

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública

Ana Lisa do Vale Gomes

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM A
INDUÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA DA DENGUE:
IMPLICAÇÕES NO PROGNÓSTICO**

RECIFE
2011

Ana Lisa do Vale Gomes

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM A INDUÇÃO DA RESPOSTA IMUNE
INATA DA DENGUE: IMPLICAÇÕES NO PROGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a
obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientadores: Dra. Laura Helena Vega Gonzalves Gil
Dr. Carlos Eduardo Calzavara-Silva
Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Junior.

Recife
2011

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

G633 Gomes, Ana Lisa do Vale.
e Expressão de genes relacionados com a indução da
resposta imune inata da dengue: implicações no prognóstico/
Ana Lisa do Vale Gomes. — Recife: A. L. do Vale, 2011.
120 f.: il.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

Orientadores: Laura H. V. G. Gil, Carlos Eduardo
Calzavara-Silva, Ernesto T. A. Marques Jr.

1. Dengue. 2. Prognóstico. 3. Reação em Cadeia da
Polimerase. 4. Inteligência Artificial. I. Gil, Laura H. V. G. II.
Calzavara-Silva, Carlos Eduardo. III. Marques Jr., Ernesto T.
A. IV. Título.

CDU 616.92

ANA LISA DO VALE GOMES

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM A INDUÇÃO DA RESPOSTA IMUNE
INATA DA DENGUE: IMPLICAÇÕES NO PROGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a
obtenção do grau de doutor em Ciências

Aprovado em : 23/ fevereiro /2011.

BANCA EXAMINADORA

PhD Laura Helena Vega Gonzáles Gil (Orientadora)
CPqAM/FIOCRUZ

PhD Rita de Cássia de Carvalho Maia (Membro externo)
UFRPE

PhD Bartolomeu Acioli dos Santos (Membro externo)
CPqAM/FIOCRUZ

PhD Marli Tenório Cordeiro
(Membro externo)
Colaboradora - CPqAM/FIOCRUZ

PhD Fernando Buarque de Lima Neto (Membro externo)

AGRADECIMENTOS

Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Virologia e Terapia Experimental, CAPES, FACEPE, UFPE – CAV, UFRPE, UPE, National University of Singapore.

Aldenor Gomes, Ana do Vale, Mariana do Vale, Silvana Batista, Luiza, Edna Porto, Ana Maria Silva, Viviane Carvalho, Cássia Docena, Mariane, Sidney, Gil, Alan, fam'ilia Holder, Asif Khan, Nazo Khan, Tan Tin Wee, Jean Shen, Yongli, Andréa Rangel, Doris, Rita Maia, Dani, Cosme, Telissa, prof Roberto, Equipe LaViTE, Nilda Lima, Prof André Furtado, Dra Marli Cordeiro, Dr. Alfredo Arnobio, Thiego, Jefferson, Laura Gil, Carlos Calzavara, Ernesto Marques doutores da banca, pessoal da secretaria acadêmica, biblioteca e da fotoreprodução do CPqAM.

“...dengue is one disease entity with different clinical presentations and often with unpredictable clinical evolution and outcome...”

Organização Mundial de Saúde, 2009

GOMES, Ana Lisa do Vale. **Expressão de genes relacionados com a indução da resposta imune inata da dengue: implicações no prognóstico.** 2011. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

RESUMO

Estudos que buscam entender o porque de pacientes com dengue apresentarem diferentes prognósticos são de grande importância para a Saúde Pública. Baseado na teoria de que a resposta do sistema imune do hospedeiro frente a infecções pelo DENV tem influência no prognóstico da infecção, foram analisados e quantificados a expressão de genes em pacientes com diferentes formas clínicas da dengue. Essa tese apresenta seus resultados nos três artigos publicados. Nesse estudo, dentre os seis genes – relacionados com a resposta imune inata, analisados, três deles (MYD88, PDCD4, FCGR3B) apresentaram potencial para serem utilizados como classificadores dos pacientes com dengue. No segundo artigo, 28 pacientes (15 DF e 13 DHF) tiveram a expressão de 12 genes - relacionados com a via de indução da resposta imune inata antiviral, principalmente interferon – individualmente quantificados. Foi utilizado o método de inteligência computacional de predição Vetor de Suporte de Máquina para a classificação dos pacientes em DF e DHF. Os resultados destacaram MYD88 e TLR7 como os mais importantes (acurácia de ~89%) para a classificação entre DF e DHF; TLR9, RIG-I, IRF7, IFN- β , IFN- γ mostraram efeito negativo na classificação, já TLR3, MDA5, IRF3, CLEC5A, IFN- α separadamente não influenciaram na classificação, no entanto, quando analisados juntamente com MYD88 e TLR7 aumentaram a acurácia de classificação para ~96%. Destacando assim que os genes exercem influência entre si e dessa forma se tornam os melhores elementos para classificação dos pacientes. Finalizando a tese, o terceiro artigo apresenta a análise baseada nos dados do segundo artigo, de como cada genes poderia estar sendo influenciado pela infecção do vírus nos pacientes. Observamos que o DENV influencia mais de uma via intracelular na indução do IFN; não apenas através do TLRs, mas também genes citoplasmáticos como MDA5 e RIG-I. O presente trabalho buscou identificar genes com potencial de relevância no prognóstico da infecção por DENV e através de suas relações contribuir para o esclarecimento a cerca do prognóstico da dengue.

Palavras chaves: Dengue, Prognóstico, Reação em Cadeia da Polimerase, Inteligência Artificial.

.

GOMES, Ana Lisa do Vale. **Expression of related genes with innate immune response on dengue: prognosis implication.** 2011. Thesis (Doctorate in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

ABSTRACT

Studies which objectives is understood why dengue patients have different prognosis are relevant for Public Health. Based on the theory that prognosis of DENV infection is influenced by immune system response, it was analysed and quantified gene expression in patients with different dengue clinical forms. This thesis presents your results in three papers. The results showed that among 6 genes –related with innate immune response – analysed, 3 of them (MYD88, PDCD4, FCGR3B) have potential to classify dengue patients. On the second paper, 12 genes – involved in the innate immune response (interferon type I) expression level were individually quantified from 28 patients (15 DF and 13 DHF). We established by taking the average of the expression values of each of the genes analysed for all the DF and DHF patients and then normalized to ND. The support vector machine (SVM) model was trained using gene expression data of these genes and achieved the highest accuracy of 85% with leave-one-out cross-validation. Through selective removal of gene expression data from the SVM model, we have identified seven genes (MYD88, TLR7, TLR3, MDA5, IRF3, IFN- and CLEC5A) that may be central in differentiating DF patients from DHF, with MYD88 and TLR7 observed to be the most important. We demonstrated that there are different gene expression patterns in patients with DF and DHF and also between primary and secondary dengue infection stages. We show differential gene expression patterns between DF and DHF: RIG-I, TLR3, IRF3, IFN- α , IFN- β and IFN- γ were upregulated in DF patient samples, while only TLR7, TLR9, MDA5, and MYD88 were upregulated in DHF. Additionally, TLR7, TLR9, MYD88, IRF3, IFN- α and IFN- γ could be used to study the difference between primary and secondary infection. The present study main objective was identify through gene expression how genes related to innate immune response could influence in DENV infected patients prognosis and provide insights to better understand the role of the initial events of innate immunity in the defense and development of dengue infection.

Keywords: Dengue, Prognosis, Polimerase Chain Reaction, Artificial Inteligence

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A e B	Estrutura dos <i>Flavivirus</i>	14
Figura 2	Pirâmide representando infecção pelo vírus e distribuição dos casos de dengue.....	19
Figura 3	Esquema sobre diferentes formas de manifestações na infecção do vírus da dengue.	20
Figura 4	Adaptação do modelo de classificação da dengue sugerido pela OMS em 2009.....	22
Figura 5	Interface das contribuições biológicas do humano, mosquito e do vírus no aspecto clínico e geográfico da distribuição da dengue.....	25
Figure 6	Via dos receptores Toll like e os genes envolvidos na cadeia de ativação.....	28
Figura 7	Curso da infecção da dengue e tempo de diagnóstico.....	32
Figura 8	Representação sobre a detecção de IgG e IgM em infecções primárias e secundárias.....	34
Figura 9	Curva de amplificação de uma reação de qPCR.....	38
Figura 10	Sonda em haste.....	41
Figura 11A e B	Curva de dissociação.....	42
Figura 12	Esquema demonstrativo com o funcionamento da sonda tipo TaqMan.....	45
Figura 13	Mapeamento do espaço de entrada via função Kernel.....	55
Figura 14	Esquema de classificação utilizando SVM.....	56
Figura 15	Possíveis hiperplanos.....	56
Figura 16	Hiperplano de separação.....	57
Figura 17	Esquema representativo da sonda tipo TaqMan utilizada no estudo.	68
Figura 18	Valores da acurácia para função kernel linear, RBF e sigmóide com valores das variáveis C, G, e R.	72

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....		
1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Vírus dengue.....	13
1.1.1	Replicação do vírus dengue.....	15
1.2	Aspectos epidemiológicos da dengue	15
1.3	Transmissão do vírus	17
1.3.1	Mosquito vetor.....	18
1.4	Classificação da dengue.....	18
1.4.1	Nova classificação da dengue.....	21
1.4.2	Teorias sobre o prognóstico da dengue.....	23
1.5	Resposta imune inata á infecção viral.....	25
1.5.1	Sistema imune inato – resposta via interferon.....	26
1.5.2	Primeiros alvos celulares do vírus da dengue.....	29
1.5.3	Resposta via interferon na infecção pelo DENV.....	30
1.6	Diagnóstico da infecção.....	31
1.6.1	Diagnóstico sorológico.....	33
1.6.2	Diagnóstico molecular e isolamento viral.....	35
1.7	PCR quantitativa em tempo real.....	36
1.7.1	Elementos da reação de qPCR.....	37
1.7.2	Curva de amplificação.....	37
1.7.3	Orientações para garantir a qualidade da reação de qPCR.....	39
1.7.4	Sistema de fluoróforos para qPCR.....	40
1.7.4.1	<i>Moléculas em haste.....</i>	40
1.7.4.2	<i>Corantes intercalantes: Sybr Green I e curva de dissociação.....</i>	41
1.7.4.3	<i>Sondas de hidrólise.....</i>	43
1.7.5	Controles da reação de qPCR.....	46
1.7.5.1	<i>Controle positivo, negativo e endógeno das reações.....</i>	47

1.7.6	Curva padrão.....	48
1.7.7	Vantagens e desvantagens da qPCR em relação à PCR.....	48
1.7.8	Tipos de quantificação.....	49
1.7.8.1	<i>Quantificação absoluta</i>	50
1.7.8.2	<i>Quantificação relativa</i>	50
1.8	Inteligência computacional	51
1.8.1	Aprendizado de máquina.....	52
1.8.2	Tipos de algoritmos de aprendizagem.....	53
1.8.3	Máquina de vetor de suporte.....	53
1.8.4	Função kernel.....	54
1.8.5	Hiperplano de separação.....	54
1.8.6	Aplicações da SVM	57
1.8.7	Limitações da aplicação de SVM no presente estudo.....	58
2	JUSTIFICATIVA	61
3	OBJETIVOS	61
3.1	Objetivo geral	61
3.2	Objetivos específicos	61
4	PERGUNTA CONDUTORA	62
5	HIPÓTESE	63
6	MATERIAS E MÉTODOS	64
6.1	Tipo de estudo	64
6.2	População de estudo	64
6.3	Amostras de sangue dos pacientes	64

6.4	Classificação dos pacientes.....	65
6.5	Separação das células mononucleares do sangue periférico.....	66
6.6	Purificação de RNA.....	66
6.7	Transcrição Reversa	67
6.8	PCR em tempo real.....	67
6.9	Análise Estatística.....	70
6.10	Implementação de Máquina de vetor de suporte.....	70
6.11	Codificação dos vetores.....	73
6.12	Matriz de SVM.....	73
6.13	Desenvolvimento modelo SVM.....	74
6.14	Considerações éticas.....	76
7	ARTIGOS.....	77
7.1	Artigo 1 – Early molecular markers predictive of dengue hemorrhagic fever.....	77
7.2	Artigo 2 – Classification of dengue fever patients based on gene expression data using support vector machines.....	85
7.3	Artigo 3 – Expression of genes involved in innate immune response pathway in dengue fever and hemorrhagic patients.....	93
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	109
	REFERÊNCIAS.....	112

Anexo A – Parecer da Comissão de ética em

120

Pesquisa/CPqAM/FIOCRUZ.....

APRESENTAÇÃO

Esta tese derivou dos resultados obtidos em um projeto maior, que visa o desenvolvimento de uma vacina contra dengue, intitulado “Vacina de dengue baseada em epítomos, tetravalente e direcionada ao compartimento MHCII”, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (CONEP) sob o número 4909, já em desenvolvimento no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental – LAViTE (FIOCRUZ-PE) sob a coordenação do Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Júnior. Nesse grande projeto, através da tecnologia de microarranjos de DNA, foram identificados diversos genes diferencialmente expressos em pacientes acometidos por dengue, dengue hemorrágica e de pacientes febris não infectados pelo vírus dengue. Tais genes despertaram nossa atenção devido à relação com a resposta imune inata do paciente frente à infecção pelo vírus. Diante disso e da afinidade acadêmica da pesquisadora Laura Helena Vega Gonzáles Gil em imunologia viral, surgiu a presente proposta de realizar um estudo, associado à bioinformática, sobre os genes envolvidos na ativação da resposta imune inata em células do sangue periférico dos pacientes que permitirá um melhor entendimento da patogenia da dengue e sua evolução clínica.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus dengue

O vírus da dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*) e está classificado em quatro sorotipos antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4.

Essa classificação em sorotipos é tradicionalmente baseada em suas características antigênicas, analisadas por testes como neutralização viral, imunofluorescência em cultura de células, por fixação de complemento e estudos de painéis de anticorpos monoclonais (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

O DENV é esférico, coberto por um envelope lipídico, apresenta nucleocapsídeo icosaédrico (aproximadamente 30 nanômetro de diâmetro) e seu genoma tem 10,2 kb sendo de RNA fita simples (ssRNA) com polaridade positiva (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). O genoma dos *Flavivirus* possui apenas uma fase aberta de leitura (*open reading frame – ORF*), codificando uma poliproteína (aproximadamente 3.400 aminoácidos), que origina três proteínas estruturais (envelope - E, capsídeo - C e membrana - M) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) sendo flanqueada por duas regiões não codificantes (5' e 3') (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). A ordem das proteínas que constituem a ORF do DENV é a seguinte: **Cap5'-C-pré-M-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'** (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; NAVARRO-SANCHES; DESPRÉS, CEDILLO-BARRÓN, 2007).

A proteína E é fundamental para a ligação e fusão viral no processo de entrada do vírus na célula, além de participar da montagem da partícula viral. Essa proteína apresenta atividade hemoaglutinante e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes e, por isso, é o maior determinante antigênico da partícula viral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Já a proteína M é uma pequena fração (8 kDa) originada a partir da clivagem proteolítica da precursora pré-M (pré-membrana – 22 kDa) durante a maturação viral. Esta clivagem precede a liberação do DENV da célula e resulta na reorganização da estrutura superficial do vírus para então expor o domínio de ligação do receptor E. A presença de pré-M parece ser necessária para

o correto dobramento da proteína E e acredita-se que proteja a proteína E da reorganização por pH e fusão prematura durante a secreção (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007) (Figura 1).

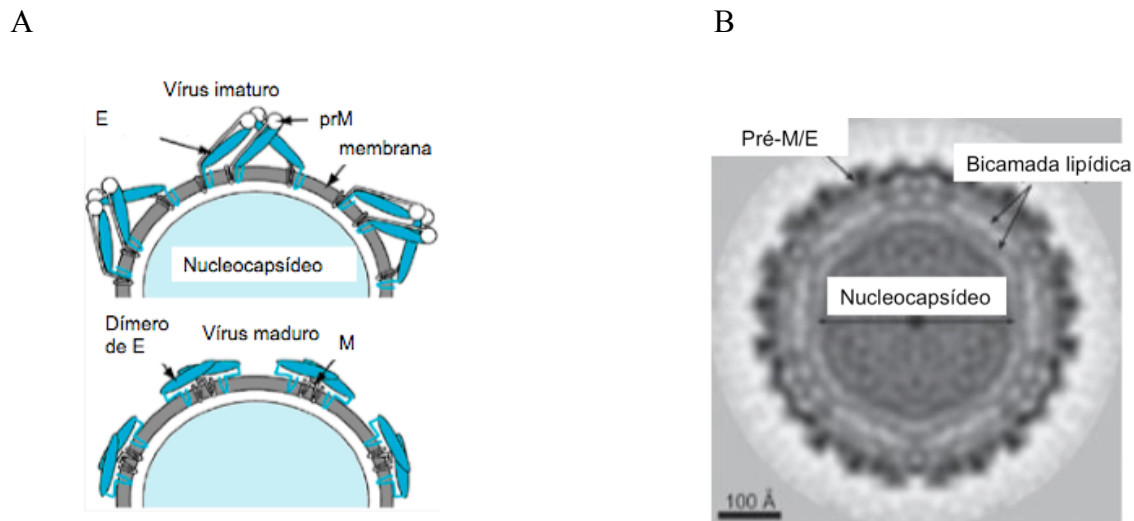


Figura 1A e B – Estrutura dos *Flavivirus*.

Fonte: SILVA, 2008

Nota 1A: Apresentando vírus imaturo e vírus maduro, destaque para formas de pré-M, M e da proteína E.

Nota 1B: Crio-eletron microscopia, identificando pré-M e E, bicamada lipídica e o nucleocapsídeo.

Já a proteína C é o primeiro polipeptídeo sintetizado e é capaz de interagir com o ssRNA viral. Essa proteína tem carga positiva devido à proporção dos aminoácidos básicos e isso parece neutralizar a carga negativa do ssRNA (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Com relação às proteínas não estruturais, NS1, NS3 e NS5 são as mais conservadas e também de maior peso molecular entre os *Flavivirus*. NS1 atua na fase precoce da infecção viral e parece estar envolvida na morfogênese da partícula viral. Sua presença nas membranas celulares determina a citólise das células infectadas e a torna alvo dominante da imunidade humoral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

NS3, melhor caracterizada entre as não estruturais, tem indicações de estar envolvida com a interação entre o DENV e a proteína de ligação do receptor nuclear humano. Epítomos de NS3 são comumente encontrados no repertório de linfócitos T citotóxicos específicos contra o DENV. NS5 é a RNA polimerase viral RNA dependente e é a mais conservada e maior proteína dos *Flavivirus* (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

As menores proteínas, NS2A, NS2B, NS4A e NS4B, são pouco conservadas entre os *Flavivírus* e indicações sugerem que participam do complexo de replicação viral como componentes de membrana (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

1.1.1 Replicação do vírus dengue

O processo de replicação do genoma do DENV acontece nas membranas intracelulares. Brevemente, a montagem do vírus acontece na superfície do retículo endoplasmático (RE), quando as proteínas estruturais e o RNA (recém sintetizado) ocupam o lúmen do RE. As partículas virais imaturas (ainda com prM) são clivadas pela furina (protease) do hospedeiro o que leva à formação das partículas maduras, agora infecciosas que são então liberadas por exocitose (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

No homem tem sido demonstrados alguns sítios onde o DENV se replica e estes sítios parecem ser restritos às células da linhagem fagocítica mononuclear. Foram descritas como células alvo de infecção *in vivo* células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, hepatócitos e linfócitos e a replicação do DENV foi demonstrada em células de Langerhans, células dérmicas e dendríticas intersticiais. A presença de antígenos virais em células mononucleares fagocitárias do fígado, pulmão e baço também contribui com indícios que há replicação do DENV nesses órgãos (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

1.2 Aspectos epidemiológicos da dengue

O vírus dengue é considerado endêmico em mais de 98 países de regiões tropicais/subtropicais, causando altos índices de infecção distribuídos na Ásia tropical, África, Austrália, América Central e América do Sul. São estimados que 3,5 bilhões de pessoas, ou a metade da população mundial, está sob risco de infecção pelo DENV em países tropicais e subtropicais (KYLE; BEATTY; HARRIS, 2007).

Nos últimos 50 anos a dengue vem progressivamente alcançando o status de pandemia global, com índices de 1 em cada 100 pessoas infectadas cada ano por um ou mais dentre os 4 sorotipos do DENV (KYLE; BEATTY; HARRIS, 2007), levando a hospitalização de mais de 5 milhões de crianças e com mais de 70.000 mortes devido à forma mais grave da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1997). Estima-se que anualmente ocorram mais de 500 milhões de infecções, sendo pelo menos 500 mil da forma grave da doença e 2000 óbitos, principalmente em crianças (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Descrições clínicas da dengue remetem a 992 a.c na China, no entanto, a primeira epidemia com casos bem documentados ocorreu em 1780, em Jacarta (Indonésia). Foi depois da Segunda Guerra Mundial que pesquisadores americanos e japoneses conseguiram isolar o DENV (KYLE; BEATTY; HARRIS, 2007), tendo sido em 1956 isolados os sorotipos 2, 3, e 4 nas Filipinas e em 1958 o DENV1 na Tailândia (CORDEIRO, 2008).

O sorotipo 1 e 2 co-circulam nas Américas há anos e depois de uma ausência de 17 anos (1994) o sorotipo 3 seguido pelo 4 (1998) começaram a ser isolados em todos os países da América Central. Depois de isolado o DENV1 em Cuba (1977) duas epidemias ocorreram na ilha (1981 e 1997) causadas pelo sorotipo DENV2 que filogeneticamente era muito próximo da cepa DENV2 do sudoeste da Ásia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

A transmissão do DENV nas Américas foi interrompida devido a campanhas de erradicação do mosquito vetor na região, nas décadas de 1960 e 1970. No entanto, fatores como descontinuidade nas campanhas de erradicação e capacidade de sobrevivência do vetor favoreceram para que novos surtos se restabelecessem. Desde então tem acontecido surtos epidêmicos da doença a cada 3 – 5 anos, tendo o maior deles acontecido em 2002 com mais de 1 milhão de casos reportados nas Américas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Segundo a classificação da OMS, os países das Américas são responsáveis por 64,6% dos casos de dengue (com 500 mortes) no período de 2001 a 2007. O Brasil seria o responsável por 98.5% dos casos e apresenta uma das mais altas taxas de infecção em todo o mundo, com mais de 438.900 casos confirmados até julho de 2007, segundo o Ministério da Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Em 1986, 1990 e 2000 foram introduzidos no estado do Rio de Janeiro o DENV1, DENV2 e DENV3, respectivamente, com rápida dispersão do vírus nos outros estados da federação. O sorotipo 4 do DENV foi recentemente notificado e confirmado pelo Ministério da

Saúde em Boa Vista e Manaus. No entanto, ainda é considerado que co-circulem no país apenas os sorotipos 1, 2 e 3 (MELO; ROMANO; ZANOTTO, 2009, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

O DENV1 foi introduzido em Pernambuco em 1987 com um surto de 2118 casos notificados. O período de 1984 a 1994 foi de “silêncio epidemiológico” para a doença e acredita-se que seja devido ao programa de combate ao vetor implementado. Em janeiro de 1995 foram notificados os primeiros casos de DENV2, o que levou a segunda epidemia no estado de Pernambuco com 9982 casos (CORDEIRO, 2008).

Em 2002, com a introdução do DENV3, houve uma epidemia com 116.245 casos notificados e esse número muito grande (correspondendo a 1.438 casos para cada 100 mil habitantes) de casos pode ser explicado devido ao fato de que a população do estado era suscetível a um novo sorotipo (CORDEIRO, 2008). De acordo com uma criteriosa análise epidemiológica realizada por Cordeiro em 2008 sobre a situação da dengue em Pernambuco, observa-se que a introdução de um novo sorotipo do vírus no estado levou a um aumento na incidência da doença, caracterizando em períodos epidêmicos, seguidos de drástica redução no número de casos.

A prevalência da dengue tem aumentado a cada ano, o que faz com que a dengue seja hoje considerado um dos melhores exemplos de doença infecciosa viral emergente e reemergente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

1.3 Transmissão do vírus

A dengue é uma arbovirose transmitida pela picada da fêmea dos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, presentes nas áreas tropicais e subtropicais mais povoadas do mundo (GUBLER, 1998). O ser humano é o principal hospedeiro amplificador do DENV. O vírus circula no sangue de pessoas infectadas no período de viremia (até 7 dias) e é ingerido pela fêmea do mosquito durante a hematofagia. Após o período de incubação extrínseca (entre 8 a 12 dias) no mosquito, o vírus pode ser transmitido a outros humanos pelo vetor. Acredita-se que a manutenção do DENV na natureza também seja devido à transmissão vertical (chamada

transmissão transovariana) do vírus em mosquitos, o que tem sido demonstrado em laboratório, mas ainda é raro em mosquitos do campo (CORDEIRO, 2008; ROSEN, 1977).

1.3.1 Mosquito vetor

O *A. aegypti* é o vetor de melhor eficiência vetorial para as arboviroses e isso devido ao fato de ser altamente antropofílico, ter hábitos diurnos, principalmente ao nascer e ao por do sol, além de que frequentemente pique muitas vezes durante a sua alimentação (GUHA-SAPIR; SCHIMMER, 2005; SILVA, 2008).

As larvas do mosquito são encontradas em água parada limpa ou água com pouco material orgânico e que se encontrem em recipientes que acumulem água como vasos de plantas (pratos sob o vaso), cisternas, caixas d'água, bromélias, pneus etc (SILVA, 2008). Estudos sugerem que a maioria das fêmeas de *A. aegypti* adultas vivem dentro ou nos arredores dos domicílios onde estavam seus criadouros larvais. Isso é relevante, pois as pessoas, em contraponto aos mosquitos, se deslocam fisicamente sendo o humano o grande responsável pela dispersão física do vírus entre as comunidades (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Vários fatores podem influenciar a dinâmica de transmissão do DENV, entre eles fatores climáticos, ambientais, interações hospedeiro-patógeno e também características imunológicas da população (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

1.4 Classificação da dengue

A dengue tem um grande espectro de formas de apresentações clínicas, frequentemente com evolução e melhora sem sinais clínicos específicos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). É estimado que anualmente sejam 100 milhões de infecções, onde 10 – 50% seriam assintomáticas, e apenas uma pequena fração disso seria reportado como dengue. Dentre

os casos reportados menos de 1 % são de casos de dengue grave (HALSTEAD, 2007) (Figura 2).

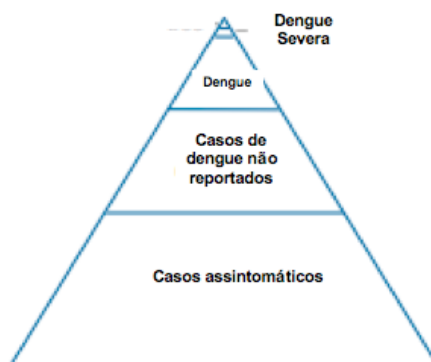
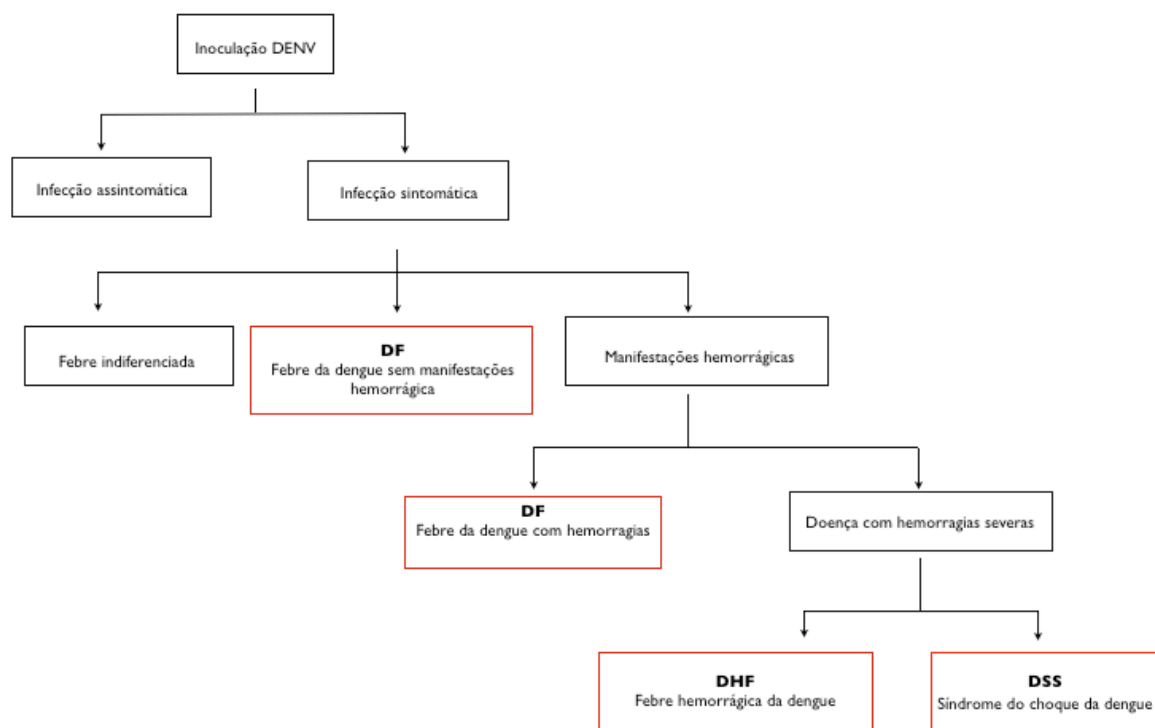


Figura 2. Pirâmide representando infecção pelo vírus e distribuição dos casos de dengue.

