauquier N, Padilla C, Becquart P, Leroy E, Vieillard V (2010) Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in Ebola virus infection. Immunogenetics 62: 767-771.
- Whitehorn J, Farrar J (2010) Dengue. Br Med Bull 95: 161-173.

WHO (2009) Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization, Geneva. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf). Acessado em 10 de janeiro de 2010.

Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM, Goronzy JJ (2001) Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 193: 1159-1167.

**Tabela 1.** Comparação das frequências de genes *KIR* entre 95 pacientes com dengue e 172 controles de uma população da região sul do Brasil

Genes	Pacientes	Controles	<i>P</i>	<i>OR</i>	IC (95%)
	N = 95 n (%)	N = 172 n (%)			
<i>KIR2DL1</i>	94 (98,9)	170 (98,8)			
<i>KIR2DL2</i>	66 (69,5)	97 (56,4)			
<i>KIR2DL3</i>	80 (84,2)	150 (87,2)			
<i>KIR2DL4</i>	95 (100)	172 (100)			
<i>KIR2DL5</i>	74 (77,9)	97 (56,4)	0,0007 <sup>a</sup>	2,72	1,54 – 4,82
<i>KIR3DL1</i>	90 (94,7)	158 (91,9)			
<i>KIR3DL2</i>	95 (100)	172 (100)			
<i>KIR3DL3</i>	95 (100)	172 (100)			
<i>KIR2DS1</i>	53 (55,8)	70 (40,7)	0,0251 <sup>b</sup>	1,84	1,11 – 3,05
<i>KIR2DS2</i>	65 (68,4)	96 (55,8)			
<i>KIR2DS3</i>	45 (47,4)	58 (33,7)	0,0392 <sup>c</sup>	1,77	1,06 – 2,95
<i>KIR2DS4</i>	90 (94,7)	156 (90,7)			
<i>KIR2DS5</i>	48 (50,5)	62 (36,0)	0,0299 <sup>d</sup>	1,81	1,09 – 3,01
<i>KIR3DS1</i>	50 (52,6)	71 (41,3)			
<i>KIR2DP1</i>	94 (98,9)	169 (98,2)			

*P* = Probabilidade do erro; *OR* = Odds Ratio, *IC* = Intervalo de confiança, *N* = número total de indivíduos, *n* = número de genes. <sup>a</sup>*P*<sub>c</sub> = 0,0105; <sup>b</sup>*P*<sub>c</sub> = 0,3765; <sup>c</sup>*P*<sub>c</sub> = 0,588 e <sup>d</sup>*P*<sub>c</sub> = 0,4485.

**Tabela 2.** Comparação das frequências dos ligantes HLA de classe I entre 95 pacientes com dengue e 172 controles de uma população da região sul do Brasil

Ligante	Pacientes	Controles	<i>P</i>	<i>OR</i>	IC (95%)
	N = 95 n (%)	N = 172 n (%)			
<i>A3 e/ou A11</i>	33 (34,7)	44 (25,6)			
<i>Bw4</i>	66 (69,5)	106 (61,6)			
<i>C1</i>	70 (73,7)	144 (83,7)			
<i>C2</i>	73 (76,8)	107 (62,2)	0,0211	2,02	1,14 – 3,56
<i>C1/C1</i>	22 (23,1)	65 (37,8)	0,0211	0,50	0,28 – 0,88
<i>C2/C2</i>	25 (26,3)	28 (16,3)			

*P* = probabilidade do erro, *OR* = Odds Ratio, *IC* = Intervalo de confiança, *N* = número total de indivíduos, *n* = número de ligantes.

*Bw4* = *HLA-B\*13, \*17, \*27, \*37, \*38, \*44, \*47, \*49, \*51, \*52, \*53, \*57, \*58*

*Grupo C1* = *HLA-C\*01, \*03, \*07, \*08, \*12, \*13, \*14, \*16*

*Grupo C2* = *HLA-C\*02, \*04, \*05, \*06, \*15, \*17, \*18*

**Tabela 3.** Comparação das frequências dos genes *KIR* na presença dos seus respectivos ligantes HLA entre 95 pacientes com dengue e 172 controles de uma população da região sul do Brasil