Fonte: Adaptação de Kyle e Harris (2008).

Enquanto a maioria dos pacientes se recupera sem evolução para forma clínica grave, uma pequena porção progride para as formas graves da doença, normalmente caracterizadas pelo extravasamento plasmático com ou sem hemorragias (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Mudanças no padrão epidemiológico da dengue tem apontado para dificuldades em utilizar a classificação da OMS atual. Atualmente, seguindo orientações da OMS de 1997, as infecções sintomáticas pelo vírus dengue foram agrupadas em três categorias: febre indiferenciada, febre da dengue (*dengue fever* – DF) e febre hemorrágica da dengue (*dengue haemorrhagic fever* - DHF) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). O esquema da figura 3 mostra a variação da infecção pelo DENV de assintomático/ febre indiferenciada/ DF com ou sem manifestações hemorrágicas/ DHF com extravasamento plasmático – nível I e II/ síndrome de choque da dengue (*dengue shock syndrome*, DSS) – DHF níveis III e IV (COFFEY et al., 2009; KYLE; HARRIS, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010; SIMMONS et al. , 2007; ZHU; HUANG; YANG, 2007).



Esquema baseado em Coffey et al 2009.

Figura 3. Esquema sobre diferentes formas de manifestações na infecção do vírus dengue.

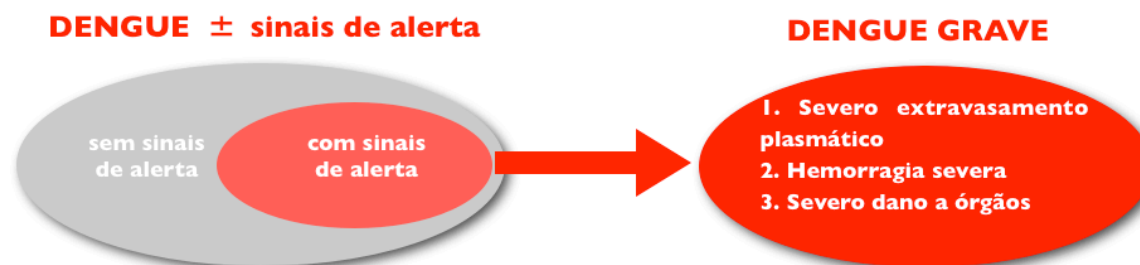
Nota: Esquema elaborado pela autora baseado em Coffey et al. (2009).

Desde a publicação da Organização Mundial de Saúde (1997) descrevendo essa classificação, estudos relatam dificuldades no uso da mesma (BANDYOPADHYAY; LUM; KROEGER, 2008; DEEN et al., 2006; GUHA-SAPIR; SHIMMER, 2005; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). As principais dificuldades são em relação aos critérios de classificação da DHF de acordo com os sintomas clínicos, juntamente com o aumento no número de casos clinicamente classificados como grave que não se encaixam nos critérios da DHF. Apesar dessas dificuldades, atualmente a classificação utilizada em todo o mundo ainda é a DF/DHF/DSS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

1.4.1 Nova classificação da dengue

A OMS tem acompanhado estudos multicêntricos em todo o mundo para avaliar a utilização da classificação de 1997 para casos de infecções sintomáticas ao vírus dengue. Nesses estudos, foram confirmados que os parâmetros clínicos e/ou laboratoriais dividem os pacientes em dois grupos: aqueles com a forma grave e aqueles com a forma não grave da dengue. No entanto, por razões práticas, o grande grupo dos pacientes com a forma não grave foram subdivididos em dois grupos: pacientes com sinais de alerta e pacientes sem sinais de alerta.

A Figura 4 representa a nova classificação proposta pela OMS em 2009 com os critérios a serem considerados para o diagnóstico da dengue (com ou sem sinais de alerta) e da forma grave da dengue. Ainda segundo a OMS, os pacientes classificados com a forma não grave da dengue e que não apresentem os sinais de alerta podem desenvolver a forma grave (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009)



Crítérios para DENGUE± sinais de alerta		Crítérios para DENGUE GRAVE
Provável dengue	Sinais de alerta*	Grave extravasamento plasmático
Morar ou ter viajado para lugares endêmicos da dengue	<ul style="list-style-type: none"> • Dor abdominal 	Seguido de: Choque (DSS***)
Febre e pelo menos 2 dos seguintes sintomas:	<ul style="list-style-type: none"> • Vômito persistente 	<ul style="list-style-type: none"> • Acúmulo de líquido com dificuldade respiratória
<ul style="list-style-type: none"> • Náusea, vômito 	<ul style="list-style-type: none"> • Acúmulo de fluídos 	
<ul style="list-style-type: none"> • Petéquias 	<ul style="list-style-type: none"> • Sangramento da mucosa 	Sangramento grave (avaliado pelo clínico)
<ul style="list-style-type: none"> • Dor muscular 	<ul style="list-style-type: none"> • letargia 	
<ul style="list-style-type: none"> • leucopenia 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento hepático 	Grave dano a órgãos: Fígado: AST ou ALT**** > 100
<ul style="list-style-type: none"> • Prova do laço positivo 	<ul style="list-style-type: none"> • Laboratório – aumento do HCT** e rápida queda plaquetária 	Sistema nervoso central: falha na consciência
<ul style="list-style-type: none"> • Algum sinal de alerta 		Coração e outros órgãos
Confirmação laboratorial – importante quando não observado sinal de extravasamento plasmático.	* requer observação cuidadosa e intervenção médica.	

Figura 4. Adaptação do modelo de classificação da dengue sugerido pela OMS em 2009 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Fonte: Organização Mundial de Saúde (2009).

Nota: ** HCT – hematócrito; *** DSS – Dengue Síndrome Shock/ Síndrome de shock da dengue; **** AST ou ALT – Aspartato aminotransferase ou alanina aminotrasferase.

Esse modelo de classificação para a dengue foi proposto por um grupo de especialistas no assunto em Genebra (Suíça) e está sendo testado em 18 países comparando com a classificação existente da OMS de 1997. Esse processo deve ser finalizado em 2010 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

O presente estudo se posiciona favorável à nova proposta de classificação sugerida pela OMS (dengue e dengue grave). No entanto, teve seus pacientes classificados de acordo com os antigos parâmetros (DF/ DHF/ DSS – 1997) da OMS ainda vigentes. Isso devido ao fato de que a seleção dos pacientes e suas classificações foram realizados no período de março a dezembro de 2008, período em que a classificação considerada era a “antiga”.

1.4.2 Teorias sobre o prognóstico da dengue

A evolução dos casos não graves para a forma grave da doença continua sendo de difícil explicação (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). Alguns aspectos são apontados como fatores de risco para o desenvolvimento da forma grave da dengue, dentre eles incluem-se: imunidade pré-existente devido à infecção prévia com DENV, tempo entre as duas infecções, idade, etnia, características genéticas, sorotipo, genótipo viral, carga viral (KYLE; BEATTY; HARRIS, 2007).

Diante dessa dificuldade em definir e explicar quais fatores seriam responsáveis pela evolução da forma grave da doença, algumas teorias tem sido testadas. Todas as teorias buscam apontar e explicar fatores que possam favorecer ao prognóstico grave da doença e dessa forma auxiliar no tratamento adequado dos pacientes sob maior risco (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Acerca das teorias sobre possíveis explicações para o prognóstico da dengue, atualmente são três as discutidas: a) teoria das infecções heterotípicas seqüenciais Halstead (1970); b) teoria da modificação de virulência Rosen (1977); c) teoria da multicausalidade Gubler (1998).

A) A teoria apresentada por Halstead em 1970 é a mais antiga e que até 2008 foi a mais predominante (KYLE; HARRIS, 2008). Essa teoria diz que a probabilidade de ocorrência da forma grave (DHF/DSS) é maior no indivíduo que sofre uma infecção

secundária (sequencial) com um sorotipo diferente de uma infecção prévia (RIGAU-PEREZ, 2006; SILVA, 2008). A teoria é fundamentada na hipótese do favorecimento de infecção dependente de anticorpos (*antibody-dependent enhancement* - ADE), ou imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos, que supõe que anticorpos pré-existentes reagindo cruzadamente, não neutralizariam a infecção, mas facilitariam a entrada viral em células que possuem receptores para a porção Fc da molécula de imunoglobulina. Dessa forma, esse fenômeno levaria ao aumento mais rápido da carga viral e aumentando, conseqüentemente, o risco em desenvolver as formas grave da doença (HALSTEAD, 1970). Estudos prospectivos na Tailândia, Indonésia e Cuba confirmaram a associação entre a infecção secundária e a forma grave da dengue. No estudo de Cuba foi sugerido ainda que o aumento no tempo entre as infecções poderiam também aumentar a gravidade da doença (KYLE; BEATTY; HARRIS, 2007).

- B) A teoria de virulência apresentada em 1977 sugere que os fatores de risco para o desenvolvimento das formas graves estão mais relacionados com os genótipos (advindos de mutações) e os sorotipos do vírus envolvidos na infecção (ROSEN, 1977)
- C) A teoria que atualmente tem sido bastante discutida e que tem o apoio da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009) e também de pesquisadores que defendiam a teoria do ADE - como o próprio virologista renomado Scott Halstead -, estabelece que os fatores de risco para o desenvolvimento das formas graves incluem: imunidade pré-existente de infecções pelo DENV, tempo entre as infecções, idade, características étnicas, informações genéticas do hospedeiro, sorotipo, genótipo e sequencia do vírus, ecologia da transmissão e da infecção (KYLE; HARRIS, 2008) (Figura 5).

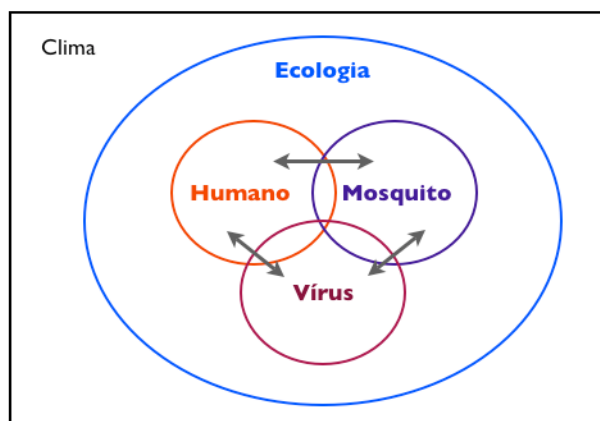


Figura 5. Interface das contribuições biológicas do humano, mosquito e do vírus no aspecto clínico e geográfico na distribuição da dengue.

Fonte: Figura traduzida e reproduzida pela autora a partir de KYLE; HARRIS (2008).

1.5 Resposta imune inata à infecção viral

A base molecular da patogenia do vírus dengue ainda não está esclarecida e isso ocorre devido, em parte, a falta de um modelo celular e animal onde as hipóteses de patogenia (tropismo células, ativação de resposta imunológica etc.), evolução clínica e epidemiológica possam ser testadas (FINK et al., 2007; KYLE; BEATY; HARRIS, 2007; MONATH ET al., 2007). Importantes grupos de pesquisadores em diferentes partes do mundo (KYLE; BEATY; HARRIS, 2007; MORENO-ALTAMIRO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2009; UBOL et al., 2008; TAKEUCHI; AKIRA, 2007) têm se dedicado a estudar a resposta imune através da expressão gênica (utilizando reações de microarranjo e reação em cadeia de polimerase quantitativa - qPCR, principalmente) em pacientes com dengue e dengue grave e também em estudos *in silico*.

No presente estudo, foi abordado (seção 1.4.2) algumas das teorias que tentam explicar os diferentes prognósticos que a infecção com o DENV pode gerar. E de acordo com a hipótese hoje mais aceita e discutida, aquela que se baseia em aspectos multifatoriais, as informações da imunidade pré-existente no paciente podem também contribuir para o prognóstico (COFFEY et al, 2009; KYLE; HARRIS, 2008).

1.5.1 Sistema imune inato – resposta via interferon

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores sendo o interferon (IFN) tipo I (alfa e beta) a maior arma na defesa antiviral contra todos os tipos de vírus (HALLER; KOCHS; WEBER, 2006; COFFEY et al, 2009; DIAMOND et al., 2009). Os interferons alfa e beta são produzidos por muitos tipos de células em resposta a infecções virais e induzem um estado antiviral através do aumento da expressão dos genes com função direta e indireta antiviral (DIAMOND et al., 2009). O DENV desencadeia uma forte resposta imune antiviral, diferente de outros vírus, como por exemplo o HIV (KWAN, 2005).

O IFN gama restringe a replicação viral pela indução do estado antiviral ou indiretamente através da modulação da resposta imune adaptativa. Estudo com o vírus da febre do Nilo (*west nile virus* – WNV), da mesma família do DENV, mostrou que o IFN gama tem função dominante no controle do WNV na resposta inata (DIAMOND et al., 2009).

É através do reconhecimento de estruturas microbianas conservadas ou produtos conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) por um conjunto de receptores chamados receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors* - PRRs) que se inicia a via de indução do IFN (HALLER; KOCHS; WEBER, 2006; SAITO; GALE, 2007; TAKEUCHI; AKIRA, 2007).

Três classes de PRRs foram identificadas, *Toll-like receptors* (TLRs), *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I)- *like helicases* (RLHs) e *NOD-like receptor* (TAKEUCHI; AKIRA, 2007). A família de PRRs melhor caracterizada é a dos TLRs que são expressos em várias células do sistema imune, incluindo macrófagos e células dendríticas (ZHU; HUANG; YANG, 2007). Há pelo menos 13 membros da família dos TLRs já caracterizados, onde pelo menos os TLRs 2, 3, 4, 7, 8, e 9 funcionam como PRRs virais (SAITO; GALE, 2007).

TLRs 3, 7, 8 e 9 estão localizados nas vesículas citoplasmáticas, tais como endossomo e retículo endoplasmático. Especificamente, TLR3 detecta RNA de fita dupla (dsRNA), enquanto que TLR7 e 9 reconhecem RNA de fita simples (ssRNA) em humanos e DNA com motivos CpG, respectivamente. TLR3 aparece como importante mediador na infecção pelo citomegalovírus murino (CMVM), reovírus e também influenza. O TLR2 para CMV humano e o TLR9 para o CMVM e para o herpes vírus humano (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

RIG-I e o gene 5 associado à diferenciação de melanoma (MDA5) são membros da família RLHs e foram identificadas como receptores intracelulares (citoplasma) de vírus dsRNA que induzem resposta do tipo IFN (MEYLAN; TSCHOPP, 2006; SETH et al., 2006; TAKEUCHI; AKIRA, 2007).

A ligação do RNA a PRRs resulta na ativação de uma cadeia de fatores, tais como fator de regulação do interferon 3 e 7 (IRF-3 e IRF-7) e o gene de resposta primária a diferenciação mielóide 88 (MYD88) e na expressão de genes que estimulam as respostas dos IFNs tipo I e II (DIAMOND et al., 2009).

A Figura 6 representa a via dos TLR e suas relações gênicas.

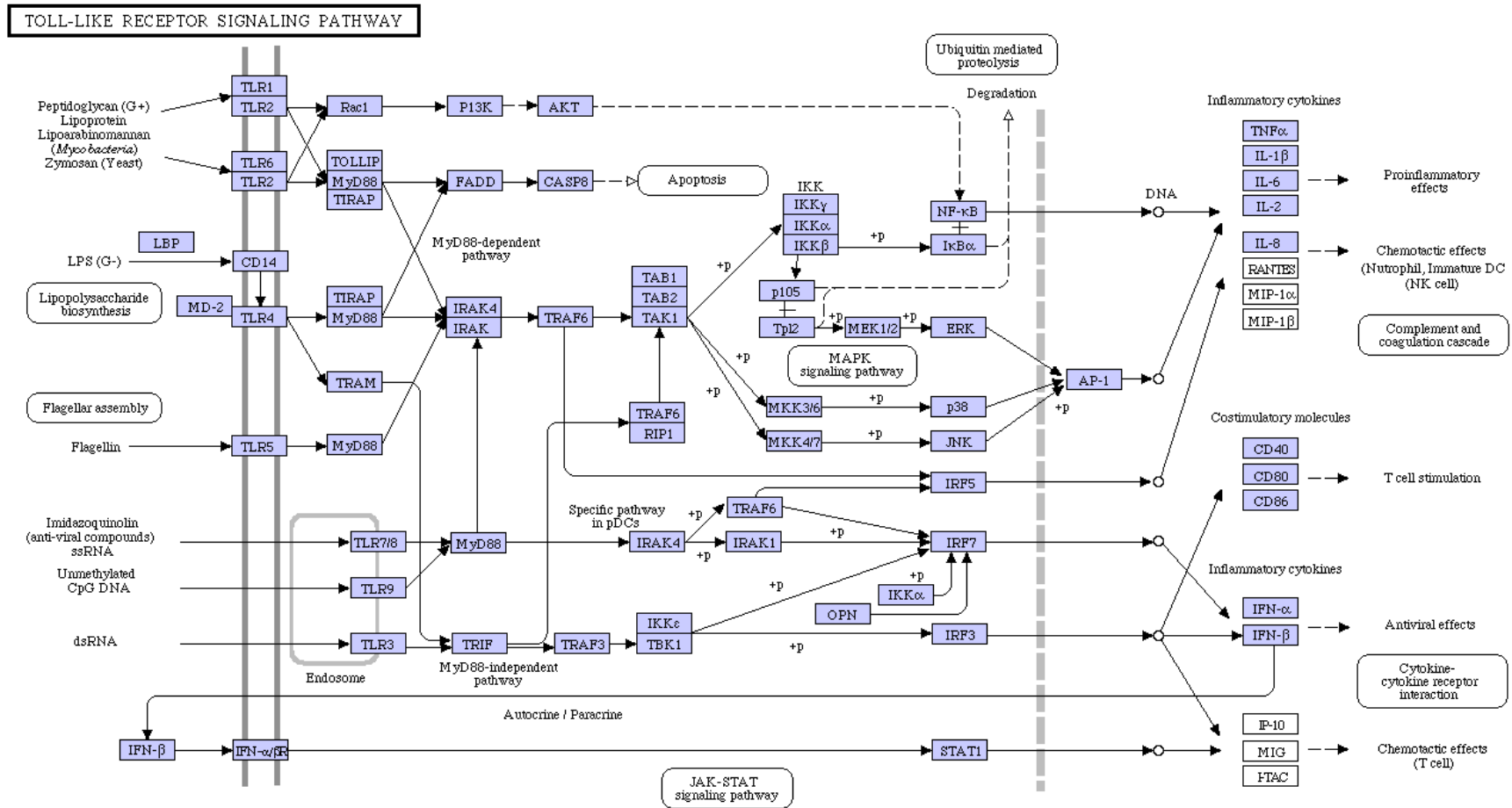


Figura 6. Via dos receptores Toll like e os genes envolvidos na cadeia de ativação.
 Fonte: KANEHISA LABORATORIES (2010).

Um importante questionamento é feito sobre as vias de sinalizações mediadas pelo TLRs e RLHs em sistemas *in vivo*. Em vários estudos foi demonstrado que as vias RIG-I e TLRs não são redundantes e que medeiam estado antiviral em diferentes células (SETH et al., 2006). Os vírus parecem ter mais de uma estratégia em relação aos PAMPs e dessa forma ativar várias vias (CONCEIÇÃO et al., 2010). Diante do enorme número de genes envolvidos nas respostas de IFN tipo I, os promotores para muitos deles ainda não estão completamente esclarecidos e conseqüentemente o completo entendimento dessas vias ainda está longe de serem elucidado (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

1.5.2 Primeiros alvos celulares do vírus da dengue

Não está totalmente esclarecido se os monócitos e macrófagos seriam alvos iniciais para o DENV (DURBIN et al., 2008). No entanto, achados clínicos e de autópsia em humanos, assim como em estudos em primatas, indicam que as células da linhagem fagocítica macrofágica sejam sim alvos celulares iniciais do vírus. Em modelo murino de infecção pelo DENV, os macrófagos e as células dendríticas nos seis primeiros dias pós infecção subcutânea são as primeiras células infectadas (FINK et al., 2007; KYLE; BEATTY; HARRIS, 2007).

A presença de células dendríticas nas mucosas, pele e no sangue assim como sua habilidade de apresentar antígenos nesses lugares, predispõe esse tipo celular a ser alvo primário em infecções virais (KWAN, 2005). As células dendríticas apresentam papel importante nas respostas imune inata e também adaptativa a organismos infecciosos e isso devido, segundo estudos, a capacidade de produzir interferon tipo I (DEAUVIEAU, 2007; WANG et al., 2006).

Em particular, as células dendríticas plasmocíticas (pDCs) são altamente especializadas e representam a principal fonte na produção de interferon alfa em resposta a um grande número de vírus envelopados e outros estímulos microbiológicos (HALLER; KOCKS; WEBER, 2006; PALUCKA, 2000; WANG et al., 2006; WU et al., 2000). Além da secreção de IFN alfa e outros efeitos, as pDCs interagem com as células dendríticas mielóides (mDCs) na indução da resposta imune inata antiviral e modela os efeitos da resposta imune adaptativa (WANG et al., 2006).

Já foi demonstrada a infecção pelo DENV em leucócitos do sangue periférico, além de identificar replicação viral em células B, monócitos, células *natural killer*, células de linhagem hepáticas e em células T de pacientes com DHF. Acredita-se que as células dendríticas imaturas da pele e dos nódulos linfáticos sejam fortes candidatas a alvos celulares para o DENV (CONCEIÇÃO et al. 2010; DURBIN et al., 2008).

No estudo de Durbin e colaboradores é explicado que os monócitos são as células predominantes no sangue periférico de pacientes com dengue e, ainda esse estudo, conclui que o DENV apresenta a mesma predominância na infecção em relação ao tipo celular tanto nas respostas primárias e secundárias (DURBIN et al., 2008).

A rápida resposta imune anti-DENV pode estar associada à eficiente infecção das células dendríticas e indução da produção de fator de necrose tumoral (TNF) alfa e conseqüente maturação das células dendríticas. A maturação dessas células leva a uma resposta imune rápida e isso pode contribuir para o alto percentual (70 - 90%) de infecções pelo DENV consideradas assintomáticas (KWAN, 2005).

1.5.3 Resposta via interferon na infecção pelo DENV

Considerando o cenário das respostas antivirais que envolve todos os elementos das vias de ativação do IFN, em relação ao DENV, ainda há ausência de uma forte assinatura transcricional baseada em estudos com expressão gênica que tente explicar o largo espectro de possíveis prognósticos da infecção pelo DENV (MONATH et al., 2007).

Apesar de estar bem demonstrado em estudos com pacientes e estudos *in vitro* que a resposta imune inata envolvendo interferon alfa e beta seja importante contra infecção do DENV (KAWAIA; AKIRA, 2008; UBOL et al., 2008), o conhecimento sobre os TLRs (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) para o DENV ainda são limitados (KRUIF et al., 2008).

Os estudos genéticos envolvendo grupos de pacientes com dengue e dengue grave (FINK et al., 2007; LONG et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2009; SIMMONS et al., 2007; UBOL et al., 2008) têm apresentado, de uma forma geral, que os dois grupos apresentam distintos perfis de expressão no genes relacionados com a resposta imune.

Quando analisado o perfil de expressão na fase aguda da infecção em células mononucleadas do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells* – PBMCs), os genes relacionados com a resposta imune inata (principalmente aqueles envolvidos com a resposta do interferon) respondem por quase metade dos que são diferentemente expressos. E essa diferença tem sido demonstrada através do fato de que pacientes com dengue grave tem a expressão desses genes menor em relação á expressão dos mesmos genes em pacientes com dengue. Definindo, dessa forma, que os pacientes com a forma grave teriam o perfil mais próximo de pessoas não infectadas (UBOL, et al., 2008).

Estudos como esse demonstraram que a atividade da resposta imune durante a infecção é dinâmica, sendo que na fase aguda a resposta imune inata parece ser dominante em pacientes com dengue, enquanto a resposta imune adaptativa seria fundamental em pacientes com a forma grave da doença (UBOL et al., 2008).

Foi relatado em 2008 por Chen e colaboradores (CHEN, 2008) que a molécula lectina tipo C família domínio 5, membro A (CLEC5A) é um forte candidato a ser receptor para o DENV. O estudo *in vitro* destaca ainda a direta influência da expressão do CLEC5A com o extravasamento plasmático. Por esse motivo foi incluído no presente estudo a análise da expressão gênica do CLEC5A.

Diante disso, esse estudo propõe o estudo da expressão dos RNAm de alguns dos genes envolvidos com a ativação da resposta de IFN: os PRRs RIG-1, MDA-5, TLR 3, 7, 8, 9 da proteína moduladora MYD88 e do fatores transcripcionais IRF-3, 7 em células mononucleadas do sangue (PBMCs) de dois grupos de pacientes com dengue e com dengue grave.

1.6 Diagnóstico da infecção

O diagnóstico da infecção pode ser feito através da detecção do vírus (isolamento viral, técnicas moleculares), captura de antígenos dengue específicos NS1 e anticorpos IgG e IgM através de testes sorológicos – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* - (Enzimaimunoensaio/ELISA), teste de neutralização com redução de placas etc (GUZMÁN; KOURI, 2004)

O método mais adequado a ser selecionado e utilizado para o diagnóstico da dengue depende da fase e do tipo da infecção. Um eficiente diagnóstico é obtido quando levados em consideração dois aspectos: momento de coleta da amostra e para qual tipo de exame essa amostra se destinará (CORDEIRO, 2008). Segundo Halstead (HALSTEAD, 2007), o diagnóstico da dengue teria duas fases: fase I) período de febre e viremia com detecção de antígenos NS1 no sangue e a fase II) período logo após a febre seguido de algumas semanas onde anticorpos IgM e IgG sorotipo específicos estão elevados.

No período de febre o diagnóstico é feito baseado nos sinais e sintomas clínicos (brevemente demonstrado na seção referente à classificação da dengue) e o diagnóstico laboratorial através da detecção molecular de partículas virais, isolamento viral e proteínas virais (NS1). A Figura 7 demonstra esquematicamente as fases de viremia e febre e os testes de diagnósticos mais adequado para cada fase da infecção.

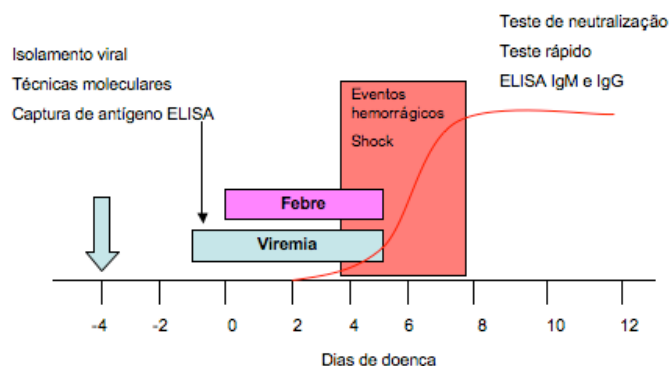


Figura 7. Curso da infecção da dengue e tempo de diagnóstico.

Fonte: Traduzido a partir de Halstead (2007) .

O período de viremia depende do tipo de infecção; nas infecções primárias a circulação de vírus no sangue dura aproximadamente dois a sete dias enquanto que nas infecções secundárias esse período de viremia seria de dois a três dias (SILVA, 2008).

O RNA do vírus da dengue pode ser detectado no período de viremia através de técnica molecular de reação em cadeia de polimerase usando a transcriptase reversa (RT-PCR) (GOMES et al., 2007; MELO; ROMANO; ZANOTTO, 2009; SILVA, 2008) e algumas modalidades como “single-tube nested” PCR (STNPCR) (GOMES et al., 2007), multiplex PCR (HARRIS et al.,

1998; LAI et al., 2007) e *real-time* PCR (CHAO; DAVIS; CHANG, 2007; CHEIN et al., 2006; FIGUEREDO et al., 2008; GUZMÁN; KOURI, 2004; GURUKUMAR et al., 2009; JOHNSON; RUSSEL; LANCIOTTI, 2005; KONG et al., 2006).

A captura de NS1 sorotipo específico no sangue é feita através de teste rápido por imunocromatografia e por ELISA utilizando anticorpo monoclonal e tem sido utilizada em muitos países do mundo como uma opção de teste de “baixo custo”, sensível e específico durante o período de febre. Estudo com pacientes infectados com DENV1 mostrou que a cinética do aparecimento de NS1 no sangue tem pico nos dias 6 a 10 depois do início da febre (HALSTEAD, 2007).

1.6.1 Diagnóstico sorológico

Alguns dos métodos utilizados para a detecção de anticorpos são: teste de inibição da hemaglutinação, neutralização e o ELISA. O teste de inibição é o teste padrão ouro, segundo a OMS, para classificação sorológica da infecção, mas que pode apresentar reação cruzada com outros flavivirus (KAO et al., 2005); o teste de neutralização por redução de placa é considerado o mais sensível e específico (quando baseado na detecção de anticorpo) com determinação do sorotipo do vírus (SILVA, 2008); o ELISA é o mais utilizado pela vigilância epidemiológica e apresenta alta sensibilidade na detecção de IgG e IgM. Apesar da possibilidade também de reação cruzada com outros flavivirus, o teste é muito utilizado em rotina de diagnóstico devido à facilidade de aplicação da técnica (KAO et al., 2005; GUZMÁN; KOURI, 2004;).

A resposta de anticorpos à infecção varia de acordo com o status do sistema imune do hospedeiro. A resposta em pacientes que não foram expostos anteriormente a flavivirus ou imunizados com vacina de flavivirus (febre amarela, encefalite japonesa, por exemplo) é caracterizada por um crescimento lento de anticorpos IgM sorotipo específico (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Uma importante ferramenta para distinguir infecções primárias de infecções secundárias é a análise da relação entre os títulos de anticorpos IgM/ IgG. Isso porque, em infecções secundárias (aquelas que acometem pessoas que já foram previamente infectadas pelo vírus da

dengue ou em alguns casos por outro flavivirus ou são vacinados) os títulos de anticorpos neutralizantes elevam-se rapidamente.

A IgG é detectável em altos níveis mesmo na fase aguda, diferentemente do que ocorre nas infecções primárias, e persiste por aproximadamente 10 meses. Em relação à detecção de IgM os índices no início da infecção são baixos e em alguns casos são indetectáveis, dependendo do tipo e sensibilidade do teste utilizado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). Nesses casos, testes como o de neutralização e inibição da hemaglutinação são requeridos para confirmação dos casos (CORDEIRO, 2008).

O diagnóstico da doença na infecção secundária através da pesquisa de IgM é feito após o período febril, não sendo possível durante o período de viremia, e pode persistir por 60 a 90 dias após início da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

O anticorpo IgG específico é geralmente detectável em baixos títulos no final da primeira semana de doença com conseqüente crescimento lento tornando-se detectável por meses e provavelmente pela vida toda (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

A Figura 8 representa graficamente a detecção diferencial entre as infecções primárias e secundárias de IgG e IgM.

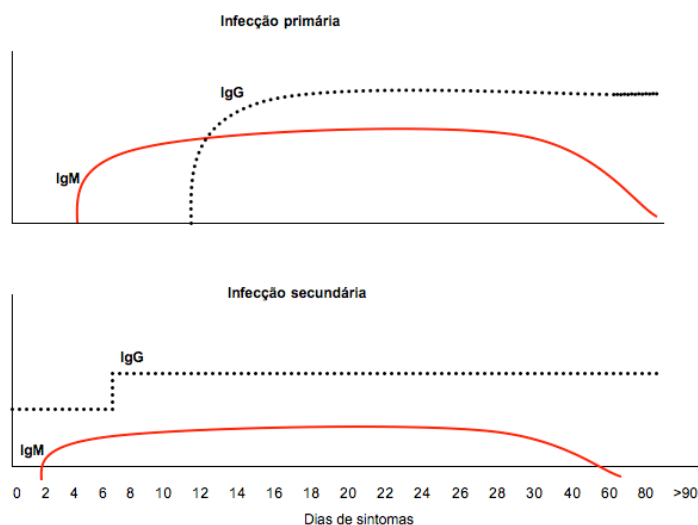


Figura 8. Representação sobre a detecção de IgG e IgM em infecções primárias e secundárias.
Fonte: Baseado no documento da Organização Mundial de Saúde (2009).

Desse modo, o diagnóstico sorológico é a forma utilizada para a diferenciação entre infecções primárias e secundárias e acredita-se que essa informação seja de grande relevância para o prognóstico do paciente.

1.6.2 Diagnóstico molecular e isolamento viral

Muitos estudos tem sido feitos utilizando abordagens moleculares para a detecção do DENV em amostras de soro e sangue de pacientes. Em 1992, Lanciotti e colaboradores publicaram o estudo sobre a detecção molecular utilizando *nested*-PCR (LANCIOTTI et al., 1992) e desde então é crescente o número de publicações que apresentam desenvolvimentos de diferentes variações de PCR em estudos com DENV.

A reação de *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) é a base para todos os protocolos que envolvem detecção molecular para o vírus da dengue. Na RT-PCR, o RNA viral é reversamente transcrito em cDNA a partir da atividade de polimerase da enzima transcriptase reversa. O DNA complementar – cDNA - então é amplificado e identificado um, dois, três ou os quatro sorotipos do DENV em uma reação subsequente de PCR que pode acontecer no mesmo tubo da RT ou em tubos distintos.

A RT-PCR tem a capacidade de detecção de até 100 cópias do DENV e sensibilidade de 94% para DENV1, 93% para DENV2 e 100% para DENV3 e DENV4 (LANCIOTTI et al., 1992). Uma desvantagem das reações moleculares é o risco de contaminação o que exige a utilização de controles positivos e negativos internos das reações, além de adequados procedimentos operacionais.

O isolamento viral é considerado o mais confiável dos testes para dengue, uma vez que é possível visualizar o vírus e garante o diagnóstico pela presença do agente infeccioso (KAO et al., 2005). No entanto, o resultado desse exame leva pelo menos 15 dias para ser revelado (GURUKUMAR et al., 2009) enquanto a detecção molecular é executável em algumas horas.

1.7 PCR quantitativa em tempo real

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR), como toda reação de PCR, é um processo exponencial onde um alvo específico é amplificado através da capacidade de dobrar a quantidade de produto a cada ciclo da reação (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). O diferencial da qPCR é o fato de que as amplificações podem ser acompanhadas no momento que acontecem, em tempo real.

Utilizando a reação de qPCR podem ser realizados diferentes tipos de estudos, dentre eles: de quantificação absoluta, quantificação relativa e análise de *Single-nucleotide polymorphism* (SNP).

Estudos que envolvem quantificação absoluta são aqueles onde é possível quantificar, com precisão e uso de unidade de medida, alvos específicos. A quantificação é baseada em padrões, com quantidades conhecidas, que são usados como referência. Um exemplo para esse tipo de estudo são aqueles que envolvem a quantificação de carga viral.

Já nos estudos onde ocorre quantificação relativa são feitas quantificações sempre em comparação com uma amostra de referência, ou seja, as quantificações são relativizadas e não com uso de padrões como nos estudos com quantificação absoluta (FRAGA; MEULIA; FENSTER, 2008). Esse tipo de estudo é muito utilizado nas análises de expressão gênica, fato que ocorre no presente estudo.

Os estudos genotípicos com objetivo de analisar polimorfismos, SNP, por exemplo, podem ser facilmente realizados a partir da capacidade da reação de qPCR de distinguir diferenças de apenas um nucleotídeo entre as seqüências alvos.

A seção 1.7.8, mais adiante no estudo, abordará mais detalhadamente características das quantificações absolutas e relativas.

1.7.1 Elementos da reação de qPCR

Os reagentes necessários para uma reação de qPCR são praticamente os mesmos de uma reação de PCR (tampão adequado para a reação molecular, enzima polimerase, os quatro nucleotídeos – adenina, guanina, citosina e timina – iniciadores, co-fatores para enzima – $MgCl_2$) com o diferencial de ter o acréscimo de um componente que emita fluorescência para detecção da reação em tempo real (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010). Mais adiante serão discutidos alguns tipos de componentes fluorescentes que podem ser utilizados.

Os termocicladores, equipamentos utilizados para reações de PCR e qPCR, são instrumentos que controlam de forma automática a variação de temperatura nos termoblocos para que a reação de PCR possa acontecer (FRAGA; MEULIA; FENSTER, 2008). Aqueles instrumentos utilizados para qPCR apresentam, além do controle automático do termobloco, um sistema de detecção de fluorescência, que em alguns é uma câmera do tipo “charge-couple device” (dispositivo de carga acoplado - CCD).

Esse sistema CCD é um sensor para captação de imagens com capacidade de ser sensibilizado por luz com comprimento de ondas que variam entre infra-vermelho a ultra violeta. Diferentes filtros são utilizados para a leitura dos respectivos comprimentos de onda referentes a cada fluoróforo. Essa captura de fluorescência acontece, em média, em intervalos de frações de segundos durante toda a reação (MANUAL..., 2003). O equipamento utilizado no presente estudo, ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems®), apresenta 5 filtros e isso possibilita a leitura de cinco fluoróforos diferentes.

1.7.2 Curva de amplificação

A amplificação da reação de qPCR pode ser representada por uma curva (Figura 8), onde o eixo das abscissas representa o número de ciclos e o eixo das ordenadas a variação da fluorescência detectada.

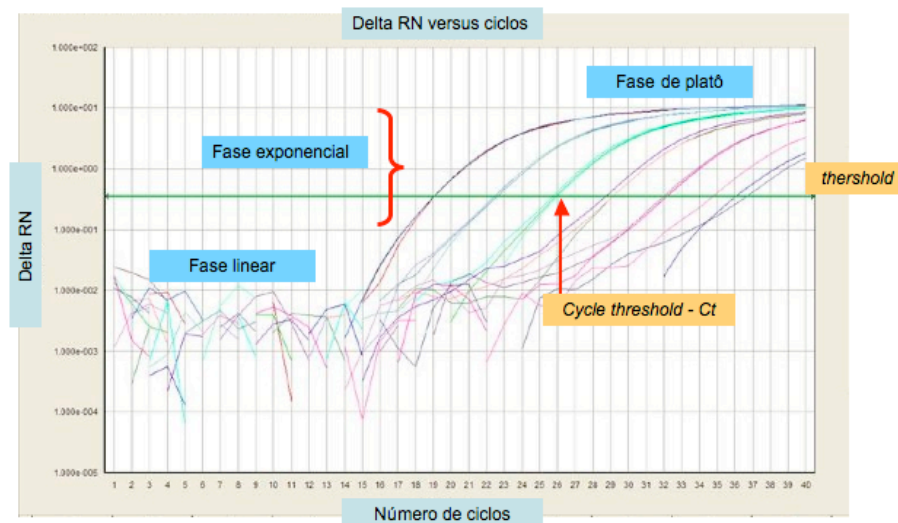


Figura 9. Curva de amplificação de uma reação de qPCR.

Fonte: elaborado pela autora.

O gráfico na Figura 9 apresenta o que chamamos de curva de amplificação. Essa curva é didaticamente dividida em 3 fases principais (considerando uma reação com 40 ciclos): fase linear, fase exponencial e fase de platô.

A fase linear é a fase, entre os ciclos 1 a 12 em média, onde as amplificações ainda não são totalmente específicas e o número de seqüências alvo amplificadas ainda não dobra a cada ciclo.

A fase exponencial é assim chamada, pois, é nessa fase que a reação tem a duplicação da quantidade de seqüências alvo a cada ciclo, isso quando a reação tem próximo a 100% de eficiência. Essa fase acontece entre os ciclos 12 e 35 da reação.

A última das fases é a fase de platô, e o nome vem exatamente do fato de que é nessa etapa onde a reação atinge o platô nas amplificações. Isso devido, principalmente, ao fato de que os reagentes começam a ser exauridos, como a enzima polimerase por exemplo. Essa etapa final acontece por volta dos ciclos 35 ao ciclo 40 (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008).

Um importante conceito referente às reações de qPCR é o Ct. Ct é a abreviação para *cycle threshold* representando o ciclo em que a amostra atinge o limite de positividade (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010). Isso porque aproximadamente no primeiro 1/3 da fase exponencial é estabelecido o limite onde a partir daquele ponto as amostras que cruzarem

essa linha são consideradas positivas. O nome dado a essa linha é *threshold* e o número do ciclo que a amostra cruzar esse linha é utilizado para os cálculos de quantificação absoluta, relativa e análises genotípicas como veremos mais adiante.

1.7.3 Orientações para garantir a qualidade da reação de qPCR

A qPCR é um método excelente para análise de expressão gênica de forma rápida, acurada, sensível e de “baixo custo”. No entanto, a simplicidade da tecnologia a torna vulnerável a abusos daqueles que a executam por não atentarem aos cuidados fundamentais de controle de qualidade (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010).

São vários os cuidados para que uma reação possa garantir a qualidade dos experimentos e consequentemente dos resultados. Poderíamos dividir em três partes o experimento de qPCR: A) pré-processamento; B) experimento de amplificação; C) análises dos dados gerados no experimento (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010).

Essas três fases correspondem também à separação física necessária para a realização dos experimentos. É sugerido que os laboratórios tenham salas para o processo de preparação das amostras (considerada sala “suja”), um ambiente onde os equipamentos possam ser adequadamente acondicionados e o ambiente onde os dados possam ser analisados.

Importante destacar que a maior fonte de contaminação é a manipulação dos produtos de amplificação seguido do processo de extração das amostras (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010). Nessas duas etapas críticas, realizadas em ambientes separados, é indicado a aplicação cuidadosa de práticas adequadas de procedimento em laboratório de biologia molecular, com destaque para o uso de ponteiras com filtro (exclusivas para cada processo), cabines com luz ultra-violeta (importante ferramenta para degradação de ácido nucléico contaminante), luvas (sem subsequente aplicação de álcool, comum errôneo hábito já que o álcool aumenta a porosidade das luvas) e todo material livre DNA e RNA.

A) Na fase de pré-processamento deve-se considerar qual o tipo de material será amplificado e a escolha adequada do método de extração. Em experimentos que envolvam RNA,

a qualidade, integridade, pureza e estar livre de contaminação DNA são fundamentais e podem interferir muito nos resultados do experimento. O RNA é, se comparado ao DNA, mais instável e desse modo deve ser extraído e feita a reação de transcriptase reversa de imediato.

B) Durante o experimento é fundamental que as condições de ciclagem que serão utilizadas sejam adequadas com àquelas necessárias para o funcionamento dos iniciadores, estabelecer a etapa de captação da fluorescência e a utilização de, no mínimo, duplicatas de cada amostra.

C) A fase de análise dos resultados em qPCR tem a enorme vantagem de não ser necessário, depois de otimizados os sistemas, o manuseio dos produtos amplificados, o que minimiza os riscos de contaminação (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010; FRAGA; MEULIA, FENSTER, 2008; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). A análise dos resultados dependerá do tipo de experimento de qPCR realizado, se quantificação absoluta, relativa, genotipagem por SNP etc. Esse assunto será abordado em breve quando for discutido os tipos de quantificações.

1.7.4 Sistema de fluoróforos para qPCR

A escolha entre corantes intercalantes, como o Sybr Green I ou algum dos sistemas com sondas específicas é necessária, onde cada um apresenta vantagens e desvantagens. Há atualmente no mercado alguns sistemas disponíveis para detecção do produto amplificado em reações de qPCR, dentre os mais comuns estão as moléculas em haste, os corantes intercalantes e as sondas de hidrólise (SILVA, 2008).

1.7.4.1 Moléculas em Haste

As chamadas moléculas em haste são seqüências específicas complementares à seqüência alvo e que tem o formato de uma haste, devido ao fato de formarem uma estrutura secundária.

Em suas extremidades 5' e 3' estão um fluoróforo e um *quencher*, respectivamente. Na conformação de haste não há liberação de fluorescência, no entanto, quando a sonda está anelada à seqüência alvo a molécula fica no formato linear. Nessa conformação o *quencher* não mais consegue absorver a fluorescência do fluoróforo e será possível essa detecção (Figura 9). A detecção será então proporcional a quantidade de moléculas aneladas às seqüências alvos (SALVATORE et al., 2008).

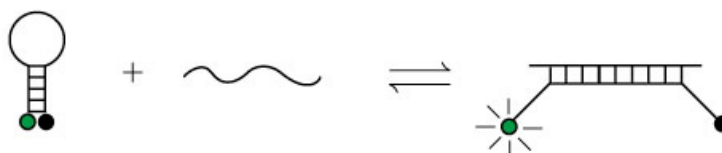


Figura 10. Sonda em haste.

Molécula em haste seguido do alvo e depois mostrando a sonda já em formação linear pareada com a seqüência alvo e assim liberando a fluorescência (bolinha verde) distante do quencher (bolinha escura).

Fonte: adaptado pela autora

1.7.4.2 Corantes intercalantes: *Sybr Green I* e curva de dissociação

O *Sybr Green I* é um corante intercalante que emite fluorescência capturável a um comprimento de onda, no intervalo, de 495 a 520 nm (MANUAL..., 2000) e tem a afinidade de se intercalar às fitas duplas de ácido nucléico (seja de DNA-DNA, RNA-RNA, DNA-RNA, RNA-DNA).

Um importante característica dessa molécula é o fato de que a fluorescência gerada quando intercalada é 100 vezes superior a fluorescência liberada quando a molécula encontra-se livre na reação (MANUAL..., 2003). É baseada nessa propriedade que é feita a leitura da fluorescência na reação, de acordo com a diferença entre a fluorescência inicial e final. Sendo, dessa forma, o aumento da fluorescência então proporcional à quantidade de ácido nucléico de fita dupla amplificado na reação.

Em uma reação de qPCR que utiliza *Sybr Green I* é fundamental a análise da curva de *melting*, ou curva de dissociação (esse será o termo utilizado no presente trabalho) (MANUAL..., 2000; MANUAL..., 2003; DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010)

independente do tipo de estudo que esteja sendo feito, se de quantificação absoluta, relativa, SNP etc. Essa curva de dissociação é gerada após o encerramento da seqüência de ciclos da qPCR.

Para a geração da curva de dissociação a temperatura é elevada gradativamente em intervalos de 0.1 a 0.5 C, geralmente de 60° a 95° C. A partir do princípio de que as fitas dupla de DNA desnaturam a uma determinada temperatura, os fragmentos gerados na reação de qPCR se desnaturam quando atingida a temperatura de dissociação específica de cada fragmento. Essa temperatura depende principalmente da composição de nucleotídeos e do tamanho do fragmento.

Partindo do princípio que o Sybr Green I emite fluorescência 100 vezes menor quando liberado, ou seja, quando os fragmentos desnaturarem, espera-se que ao atingir a temperatura de dissociação do alvo haverá uma queda abrupta da fluorescência (Figura 11 -A). Para melhor visualização dessa queda abrupta da fluorescência, é feita a derivada matemática dessa curva. Desse modo, será possível visualizar um pico no momento em que a quantidade de fluorescência medida muda (Figura 11 – B) (MANUAL..., 2000; MANUAL..., 2003).

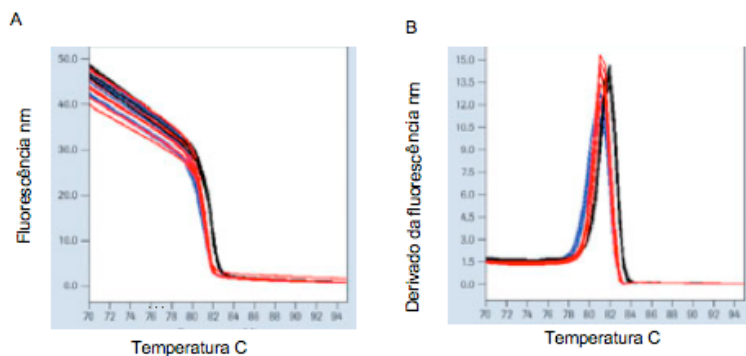


Figura 11A e B. Curva de dissociação.

Em A apresentado a queda abrupta da fluorescência na temperatura de dissociação da seqüência alvo e em B o mesmo gráfico, no entanto gerado a partir da derivada matemática da captura da fluorescência.

Fonte: Manual ... (2003).

É a partir da análise desse gráfico, que se pode estudar a especificidade da amplificação, ou seja, se as amplificações geradas foram referentes à seqüência alvo esperada. Quando o sistema de qPCR tem apenas uma banda no gel de eletroforese, esse sistema deve então ter apenas um pico na curva de dissociação. No entanto, se no gráfico da curva de dissociação são observados mais de um pico, ou mesmo apenas na amostra referente ao controle negativo são

apresentados picos, isso sugere que esse sistema tem alguma amplificação que não é a esperada e nem específica para a sequência alvo.

Diante dessa observação, fica evidenciada a importância de se estudar os sistemas de qPCR também com corrida eletroforética quando na fase de otimização dos sistemas (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010).

Uma das grandes vantagens do uso de Sybr Green I como corante fluorescente para detecção dos produtos da amplificação é o custo (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010; FRAGA; MEULIA; FENSTER, 2008; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). Hoje é o mais barato do mercado e de fácil utilização, além de ter mostrado sensibilidade, especificidade e eficiência semelhantes às outras formas de detecção.

Como desvantagem do uso de Sybr Green I é importante destacar a falta de especificidade do corante com a sequência alvo. Isso exige que o sistema (iniciadores e temperaturas de ciclagem) sejam muito bem otimizados no intuito de minimizar a amplificação de sequências que não sejam as desejadas, e conseqüentemente ter mais de um pico.

Outra característica que pode ser considerada desvantagem do uso do Sybr Green I é a necessidade de se gerar a curva de dissociação após o ciclo de reações de amplificação. A geração desse gráfico faz com que a reação fique, em média, 30 a 40 minutos mais longa do que aquelas reações que utilizam sondas específicas e que dispensam a geração e análise da curva de dissociação.

1.7.4.3 *Sondas de hidrólise*

Outra opção para a detecção da amplificação é a utilização de sondas específicas. O primeiro tipo de sonda fluorescente que foi desenvolvida são as chamadas sondas TaqMan ou sondas de hidrólise (SILVA, 2008; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). No presente estudo, as reações de qPCR realizadas para quantificação relativa dos genes foi feita com a utilização desses tipos de sondas.

Essas sondas são pequenas seqüências de oligonucleotídeos que apresentam na extremidade 5' um fluoróforo (6-carboxyfluoroceína – FAM) e na extremidade 3' uma molécula de *quencher* que pode emitir ou não fluorescência (MANUAL..., 2000; MANUAL..., 2003).

Essa seqüência que compõe a sonda é complementar à seqüência alvo que será amplificada na reação de qPCR. A sonda hibridiza na seqüência alvo e quando a enzima polimerase exerce sua função de estender a partir do iniciador a nova fita, haverá a quebra e liberação da sonda (MANUAL..., 2000; MANUAL..., 2003).

A função da molécula chamada de *quencher* (3') é absorver a fluorescência do fluoróforo que está na extremidade 5' da sonda. No entanto, quando a enzima quebra a sonda, o *quencher* não mais consegue absorver a fluorescência, que então é detectada pelo sistema de captação do termociclador. É desse modo que a fluorescência é detectada e será proporcional a quantidade de seqüências alvo novas geradas.

O *quencher* pode ser uma molécula que emite fluorescência (por exemplo, tetrametilrodamine, TAMRA) ou ser do tipo *non fluorescente quencher* (*quencher* que não emite fluorescência – NFQ). Essa informação tem relevância para o programa que fará a leitura dos resultados na diminuição entre os valores das emissões (MANUAL...,2003). As sondas do tipo NFQ são muito utilizadas já que não precisará ser lida fluorescência do *quencher*, deixando livre maior número de filtros e assim aumenta a possibilidade de reações multiplex com diferentes fluoróforos.

Outra característica importante das sondas tipo Taqman é a possibilidade de ter uma molécula ligada ao *quencher* chamada *minor groove binding* (MGB). A finalidade dessa molécula é garantir maior estabilidade à sonda, uma vez que essa é pequena (em média 8 a 10 nucleotídeos) e com a molécula de MGB a sonda se hibridizará com maior força e fidelidade à seqüência específica (MANUAL..., 2003).

O esquema abaixo (Figura 12) demonstra a estrutura das sondas tipo TaqMan e o funcionamento da sonda na reação de qPCR.

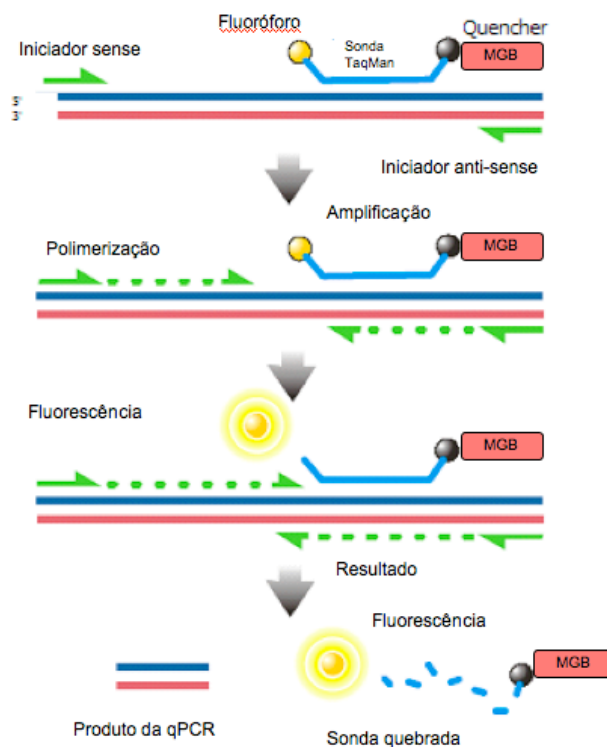


Figura 12. Esquema demonstrativo com o funcionamento da sonda tipo TaqMan.

Fonte: Adaptação de WIKIPEDIA links (2010)

Devido aos seus componentes, a sonda do tipo TaqMan MGB tem uma temperatura de dissociação de, em média, 10 graus superior à estimada teoricamente, baseada apenas na sequência de nucleotídeos que a compõe (MANUAL...,2003)). Em estudos de genotipagem de SNP as sondas TaqMan são muito utilizadas e o fato de terem molécula MGB garante a especificidade da reação e diferenciação de apenas um nucleotídeo entre duas seqüências alvo distintas.

Como principal vantagem da utilização de sondas específicas pode se destacar a especificidade (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). Diferentemente do que ocorre com as reações que utilizam os corantes intercalantes, não se faz necessário a construção da curva de dissociação após a reação com sondas específicas (DERVAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010). Como desvantagem deve se apontar o custo, onde reações que utilizam sondas específicas tem um custo, em média, três vezes superior às reações de Sybr Green I.

1.7.5 Controles da reação de qPCR

É fundamental que a reação de qPCR tenha adequados controles das amostras, da reação ou mesmo inter-reações (DERVAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008).

Em cada reação de qPCR é feito o controle da fluorescência basal através da utilização de um fluoróforo como referência passiva da reação. A maioria dos sistemas de qPCR utiliza o fluoróforo ROX (6-carboxi-X-rodamina) como referência passiva (SILVA, 2008). É através da leitura do ROX que é possível observar e normalizar a quantidade de fluorescência em cada amostra, isso porque o ROX está presente em todas as amostras, positivas e negativas.

A importância do ROX pode ser observada quando por exemplo duas amostras tem volumes diferentes. Onde em uma (A) tem o dobro do volume da outra (B) e é feita a quantificação do alvo gerando resultados iguais. Caso não seja normalizado, considerar-se-á que A e B terão a mesma quantidade, quando na verdade essas amostras não podem ser comparadas diretamente já que apresentam quantidade de reagentes diferentes.

Os *softwares* especializados utilizados para analisar os dados de qPCR são capazes de gerar gráficos onde é possível determinar a captação de cada fluoróforo por amostra. Nesses gráficos, em condições ideais, espera-se encontrar uma linha próxima a uma reta ou valores muito parecidos entre as amostras representando a referência passiva. (MANUAL...,2003).

Em estudos onde são necessários mais de uma reação, fato real para muitos pesquisadores, recomenda-se que haja a repetição de pelo menos uma amostra, com suas replicatas, em cada placa de reação. Isso servirá como controle inter-reações e pode ser uma importante estratégia de controle também das calibrações e eficiência do sistema de qPCR utilizado (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS; 2010).

1.7.5.1 Controle positivo, negativo e endógeno das reações

Devem ser utilizados controles positivos e negativos em cada reação. Os controles negativos são de dois tipos: os que são comumente chamados de controle sem alvo (*non template control* – NTC) com todos os reagentes, no entanto sem alvo (MANUAL...,2003). e os controles negativos com seqüências que não devem ser amplificadas, uma vez que não são específicas para os iniciadores.

Os controles positivos são aqueles que apresentam alvo em condições de amplificação e quantidade já conhecida. Em estudos que envolvam quantificação absoluta com construção de curva padrão são esses controles normalmente os que são diluídos de forma seriada em quantidade e diluições conhecidas e que servem de referência para a quantificação das amostras testadas (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010; FRAGA; MUELIA; FENSTER, 2008).

Um importante controle é o controle endógeno das amostras. Nesse controle o que se pretende é ter a quantificação de um alvo presente em todas as amostras, normalizar e evitar resultados falso negativos. A normalização da amostra é feita semelhantemente ao que é feito com a utilização do ROX, no entanto com o ROX são os reagentes que são normalizados e com a quantificação do controle endógeno é a quantidade de amostra - de alvo - em cada amostra que será normalizado.

Considerando que uma amostra (A) tem uma quantificação de 10 pg de alvo e outra amostra (B) tem de 20 pg e ambas tem a mesma quantidade de controle endógeno, demonstra que as amostras A e B têm realmente quantidades diferentes de alvo. Ainda de acordo com o exemplo acima, se o controle endógeno tivesse quantidades diferentes, precisaria ser normalizado para que então os valores de alvo possam ser analisados.

Para o controle endógeno normalmente são escolhidos genes chamados de *housekeeping genes* ou genes constitutivos (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010). Esses genes são aqueles que apresentam expressão constitutiva em todos os tecidos de um organismo, por exemplo genes da Beta actina e do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) para amostras de humanos (MANUAL...,2003).