<i>KIR</i> -ligante	Pacientes	Controles	<i>P</i>	<i>OR</i>	IC (95%)
	N = 95 n (%)	N = 172 n (%)			
<i>2DL1 – C2</i>	72 (75,8)	107 (62,2)	0,0337	1,90	1,08 – 3,33
<i>2DL1 – C2/C2</i>	25 (26,3)	28 (16,3)			
<i>2DL2 – C1</i>	50 (52,3)	81 (47,1)			
<i>2DL2 – C1/C1</i>	18 (18,9)	37 (21,5)			
<i>2DL3 – C1</i>	58 (61,0)	126 (73,2)			
<i>2DL3 – C1/C1</i>	16 (16,8)	57 (33,1)	0,0066	0,41	0,22 – 0,76
<i>3DL2 – A3/I1</i>	33 (34,7)	44 (25,6)			
<i>3DL1 – Bw4</i>	63 (66,3)	97 (56,4)			
<i>2DS1 – C2</i>	40 (42,1)	44 (25,6)	0,0081	2,12	1,24 – 3,60
<i>2DS2 – C1</i>	50 (52,3)	79 (45,9)			
<i>3DS1 – Bw4</i>	37 (38,9)	45 (26,1)	0,0424	1,80	1,05 – 3,07

*P* = probabilidade do erro, *OR* = Odds Ratio, *IC* = Intervalo de confiança, *N* = número total de indivíduos, *n* = número de *KIR*-ligantes.

*Bw4* = *HLA-B\*13, \*17, \*27, \*37, \*38, \*44, \*47, \*49, \*51, \*52, \*53, \*57, \*58*

*Grupo C1* = *HLA-C\*01, \*03, \*07, \*08, \*12, \*13, \*14, \*16*

*Grupo C2* = *HLA-C\*02, \*04, \*05, \*06, \*15, \*17, \*18*

**Tabela 4.** Comparação das frequências dos genótipos *KIR* entre 95 pacientes com dengue e 172 controles de uma população da região sul do Brasil

Genótipos	Pacientes	Controles	<i>P</i>	<i>OR</i>	IC (95%)
	N = 95 n (%)	N = 172 n (%)			
AA	14 (14,7)	51 (29,7)	0,0102	0,41	0,21 – 0,79
AB/BB	81 (85,3)	121 (70,3)	0,0102	2,44	1,27 – 4,69

*P* = probabilidade do erro, *OR* = Odds Ratio, IC = Intervalo de confiança, N = número total de indivíduos, n = número de genótipos.

GENÓTIPO		Genes <i>KIR</i>														Pacientes (N=95)		Controles (N=172)	
		<i>2DL1</i>	<i>2DL2</i>	<i>2DL3</i>	<i>2DL4</i>	<i>2DL5</i>	<i>3DL1</i>	<i>3DL2</i>	<i>3DL3</i>	<i>2DS1</i>	<i>2DS2</i>	<i>2DS3</i>	<i>2DS4</i>	<i>2DS5</i>	<i>3DS1</i>	<i>2DPI</i>	n	%	n
1	AA															14	14.7%	51	29.6%
2	AB/BB															15	15.7%	21	12.2%
3																12	12.6%	13	7.6%
4																9	9.4%	9	5.2%
5																11	11.5%	8	4.6%
6																6	6.3%	22	12.8%
7																4	4.2%	7	4.1%
8																4	4.2%	0	0%
9																0	0%	1	0.6%
10																1	1%	0	0%
11																0	0%	1	0.6%
12																0	0%	1	0.6%
13																1	1%	2	1.2%
14																0	0%	1	0.6%
15																0	0%	1	0.6%
16																4	4.2%	4	2.4%
17																6	6.3%	7	4.1%
18															2	2.1%	5	2.9%	

19																1	1%	1	0.6%
20																1	1%	3	1.7%
21																1	1%	2	1.2%
22																1	1%	0	0%
23																0	0%	1	0.6%
24																0	0%	0	0%
25																1	1%	2	1.2%
26																1	1%	1	0.6%
27																0	0%	1	0.6%
28																0	0%	1	0.6%
29																0	0%	1	0.6%
30																0	0%	1	0.6%
31																0	0%	1	0.6%
32																0	0%	1	0.6%
33																0	0%	1	0.6%
34																0	0%	1	0.6%

**Figura 1.** Genótipos *KIR* e suas frequências em 95 pacientes com dengue e 172 controles da região sul do Brasil. Os retângulos preenchidos representam a presença do gene.

N = número total de indivíduos; n = número de determinado genótipo.