1.7.6 Curva padrão

Finalizando a fase de otimização é fundamental a construção da curva padrão, gerada a partir de diluições seriadas com quantidades conhecidas do controle positivo da reação. É a partir dela que se calcula a eficiência da reação de acordo com a reação $[10^{(1/slope)}] - 1$ (GOMES et al., 2007; TOO et al., 2003).

O *slope* é o indicador da amplificação real, representa o coeficiente angular da reta gerada no gráfico composto pelo logaritmo da concentração (eixo das abscissas) e o valor de Ct (eixo das ordenadas) (GOMES et al., 2007).

Alguns procedimentos são importantes para que a reação de qPCR tenha a máxima eficiência. A utilização de pipetas calibradas ou mesmo de pipetadores automáticos maximizam a precisão das amostras (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). O uso de, no mínimo, duplicatas de cada amostra, controles positivos (esses devem ser repetidos em cada placa de reação - as mesmas amostras), controles negativos, são exemplos de condição essenciais.

1.7.7 Vantagens e desvantagens da qPCR em relação à PCR

São muitas as vantagens da qPCR em relação as reações de PCR ditas convencionais que necessitam ser reveladas para terem seus resultados analisados. O fato de ser uma reação onde é possível acompanhar em tempo real o que está havendo e dispensar a etapa de revelação é uma das maiores vantagens. Isso porque a fase de revelação, eletroforese com manipulação de produtos amplificados, é o momento de maior risco de contaminação, o que conseqüentemente aumenta o risco de se gerar resultados falso-positivos (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008).

A PCR é considerada uma reação que gera resultados semi-quantitativos, no entanto, a característica da qPCR cada vez mais explorada é a capacidade de quantificação precisa através de análises de quantificação absoluta (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008).

A alta sensibilidade da qPCR e a quantidade de parâmetros que podem ser analisados na reação são pontos positivos para a qPCR. Exemplos desses parâmetros seriam: a geração numérica dos resultados - e isso é fundamental para a análise desses resultados utilizando testes estatísticos; o controle individual da fluorescência em cada amostra; o desvio padrão entre as réplicas de cada amostra etc.

Ainda sobre vantagem da qPCR, destaque que com a rápida evolução dos termocicladores já é possível realizar estudos com até oito diferentes alvos em uma mesma amostra. Isso se tornaria muito mais difícil se fosse realizado em reações de PCR (MANUAL...,2003).

Como desvantagens da qPCR podemos destacar que o tamanho dos fragmentos a serem amplificados é limitado (300 pb, em média), enquanto que na PCR existe um limite muito maior para o tamanho do alvo, podendo chegar a vários Kb. O custo também seria uma desvantagem, uma vez que o custo de uma reação de qPCR em relação a PCR é maior, no entanto a cada dia os valores estão se tornando mais próximos devido a popularização da qPCR que leva a uma conseqüente diminuição dos custos (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008).

1.7.8 Tipos de quantificação

Em se tratando de estudos que envolvam quantificação a partir de reações de qPCR, são dois os tipos de quantificações: quantificação absoluta (por exemplo, o número de cópias de um determinado RNAm de um gene ou a viremia em cópias de alvo) e quantificação relativa (exemplo, amostra A tem duas vezes mais RNAm de um determinado gene do que a amostra B). Segundo VanGuilder e colaboradores na revisão sobre os 25 anos da qPCR, a maioria dos estudos utiliza a quantificação relativa e isso devido a maior facilidade de se obter os dados (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008).

1.7.8.1 *Quantificação absoluta*

Para a quantificação absoluta é necessário que se conheça o seqüência alvo e seja construído uma curva a partir da diluição seriada do controle positivo da reação. Dessa forma, de acordo com os valores de Ct para cada uma das diluições (com quantidades conhecidas) será possível quantificar uma amostra desconhecida (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010). Nos estudos que envolvem quantificação absoluta é possível a utilização de unidades.

1.7.8.2 *Quantificação relativa*

Na quantificação relativa não se faz necessário a construção de uma curva de diluição, isso porque a quantificação é feita comparando duas amostras. O método mais utilizado de quantificação relativa é o publicado por Livak e Schmittgen em 2001 (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) que é o método cujo valor de quantificação relativa (*relative quantification* – RQ) é gerado a partir da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

O valor de Ct é um valor logaritmo gerado no gráfico da curva de amplificação da reação de qPCR (já explicado anteriormente nesse estudo) e os valores de ΔCt são gerados a partir da normalização dos valores de quantificação da amostra alvo em relação à amostra constitutiva, ou seja, $\Delta Ct = (Ct \text{ alvo} - Ct \text{ controle endógeno})$. O segundo valor de ΔCt é representado pelo valor de Ct da amostra com a qual se deseja comparar também normalizada ($Ct \text{ referência} - Ct \text{ controle endógeno}$) (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010).

O número 2 que compõe a base da função exponencial denota que a amplificação dobra a quantidade de alvos a cada ciclo, isso em condições de reação onde a eficiência é de 100%. Para a utilização dessa fórmula é necessário levar em consideração dois aspectos: a reação ter 100% de eficiência e a utilização de uma amostra com expressão constante para normalização dos valores de expressão dos alvos – controle endógeno. Outra observação que deve ser considerada quando feita a escolha do método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ é que a reação não tenha muitos ciclos, em média 40, isso

evitará que sejam utilizados valores de Ct que não estão na fase exponencial (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010).

1.8 Inteligência computacional

Inteligência computacional (Inteligência artificial – IA) é definida como a ciência e a engenharia de tornar máquinas inteligentes por John McCarthy em 1956 (LUGER; STUBBLEFIELD, 2004). Foi logo após a Segunda Grande Guerra com a publicação do artigo *Computing Machinery and Intelligence* pelo matemático Alan Turing que a área começou a se desenvolver (TURING, 1950).

Conceituar inteligência artificial é considerada uma tarefa difícil já que envolve conceitos de inteligência (com considerações sobre mente e consciência) e artificialidade (destacando assim que o homem teria o poder de criar). Na tentativa de melhor conceituar, IA foi dividida em IA forte e IA fraco.

O termo IA forte se refere à máquina consciente ou máquinas que conseguem raciocinar e resolver problemas. Apesar da rápida evolução na criação de super computadores inteligentes desde a década de 50, do século passado até agora, ainda são poucos os exemplos reais de existência de IA forte. Cabe ao campo da literatura de ficção científica as descrições do que seriam as máquinas capazes de raciocinar, como o clássico “O homem bicentenário” de Issac Asimov (LUGER; STUBBLEFIELD, 2004).

Outro grande debate em torno de IA forte é o aspecto ético, já que criar uma máquina consciente e com capacidade de pensar e demonstrar autoconsciência poderia assim ser a tentativa de colocá-la no mesmo nível de inteligência do homem (TURING, 1950).

IA fraco é o termo relacionado aos computadores inteligentes, no entanto, que não tem a capacidade de raciocinar por si só e podem resolver problemas a partir de treinamentos orientados pelo programador, o homem. Devido a essa diferença entre IA forte e IA fraco, os avanços com relação a IA são muito maiores em IA fraco. São exemplos de IA fraco as aplicações de alguns métodos como os modelos conexionistas, máquina de vetor de suporte e redes neurais (LUGER; STUBBLEFIELD, 2004).

1.8.1 Aprendizado de máquina

Aprendizado de máquina - *Machine learning* é uma disciplina científica da IA que se dedica ao desenvolvimento de algoritmos e técnicas que tornam o computador capaz de aprender, isto é, que permitam ao computador aperfeiçoar seu desempenho (ALMEIDA, 2007; VALPAYDIN, 2004).

O principal objetivo das pesquisas que envolvem *machine learning* é a aprendizagem automática no reconhecimento de padrões complexos e tomar decisões baseada nos dados. Dessa forma, *machine learning* é diretamente relacionada à estatística, teorias da probabilidade, reconhecimento de padrões, inteligência artificial, controle adaptativo e teorias da ciência da computação (VALPAYDIN, 2004).

Considerar um computador inteligente significa que a partir de informações recebidas ele melhora gradualmente o desempenho. No entanto, esse conceito de aprendizagem da máquina é ainda muito controverso no âmbito da IA, porém algumas definições de aprendizagem de máquina podem esclarecer ou melhor definir o que aqui foi considerado com processo de *machine learning* (ALMEIDA, 2007). Segundo Rich and Knight (1991) (RICH; KNIGHT, 1991) o processo de *machine learning* em IA seria a situação onde mudanças adaptáveis no sistema, que permitem ao sistema fazer, da próxima vez, a mesma tarefa do mesmo grupo com mais eficiência.

Ainda sobre a polêmica acerca do processo de *machine learning*, existe a discussão sobre o envolvimento do ser humano nesse processo. Em alguns sistemas que funcionam com algoritmos baseados em *machine learning* há a tendência de eliminar a necessidade da intuição humana na análise dos dados, enquanto que outros adotam uma colaboração entre a máquina e o humano (VALPAYDIN, 2004). No entanto, a intuição humana não pode ser completamente eliminada em nenhum sistema, já que para existir é condição *sine qua non* que esse seja desenhado e essa tarefa é impreterivelmente realizada pelo ser humano.

A importância de estratégias de algoritmos de *machine learning* é fundamental e tem se mostrado capaz de solucionar problemas onde o uso de técnicas de programação clássica não podem resolver.

1.8.2 Tipos de algoritmos de aprendizagem

Algoritmo é o conjunto de regras finitas bem definidas e não ambíguas que o computador necessita seguir para executar uma função (KNUTH, 1997). Em *machine learning* existem alguns tipos de algoritmos que vão determinar a forma de aprendizagem do sistema.

Dois dos mais importantes exemplos desses algoritmos seriam: aprendizagem supervisionada e não-supervisionada (ALMEIDA, 2007; VALPAYDIN, 2004). Na aprendizagem supervisionada, o sistema precisa conhecer o ambiente através de exemplos de pares de entrada-saída. Por exemplo, na classificação de problemas, aprender significa conhecer qual resposta é a saída (resposta) para cada entrada (situação). Já na aprendizagem não supervisionada, não há exemplos de valores de saída desejada (ALPAYDIN, 2004). A tarefa neste caso busca, a partir dos dados de entrada, criar alguma compreensão e gerar uma representação interna capaz de codificar as características de entrada em novas classes e agrupá-las corretamente (ALMEIDA, 2007).

1.8.3 Máquina de vetor de suporte

Máquina de vetor de suporte - *Support Vector Machines* (SVM) - é uma técnica inovadora supervisionada de “machine learning” desenvolvida baseada no princípio de minimização do risco de estrutura da teoria de aprendizado estatístico (BURGES, 1998; STEINWART; CHRISTMANN, 2008). Os fundamentos das máquinas de SVM foram desenvolvidos por Valpink e colaboradores nos anos 1970.

SVM é uma técnica para classificação e regressão binária (duas classes) que funciona pela representação de um grupo de exemplos positivos e negativos em um banco de dados através de vetores x_i ($i = 1, 2, \dots, N$) com correspondentes características y_i (+1,-1). SVM funciona como uma poderosa ferramenta de IA quando a separação linear não é possível, sendo necessário um espaço com maior dimensão, onde os dados podem então ser separados linearmente.

1.8.4 Função kernel

A função kernel, em *machine learning*, é uma ferramenta utilizada nos algoritmos de classificação linear para solucionar problemas não-lineares. Isso acontece a partir do mapeamento de observações originalmente não-lineares em um hiperplano e aplicação da classificação linear, ou seja, projeção dos vetores de características de entrada, nesse novo espaço equivalente ao espaço original (AIZERMAN; BRAVERMAN; ROZONOER, 1964; ALMEIDA, 2007).

A eficiência do sistema de predição do SVM é dependente do tipo de função kernel usada para analisar os dados. No estudo realizado foram explorados três tipos (linear, sigmóide e função de base radial – RBF) que são comumente implementadas em problemas biológicos (CHANG; LIN, 2009).

Os tipos de função kernel são ajustadas pelos valores de determinados parâmetros. Para a função linear a variável C , para RBF as variáveis C e G e a função sigmóide as variáveis G e R . As variáveis G e R funcionam como parâmetros de custo que controla a capacidade da função em estabelecer os valores entre a margem e o erro da classificação enquanto C é chamado o parâmetro de regularização da função (CHANG; LIN, 2009).

1.8.5 Hiperplanos de separação

A SVM aprende a diferenciar os exemplos positivos dos negativos pelo treinamento e classificação que mapeiam as amostras de entrada, usando função kernel na maioria dos casos, em um espaço de alta dimensão. (Figura 13)

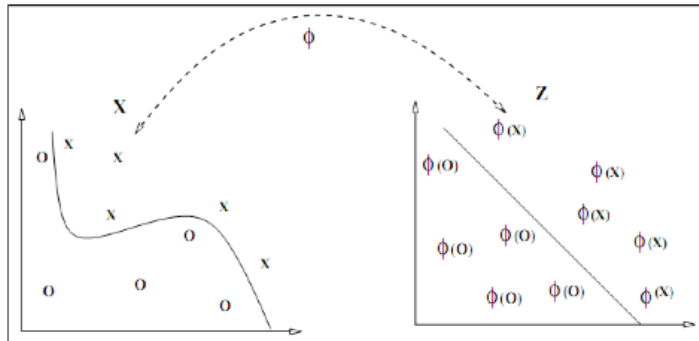


Figura 13. Mapeamento do espaço de entrada via função Kernel.

Fonte: Almeida, (2007)

Nota: Mapeamento linear após aplicação de função kernel de separação.

Dessa forma, procura uma separação hiperplana que melhor diferencie as duas classes com margem máxima e erro mínimo (ALMEIDA, 2007).

A melhor classificação será aquela onde a margem entre o hiperplano e os mais próximos vetores de características das duas classes é máxima. Os vetores de características que são mais próximos do hiperplano são chamados de *support vectors*.

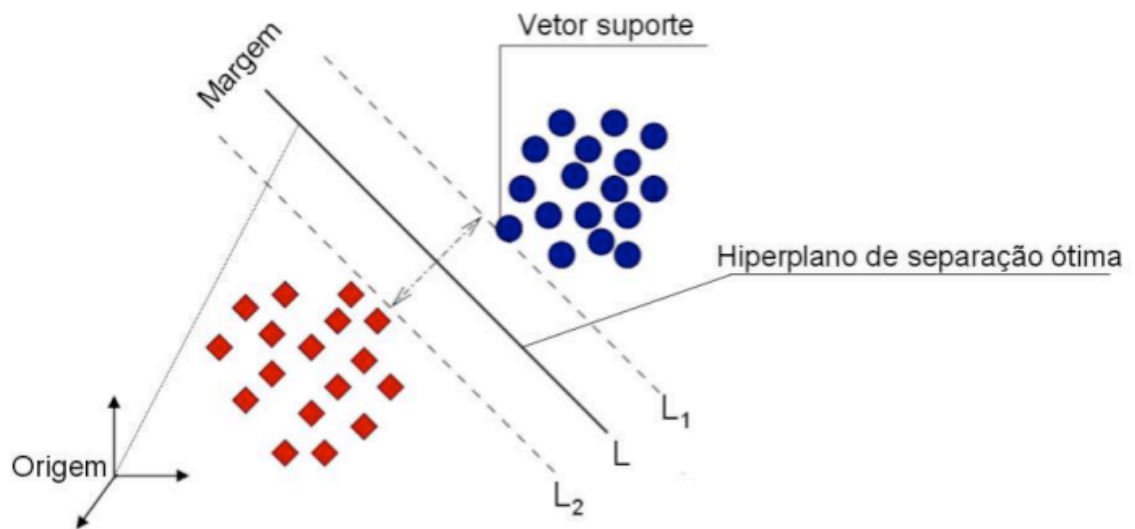


Figura 14. Esquema de classificação utilizando SVM.

Fonte: Nascimento, et al. (2009).

Nota: Destacando origem do plano, margem de separação, vetor suporte e hiperplano de separação ótima.

A Figura 15 representa uma situação com dois grupos distintos (bolas amarelas e azuis) que necessita de separação e seus possíveis hiperplanos (linhas pretas).

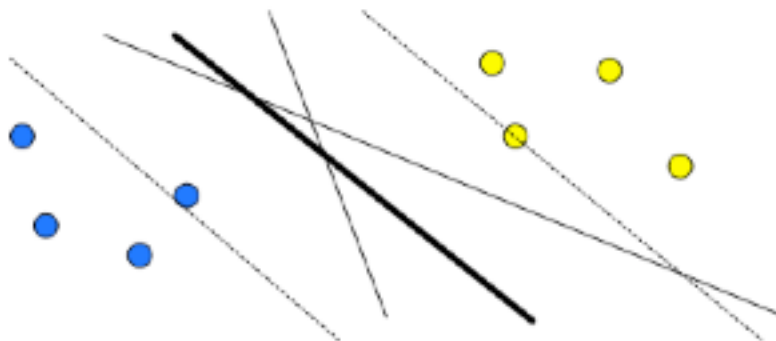


Figura 15. Possíveis hiperplanos

Fonte: Almeida (2007).

O painel 16 apresenta duas possíveis situações de separação, onde no gráfico (a) o hiperplano de separação tem a margem pequena e em (b) o hiperplano tem a margem máxima. As linhas pontilhadas nos gráficos representam a margem máxima e a linha fechada a função que determina a separação entre as duas amostras.

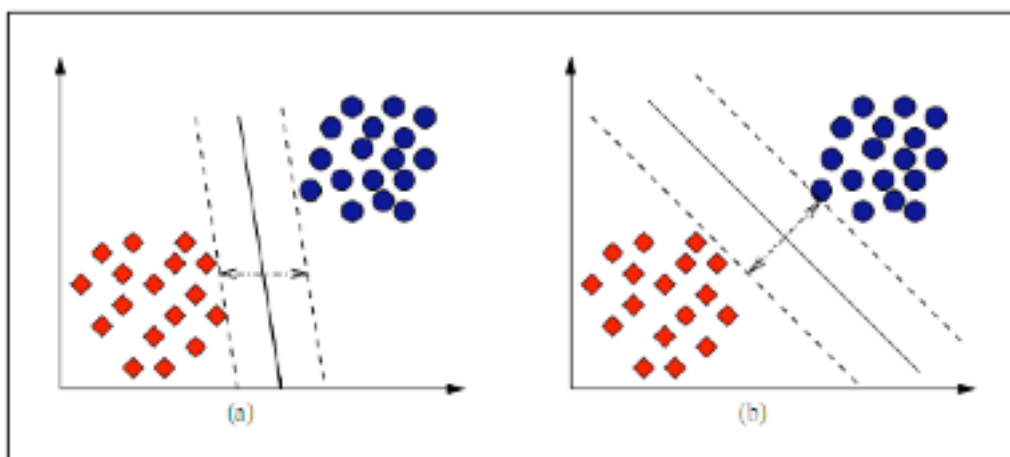


Figura 16. Hiperplano de separação.

Fonte: Almeida (2007).

Nota: A) hiperplano de separação pequena e B) hiperplano de margem máxima.

1.8.6 Aplicações da SVM

As aplicações de SVM não se restringem apenas à área de informática e inteligência computacional. Atualmente, a literatura científica destaca importantes aplicações de SVM na área de biologia e bioinformática. Alguns exemplos dessas aplicações seriam estudos envolvendo detecção de proteínas homólogas, classificação da expressão gênica a partir de resultados de microarranjo, predição de estrutura protéica, identificação de éxon alternativo, classificação de imagens, análises de seqüências biológicas etc (CHANG; LIN, 2009; NASCIMENTO et al., 2009).

1.8.7 Limitações da aplicação de SVM no presente estudo

Foi utilizado no estudo a metodologia de SVM que é uma recente abordagem avançada de inteligência computacional baseada na teoria de aprendizado estatístico (SHAWE-TAYLOR; CRISTIANNI, 2000) para verificar qual ou quais genes dentre os estudados teriam maior influência no diagnóstico e prognóstico da dengue. A relevância em se utilizar SVM é que a partir dessa metodologia é possível gerar um modelo onde os genes mais importantes para o diagnóstico são selecionados e esse modelo pode ser testado e “ensina” o sistema computacional a gerar o melhor modelo de acordo com os dados que são acrescentados. Uma outra grande importância na escolha por SVM foi a capacidade que esta ferramenta tem de ser aplicável e gerar bons resultados quando a matriz de dados a serem analisados é pequena.

No presente estudo foram analisados 28 pacientes (13 DF e 15 DHF) o que faz com que a matriz que suporta o modelo de SVM seja relativamente pequena, no entanto, é importante destacar a possibilidade de aumentar a matriz pré-existente. Sendo assim, o presente estudo se propõe a apresentar uma importante ferramenta baseada em inteligência computacional que pode ser utilizada associada aos estudos de expressão gênica e contribuir para melhor entendimento e análise dos dados de origem biológica.

2 JUSTIFICATIVA

A OMS apóia estudos multicêntricos em regiões endêmicas para dengue com o objetivo de coletar evidências sobre o critério de classificação da dengue e seus níveis de gravidade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). A falta da compreensão dos diferentes fenômenos envolvidos na resposta imunológica de pessoas infectadas pelo vírus dengue, assim como o insuficiente conhecimento sobre a patogenia da dengue justificam o desenvolvimento de estudos nesses temas (COFFEY et al., 2009).

Apesar do grande número de trabalhos publicados referentes ao tema, ainda não se sabe ao certo quais são os determinantes para os diferentes prognósticos da dengue (COFFEY et al., 2009). Uma importante indicação é que o sistema imune, dentre outros fatores, tem influência nesse prognóstico, uma vez que a resposta imune inata tem importante papel na resposta antiviral (DIAMOND et al., 2009).

Muitos vírus tem estratégias diretas para controlar a ativação da resposta imune inata do hospedeiro, ou apresentam ações efectoras que tem como alvo pontos cruciais na via de indução do interferon (SAITO; GALE, 2007; HALLER; KOCHS; WEBER, 2006; CONZELMAN, 2005). O melhor conhecimento sobre o comportamento do vírus dengue em relação à ativação do sistema imune irá promover avanços para que possam ser realizadas estratégias de intervenção, diagnóstico, vacinas, e desenho de drogas antivirais (HALLER; KOCHS; WEBER, 2006; KAWAI; AKIRA, 2008; MEYLAN; TSCHOPP, 2006).

É importante que se compreenda quais são os fatores que influenciam no prognóstico da dengue e isso tem um importante impacto econômico na saúde pública. Já que os pacientes que apresentam maior risco de evoluírem para a forma grave merecem atenção e cuidados especiais dos profissionais de saúde, devendo ser internados (CORDEIRO, 2008). Melhores métodos para predição de prognósticos deverão minimizar o número de internações desnecessárias, oferecer serviços de saúde mais adequados, minimizar a morbidade e diminuir o índice de mortalidade referente a pacientes com dengue (COFFEY et al., 2009).

A correlação entre a gravidade da doença com marcadores de ativação imune em diferentes células tem sido interpretado por pesquisadores, os quais sugerem que a resposta imune aos componentes do vírus dengue poderia contribuir para o processo autoimune que

resulta na forma grave da dengue (HALSTEAD, 2007). É nesse contexto que importantes grupos tem se fundamentado e realizado estudos “in vitro” e com grupo de pacientes sobre a expressão gênica (FINK et al., 2007; LONG et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2009; TSAI et al., 2009; SIMMONS et al., 2007; UBOL et al., 2008; KRUIF et al., 2008) assim como o painel protéico nas diferentes modalidades clínicas da dengue (THAYAN et al., 2009).

Diante disso, é interessante que sejam estudados os genes expressos nas diferentes formas clínicas da dengue que apresentam relação com a resposta imune inata. Acreditamos que através do estudo e quantificação do RNA mensageiro (RNAm) de alguns genes envolvidos na ativação da via do interferon poderemos contribuir para avanços sobre a patogenia da dengue e suas relações com a evolução clínica da doença.

A fim de refinar a análise dos dados gerados, foi utilizado ferramentas de bioinformática e inteligência computacional. Dessa forma, o presente estudo propõe associar aos estudos de expressão gênica novas maneiras de analisar dados e contribuir para melhor entendimento, assim como disponibiliza uma estratégia que pode ser facilmente adaptada a estudos com outros genes e maior número de pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o nível de expressão dos RNAm de genes relacionados com a indução da resposta imune inata em células do sangue periférico de pacientes com dengue e relacionar os níveis de expressão com o desenvolvimento dos sintomas graves da doença.

3.2 Objetivos específicos

- a) Definir nível de expressão dos RNAm de genes selecionados para o estudo;
- b) Relacionar os níveis da expressão gênica nos pacientes com dengue clássica (DF) e dengue hemorrágica (DHF);
- c) Classificar, através de ferramenta de informática, pacientes como DF ou DHF baseado nos níveis de expressão dos genes testados.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Como o nível de expressão e interação dos genes envolvidos na resposta imune inata em células do sangue periférico de pacientes com dengue se relacionam com o prognóstico da doença?

5 HIPÓTESE

A expressão e interação de genes relacionados com a indução da resposta imune inata em células do sangue periférico de pacientes com o vírus dengue reflete em diferentes prognósticos para a dengue.

6 MATERIAS E MÉTODOS

6.1 Tipo de estudo

Estudo observacional, envolvendo um componente de natureza laboratorial a partir de casos provenientes de uma coorte prospectiva.

6.2 População de estudo

O presente estudo foi realizado na cidade do Recife, capital do Estado de Pernambuco, localizado na região Nordeste do Brasil.

Foram utilizadas células do sangue periférico mononucleadares (PBMCs) de pacientes de um banco de amostra proveniente de um estudo de coorte sobre dengue desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, descrito por Cordeiro et al. (2007) (CORDEIRO et al., 2007). O projeto da coorte foi revisado e aprovado pelos Comitê de ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães CEP – CPqAM (número 32/09, documento em anexo). Essas amostras foram encaminhadas ao Departamento de Virologia em seguida ao Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE) através de um convênio com os Hospitais Santa Joana, Esperança, Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP) e Hospital Barão de Lucena, todos localizados na cidade do Recife.

6.3 Amostras de sangue dos pacientes

As amostras foram identificadas de acordo com a ordem de coleta, da primeira à quinta, sendo a primeira amostra aquela correspondente ao dia do primeiro atendimento hospitalar e

início da participação do voluntário no projeto, quando o mesmo assinou o termo de consentimento livre e esclarecido. As amostras estão classificadas em um banco de dados do LAVITE com informações sobre dias de febre, diagnóstico e classificação clínica, carga viral, diagnóstico molecular e sorológico.

Para a realização do presente estudo foram selecionadas amostras (13 de pacientes diagnosticados com DHF e 15 de pacientes diagnosticados com DF) que estivessem entre os 3º e 5º dia de febre (segundo relato do próprio paciente no momento da coleta e informações do prontuário médico). Cinco colaboradores foram voluntários ao projeto e suas amostras foram classificadas como não dengue - ND.

6.4 Classificação dos pacientes

A classificação dos pacientes foi feita seguindo as orientações da Organização Mundial da Saúde (OMS - 2007). Segundo a OMS, dengue clássica ou febre da dengue (*dengue fever* – DF) é definida como uma doença clinicamente diagnosticada como dengue e confirmada laboratorialmente por pelo menos um dos seguintes testes: sorologia (IgM), isolamento de vírus e/ou por detecção do RNA viral. A febre hemorrágica da dengue (*dengue hemorrhagic fever* – DHF) foi definida como um caso agudo de dengue, confirmado laboratorialmente e com evidência de manifestação hemorrágica, incluindo a prova do laço positiva, plaquetopenia ($< 100.000 \text{ mm}^3$), hemoconcentração (elevação do hematócrito maior do que 20% do valor basal) ou outro sinal de extravasamento de plasma (CORDEIRO, 2008).

A Tabela 1 apresenta as informações referente a média de idade, dias de infecção, quantificação das plaquetas, sorotipo infectante, diagnóstico molecular e tipo de infecção (primária ou secundária) das amostras utilizadas no presente estudo.

Tabela 1 – Informações das amostras estudadas.

Classificação dos pacientes (número da amostra)	DF (15)	DHF (13)
Idade, média em anos	11,25 (5 - 48)	28.58 (5 – 80)
Média dos dias de infecção	3.37	3
Sorotipo infeccioso	DENV- 2 (6) e DENV- 3 (4)	
Infecção secundária, número (%)	12 (80)	9 (69.2)
Plaquetas, média células/ μ L	219,675	105,636.363
PCR ou isolamento viral positivo, número (%)	8	3

6.5 Separação das células mononucleares do sangue periférico

Para obter as células mononucleares do sangue periférico (PBMC), o sangue total do paciente, coletado em heparina, foi diluído em solução salina na proporção de 1: 2 (v/v). Em seguida, o volume total dessa amostra diluída foi colocado em tubo estéril contendo solução de Ficoll-Hypaque ($d = 1.007 \text{ g/L}$) (Amersham, Biosciences) em um volume igual ao volume de sangue utilizado e submetido à centrifugação a 2500 rpm/20°C. Após 25 minutos as PBMCs foram recuperadas com uso de pipetas Pasteur estéreis, na interface entre a solução salina e a solução de Ficoll. As células obtidas foram então submetidas a três procedimentos de lavagem com meio de cultura de RPMI 1640 (Sigma Co.), quantificadas automaticamente por contador de células Vi-cell XR (Beckman Coulter), armazenadas e congeladas em 10% (v/v) de DMSO (dimetil sulfóxido) e soro fetal bovino inativado (FBS, Hyclone) a -80°C até o momento do uso.

6.6 Purificação de RNA

A purificação de RNA total de PBMC foi realizada através do kit *Spin Cell Rna Mini Kit For Total RNA Extractions From Animal And Human Cells* (Invisorb) de acordo com instruções do fabricante. Resumidamente, de acordo com a concentração das PBMCs que foram utilizadas

para purificação foi realizada a lise celular seguido da separação do DNA genômico através da retenção em coluna de sílica-gel. O material que passou pela coluna foi então misturado a etanol 70% e o RNA foi separado por retenção em coluna de sílica-gel de porosidade diferente da primeira coluna utilizada (para retenção do DNA genômico). A coluna contendo o RNA total foi lavada algumas vezes e o RNA total foi eluído em 40 μL em tampão de eluição do kit e imediatamente transportado em gelo para o armazenamento em -80°C .

A dosagem do RNA total purificado foi feita por leitura espectrofotométrica onde absorvância 260 nm x fator de diluição x 0.4 = [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] e leituras das absorvâncias 280 e 320 nm garantiram analisar a qualidade do RNA total purificado.

6.7 Transcrição Reversa

A transcrição reversa foi realizada utilizando-se a enzima Superscript III reverse transcriptase 200U/ μl (Invitrogen), iniciadores randômicos hexâmeros (Invitrogen) e inibidor de RNase (RNase OUT 40 U/ μl - Invitrogen), segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante dos reagentes. 5 μL do RNA purificado foi misturado a 10 mM de iniciadores, 10 mM de dNTP e 6 μL de água tipo I (ASTM) e aquecido a 65°C por cinco minutos e incubados em gelo por, pelo menos um minuto. Em seguida, foram adicionados a essa reação 4 μL de tampão first-strand (5x), 100 mM de ditiotreitol (DTT), 1 U de inibidor de RNase e 1 U da enzima transcriptase. A reação foi incubada a 25°C por cinco minutos e, posteriormente a 50°C por 45 minutos. Ao final, a reação foi aquecida a 70°C por 15 minutos. O DNA complementar (cDNA) gerado foi armazenado a -20°C até o momento de sua utilização.

6.8 PCR em tempo real

Para realização da quantificação da expressão dos genes selecionados para estudo foi utilizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR). As reações foram realizadas no

equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), instalados no Núcleo de Plataforma Tecnológica (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ.

A quantificação de cada gene foi realizada baseada no sistema de sondas tipo Taqman da Applied Biosystems (MANUAL..., 2003) utilizando pares de primers específicos e sondas do tipo MGB marcadas com corante fluorescente FAM na extremidade 5' e *quencher* NFQ na extremidade 3' (Figura 17).

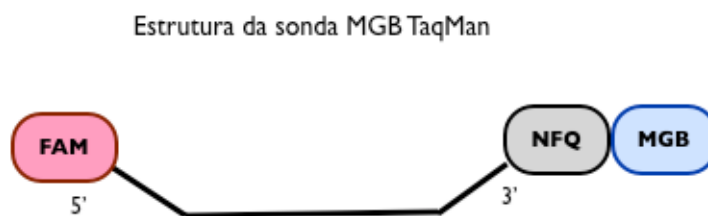


Figura 17 – Esquema representativo da sonda tipo TaqMan utilizada no estudo.

Fonte: esquema elaborado pela autora.

A quantificação do gene da beta-actina, utilizado como gene endógeno, foi feita também pelo sistema de sonda tipo Taqman, no entanto as sondas foram marcadas com o corante fluorescente VIC na extremidade 5'. A fluorescência passiva da reação foi medida através da utilização do fluoróforo ROX.

As reações foram realizadas em triplicatas para a quantificação de cada gene em cada amostra em conjunto com dois controles negativos da reação (NTC). Foram realizadas reações distintas para cada gene assim como para o controle endógeno (beta-actina). Foi testada a possibilidade de se realizar reação de qPCR em multiplex, onde seriam quantificados um gene por vez e a beta-actina no mesmo tubo. No entanto, foi observado que a eficiência da reação era muito baixa. Por isso, em cada placa (96 poços) realizada, as amostras tinham o gene da beta-actina quantificado e os genes específicos em tubos separados.

Cada reação teve volume final de 25 μ L e foi composta de 12,5 μ L TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) Applied Biosystems, 1,25 μ L do TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) do gene analisado, 2 μ L do cDNA, completado o volume com água tipo I

(*American Society for Testing and Material - ASTM*). As condições de amplificação foram de 50°C por 3 minutos, 95°C por 10 minutos seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

A quantificação foi feita de modo relativo (*relative quantification* – RQ) e baseada no método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ uma vez que as reações foram consideradas com eficiência de 100% (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Nesse método é feita a normalização da quantificação da expressão gênica a partir da quantificação do gene utilizado como controle endógeno, no caso beta-actina e então comparada as expressões em duas amostras relativizando a quantificação.

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Onde: Ct significa *cycle threshold*. Ou seja, o ciclo em que a amostra ultrapassou a linha que determina o limite entre positivo e negativo.

São calculados dois valores de delta Ct já que na quantificação relativa é feita através de comparação entre duas amostras. Para melhor esclarecimento, consideremos a situação do estudo como exemplo, onde foi comparada a quantificação gênica em amostras de pacientes com DF e DHF. Para que a quantificação pudesse ser feita utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foram gerados dois valores de delta; um para DF e um para DHF. Esses valores de delta são gerados com a finalidade de normalizar a quantificação.

Portanto, $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ de cada amostra é calculado onde:

$$\text{delta Ct da amostra DF} = Ct \text{ do gene estudado} - Ct \text{ do gene endógeno}$$

$$\text{delta Ct da amostra DHF} = Ct \text{ do gene estudado} - Ct \text{ do gene endógeno}$$

Desse modo, é possível quantificar a expressão de um determinado gene na amostra DF em relação a amostra DHF e vice versa. O valor de RQ será >1 se o gene for mais expresso em DF do que em DHF e <1 se a situação for a inversa.

Em cada experimento de qPCR realizado foram analisados os valores das triplicatas de cada amostra e o valor do *threshold* foi ajustado de acordo com o menor desvio observado entre as triplicatas. Em algumas amostras uma das triplicatas foi omitida, já que as duplicatas tiveram um desvio padrão abaixo de 0.10. Dessa forma, quando utilizados os valores de Ct na fórmula de RQ foram considerados os valores da média dos Ct (média das triplicatas ou duplicatas) e também os desvio padrões entre elas. Revendo a fórmula:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct};$$

Delta Ct DF = (Média dos Ct do gene estudado \pm desvio padrão) – (Média do Ct do gene endógeno \pm desvio padrão)

Delta Ct DHF = (Média dos Ct do gene estudado \pm desvio padrão) – (Média do Ct do gene endógeno \pm desvio padrão)

A análise dos dados foi feita pelo *software* ABI PRISM (versão 2.0.1 - Applied Biosystems) (MANUAL..., 2003).

Para a análise de cada gene foi feito o estudo individual dos pacientes e também agrupados a fim de estudar como a expressão dos genes selecionados para o estudo se comportam nas amostras de DF e DHF.

6.9 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o teste T não paramétrico de Student com correção de Welch através do programa GraphPad Prism versão 4.0 para Macintosh (San Diego, California, USA - www.graphpad.com).

6.10 Implementação de Máquina de vetor de suporte

O processo de aprendizagem do sistema computacional a partir de uma matriz de SVM acontece baseado nas duas etapas da implementação do SVM: treinamento e validação. Para realização dessas etapas, a amostra é dividida aleatoriamente em duas partes, sendo uma utilizada para treinar o modelo e assim definir quais genes são mais relevantes e então o modelo é validado. Dessa forma, o sistema “aprende” quais são os genes mais relevantes e se adapta de acordo com a entrada de mais amostras no sistema (SHAWE-TAYLOR; CRISTIANINI, 2000).

O SVM funciona baseada em um tipo de função matemática do tipo kernel. A escolha do tipo de função kernel a ser utilizada no estudo foi feita baseada nos resultados obtidos com os testes feitos com o banco de dados a ser utilizado. Foram testados três dos mais comuns tipos de função kernel (linear, sigmóide e RBF) e algumas combinações entre os valores das variáveis (C, G e R) que coordenam cada uma das função. A tabela 2 apresenta quais valores foram testados para cada tipo de função:

Tabela 2 – Valores das variáveis para cada tipo de função kernel testada.

Variável	Tipo de função kernel		
	Linear	RBF	Sigmóide
C	0.01, 0.10, 1.0, 10.0, 100.0		
R		0.01, 0.10, 1.0, 10.0, 100.0	
G		0.10, 1.0, 10.0, 100.0, 1000.0	

Foi então calculado a acurácia de cada uma das três funções e as possíveis combinações de valores das variáveis e então foi escolhido o RBF como melhor tipo de função kernel por ter apresentado melhor eficiência.

A Figura 18 apresenta um resumo dos testes de acurácia onde os três gráficos representam as três funções e alguns dos valores das variáveis testadas: função Linear com 5 valores de C (0.01, 0.10, 1.00, 10.00, 100.0); RBF com cinco valores de C (0.01, 0.10, 1.00, 10.00, 100.0) e G de 0.10 e Sigmóide com cinco valores de R (0.01, 0.10, 1.00, 10.00, 100.0); e G de 0.10. Foram apresentados na Figura 18 apenas os valores mais relevantes de acurácia para as combinações entre os valores das variáveis C, G, e R nas três funções kernel testadas.

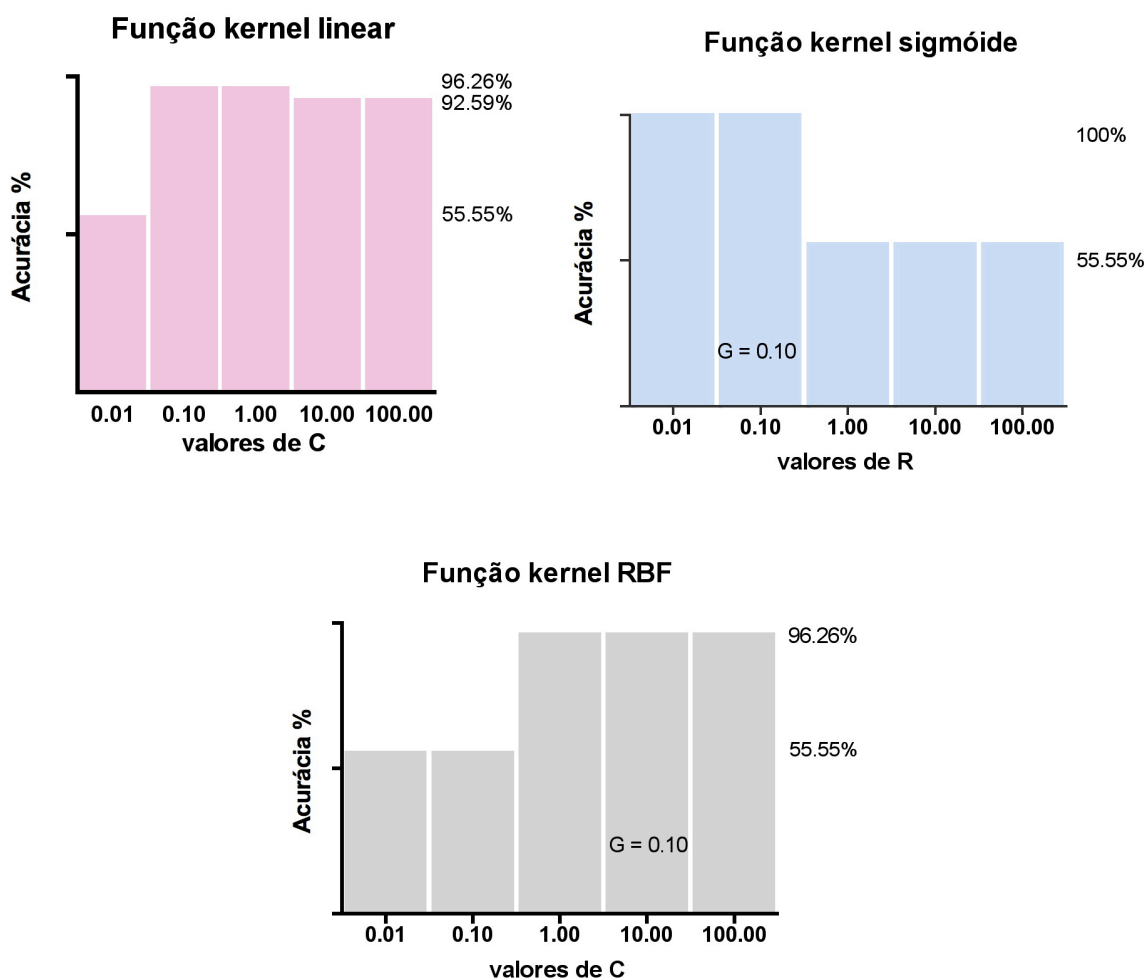


Figura 18 – Valores da acurácia para função kernel linear, RBF e sigmóide com valores das variáveis C, G, e R.

Fonte: Dados da autora

Diante dos resultados de acurácia para cada tipo de função kernel e combinações entre as variáveis obtidos foi selecionado para utilização no presente estudo a função kernel RBF (valor de C de 1.00 e G de 0.10) onde a acurácia nos testes foi de 96,26% além de ser o tipo de função kernel mais comumente implementado em solucionar problemas biológicos (CHANG; LIN, 2009).

6.11 Codificação dos vetores

Para implementação do SVM nos dados de expressão gênica, cada um dos 12 genes testados tiveram os valores gerados nos experimentos de qPCR utilizados. Os valores foram aqueles referentes as razões DF/ND e DHF/ND.

Foram definidos os status de *up-regulated* (mais expresso) e *down-regulated* (menos expresso) para cada gene, onde *up-regulated* foram aqueles que tiveram os valores > 1 para as razões DF/ND e DHF/ND, enquanto “down-regulated” foram aqueles que tiveram os valores < 1 para as razões DF/ND e DHF/ND.

Nas situações onde os genes foram classificados como *up-regulated* foi estabelecido o valor de “10” enquanto que para os genes *down-regulated* o valor de “01”. Dessa forma, a expressão gênica observada em cada paciente é representada por um vetor de 24 dimensões (12 genes e duas possibilidades de status para cada gene: *up* ou *down-regulated*).

Cada um dos vetores de 24 dimensões foi classificado como “1” quando relacionado a expressão gênica de pacientes DF e “-1” para pacientes DHF. Dessa forma, o sistema de classificação de SVM “entende” os exemplos binários de positivo e negativo para o treinamento.

6.12 Matriz de SVM

De acordo com a classificação explicada no item anterior a matriz utilizada no estudo foi composta por 28 linhas que representam os 28 pacientes analisados (15 DF e 13 DHF) e 13 colunas (sendo 12 referente a expressão de cada um dos 12 genes e a primeira que é aquela onde o paciente é classificado em DF ou DHF).

A representação para a codificação binária utilizada na classificação da expressão gênica dos pacientes foi aquela onde a posição dos valores de 1 são representados antes os dois pontos. Por exemplo: 10 é igual a 1:1; 0001 é igual a 4:1, ou seja, na posição 4 tem o número 1. Como são 12 vetores com 24 dimensões, são então 24 possíveis posições para o número 1. A posição sendo então determinada pela valor de 10 ou 01 que cada gene adquiri de acordo com o valor da

expressão gênica. Sendo assim, por exemplo, na matriz “5:1” significa 00001, ou seja esse gene está na terceira coluna (posições cinco e seis) e sua expressão foi 10, ou seja *up-regulated*.

6.13 Desenvolvimento modelo SVM

A implementação do modelo de SVM usado no estudo foi feito a partir do pacote gratuito LIBSVM desenvolvido por Chang e Ling (CHANG; LIN, 2009).

Utilizando a matriz explicada no item anterior, foi realizado estudo de validação cruzada em 28 partes (*28-fold cross-validation*) de acordo com o banco de dados dos pacientes e utilizando várias combinações das variáveis C e G.

Dessa forma, na realização da validação cruzada o banco de dados dos 28 pacientes foi dividido em 28 partes, onde uma dessas partes é usada como teste enquanto as outras 27 partes são usadas para o treinamento da classificação do SVM. O processo é repetido 28 vezes de modo que cada parte serve de teste uma vez. Essa estratégia garante que todas as partes sejam usadas como teste e também façam parte do treinamento.

Foram realizadas validação cruzada 28 vezes para cada uma das combinações dos valores das variáveis C (0.01, 0.1, 1, 10.0 e 100.0) e G (0.1, 1, 10, 100.0, and 1000.0) e dessa forma foram obtidos os valores que representam a performance do modelo. A acurácia (AC) é dada a partir do cálculo gerado após cada validação cruzada, de acordo com a seguinte fórmula:

$$AC (\%) = \frac{TP + TN}{TP + FN + TN + FP} \times 100$$

Onde:

TP - verdadeiro positivo

TN – verdadeiro negativo

FN – falso negativo

FP – falso positivo

Depois de selecionados os melhores valores para as combinações de C e G de acordo com acurácia, a validação cruzada foi repetida 12 vezes sob diferentes condições. Essa metodologia, conhecida também como Jack Knife foi fundamental onde cada uma das 12 condições selecionadas foi utilizada para testar e validar o modelo. Nessa etapa foi analisado, coletivo, e individualmente, a contribuição de cada gene na classificação DF e DHF.

Para isso, foram testadas 12 diferentes condições onde foram retirados um gene por vez e também agrupados aqueles onde o valor da acurácia foi maior.

6.14 Considerações éticas

Esse estudo utilizou amostras de soro proveniente de um banco de dados de amostras de um projeto mais amplo, intitulado “Vacina de dengue baseada em epítomos, tetravalente e direcionada ao compartimento MHCII”, registrada no Comissão de ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães com o número 68/02 e aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisas (CONEP) com o número 4909. As metodologias aqui descritas já fazem parte desse projeto maior, ao qual está vinculado. O presente estudo teve a aprovação do Comissão em Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ, em 25 de setembro de 2009, Registro 32/09, CAAE 0030.0.095.000-09, de acordo com a Resolução CNS 196/96 (documento em anexo).

7 ARTIGOS

7.1 Artigo 1

MARCADORES MOLECULARES PRECOSES DA DENGUE HEMORRÁGICA EARLY MOLECULAR MARKERS PREDICTIVE OF DENGUE HEMORRHAGIC FEVER

Autores:

Carlos Eduardo Calzaara – Silva 1

Ana Lisa V Gomes 1

Rita de Cássia Carvalho Maio 3

Bartolomeu Acioli Santos 1

Laura Helena Vega Gil 1

Ernesto Torres A Marques Junior 2.

Instituição que pertencem:

(1) Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, CPqAM/FIOCRUZ

(2) Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Department of Pharmacology and Molecular Sciences The Johns Hopkins School of Medicine,

(3) Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço para correspondência do autor responsável:

Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, CPqAM/FIOCRUZ.

Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil

Artigo publicado na revista Anais da Academia Brasileira de Ciências (2009) 81(4): 1-7



Early molecular markers predictive of dengue hemorrhagic fever

CARLOS E. CALZAVARA-SILVA^{1*}, ANA L.V. GOMES^{1*}, RITA C.C. MAIA³,
BARTOLOMEU A. SANTOS¹, LAURA H.V.G. GIL¹ and ERNESTO T.A. MARQUES JR.²

¹Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, CPqAM/FIOCRUZ
Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil

²Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Department of Pharmacology and Molecular Sciences
The Johns Hopkins School of Medicine, 725 North Wolfe Street, Biophysics Bld., Baltimore, MD 21205, USA

³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Francisco Lacerda, 410, Bloco 5, Várzea, 50741-150 Recife, PE, Brasil

*Manuscript received on August 11, 2008; accepted for publication on July 9, 2009
presented by JERSON L. SILVA*

ABSTRACT

The management of acute dengue patients during outbreaks is a challenging problem. Most of the dengue fever cases are benign, but some cases develop into a severe and possibly lethal vasculopathy, known as dengue hemorrhagic fever. Early symptoms of dengue and hemorrhagic fever are very similar. An early differential diagnosis is needed to predict which of these two clinical presentations is crucial to proper patient care and public health management. This study evaluates the predictive potential of specific mRNA expression markers of dengue hemorrhagic fever using quantitative real-time PCR assays. Six candidate “dengue hemorrhagic fever specific signature genes” were evaluated and all showed good correlation among their transcription levels at early days of infection and the later development of severe vasculopathy. The markers selected were able to indicate, at early stages of infection, the evolution of a dengue-infected patient to the severe form of the illness. Despite the fact that these results grant further validation studies, the panel of candidate prognostic markers obtained demonstrated the potential to be useful for clinical use in the form of a fast assay based in blood samples.

Key words: real-time PCR, dengue hemorrhagic fever, molecular markers.

INTRODUCTION

Dengue is an acute febrile illness that has a large clinical spectrum, ranging from unapparent infection, flu-like mild undifferentiated fever and the classical dengue fever (DF) to the severe disease plasma-leakage syndrome known as dengue hemorrhagic fever (DHF) (Lee et al. 2006). The impact of dengue infection in public health and on the overall economy is not well defined, but it can be considered to be very high mainly in developing countries (Shu and Huang 2004).

In the last years, we have been witnessing an increasing amount of knowledge concerning dengue. However, molecular aspects of the immune response triggered by dengue virus infection and pathogenesis of the severe form of dengue are poorly understood (Sanches et al. 2005) owing to the lack of natural animal models that develop the disease (Bente and Rico-Hesse 2006). DHF most often occurs in sequential dengue infection (Halstead et al. 1983). This is probably due to antibody mediated enhancement and the occurrence of abnormal immune responses against high levels of viremia and circulating antigens, resulting in an exacerbated production of cytokines, activation of T-lymphocytes and insufficient clearance of apoptotic

*These authors contributed equally in this work.
Correspondence to: Carlos Eduardo Calzavara-Silva
E-mail: calzavara@cpqam.fiocruz.br

bodies. The correlation of disease severity with molecular markers of immune activation and other factors such as altered platelet, dendritic cells and monocytes counts, have suggested that immune responses of dengue viruses are contributing to autoimmune process that results in DHF (Halstead 2007).

There are currently no vaccines nor antiviral drugs available for dengue viruses and neither specific therapy for the prevention and treatment of the infection caused by dengue virus. However, early diagnostic and intervention with simple medical care, like hydration, is effective to significantly reduce the dengue mortality (Sanches et al. 2005, Shu and Huang 2004).

One of the problems associated with dengue patient management is the early identification of which patients will develop DHF and will require hospitalization (Shu and Huang 2004). The diagnosis of dengue virus infection is relatively simple and trustable, but the reliable prediction of which patients will develop severe vasculopathy and DHF is not currently possible. The diagnosis is usually made after the patients had already presented severe DHF symptoms. Therefore, a rapid differential DF/DHF diagnosis is crucial to proper patient triage. A prognosis test that allows foreseeing which patients will develop DHF during the acute febrile phase of the infection could permit the focus of the medical attention to be those patients identified as under high risk to develop the lethal disease and reduce unnecessary costly hospitalizations.

The development of genomics technology, microarray and high throughput quantitative PCR has allowed the study of all the transcriptomes and develop useful tools for the investigation of the simultaneous expression and interaction of thousands of genes. The comparison of the transcriptomes of patients that developed DF with those that developed DHF has provide an opportunity to identify molecular markers associated with immunity and symptomatology of the disease (Ubol et al. 2008, Kruif et al. 2008).

Here we investigate patterns of six differentially expressed innate immune response genes in DF and DHF quantified by quantitative real-time PCR (qPCR) previously identified by DNA microarray assays and putatively candidates for molecular markers predictive of the hemorrhagic fever.

MATERIALS AND METHODS

PATIENTS

The study was performed on patients from an ongoing dengue cohort study carried out in Recife-Brazil (Cordeiro et al. 2007), approved by the local (68/02) and National Ethics Committee (4909). We used peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of sixteen patients with different dengue clinical forms (eight DF and eight DHF) in acute phase, and five samples obtained from health non-dengue (ND) individuals. Patients were classified following the World Health Organization (WHO) criteria. Cases that did not fitted in DF or DHF criteria were classified as dengue fever with complications (DFC). Table I shows the patients characteristics.

TABLE I
Samples used in the qPCR assays.

Sample ID	Pathology	Age	DPO	Infection	Sex
588	DF	26	5	P	M
659	DF	32	8	S	F
650	DF	58	8	S	F
620	DF	62	8	S	M
600	DF	52	8	S	M
677	DFC	69	8	S	F
633	DFC	39	8	P	F
634	DFC	27	8	S	F
430	DHF	25	6	P	F
586	DHF	16	5	S	F
557	DHF	76	9	S	F
549	DHF	10	11	S	F
543	DHF	29	11	S	F
586	DHF	16	7	S	F
414	DHF	34	5	?	M
277	DHF	41	9	S	M
COL1	ND	32	—	—	M
COL2	ND	38	—	—	M
COL3	ND	28	—	—	F
COL4	ND	30	—	—	F
COL5	ND	26	—	—	F

DPO = days post onset of symptoms, P = primary infection, S = sequential infection, ? = not known.

DESIGNING OF PRIMERS AND PROBES

Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used to design sets of primers

and probes. The design of six sets of primers and probes were performed following the same principle: only the mRNA should be amplified. To test the specificity of the primers, we performed conventional PCR assays using cDNA (400ng) obtained as described below, and also human genomic DNA (5ng – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as control. The PCR reactions were made using the following parameters: 95°C-15 s, 58°C-60 s, 40 cycles, and primers 2, 5µM.

QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

Genes were amplified and detected using TaqMan® gene expression assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with primers and probes designed as mentioned above. Total RNA was extracted using the RNeasy mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and treated with DNase (Qiagen, Valencia, CA, USA). Total RNA (1µg) was reversely transcribed to cDNA using SuperScript III First-strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random hexamer primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the reaction: 50°C for 30 minutes, 85°C for 5 minutes and chilled on ice. RNase H (2U) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added and samples were incubated at 37°C for 20 minutes. Quantitative real time PCR was carried out using the ABI PRISM 7500 device (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Two mixes composed by eight DF/DFC or eight DHF cDNA samples were used as targets. A mix of five ND cDNA samples was used as a reference to DF and DHF results. β -Actin gene expression was used for the normalization of gene expression data due to the constitutive nature of its expression. The reactions were performed in triplicates and included 2µl of cDNA, primers (20µM each) and 6.25µM of the specific probe, human Beta-Actin (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and water added to a final volume of 25µl. Triplicates of non-template controls (NTC) were always included when qPCR was undertaken. Cycle conditions were as follows: after an initial 2-min hold at 50°C and 10 minutes at 95°C, the samples were cycled 40 times at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Baseline and threshold for cycle threshold (Ct) calculation were set automatically with Sequence Detection Software version 1.4 (Applied Bio-

systems, Foster City, CA, USA). The efficiency of amplification (E) of a target molecule was calculated from the slope of the standard curve (plot of Ct versus the negative log₁₀ concentration of the target) derived from the slopes ($E = [10^{(-1/Slope)}] - 1$). For relative calculation, the $\Delta\Delta C_t$ method was used (Livak and Schmittgen 2001, Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems – User Bulletin) once all assays met the amplification efficiency criteria of 100% ± 10% (Applied Biosystems – Application Note 127AP05-02).

RESULTS

A set of primers were designed to specifically amplify the target genes from cDNA, but not from any contaminant genomic DNA in the samples. For this purpose, it was chosen the junction regions of exons from these genes and, for all of them, the primers or the probe was annealed in this region. To test the specificity of the primers, we performed conventional PCR using patient's extracted cDNA and human genomic DNA as control. In Figure 1 it is possible to notice unique bands with the expected molecular weight indicating that all the six sets of primers amplified correctly their respective genes. To test the primers ability to amplify genomic DNA, we used human genomic DNA in the same conditions of amplification. It is also possible to observe that none of the primers specifically amplifies genomic DNA.

To verify the influence of infection by DENV on the expression of tested genes, we performed qPCR assays using a pool composed by five cDNA samples of health individuals, and a pool composed by sixteen cDNA samples obtained from PBMCs of DF and DHF patients. All the genes tested, previously identified by microarray experiments, were up-regulated after infection of patients by DENV (Fig. 2). The mRNA of each patient was collected during the acute febrile phase of disease (Table I). Among the six genes, genes 4, 5 and 6 were the most highly expressed.