## CAPÍTULO III

### CONCLUSÕES

Neste estudo, as comparações das frequências de genes *KIR* e de seus ligantes HLA de classe I entre um grupo de indivíduos que desenvolveu dengue e um grupo controle permitiram algumas conclusões:

- ✓ Uma possível associação positiva dos genes *KIR2DL5* e *KIR2DS1* com o desenvolvimento do dengue;
- ✓ Associação positiva das interações entre *KIR3DL1/3DS1* com ligantes HLA-B do grupo de alelos Bw4;
- ✓ Associação positiva do gene ativador *KIR2DS1* na presença do ligante HLA-C2;
- ✓ Associação negativa do gene inibidor *KIR2DL3-C1/C1* com o dengue, representando um possível fator de resistência à infecção pelo vírus do dengue;
- ✓ Com relação aos genótipos de *KIR*, uma associação negativa com o dengue foi observada na distribuição da frequência do genótipo AA entre os grupos estudados, sugerindo um possível fator de resistência contra a evolução do dengue em suas formas mais graves.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo avaliou a influência de genes *KIR* e de seus ligantes HLA de classe I na susceptibilidade ou resistência à infecção pelo vírus do dengue em uma população da região sul do Brasil. A perspectiva se traduz na continuidade de pesquisas nessa área com o recrutamento de um maior número de indivíduos para formar os grupos de pacientes e controles, a fim de que se possa confirmar ou redefinir os resultados obtidos nesse estudo.

Que este estudo possa servir de referência para futuras investigações da resposta imunológica em casos de dengue hemorrágico e síndrome de choque do dengue, pois um maior entendimento sobre a contribuição destes fatores genéticos no desenvolvimento da doença poderia ajudar a definir mais claramente as populações de risco.

Além disso, a genotipagem *HLA* de alta resolução do *locus* C permitirá definir melhor a influência dos ligantes de receptores *KIR* na ativação e/ou inibição das células NK no desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro.

**ANEXOS**



## Universidade Estadual de Maringá

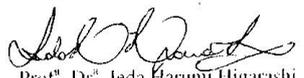
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

Registrado na CONEP em 10/02/1998

PRO N.º 0113-03

PARECER N.º 018/2007

<b>Pesquisador(a) Responsável:</b> Jeane Eliete Laguilá Visentainer	
<b>Centro/Departamento:</b> Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Análises Clínicas	
<b>Título do projeto:</b> Influência de polimorfismos de citocinas na susceptibilidade ao dengue.	
<p><b>Considerações:</b></p> <p>O projeto aprovado neste comitê em outubro de 2003 (parecer 113/2003-COPEP), quando o pesquisador pretendia trabalhar com 300 sujeitos, 100 que desenvolveram dengue entre 1995 e 2003 e 200 saudáveis. O objetivo geral era investigar a influência de alelos de genes reguladores de citocinas na susceptibilidade e/ou resistência ao dengue, na nossa região. Em dezembro de 2006 a pesquisadora encaminha a este comitê emenda ao projeto acima, solicitando alteração do título, que passaria a ser: "Influência de polimorfismo de genes de resposta imune na susceptibilidade ao dengue"; Alteração do número de sujeitos de 100 para 300 e aumentando o número de genes a serem tipados.</p> <p>Uma nova folha de rosto foi encaminhada, pertence ao modelo antigo (anterior ao sistema SISNEP), com um número de sujeitos igual a 300. Entretanto a nova versão da metodologia encaminhada apresenta um número de 400 sujeitos, sendo 200 que desenvolveram dengue entre 1995 e 2003 (mesmo período do anterior) e 200 sujeitos saudáveis para controle.</p> <p>Uma nova versão do termo de consentimento foi encaminhada, descrita conforme as recomendações da Resolução 196/96-CNS/MS item IV, com exceção do item assistência, onde foi definida a "Universidade Estadual de Maringá" como responsável pela assistência aos riscos relacionados à coleta de sangue. Também foi encaminhado um novo cronograma, onde se observou que a duração do projeto será de 24 meses, começando em julho de 2006 e um período de coleta de amostras previsto para janeiro e fevereiro do presente ano.</p> <p>Em relação aos gastos com o aumento do número de sujeitos nada foi mencionado já que uma nova planilha orçamentária não foi apresentada.</p> <p>O atraso para o início do projeto foi justificado pela "dificuldade em conseguir as amostras de sangue dos pacientes".</p> <p><b>Parecer:</b></p> <p>De acordo com o acima exposto somos de parecer pela aprovação da emenda ao projeto acima intitulado desde que o pesquisador nos encaminhe as seguintes adequações:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Esclarecimento em relação ao número de sujeitos envolvidos na coleta;</li> <li>2) Esclarecimentos em relação à assistência a ser executada pela UEM no caso de problemas durante a coleta sanguínea;</li> <li>3) Apresentação da nova planilha orçamentária.</li> </ol>	
<b>Situação:</b> APROVADO COM RECOMENDAÇÃO	
CONEP: ( X ) para registro ( ) para análise e parecer      Data: 16/02/2007	
<b>O pesquisador deverá apresentar Relatório Final para este Comitê em:</b> 30/08/2008	
A emenda ao protocolo foi apreciada de acordo com a Resolução nº. 196/96 e complementares do CNS/MS, na 128ª reunião do COPEP em 16/02/2007.	 Prof.ª Dr.ª Ieda Harumi Higarashi Presidente do COPEP

Em suas comunicações com esse Comitê cite o número de registro do seu CAAE.  
 Bloco 10 sala 01 - Avenida Colombo, 5790 - CEP 87000-900 - Maringá - PR  
 Fone-Fax: (41) 3761-4441 - e-mail: coep@uem.br

## FICHA CADASTRAL

Projeto de Pesquisa: **INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE GENES DE RESPOSTA IMUNE NA SUSCEPTIBILIDADE AO DENGUE**

### Dados cadastrais

Nome:.....