To test which genes could be used as putative "DHF molecular signatures", we performed qPCR analyses using pools composed by cDNA of health individuals, or by cDNA of DF patients, or by cDNA of DHF patients. All of the six genes selected from the differentially expressed genes in DF and DHF patients

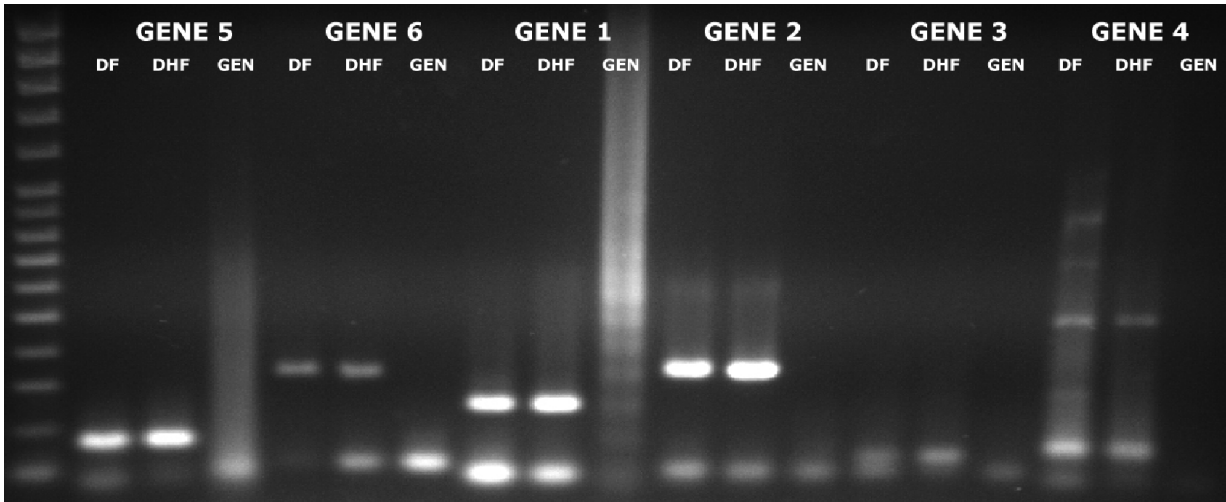


Fig. 1 – Specific amplification of the target genes in DF and DHF samples. DF = cDNA of dengue fever patients, DHF = cDNA of dengue hemorrhagic fever patients and GEN = human genomic DNA. Gene 5 (80 bp) Gene 6 (164 bp) Gene 1 (124 bp) Gene 2 (171 bp) Gene 3 (64 bp) Gene 4 (75 bp). Molecular weight marker 50 bp step ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA).

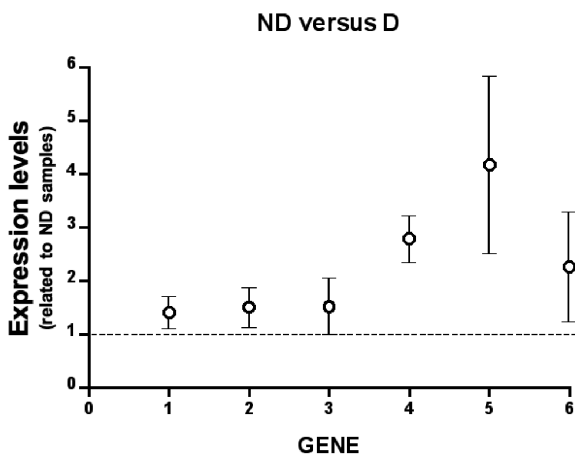


Fig. 2 – Comparison of the expression levels of the tested genes between health and dengue virus infected samples. A pool of sixteen (8 DF/DFC plus 8 DHF) dengue samples and a pool of five non-dengue (ND) samples were used to extract mRNA. The amount of mRNA of each tested gene was measured by qPCR assays. Expression levels of tested genes are related to ND samples. All samples were tested in triplicates.

confirmed to be potential candidates as “molecular signatures” to foresee DHF (Fig. 3). Gene 6 is more expressed in DHF patients, whereas the other genes showed the opposite behavior. Among the six tested candidates, apparently genes 3 to 6 showed better capacity to discriminate DF and DHF. Like genes 3 and 6,

gene 5 also shows a difference in its expression levels when comparing DHF and DF samples. It is interesting to note that gene 5 was the most expressed in DF samples among the tested genes.

DISCUSSION

Gene expression studies represent an opportunity to identify novel markers linked to immunity and disease pathogenesis, and an opportunity to classify patients with dengue in a manner that provides greater biological relevance and clinical utility (Fink et al. 2007).

Nowadays, one of the most relevant questions to scientists concerning dengue symptomatology is to determine which factors have influence on the development of DHF. It is a consensus that the severity of dengue is associated to multifactorial aspects like viral charge and serotype, sequential infections and genetics aspects of the host (Simmons et al. 2007).

The diagnostic techniques to detect and confirm the presence and serotype of DENV infecting a patient are very accurate, simple and satisfactorily fast. However, the current diagnostic techniques are unable to predict the prognosis of DENV infected patients to develop the severe form of the disease.

Studies performed in cell lines or in patient’s samples have been obliging to demonstrate gene expression

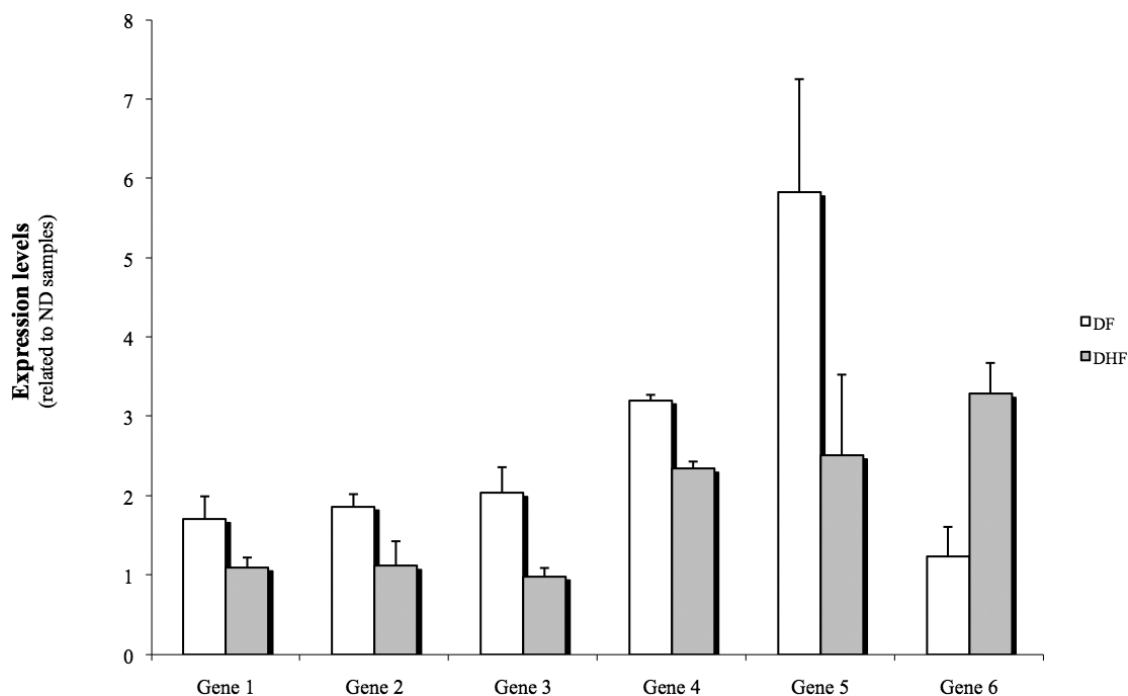


Fig. 3 – Expression levels of six genes in samples of patients with different clinical forms of dengue. The amount of mRNA of each tested gene was measured by qPCR assays using pools of eight DF/DFC or eight DHF cDNA samples as template. Expression levels are related to values obtained from pools of five ND samples. All samples were tested in triplicates. Data representative of three experiments to genes 1, 3, 4 and 5 and two experiments to genes 2 and 6.

associated with dengue infection. Kruif et al. (2008) showed the molecular basis of inflammatory gene expression patterns in peripheral blood leukocytes from children with severe dengue infection. It was demonstrated significant differences in gene expression patterns between DF PBMCs and DHF PBMCs during the acute phase of the infection.

In this work, we used a set of primers specifically designed to amplify cDNA, obtained from PBMC of DF and DHF patients, codifying for six genes involved on innate immune responses, previously identified by microarray approach, whose expression levels were different between the classical and severe forms of the disease (unpublished data).

As shown in Figure 2, all tested genes had its expression levels under influence of DENV infection. It has been shown a strong association between a decreased innate immune response and increased apoptosis levels with the development of DHF (Kruif et al. 2008, Ubol et al. 2008, Simmons et al. 2007, Chaturvedi et al. 2006). Corroborating our data, the only gene more expressed

in DHF samples was gene 6 (Fig. 3), a pro-apoptotic gene. Gene 6 is almost 4-fold more expressed in dengue than in non-dengue samples. Otherwise, all the other five genes tested, involved on innate immune responses, were up regulated in DHF patients.

The involvement of apoptosis on the developing of severe symptoms noticed in DHF was earlier studied by Mongkolsapaya et al. (2003), when they recovered few dengue-responsive CD8+ T cells in Thai children during acute phase of disease; most of those undergoing programmed cell death. In fact, during the last years, the correlation between the apoptosis process and hemorrhagic manifestations noticed in severe dengue has been established (Myint et al. 2006, Mosquera et al. 2005, Espina et al. 2003).

In our study, gene 5, which is more directly involved on innate immune responses, since its product codify for a receptor to the Fc portion (FcR) of immunoglobulin, was the most down regulated in DHF samples among the five tested genes, corroborating the findings of other research groups (Kruif et al. 2008, Ubol

et al. 2008, Simmons et al. 2007, Chaturvedi et al. 2006). However, the expression levels of gene 5 presented the highest standard deviation values, indicating that the level of expression of this gene could be very variable among patients and, consequently, inappropriate to be used alone as “DHF molecular signature”.

Recently, Brown et al. (2009) had demonstrated that antibody-enhanced dengue virus infection of the FcR-bearing mast cell/basophil KU812 cell line results in a massive induction of caspase-dependent apoptosis. This finding corroborates the relationship of the expression levels of genes 5 and 6.

The qPCR assay results indicate that the quantification of those genes in samples collected during the early symptoms of a dengue infected patient could be useful on the prognosis of DHF development. The identification of a group of genes with potential to be used as molecular signatures of DHF development can become a confident tool, valuable in helping on DHF clinical diagnosis. Our results suggest that it is possible to define the genes that are differentially expressed between DF and DHF patients during the initial moments of the onset of symptoms and, consequently, predict the propensity of a dengue patient to evolve to the severe form of the disease. However, it is necessary to increase the number of samples to statistically determine the reliability limits of these results.

Nowadays we are collecting more samples of dengue-infected patients in the acute phase of the disease to reinforce data presented here and also to be used on tests of predictive value, specificity and sensibility. Moreover, we are selecting other genes to be tested aiming to define the best panel of “DHF molecular signature genes”.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the financial support of the Strategic Program of Support to Health Research – PAPES-FIOCRUZ (403539/2008-0), National Institute of Health – NIH (U19 AI56541), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (472939/2007-6). The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health – PDTIS RVR09 – FIOCRUZ for the use of its facilities.

RESUMO

O manejo de pacientes infectados pelo dengue ainda é um problema desafiador. A maioria dos casos de dengue é benigna mas parte desses casos pode evoluir para o desenvolvimento de vasculopatia severa conhecida como dengue hemorrágica, que pode ser letal. Os sintomas iniciais da dengue e sua forma hemorrágica são bastante similares. O desenvolvimento de um teste diagnóstico que seja rápido e capaz de diferenciar as duas formas clínicas da dengue é crucial para o cuidado adequado de pacientes. O presente estudo avalia, através da PCR quantitativa em tempo real, o potencial preditivo dos níveis de expressão de RNAm candidatos a marcadores da dengue hemorrágica, previamente identificados por estudos genômicos funcionais. Um conjunto de seis marcadores moleculares para a dengue hemorrágica foi avaliado e apresentou correlação entre seus níveis de transcrição e o posterior desenvolvimento da vasculopatia severa. Os marcadores selecionados foram capazes de indicar, nos momentos iniciais dos sintomas, a evolução de um paciente infectado pelo dengue para a forma severa da doença. O painel de candidatos a marcadores de prognóstico obtido demonstrou um bom potencial para uso clínico na forma de um ensaio rápido baseado em amostras de sangue.

Palavras-chave: PCR em tempo real, dengue hemorrágica, marcadores moleculares.

REFERENCES

- APPLIED BIOSYSTEMS 7500/7500. 2008. Fast Real-Time PCR Systems – User Bulletin.
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_050637.pdf.
- APPLIED BIOSYSTEMS – APPLICATION NOTE 127AP05-02. 2006.
<http://ifr31.toulouse.inserm.fr/PFT/BM/mediabm/22.pdf>.
- BENTE DA AND RICO-HESSE R. 2006. Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models* 3: 97–103.
- BROWN MG, HUANG YY, MARSHALL JS, KING CA, HOSKIN DW AND ANDERSON R. 2009. Dramatic caspase-dependent apoptosis in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells. *J Leukoc Biol* 85: 71–80.
- CHATURVEDI UC, NAGAR R AND SHRIVASTAVA R. 2006. Dengue and dengue hemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Microbiol Lett* 47: 155–166.

- CORDEIRO MT, SILVA AM, BRITO CA, NASCIMENTO EJ, MAGALHÃES MC, GUIMARÃES GF, LUCENA-SILVA N, DE CARVALHO EM AND MARQUES ET JR. 2007. Characterization of a Dengue Patient Cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 77: 1128–1134.
- ESPINA LM, VALERO NJ, HERNÁNDEZ JM AND MOSQUERA JA. 2003. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor- α caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg* 68: 48–53.
- FINK J ET AL. 2007. Host Gene Expression Profiling of Dengue Virus Infection in Cell Lines and Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 1(2): e86.
- HALSTEAD SB, ROJANASUPHOT S AND SANGKAWIBHA N. 1983. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg* 32: 154–156.
- HALSTEAD SB. 2007. Dengue. *Lancet* 370: 1644–1652.
- KRUIF MD ET AL. 2008. Differential Gene Expression Changes in Children with Severe Dengue Virus Infections. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e215.
- LEE YR, LIU MT, LEI HY, LIU CC, WU JM, TUNG YC, LIN YS, YEH TM, CHEN SH AND LIU HS. 2006. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol* 87: 3623–3630.
- LIVAK KJ AND SCHMITTGEN TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\delta}$ delta CT Method. *Methods* 25: 402–408.
- MONGKOLSAPAYA J ET AL. 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 9: 921–927.
- MOSQUERA JA, HERNANDEZ JP, VALERO N, ESPINA LM AND AÑEZ GJ. 2005. Ultrastructural studies on dengue virus type 2 infection of cultured human monocytes. *Virology* 2: 26.
- MYINT KS ET AL. 2006. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. *J Infect Dis* 194(5): 600–607. Epub 2006 Jul 31.
- SANCHES EN, DESPRÉS P AND CEDILLO-BARRÓN L. 2005. Innate Immune Response to Dengue Virus. *Arch Med Res* 36: 425–435.
- SHU PY AND HUANG JH. 2004. Current Advances in Dengue Diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 642–650.
- SIMMONS CP ET AL. 2007. Patterns of Host Genome-Wide Gene Transcript Abundance in the Peripheral Blood of Patients with Acute Dengue Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* 195: 1097–1107.
- UBOL S, MASRINOUL P, CHAIJARUWANICH J, KALAYANAROOJ S, CHAROENSIRISUTHIKUL T AND KASISITH J. 2008. Differences in Global Gene Expression in peripheral Blood Mononuclear Cells Indicate a Significant Role of the Innate Responses in Progression of Dengue Fever but Not Dengue Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* 197: 1459–1467.

7.2 Artigo 2

Classificação de pacientes com dengue baseado na expressão Gênica usando vetor de suporte de máquina.

Classification of Dengue Fever Patients Based on Gene Expression Data Using Support Vector Machines

Autores:

Ana Lisa V Gomes 1

Lawrence J. K. Wee²

Asif M. Khan ²

Laura Helena Vega Gil 1

Ernesto Torres A Marques Junior ³

Carlos Eduardo Calzaara – Silva ⁴

Tin Wee Tan²

Instituição que pertencem:

1Department of Virology and Experimental Therapy, Aggeu Magalhães Research Center-CPqAM/FIOCRUZ, Recife, Brazil,

2Department of Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore, Singapore,

3 Center for Vaccine Research, Department of Infectious Diseases and Microbiology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America, 4 Department of Cellular and Molecular Immunology, Rene Rachou Research Center - CPqRR/FIOCRUZ, Belo Horizonte-MG, Brazil

Endereço para correspondência do autor responsável:

Department of Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore, Singapore,

Artio publicado na revista PLoS ONE June 2010 | Volume 5 | Issue 6 | e11267

Classification of Dengue Fever Patients Based on Gene Expression Data Using Support Vector Machines

Ana Lisa V. Gomes^{1,9}, Lawrence J. K. Wee^{2,9}, Asif M. Khan², Laura H. V. G. Gil¹, Ernesto T. A. Marques, Jr.^{1,3}, Carlos E. Calzavara-Silva⁴, Tin Wee Tan^{2*}

1 Department of Virology and Experimental Therapy, Aggeu Magalhães Research Center-CPqAM/FIOCRUZ, Recife, Brazil, **2** Department of Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore, Singapore, **3** Center for Vaccine Research, Department of Infectious Diseases and Microbiology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America, **4** Department of Cellular and Molecular Immunology, Rene Rachou Research Center - CPqRR/FIOCRUZ, Belo Horizonte-MG, Brazil

Abstract

Background: Symptomatic infection by dengue virus (DENV) can range from dengue fever (DF) to dengue haemorrhagic fever (DHF), however, the determinants of DF or DHF progression are not completely understood. It is hypothesised that host innate immune response factors are involved in modulating the disease outcome and the expression levels of genes involved in this response could be used as early prognostic markers for disease severity.

Methodology/Principal Findings: mRNA expression levels of genes involved in DENV innate immune responses were measured using quantitative real time PCR (qPCR). Here, we present a novel application of the support vector machines (SVM) algorithm to analyze the expression pattern of 12 genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 28 dengue patients (13 DHF and 15 DF) during acute viral infection. The SVM model was trained using gene expression data of these genes and achieved the highest accuracy of ~85% with leave-one-out cross-validation. Through selective removal of gene expression data from the SVM model, we have identified seven genes (MYD88, TLR7, TLR3, MDA5, IRF3, IFN- α and CLEC5A) that may be central in differentiating DF patients from DHF, with MYD88 and TLR7 observed to be the most important. Though the individual removal of expression data of five other genes had no impact on the overall accuracy, a significant combined role was observed when the SVM model of the two main genes (MYD88 and TLR7) was re-trained to include the five genes, increasing the overall accuracy to ~96%.

Conclusions/Significance: Here, we present a novel use of the SVM algorithm to classify DF and DHF patients, as well as to elucidate the significance of the various genes involved. It was observed that seven genes are critical in classifying DF and DHF patients: TLR3, MDA5, IRF3, IFN- α , CLEC5A, and the two most important MYD88 and TLR7. While these preliminary results are promising, further experimental investigation is necessary to validate their specific roles in dengue disease.

Citation: Gomes ALV, Wee LJK, Khan AM, Gil LHV, Marques ETA Jr, et al. (2010) Classification of Dengue Fever Patients Based on Gene Expression Data Using Support Vector Machines. PLoS ONE 5(6): e11267. doi:10.1371/journal.pone.0011267

Editor: Anita Brandstaetter, Innsbruck Medical University, Austria

Received: January 18, 2010; **Accepted:** May 14, 2010; **Published:** June 23, 2010

Copyright: © 2010 Gomes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de (FACEPE), Brazil, the National Institutes of Health (NIH), USA. The first author ALVG was a visiting scientist with the Department of Biochemistry, National University of Singapore (NUS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: tinwee@bic.nus.edu.sg

 These authors contributed equally to this work.

Introduction

Dengue virus (DENV) is an emerging mosquito-borne pathogen that infects approximately 50–100 million people every year. The virus has an RNA genome and exists as four major serotypes (DENV1-4) that are phylogenetically distinct [1]. According to the World Health Organization (WHO) reports during the past 50 years, the incidence of dengue has increased 30-fold and it is estimated that 2.5 billion people live in endemic areas spread over 100 countries [2]. Symptomatic infection by DENV can range from a mild disease, dengue fever (DF), to a severe dengue haemorrhagic fever (DHF), which can culminate with dengue shock syndrome (DSS) and death. Although sequential dengue infection by distinct serotypes and antibody-mediated enhance-

ment (ADE) are the two most studied risk factors for the development of the severe diseases, the key determinants of DF or DHF progression remain elusive [2–6].

During infection, the innate immune response plays an important role as the first line of defence and also in the shaping of the adaptive responses. One of the first steps of the innate responses is the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [7]. The innate immune system identifies these patterns through pattern recognition receptors (PRRs) [8], such as the Toll-like receptors (TLRs) 3, 7, and 9 located at the cellular membranes, and also by cytoplasmic proteins, like the retinoic acid-inducible gene-I (RIGI) and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5). Binding of viral molecules to these PRRs results in a downstream activation of a gene cascade,

including MYD88 (an adapter protein that serves as an intermediate molecule), transcription factors (IRF3 and IRF7), and the expression of interferon (IFN) type I and II genes [7]. IFNs are produced by many types of cells and induce an antiviral state by up-regulating genes with direct and indirect antiviral functions [7–15]. While it is known that IFNs are the first line in the host defence against DENV infections [7], and that DENV inhibits the IFN signalling pathway [16], the actual relationship between the ability to block IFN signal and pathogenicity is not known. We previously postulated that the expression levels of the TLRs and the signal transduction molecules of IFN type I and II pathway would have a significant role in modulating the host IFN response to DENV and hence the disease outcome. The possible associations of this interplay with clinical outcomes appear complex, with indications that differential expression of different immunological pathways result in disparate clinical outcomes [17]. To investigate the possible role of the expression level of these genes at mRNA levels during DENV infection, it is necessary to design rational gene expression studies followed by careful analyses of gene expression patterns in well characterized dengue patients [18]. Towards this end, several groups have been studying disease susceptibility factors, via high throughput molecular typing or through association studies to identify disease associated candidate genes [2]. *In silico* approaches utilizing clinical data have been developed to improve dengue diagnosis and prognosis. Recently, our group developed a simple method to reliably differentiate primary and secondary acute dengue infections based on serological data (IgG ELISA) [19] and quickly identify individuals with a secondary dengue infection, which is considered as a risk factor. Nevertheless, only a small fraction of secondary infections develop DHF and the early detection of patients with risk of developing DHF is still not possible.

In this manuscript, we present a computational approach to classify DF and DHF patients based on mRNA expression data of 11 genes (MYD88, MDA5, TLR3, TLR7, TLR9, IRF3, IRF7, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , and RIGI) involved in the innate immune response pathway using the support vector machines (SVM) algorithm. The significance of these genes in determining DF or DHF progression was also explored using this approach. Additionally, CLEC5A, a cell surface receptor, which is also involved in innate response, was included in the analysis as a reference marker because it has been proposed to be involved in the development of DHF [20]. A schematic map depicting the interactions of the 12 proteins/genes in the viral innate immune response pathway is provided in Figure 1. We selected these genes because i) they have been previously shown to have a significant fold-change in our cDNA microarray analysis [18] of genes expressed in patients with DF versus DHF, compared to non-dengue (ND) patients, or ii) they have been described to be relevant for hemorrhagic symptoms of dengue by others in the literature [7–10,12,17,20]. The aim of this study was to help identify important genes or pathways of the innate immune responses involved in DF or DHF, which can then be used as markers.

SVM, introduced by Cortes and Vapnik [21], is a relatively new sub-branch of supervised learning methods, and has been shown to be highly effective for diverse computational biology applications [22]. Some example applications include prediction of secondary structure, quaternary structure, homology, domains, cleavage sites, protein-protein interaction, T-cell epitopes, classification and validation of cancer tissue samples and also microarray expression data. Our gene expression data from dengue disease patients provides an opportunity to better

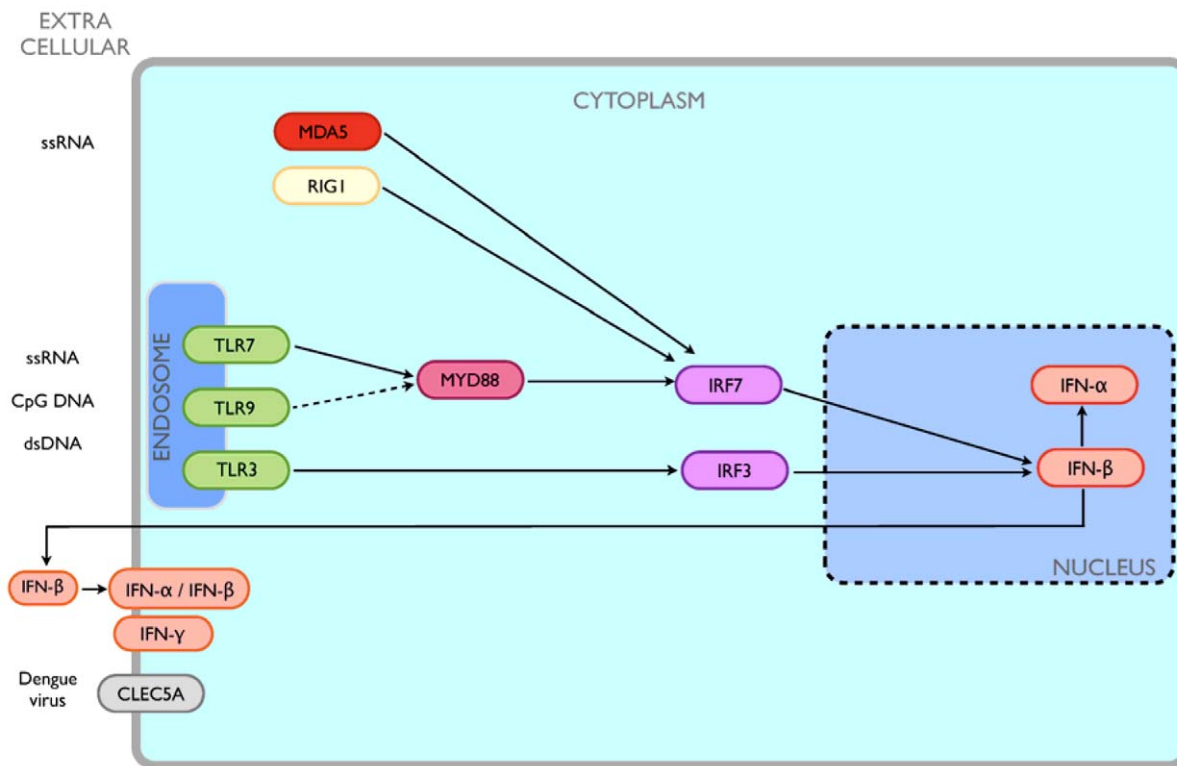


Figure 1. A schematic map depicting the interactions of the 12 proteins/genes studied herein, known or indicated to be relevant to the viral innate immune response pathway, including for dengue.

doi:10.1371/journal.pone.0011267.g001

understand the relevance of the individual genes in the DENV infection pathway involving the innate immune response. Though the application of SVM as a classification tool for expression data is not new, its utility to analyse the role of genes of the innate immune response pathway in DENV has not been explored.

Materials and Methods

Ethics statement

All participants signed an informed consent. This study, related to gene expression of dengue patients and application of the SVM algorithm to the data is part of a bigger functional immunomics study in our lab and was reviewed and approved by ethics committee of Brazilian Ministry of Health CONEP: 4909; Process n° 25000.119007/2002-03; CEP: 32/09. In addition, the Johns Hopkins IRB also reviewed this study as protocol JHM-IRB-3: 03-08-27-01.

Patient data

A total of 33 patients (5 ND, 15 DF and 13 DHF) were studied from the Recife metropolitan area, Brazil [23] and were classified following the WHO criteria [4]. Blood samples from patients enrolled in this study were collected in heparin vacutainer tubes (BD Vacutainer) and within 2 hours after the collection, peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples were separated by gradient density using Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) and cryopreserved in 10% (v/v) Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) in inactivated fetal bovine sera (FBS; Hyclone). All samples were collected from patients between 3rd and the 5th day of onset of fever.

Gene expression

RNA extraction was performed according to the manufacturer's manual for the Spin cell RNA mini kit (Invisorb). Total RNA was reverse transcribed to cDNA using SuperScript III First-strand Synthesis System for qPCR (Invitrogen) using random hexamer primers, according to the manufacturer's instructions. The expression of 12 genes related to viral innate immune response were quantified using qPCR based on $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [24]. Expression values for each gene were normalized by use of beta-actin housekeeping gene, which were then quantified and related to ND cycle threshold (Ct) values (i.e. DF/ND ratio).

For each of the 12 genes tested, the DF/ND and DHF/ND ratio of qPCR experimental values were used to define the up-regulated and down-regulated states of the genes (Figure 2). DF/ND and DHF/ND ratio values of ≥ 1 were defined as up-regulated, while DF/ND and DHF/ND values of < 1 were defined as down-regulated.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed on qPCR data using unpaired two-tailed Student's T test with Welch's correction due to the small sample size and because we assumed unequal variances in the data. All tests were done using the Prism software version 4.0a (www.graphpad.com).

SVM implementation

The SVM algorithm is a machine learning technique developed based on the structural risk minimization principle of statistical learning theory (see [25] for details on the algorithm and [22] for details on its implementation, optimization, training and testing).

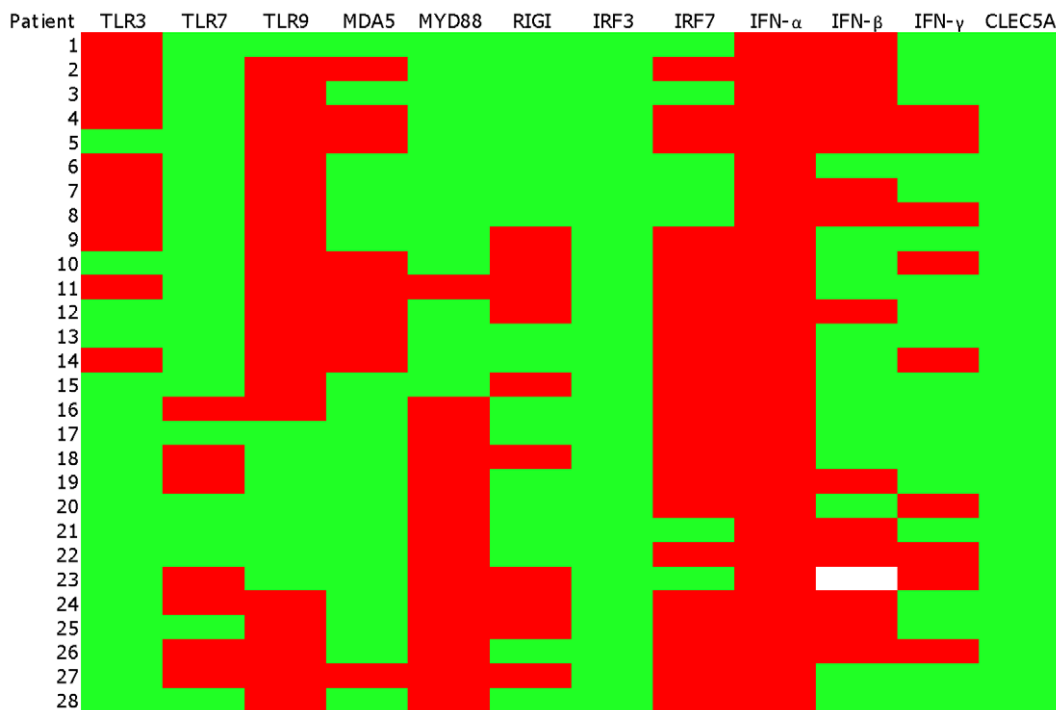


Figure 2. Heatmap for gene expression data of the 12 genes (columns) studied from the 28 patients (rows). The first 15 are DF patients, while the rest are DHF patients. The DF/ND and DHF/ND gene expression values from qPCR were used to create the heatmap. The colour shades are associated with the values in the cells: green for ratio of DF/ND and DHF/ND of < 1 (down-regulated) and red for DF/ND and DHF/ND ratio of ≥ 1 (up-regulated). The gene expression data for IFN- β of one of the patients (23) was not available and therefore the vector attributes of this gene for the patient were represented as blank.
doi:10.1371/journal.pone.0011267.g002

Briefly, both positive and negative examples in a dataset were represented by feature vectors x_i ($i = 1, 2, \dots, M$) with corresponding binary labels $y_i \in \{+1, -1\}$. The SVM algorithm classifies the positive and negative examples by training a classifier which maps the input samples, using a kernel function in most cases, onto a high-dimensional space, and then seeks for a separating hyper-plane that best differentiates the two classes with a maximal margin and a minimal error. The decision function for classification of unseen examples is given as:

$$f(x) = \text{sgn}\left(\sum_{i=1}^m \alpha_i y_i k(x, x_i) + b\right)$$

where $K(x_i, x_j)$ is the kernel function, and the parameters are determined by maximizing the following:

$$\sum_{i=1}^N \alpha_i - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \alpha_i \alpha_j y_i y_j K(x_i, x_j)$$

under the conditions,

$$\sum_{i=1}^N \alpha_i y_i = 0 \text{ and } 0 \leq \alpha_i \leq C$$

The variable C serves as the cost parameter that controls the trade-off between margin and classification error. As the efficacy of the SVM-based classification is dependent on the type of kernel used, we explored the use of various commonly used kernels (linear, sigmoid, polynomial and the radial basis function) on our datasets. We chose the radial basis function (RBF) kernel as it was found to be most effective (data not shown):

$$K(x_i, x_j) = \exp\left(\frac{-\|x_i - x_j\|^2}{2\gamma^2}\right)$$

Two parameters are required to optimize the RBF kernel of the SVM classifier; γ , which determines the capacity of the RBF kernel and C , the regularization parameter.

Vector encoding schemes

To encapsulate gene expression data in a format suitable for SVM training and testing, vectors based on the orthonormal encoding scheme were created. Each gene was designated as either “10” (for observation of up-regulation) or “01” (for observation of down-regulation). Therefore, the collective gene expressions observed in each patient was represented by a 24-dimension vector (12 genes \times 2 gene states: up- or down-regulated). Each of the 24-dimension vectors was labeled as either “1” for DF patients or “-1” for DHF patients, corresponding to positive and negative examples for SVM training, respectively. The first 15 rows in the input matrix corresponded to the gene expression data of the 15 DF patients analyzed herein, while the last 13 rows were of the DHF patients. The vector labels “1” and “-1” are in the first column of the matrix and the subsequent 12 columns of each row correspond to the gene expression states, in orthonormal encoding scheme, for the 12 genes studied. For example, the vector encoding “1 1:1 4:1...” represents data of a DF patient (1, first column) and the first two genes, TLR3 and TLR7, which are up-regulated and down-regulated, respectively.

It is noted that the gene expression data for IFN- β of one of the patients (23) was not available and therefore the vector attributes

of this gene for the patient were represented as blank, and this notation was acceptable as our simulation studies of setting the gene as up- or down-regulated did not change the accuracy of the model.

SVM model development

The SVM model was implemented using the freely downloadable LIBSVM package by Chang and Lin [26]. Here, the SVM model was used to classify the DF and DHF patients using gene expression data from the patients. We conducted leave-one-out cross-validation (LOOCV) on the patient gene expression dataset using various combinations of γ and C . In LOOCV, the patient vectors dataset was split into 28 training examples where one of the training examples was used as the test example while the others were used for training the SVM classifier. The trained classifier was tested on the test example. The process was repeated 28 times using different test and training examples each time, hence ensuring that all examples were included for both training and testing. SVM parameters γ and C were stepped through combinations of 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 for C , and 0.1, 1, 10, 100, and 1000 for γ in a grid-based manner. To provide an indication of the overall performance of the model, the accuracy (AC), as given in the following equation, was calculated on the output of the LOOCV:

$$AC(\%) = \frac{TP + TN}{TP + FN + TN + FP} \times 100$$

The values of C and γ that returned the optimal accuracy were noted. The corresponding accuracy value obtained was assigned as baseline.

The cross-validation procedure was repeated fifteen times under different conditions to analyse the individual and collective contributions of each gene expression data to DF/DHF classification. Specifically, in the first twelve trials, a different gene was removed from the vector dataset, while multiple genes were removed from the vector dataset in the last three trials. Corresponding changes to the baseline accuracy were measured for all cases (Table 1).

Results

A total of 12 genes (TLR3, TLR7, TLR9, RIGI, IRF3, IRF7, MYD88, CLEC5A, IFN- α , IFN- γ , IFN- β , and MDA5), were quantified in 28 dengue patients (13 DHF and 15 DF) using qPCR. The expression data was obtained from PBMCs of patients with DF and DHF during acute phase (between 3rd and 5th day of fever) before defervescence and any signs of vascular leakage. The gene expression data was used to explore associations of individual expression levels with DF and DHF using the SVM algorithm. We had selected the RBF kernel because it was shown to perform well on our datasets and it is also widely used for SVM classification in other related domains. The parameters (C and γ) of RBF were optimized by performing leave-one-out cross validation. The C and γ values that returned the highest accuracy of $\sim 85.18\%$ were C of 1, 10 (selected for further work) or 100 and γ of 1.0 (Figure 3). Henceforth, this accuracy of $\sim 85.18\%$ will be referred to as the baseline accuracy for the SVM model of the 12 genes.

Influence of each gene to the accuracy of the SVM model

To define the contribution of each of the 12 genes on the determination of DF and DHF, selective removal of vector attributes corresponding to each specific gene expression data were carried out and the downstream effect on the baseline

Table 1. Performance of SVM model for various combinations of genes tested. RBF kernel function (γ value = 1.0 and C value = 10) was utilized for model building.

Matrix conditions	Genes tested	Gene(s) removed	Accuracy (%)
1	MYD88, MDA5, TLR7, TLR9, IRF3, IRF7, CLEC5A, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , and RIGI	TLR3	85.19
2	MYD88, MDA5, TLR3, TLR9, IRF3, IRF7, CLEC5A, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , and RIGI	TLR7	81.48
3	MYD88, MDA5, TLR3, TLR7, IRF3, IRF7, CLEC5A, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , and RIGI	TLR9	92.59
4	MYD88, TLR3, TLR7, TLR9, IRF3, IRF7, CLEC5A, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , and RIGI	MDA5	85.19
5	MDA5, TLR3, TLR7, TLR9, IRF3, IRF7, CLEC5A, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , and RIGI	MYD88	66.66
6	MYD88, MDA5, TLR3, TLR7, TLR9, IRF3, IRF7, CLEC5A, IFN- α , IFN- β , and IFN- γ	RIGI	92.59
7	MYD88, MDA5, TLR3, TLR7, TLR9, IRF7, CLEC5A, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , and RIGI	IRF3	85.18
8	MYD88, MDA5, TLR3, TLR7, TLR9, IRF3, CLEC5A, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , and RIGI	IRF7	88.88
9	MYD88, MDA5, TLR3, TLR7, TLR9, IRF3, IRF7, CLEC5A, IFN- β , IFN- γ , and RIGI	IFN- α	85.18
10	MYD88, MDA5, TLR3, TLR7, TLR9, IRF3, IRF7, CLEC5A, IFN- α , IFN- γ , and RIGI	IFN- β	92.59
11	MYD88, MDA5, TLR3, TLR7, TLR9, IRF3, IRF7, CLEC5A, IFN- α , IFN- β , and RIGI	IFN- γ	88.88
12	MYD88, MDA5, TLR3, TLR7, TLR9, IRF3, IRF7, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , and RIGI	CLEC5A	85.18
13	MYD88, MDA5, TLR3, TLR7, IRF3, CLEC5A, and IFN- α	TLR9, RIGI, IRF7, IFN- β , and IFN- γ	96.26
14	MDA5, TLR3, TLR9, IRF3, IRF7, CLEC5A, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , and RIGI	TLR7 and MYD88	62.96
15	MYD88 and TLR7	TLR3, TLR9, MDA5, RIGI, IRF3, IRF7, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , and CLEC5A	88.88

doi:10.1371/journal.pone.0011267.t001

accuracy of the SVM model were measured. Vector attributes of genes removed from the input vectors that result in a significant reduction in the model accuracy are likely to be more relevant to determine the differences between the DF and DHF gene expression pattern. We postulated that genes with greater impact on the model accuracy would have a relatively greater importance defining the different innate immune response in DF and DHF patients.

The genes MYD88, TLR7, TLR3, MDA5, IRF3, IFN- α and CLEC5A were observed to be relevant in defining the distinction between DF from DHF expression patterns, and among these MYD88 and TLR7 were the two most important (Figure 4 and

Table 1). Removal of MYD88 or TLR7 decreased the baseline accuracy to $\sim 66.66\%$ and $\sim 81.48\%$, respectively. The individual removal of the genes TLR3, MDA5, IRF3, IFN- α , and CLEC5A from the input matrix dataset did not change the accuracy value obtained with all the 12 genes ($\sim 85.18\%$). However, when these five genes were trained collectively with MYD88 and TLR7, the accuracy increased to $\sim 96.26\%$ (Figure 4 and Table 1), indicating a subtle individual, but significant combined role of these five genes. According to our SVM results, the remaining five genes (TLR9, RIGI, IRF7, IFN- β and IFN- γ) showed negative effect to the classification of the patient types – individual removal of the five genes increased the accuracy (~ 88.88 to $\sim 92.59\%$; Figure 4 and Table 1), suggesting that in the context of the genes selected and the disease outcome there is a lack of association between the mRNA levels of these five genes with the levels of the others. Taken together, the observations that the expression levels of signal transduction molecules had important effect in the model and the negative effects of IFN- β and IFN- γ suggest that impaired IFN signalling play important role in DHF.

Discussion

In this study, we describe application of the SVM algorithm to classify DF and DHF patients based on the expression data of innate immune response pathway genes, to better understand their roles in the disease progression. SVM modelling of the expression patterns of the 12 genes in the dengue patients with different disease outcomes implicates the association of some of the genes with the severity of dengue symptoms. Our results suggest that MYD88 and TLR7 genes are relatively the most important for defining specific DF and DHF expression patterns. This finding is supported by experimental data that showed the utilization of the TLR7 receptor by DENV [5] and the direct influence of the virus on the expression of MYD88 [14]. In addition, it is clear from the gene expression data that the expression levels of TLR7 and MYD88 are significantly higher in DHF patients than in DF

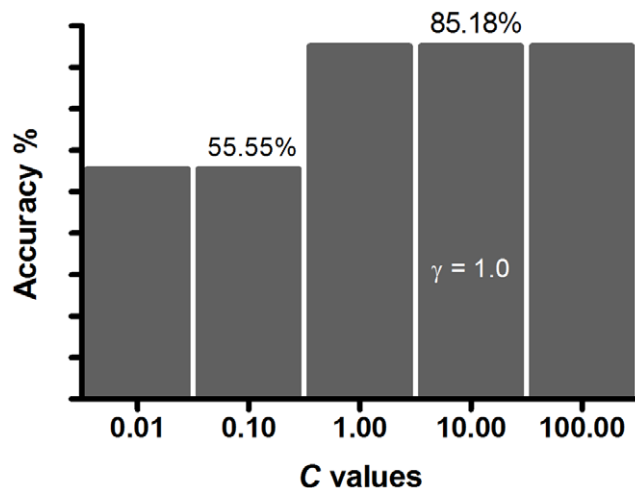


Figure 3. SVM optimization. Optimization of the parameters C and γ of the SVM kernel RBF: only C values of 0.01, 0.10, 1.0, 10.0 and 100.0, and γ value of 1.0 are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0011267.g003

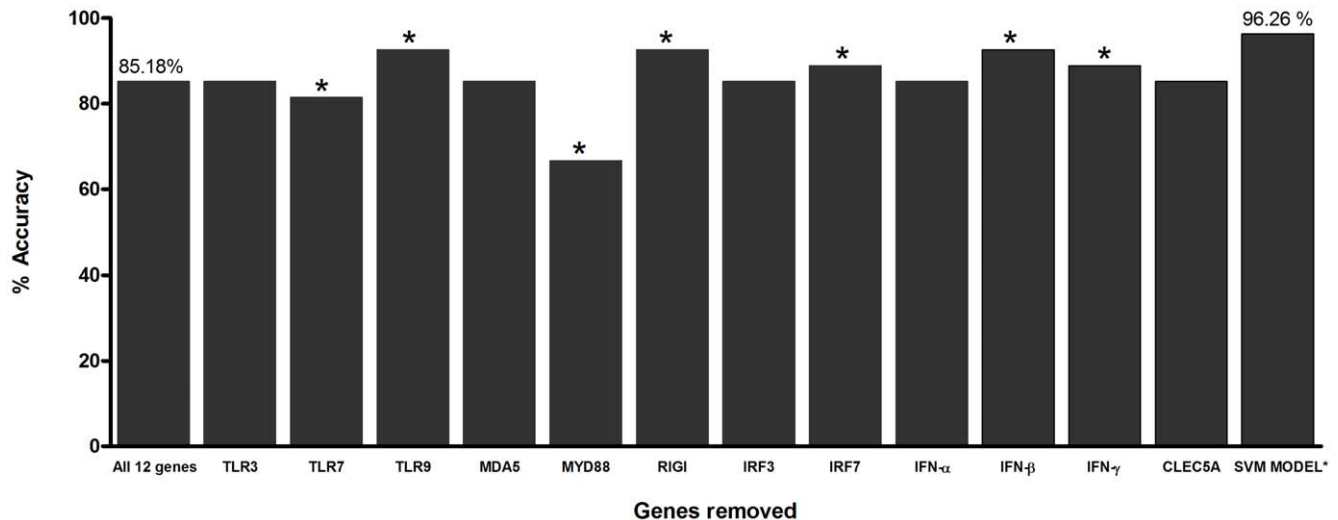


Figure 4. Influence of each gene to the accuracy of the baseline SVM model. The first bar represents the baseline accuracy of all the 12 genes (TLR3, TLR7, TLR9, MDA5, MYD88, RIGI, IRF3, IRF7, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , and CLEC5A). The subsequent bars represent accuracy of datasets with only 11 genes, whereby vector attributes of one gene were removed at a time (the name of the gene removed is indicated). The last bar, SVM model refers to the seven genes (MYD88, TLR3, TLR7, MDA5, IRF3, IFN- α and CLEC5A) that returned optimum accuracy. The RBF kernel function of SVM with optimum parameter settings ($C = 10$ and $\gamma = 1.0$) were used for model building of each situation. * represents $p < 0.05$ value compared with the 12 baseline gene set (the bar labelled "All 12 genes").
doi:10.1371/journal.pone.0011267.g004

(Table 2). Based on these analyses, we posit that these two genes and possibly others in the TLR7 pathway are likely to be good candidates for further studies.

Apart from MYD88 and TLR7, five other genes (TLR3, MDA5, IRF3, IFN- α , and CLEC5A) were observed to exhibit subtle individual, but significant collective role (Table 1). The significant involvement of the genes TLR3, IRF3 and MDA5 on the diagnostic specific expression pattern suggests that DENV likely interacts with more than one IFN activation pathway [7,14]. CLEC5A, a cell surface receptor, has been reported to be differentially expressed between DF and DHF patients, suggesting involvement in the development of DHF [20]. However, in our study, the differences in mRNA expression levels of CLEC5A between DF and DHF patients were relatively less relevant than TLR7 and MYD88 (Table 2). This difference could be because of the different experimental approaches utilized, whereby our data was from clinical patients and theirs was an *in vitro* study. IFN- α , the other member of the five genes, is a well-established antiviral response factor and we observed over-expression for both DF and DHF patients. The five genes (TLR9, RIGI, IRF7, IFN- β and IFN- γ) that showed negative effect on the accuracy confounded

the classification of DF and DHF patients. However, further investigation is necessary before we can eliminate their specific role in this regard. It is possible that the IFN- α is being produced but its signal is not being efficiently transduced.

Two important limitations of the present study include the small sample size of the patient data and the sampling bias. This may impact the interpretation of our results, which were based only on 28 patients from Brazil. Nevertheless, despite these limitations, we have shown the utility of the SVM method in deciphering the complex interplay of numerous genes involved in a biological pathway through gene expression data of patient samples. Moreover, the method is scalable as new patient sample data can be easily appended to the preliminary SVM model and reassessed. In addition, several novel machine learning algorithms have been reported by various groups to accurately select gene markers in expression studies [27–29]. As they are particularly effective for handling large datasets and feature dimensionality, it would be useful to explore these methods for DF and DHF classification as larger and more complex expression datasets become available.

Notably, the SVM model built on a large number of expression data can potentially be used to accurately classify the prognosis of patients with the benign form (DF) from those with the life-threatening (DHF) DENV disease. The lack of reliable classification tools to differentiate DF and DHF patients has often resulted in a large number of unnecessary and costly hospitalizations [6,19]. Further, early diagnosis of DHF patients will represent better prognosis.

In summary, this is the first report of application of the SVM method to gene expression data from DF and DHF patients to better understand the role of the genes in DENV infection pathway. The results suggest important role of seven genes in classifying DF and DHF patients: TLR3, MDA5, IRF3, IFN- α , CLEC5A, and the two most important MYD88 and TLR7.

Table 2. Average gene expression ratios (DF/ND and DHF/ND) for the seven genes found to be important for the classification of DF and DHF patients.

Dengue clinical form	Genes						
	TLR7	MYD88	TLR3	MDA5	IRF3	IFN- α	CLEC5A
DF/ND	01	01	01	10	01	10	01
DHF/ND	10	10	01	01	01	10	01

The binary "01" means ratio of DF/ND and DHF/ND of < 1 (down-regulated) and "10" means DF/ND and DHF/ND ratio of > 1 (up-regulated).
doi:10.1371/journal.pone.0011267.t002

Acknowledgments

The authors thank the patients that participated in the research.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ALVG LJW AMK LHVGG CECS. Performed the experiments: ALVG. Analyzed the data: ALVG

LJW AMK LHVGG ETMJ CECS TWT. Contributed reagents/materials/analysis tools: LHVGG ETMJ. Wrote the paper: ALVG LJW AMK LHVGG ETMJ CECS TWT.

References

- Holmes EC, Burch SS (2000) The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol* 8: 74–77.
- Coffey LL, Mertens E, Brehin AC, Fernandez-Garcia MD, Amara A, et al. (2009) Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes Infect* 11: 143–156.
- Halstead SB (2007) Dengue. *Lancet* 370: 1644–1652.
- WHO (1997) Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, second ed.
- Ubol S, Masrinoul P, Chaijaruwanich J, Kalayanarooj S, Charoensirisuthikul T, et al. (2008) Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 197: 1459–1467.
- Tanner L, Schreiber M, Low JGH, Ong A, Tolfvenstam T, et al. (2008) Decision tree algorithms predict the diagnosis and outcome of dengue Fever in the early phase of illness. *PLoS neglected tropical diseases* 2: e196.
- Kawai T, Akira S (2008) Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1143: 1–20.
- Yoneyama M, Fujita T (2009) RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev* 227: 54–65.
- Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, et al. (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434: 772–777.
- Knipe D, P (2007) *Fields Virology*. pp 250–255.
- Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, et al. (2005) Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol* 79: 5414–5420.
- Platanias LC (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5: 375–386.
- Diamond MS, Mehlichop E, Oliphant T, Samuel MA (2009) The host immunologic response to West Nile encephalitis virus. *Front Biosci* 14: 3024–3034.
- Sun P, Fernandez S, Marovich MA, Palmer DR, Celluzzi CM, et al. (2009) Functional characterization of ex vivo blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after infection with dengue virus. *Virology* 383: 207–215.
- McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N (2005) Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol* 79: 17–27.
- Muñoz-Jordán JL (2010) Subversion of interferon by dengue virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 338: 35–44.
- de Kruif MD, Setiati TE, Mairuhu ATA, Koraka P, Aberson HA, et al. (2008) Differential gene expression changes in children with severe dengue virus infections. *PLoS neglected tropical diseases* 2: e215.
- Nascimento EJM, Braga-Neto U, Calzavara-Silva CE, Gomes ALV, Abath FGC, et al. (2009) Gene expression profiling during early acute febrile stage of dengue infection can predict the disease outcome. *PLoS one* 4: e7892.
- Cordeiro MT, Braga-Neto U, Nogueira RMR, Marques ETA (2009) Reliable classifier to differentiate primary and secondary acute dengue infection based on IgG ELISA. *PLoS one* 4: e4945.
- Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, et al. (2008) CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* 453: 672–676.
- Cortes C, Vapnik V (1995) Support vector networks. *Machine Learning* 20: 1–25.
- Wee LJK, Tan TW, Ranganathan S (2006) SVM-based prediction of caspase substrate cleavage sites. *BMC Bioinformatics* 7 Suppl 5: S14.
- Cordeiro MT, Silva AM, Brito CAA, Nascimento EJM, Magalhães MCF, et al. (2007) Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 77: 1128–1134.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25: 402–408.
- Burges C (1998) A tutorial on support vector machines for pattern recognition. *Data Min Knowl Discov* 2: 121–167.
- Chang C, Lin C (2009) LIBSVM: a library for support vector machines.
- Chen PC, Huang SY, Chen WJ, Hsiao CK (2009) A new regularized least squares support vector regression for gene selection. *BMC Bioinformatics* 10: 44.
- Tang Y, Zhang YQ, Huang Z (2007) Development of two-stage SVM-RFE gene selection strategy for microarray expression data analysis. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 4: 365–381.
- Tang EK, Suganthan PN, Yao X (2006) Gene selection algorithms for microarray data based on least squares support vector machine. *BMC Bioinformatics* 7: 95.

7.3 Artigo 3

Padrões de expressão de genes envolvidos com a resposta da via inata em pacientes com dengue e hemorrágica.

Expression patterns of genes involved in innate immune response pathway of dengue fever and haemorrhagic patients

Ana Lisa V. Gomes^{1*}

Carlos Eduardo Calzavara-Silva^{3*}

Mayara Marques Carneiro da Silva¹

Ernesto T. A. Marques Jr^{1,2}

Laura H. V. G. Gil^{1,#}

Instituição que pertencem:

¹Department of Virology and Experimental Therapy, Aggeu Magalhães Research Center-CPqAM/FIOCRUZ, Recife, Brazil

²Center for Vaccine Research, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA

³Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Rene Rachou Research Center-CPqRR/FIOCRUZ, Belo Horizonte-MG, Brazil

Endereço para correspondência do autor responsável:

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ

Departamento de Virologia e Terapia Experimental

Av. Professor Moraes Rego, s/n

Cidade Universitária – Recife – PE – Brasil

CEP: 50.670-420 Caixa Postal: 7472

+55 81 2101 2564 FAX: +55 81 2101 2564.

Artigo submetido para publicação na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Running title: Gene expression patterns of DF and DHF patients

**EXPRESSION PATTERNS OF GENES INVOLVED IN INNATE IMMUNE RESPONSE
PATHWAY OF DENGUE FEVER AND HAEMORRHAGIC PATIENTS**

Ana Lisa V. Gomes^{1*}; Carlos Eduardo Calzavara-Silva^{3*}; Mayara Marques Carneiro da Silva¹; Ernesto T. A. Marques Jr^{1,2}; Laura H. V. G. Gil^{1,#}

¹Department of Virology and Experimental Therapy, Aggeu Magalhães Research Center-CPqAM/FIOCRUZ, Recife, Brazil

²Center for Vaccine Research, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA

³Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Rene Rachou Research Center-CPqRR/FIOCRUZ, Belo Horizonte-MG, Brazil

*These authors contributed equally

#Author to whom correspondence: Laura H. V. G. Gil.

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ

Departamento de Virologia e Terapia Experimental

Av. Professor Moraes Rego, s/n

Cidade Universitária – Recife – PE – Brasil

CEP: 50.670-420 Caixa Postal: 7472

+55 81 2101 2564 FAX: +55 81 2101 2564.

laura@cpqam.fiocruz.br

Summary

Dengue virus infection can range from dengue fever (DF) to the life-threatening dengue hemorrhagic fever (DHF), and the determinants of DF or DHF manifestation are still incompletely understood. Studies have shown that genes involved in the innate immune response (interferon type I) are candidates for genetic association studies correlating with severe symptoms observed in dengue patients. In this study, we measured the expression of MYD88, MDA5, TLR3, TLR7, TLR9, IRF3, IRF7, CLEC5A, IFN- α , - β , - γ and RIG-I involved in interferon type I response. The mRNA expression levels of genes were measured using qPCR from PBMCs of 28 dengue patients (13 DHF and 15 DF) during acute viral infection. We show differential gene expression patterns between DF and DHF: RIG-I, TLR3, IRF3, IFN- α , IFN- β and IFN- γ were upregulated in DF patient samples, while only TLR7, TLR9, MDA5, and MYD88 were upregulated in DHF. Additionally, TLR7, TLR9, MYD88, IRF3, IFN- α and IFN- γ could be used to study the difference between primary and secondary infection. We demonstrated different gene expression patterns in patients with DF and DHF and this may provide insights to better understand the role of the initial events of the innate immunity in the defense and development of dengue infection.

Key words: Dengue virus, dengue fever, dengue haemorrhagic fever, innate immune system, gene expression, primary and secondary infection.

Sponsorships: This work was supported by Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and National Institute of Health (NIH), USA.

Introduction

Dengue virus (DENV) is an enveloped virus, member of the *Flaviviridae* family, with an ~11 kilobase single-strand, positive sense RNA genome. The virus is classified into four serotypes (DENV 1-4) that are phylogenetically distinct and typically cluster

geographically (Coffey *et al.*, 2009). DENV infection can range from dengue fever (DF) with or without hemorrhagic manifestations, to the life-threatening dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS) (Coffey *et al.*, 2009; Halstead 2007; Kyle & Harris 2008; Ubol *et al.*, 2008; WHO 1997).

The determinants of DF or DHF manifestation are still incompletely understood (Cordeiro *et al.*, 2009). DHF and DSS incidences vary significantly between primary and sequential DENV infection, whereas sequential infection results when a person previously infected with one serotype is infected by a different viral serotype. The theory of sequential infection by distinct serotypes and antibody-mediated enhancement (ADE) is one of the most studied hypotheses for the development of the severe symptoms (Halstead 2007; Kyle & Harris *et al.*, 2008). Another commonly proposed theory is that based on multi-factorial aspects. In a recent study, Coffey *et al.* (2009) highlighted that DENV disease outcome is determined by interaction of several factors: virus strains and serotypes, vector status, epidemiological situation, primary or sequential infections, immunological response and age of the host (Coffey *et al.*, 2009; Kyle & Harris 2008; Long *et al.*, 2009; Ubol *et al.*, 2008; Yoneyama & Fujita 2009).