Data de Nascimento:.....Cidade/Estado onde nasceu:...../.....

Endereço:.....,nº:.....Cidade:.....Estado:.....

CEP:.....Complemento:.....

Telefone (residencial):.....Telefone (trabalho):.....

Telefone de contato (vizinho ou parente):.....

Grupo étnico (assinale um quadro abaixo):

Branco     Negro     Mulato (Branco x Negro)     Oriental     Oriental x Branco

Índio     Outros:.....

Atividade profissional:.....Empresa:.....

Principais atividades desenvolvidas nos últimos anos:.....

Fumante

Diabético

Histórico familiar de Diabetes

### Dados clínicos

Forma clínica da doença:.....

Data do diagnóstico da doença:.....

Data do início do tratamento:.....Medicamentos:.....

Exames utilizados no diagnóstico da doença e das formas clínicas:.....

Médico responsável:.....

Responsável pelo preenchimento da ficha cadastral:.....

Data:.....

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO  
NO ESTUDO:**

**“INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE GENES DE RESPOSTA IMUNE NA  
SUSCEPTIBILIDADE AO DENGUE”**

**Justificativas, objetivos e procedimentos:**

O objetivo principal deste estudo é definir se determinados genótipos HLA, citocinas, KIR, MICA e MICB poderiam influenciar na ocorrência do dengue em nossa região. Poderá servir também para prever quem desenvolverá a forma mais grave da doença.

Este estudo será realizado com uma técnica de Biologia Molecular usando o material contido em células do sangue. Desta forma, uma amostra de 10 mL (pouco mais de duas colheres de sopa) de sangue será obtida por punção da veia do braço.

**Desconforto e riscos:**

O desconforto se relaciona somente à picada da agulha, que pode gerar um leve ardor no local da coleta. A coleta será feita com agulha e seringa descartáveis, sem risco de contaminação para o participante.

**Benefícios esperados:**

Se for confirmado que determinados genes de citocinas influenciam no desenvolvimento do dengue, este exame poderá ser usado para o diagnóstico e/ou prognóstico desta doença.

**Métodos alternativos existentes:**

Não existem outros métodos de realização de genotipagem de citocinas disponíveis.

**Assistência:**

Não existem riscos para o participante deste estudo, pois a coleta de sangue é simples e será realizada por um técnico de laboratório e/ou bioquímico responsável.

**Privacidade:**

O coordenador do projeto garante que os dados do participante serão mantidos em segredo e o seu nome não será exposto nas conclusões ou publicações do estudo.

**Formas de ressarcimento e Indenização:**

O participante não terá despesas na realização deste exame e a sua participação será voluntária, ou seja, não haverá pagamento para o participante ou seu familiar.

**Liberdade de recusar ou retirar o consentimento:**

O participante ou seu responsável tem a liberdade de recusar ou retirar o consentimento a qualquer momento sem prejuízo ao seu cuidado.

**Destino das amostras:**

As amostras restantes serão armazenadas no laboratório e, para utilização futura, um novo termo de consentimento será solicitado ao participante após aprovação pelo Comitê de Ética.

**Esclarecimentos:**

Qualquer esclarecimento sobre a pesquisa poderá ser dado pela coordenadora deste projeto (**Dra. Jeane E. L. Visentainer - Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Análises Clínicas - Laboratório de Imunogenética – Bloco I90 sala 102, Telefone: 44-3261-4847**).

**Estando ciente e de acordo com o contido neste documento:**

Eu, \_\_\_\_\_, (*responsável pelo menor, se for o caso*) após ter lido e entendido as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo com o Prof. Dr. \_\_\_\_\_, CONCORDO VOLUNTARIAMENTE, em participar do estudo (*ou que o meu filho, se for o caso*) \_\_\_\_\_ participe do mesmo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura (do participante ou seu responsável)

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Eu, Jeane Eliete Laguila Visentainer, responsável pelo projeto de pesquisa, declaro que prestei todas as informações aos responsáveis e comprometo-me a conduzir todas as atividades deste estudo de acordo com as normas da Resolução 196/96 CNS e complementares.**

Maringá, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Assinatura: \_\_\_\_\_