Cytokines, important part of the host immune response, that enable control of most RNA and DNA virus infections include Interferon (IFN) system: type I – IFN- α and IFN- β , and type II – IFN- γ . During viral infections, IFN type I response is induced in distinct types of cells and promotes an antiviral state by upregulating genes with direct and indirect antiviral functions. IFN- γ restricts viral replication directly by inducing an antiviral state and, indirectly, by modulating the adaptive immune response (Diamond *et al.*, 2009; Fields *et al.*, 2007; Kawai *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2005). Extensive research on the nature of cellular responses to viral infection has revealed that induction of IFN-I is triggered by the recognition of viral Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). Immune system cells recognize PAMPs through the pattern recognition receptors (PRRs), which are proteins that recognize molecules associated with microbial pathogens or cellular stress. Examples of PRRs are Toll-Like Receptors (TLR) and several cytoplasmic proteins, such as the RNA helicases Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) and Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5). Binding of viral molecules to these PRRs results in downstream activation of transcription factors, such

as interferon regulatory factors (IRF), and expression of genes coding for adapter proteins like MYD88, which will induce expression of both IFN- α and - β genes, and other relevant genes downstream of their respective pathway (Diamond *et al.*, 2009; Kawai *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2005; Honda *et al.*, 2005; Fields *et al.*, 2007; Platanias, 2005; Yoneyama & Fujita, 2009).

Single-stranded RNA (ssRNA) virus, like DENV, could activate type I IFN pathway more commonly through endosomal TLRs (TLR 7, 8, and 3), or cytoplasmic receptors like helicases MDA5 and/or RIG-I, named the “alternative pathway” for viral recognition (Kawai & Akira 2008; Guiducci *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2009; Yoneyama & Fujita, 2009). TLR9 recognizes cytosine and guanine (CpG) sequence-containing DNA and subsequently was found to recognize viral DNA (Kawai & Akira 2008). It has been documented that viruses resist against the antiviral defense machinery by escaping recognition by TLRs, RIG-I and MDA5 receptors, suggesting presence of alternative sensing machinery by the host to contain viral escape (Loo *et al.*, 2008; Yoneyama & Fujita, 2009).

Immunopathogenesis studies revealed that genes involved in viral entry and replication, as well as interferon and complement pathways, are candidates for genetic association studies correlating with more severe symptoms observed in dengue disease (Coffey *et al.*, 2009). IFN- α and - β are likely to be important in the host defense against DENV infection (Kawai & Akira 2008; Ubol *et al.*, 2008) and the virus induces production of IFN- α and - β once dendritic cells are activated. Therefore, the incomplete knowledge of IFN responses, in particular the absence of a strong transcriptional signature for DENV infection, highlights the importance of studies focusing on molecular gene expression using DENV-infected patients and cellular models (Calzavara-Silva *et al.*, 2009; Monath *et al.*, 2007; Muñoz-Jordán, 2010; Ubol *et al.*, 2008).

Using a microarray approach, Nascimento *et al.* (2009) identified genes involved in innate immune response and specific interferon-mediated immunity that were differentially expressed among undifferentiated dengue, DF and DHF patients and also febrile non-dengue, in agreement with previous studies (Hibberd *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2009; Ubol *et al.*, 2008), and this guided us to select genes involved in innate immune

response pathways to better understand the role of the initial events of the innate immunity in the defense and development of dengue infection.

In this study, we measured and compared the expression of 12 genes (MYD88, MDA5, TLR3, TLR7, TLR9, IRF3, IRF7, CLEC5A, IFN- α , - β , - γ and RIG-I) involved in the innate immune response pathway using qPCR from peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) of patients with DF and DHF.

Materials and Methods

Samples

We analyzed total RNA extracted from PBMC of fifteen DF and thirteen DHF patients from Recife metropolitan region (Pernambuco state, Brazil). DENV infection was serologically confirmed and classification of dengue severity was performed according to WHO criteria (WHO 2009). Blood samples from patients enrolled in this study were collected between 3rd and 5th day of start of fever. Patient characteristics, same criteria as Cordeiro *et al.* 2007, are described in Table 1.

Table 1. Characteristics of dengue DF and DHF patients studied.

Patient characteristic	Classification of patients (number of samples)	
	DF (15)	DHF (13)
Age (average in years)	11.25 (5 - 48)	28.58 (5 – 80)
Average of days of infection	3.37	3
DENV serotypes	DENV- 2 and DENV- 3	
Secondary infection	12 (80%)	9 (69.2%)
IgG positive		
Platelet – average cell/ μ L	219,675	105,636.363
PCR or virus isolation positive (%)	8	3

Total blood were collected in heparin tubes (BD Vacutainer) and within 2 hours after the collection, PBMC were separated by gradient density using Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) and cryopreserved in 10% (v/v) Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) in inactivated fetal bovine sera (FBS; Hyclone).

Total RNA extraction was performed using the Spin cell RNA mini kit (Invisorb) following the manufacturer's manual. Extracted RNA was reverse transcribed to cDNA using SuperScript III First-strand Synthesis System for qPCR (Invitrogen) using random hexamer primers according to the manufacturer's instructions.

Gene expression measurement

Quantitative real time PCR (qPCR) was performed in the ABI Prism 7500 device (Applied Biosystems) using default conditions (40 cycles - 95°C, 15 sec followed by 60°C, 1 min) to quantify the expression levels of target genes (MYD88, MDA5, TLR3, TLR7, TLR9, IRF3, IRF7, CLEC5A, IFN- α , - β , - γ and RIG-I). Beta-actin was selected as endogenous control and a mix of five non-dengue (ND) cDNA samples was used for normalization of DF and DHF samples. Genes were amplified and detected using specific TaqMan® gene expression assays (Applied Biosystems). Reactions were performed in triplicates and non-template controls (NTC) samples were included each time qPCR was undertaken. The relative quantification was performed using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen 2001) and results were analyzed on Sequence Detection Software version 1.4.3 (Applied Biosystems).

Statistical analysis

The qPCR data were statistically analyzed using the Prism software version 4.0a (www.graphpad.com). Considering small data size and also unequal variances among the data, we used the unpaired two-tailed Student's T test with Welch's correction and one-way analysis of variance (ANOVA) was used for mean comparison from multiple groups ($p < 0.05$ - and - confidence interval 95%).

Relationship between gene expression levels and DENV clinical form

Gene expression data from all patients were grouped into five classes – DF, DHF, ND, primary and secondary infection. The expression value of the genes for both DF and DHF patients were converted to the logarithmic scale and all comparisons were normalized with the average value of the corresponding gene for the ND patients in order to allow comparison. The average gene expression value for any given dengue patient, both DF and DHF together (DF&DHF/ND), was established by taking the average of the expression values of each of the genes analysed for all the DF and DHF patients and then normalized to ND. Similarly, the average gene expression value for only DF (DF/ND) or DHF (DHF/ND) patients was established. The ratio of the average

gene expression value of DF (DF/ND) over DHF (DHF/ND) patients was obtained for differential expression levels between the two classes. Similarly, differentially expressed genes between primary and secondary dengue infected patients, irrespective of clinical form, were determined, with the normalization of each gene expression value to the average of the corresponding gene for ND patients.

The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Toll like receptor signaling reference pathway schema (http://www.genome.jp/keggbin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04620&keyword=toll%20like%20receptors) was used as a template to map the interactions of the 12 genes analysed herein, including their up- and down-regulations for the different situations involving DF, DHF and ND patients.

Ethical aspects

Sample collections were performed following all legal ethic procedures. This study was approved by the Brazil Ministry of Health (CONEP: 4909; Process nº 25000.119007/2002-03; CEP/CPqAM: 32/09).

Results

We first established the average gene expression values for any given dengue patient, both DF and DHF included, compared to ND patients (i.e. DF&DHF/ND). The genes TLR9, IRF7, IFN- α and mainly IFN- β were upregulated in DENV infected patients, compared to the ND group (Figure 1). The opposite was observed for TLR3, TLR7, RIG-I, IRF3, and CLEC5A genes. Expression levels of genes MDA5, MYD88 and IFN- γ were not significantly different between dengue and ND samples.

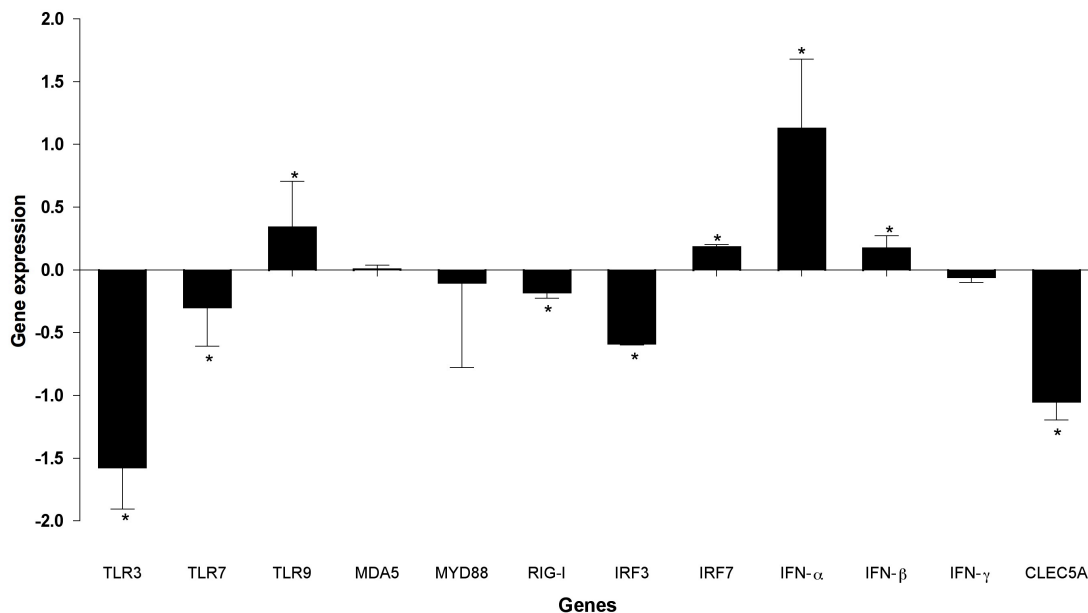


Figure 1. Expression pattern of the 12 genes analysed in 28 dengue patients, 15 DF and 13 DHF together, compared to 5 ND patients. * $p < 0.05$.

The pattern of gene expression according to dengue disease severity was studied by comparing the average expression values of DF or DHF samples only, normalized to the average of ND (Figure 2). The genes IRF7 and IFN- α were similarly upregulated in both DF and DHF patients compared to ND, with additional upregulation of TLR9 specific to DF patients, while MYD88 and IFN- β specific for DHF. As many as 5 genes,

TLR3, RIG-I, IRF3, IFN- γ , CLEC5A, were similarly down-regulated in both DF and DHF patients compared to ND. The additional down regulation of TLR7 and MYD88 was unique to DF patients, whereas that of TLR9 and MDA5 was unique to DHF. DF and ND patients showed no significant difference in the expression values for MDA5 and IFN- β , and there was no change for TLR7 of DHF.

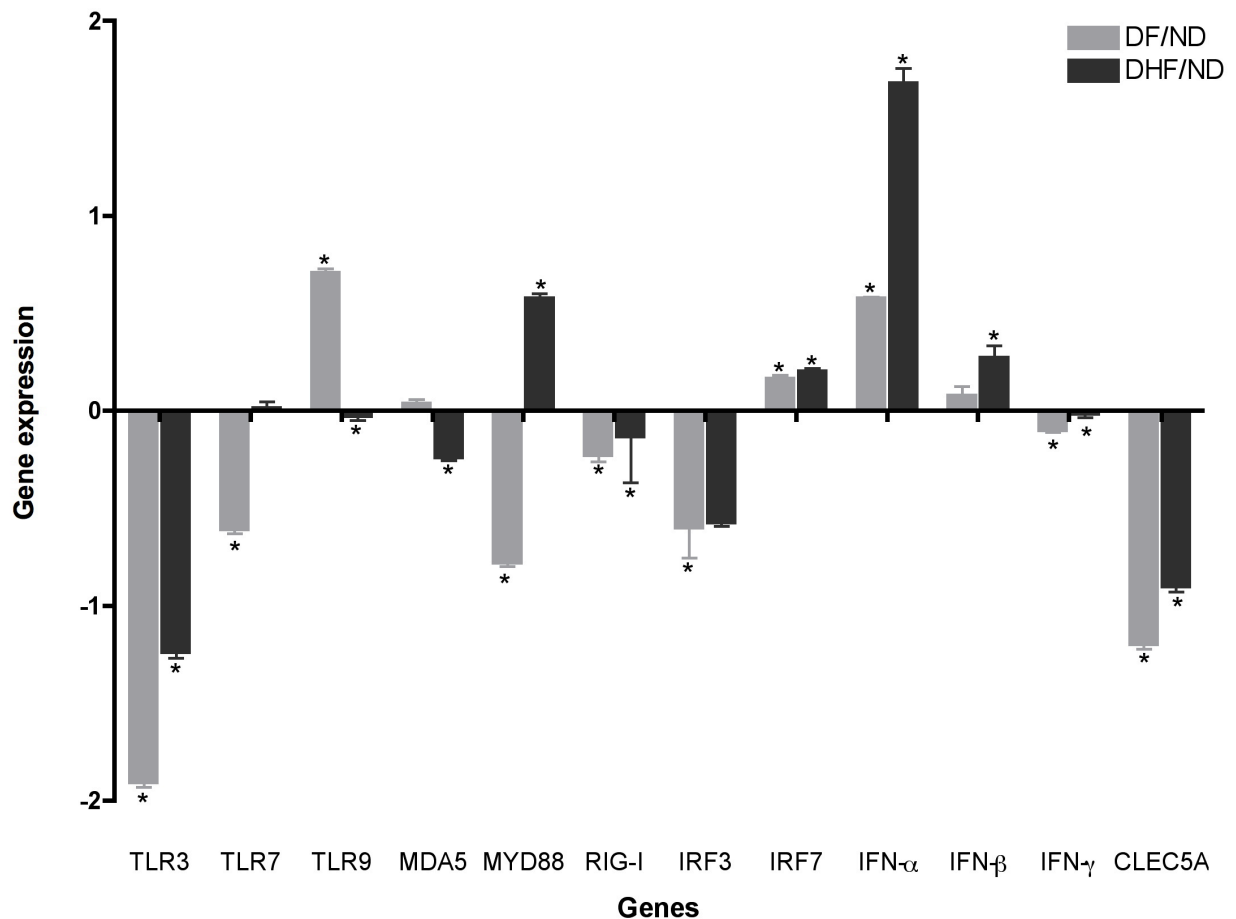


Figure 2. Expression pattern of 12 genes analysed according to disease severity (15 DF or 13 DHF patients). * $p < 0.05$.

Analysis of the differential expression levels between DF and DHF patients (DF/ND over DHF/ND) revealed that half of the 12 genes (TLR3, RIG-I, IRF3, IFN- α , IFN- β and IFN- γ) were more upregulated in DF patients than DHF. Only TLR7, TLR9, MDA5 and MYD88 were more upregulated in DHF (Figure 3). No statistical difference was observed for expression levels of IRF7 and CLEC5A.

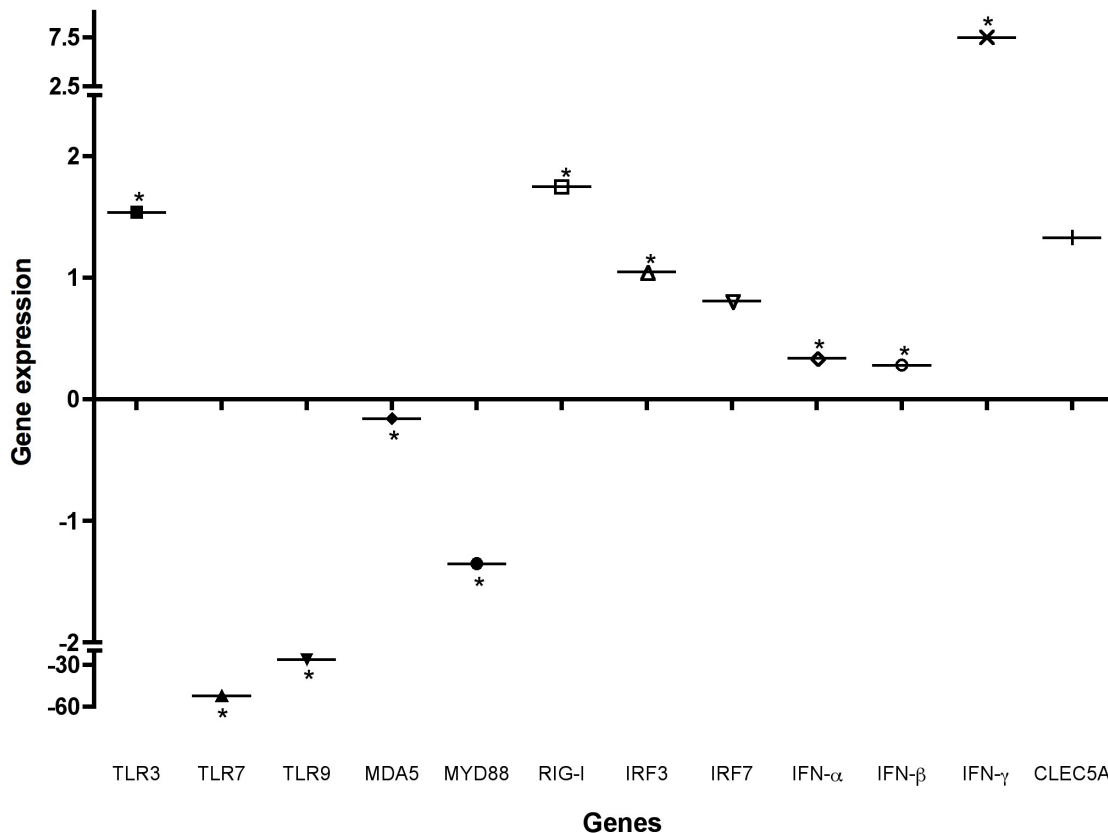


Figure 3. Gene expression pattern of the 12 genes analysed between DF and DHF patients (DF/ND over DHF/ND). * $p < 0.05$.

The 28 patients were also analysed, irrespective of clinical form, according to primary (7) and secondary infections (21), based on IgM (primary) and IgG (secondary) results. Six genes (TLR7, TLR9, MYD88, IRF3, IFN- α and IFN- γ) showed significant difference in the expression levels and could be used to study the difference between primary and secondary infection stages (Figure 4).

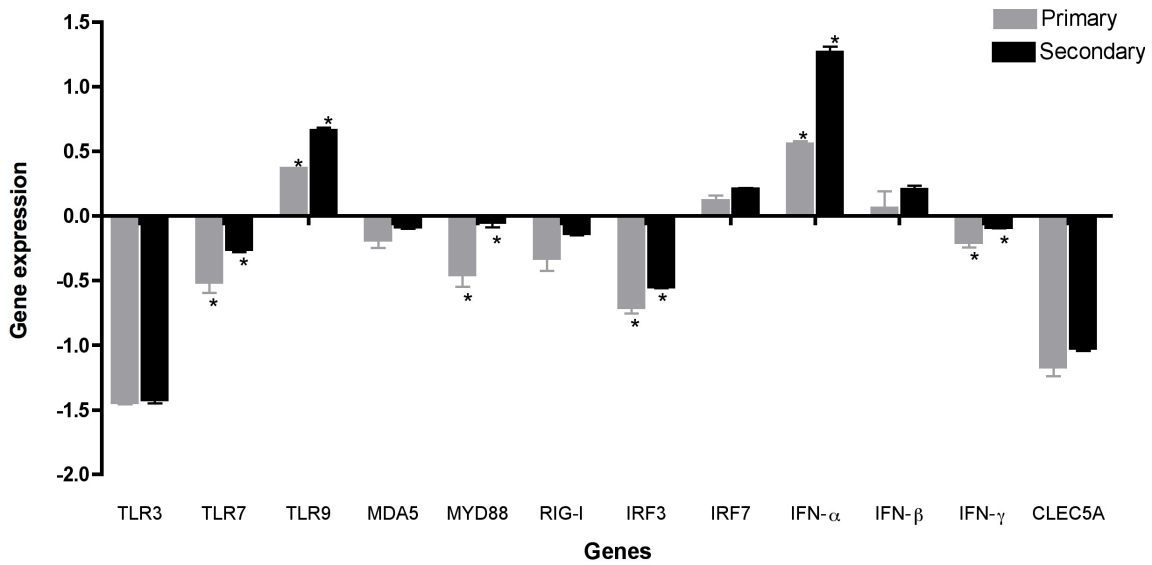


Figure 4. Expression pattern of the 12 analysed genes between primary and secondary infections. * $p < 0.05$.

The results of the analysis of the 12 genes for DF&DHF/ND, DF/ND, DHF/ND and DF/ND over DHF/ND are summarized in Figure 5, with respect to their interactions and complex interplay in the Toll-like receptor signaling pathway.

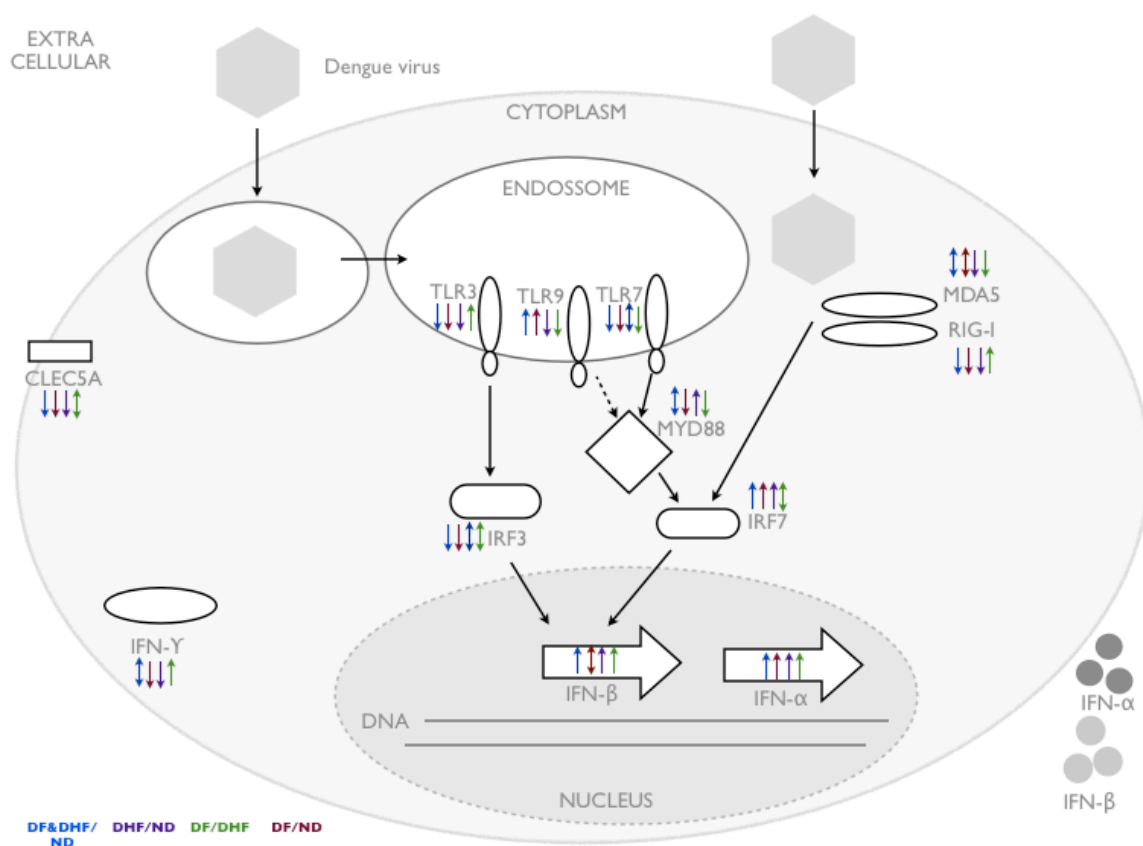


Figure 5. A schema depicting the interactions of the 12 genes analysed herein, including their up- and down-regulations for the different situations involving DF, DHF and ND patients. For each gene, arrows in colors represent ratios between DF&DHF/ND (blue), DF/ND (dark red), DHF/ND (purple) and DF/ND over DHF/ND (green). Arrows in the up direction represent upregulation, while those down represent down-regulation. Arrows in both up and down directions represent no statistical difference ($p < 0.05$). Interactions between the genes are represented by black full arrows for direct influence or as discontinued for indirect influence.

Discussion

In this study, we measured the expression levels of innate immune response-related genes in 28 dengue fever patients. Samples were obtained during the acute phase of infection, between the 3rd and 5th day of fever, to specifically measure the IFN type I induction and signaling pathways related genes.

It has been reported in some studies that there is a delay in type I IFN response in DHF patients (Kruif *et al.*, 2008; Long *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2009; Ubol *et al.*, 2008; Simmons *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2009). Here we show most of the studied genes (RIG-I, TLR3, IRF3, IFN- α , - β and - γ) are less expressed in DHF samples (Figures 3 and 5) possibly due to the delay in type I IFN response in severe dengue patients.

The genes TLR3, RIG-I, IRF3, IFN- γ and CLEC5A showed the same pattern of expression, upregulated in ND when compared to DF&DHF, DF or DHF only cases. However, these genes were also upregulated in DF patients when compared to those of DHF, suggesting similarity in expression patterns of these genes for ND and DF patients, but with higher upregulation in ND patients than DF.

The direct interaction between TLR3 and IRF3 (Figure 5) has been reported by Fields *et al.* (2007). The same pattern of gene expression for TLR3 and IRF3 that we observed (DF&DHF/ND and DF/ND) confirms this relationship. Moreover, some *flaviviridae* viruses prevent the induction of IFN I response by inhibiting IRF3 expression (Kawai & Akira 2008) or downregulating TLR3 and IRF3 (Chen *et al.*, 2008). This hypothesis is supported by our results, which showed that IRF3 and TLR3 were upregulated in ND samples than in DF or DHF samples (Figure 2).

Expression levels of IFN- β were unaltered in DF samples and upregulated in DHF samples, in comparison with ND (Figure 2). This suggests that the regulation of IFN- β expression could be influenced by IRF7 in DHF patients. IFN type I genes have been reported to be regulated by IRF3 and IRF7, reinforcing the essential function of IRF(s)-like regulators on induction of IFN genes after a viral infection (Colina *et al.*, 2008; Yoneyama & Fujita 2009). Herein we show that IRF7 is upregulated during the acute phase of DENV infection (Figure 1), in agreement with the observation by Honda *et al.* (2005) that IRF7, and not IRF3, is the main regulator of type I IFN antiviral immune responses.

Gene expression levels of the final products in type I IFN induction pathway (IFN- α and - β) are upregulated in DENV infection (DF&DHF) than in ND (Figure 1), which is expected since they are important elements for antiviral response (Colina *et al.*, 2008; Fink *et al.*, 2007; Kin *et al.*, 2007; Umerdday *et al.*, 2008). Recent studies (Nascimento *et al.*, 2009; Ubol *et al.*, 2008), however, showed that IFN- α is down-regulated in DHF than DF patients, which is also supported by our results (DF/ND over DHF/ND; Figure 3). Exceptions to this has also been reported, Nguyen *et al.* (2004) showed that IFN- α is over expressed in DHF and DSS patients, suggesting further investigation is needed.

Gene expression patterns for MDA5 and TLR9 are relevant to better understand how DENV infection influences IFN I pathway. There is no change in MDA5 in DF&DHF compared to ND, but an upregulation of TLR9. MDA5 and TLR9 are cytoplasmic and endosomal PRRs, respectively, and based on our results, also according to Conceição *et al.* (2010) and Villas-Bôas *et al.* (2009), DENV could interfere both cytoplasmic and endosome-associated genes. This may explain the observation that during DENV replication, which occurs in the cytosol, the recognition of dsRNA is more efficient through MDA5 (Conceição *et al.*, 2010).

TLR7 and MYD88 are important molecules during the initiation of innate immune response related to IFN and to DENV infection (Tsai *et al.*, 2009). Our results showed that both TLR7 and MYD88 were down-regulated in DF when compared to ND, but there was no change in DHF for TLR7 and upregulation for MYD88 (Figure 2). Between DF and DHF patients, TLR7 and MYD88 are upregulated in DHF, corroborating the observations of Kruif *et al.* (2008). In DF patients, Conceição *et al.* (2010) pointed that TLR7 had no stimulation on mRNA production during first 48H of DENV infection and MYD88 was down regulated in the same condition, which could be seen as a viral mechanism to escape from cellular defense response. In a previous work (Gomes *et al.*, 2010), we used Support Vector Machine (SVM) algorithm as a DHF prediction system based on the expression values of the genes studied herein, and we show strong correlation of MYD88 and TLR7 expression levels dengue severity (DHF).

Regarding increased gene expression of TLR7 and MYD88 observed in DHF patients, we postulate this to be a direct effect of plasmacytoid dendritic cells (pDCs). It has been reported (Conceição *et al.*, 2010; McKenna *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2009;

Taylor *et al.*, 2006) that an increase in the number of mature dendritic cells (mDCs) and pDCs in the circulating peripheral blood during acute infection correlates with increased disease severity. Furthermore, it has been shown that during the early phase of DENV infection, MYD88, TLR7, IRF7 and IFN- α are genes participating in the pDC signaling pathway (Guiducci *et al.*, 2008). Considering that our study was performed based on PBMCs (multiple subset of cells, where pDC are included), this data could explain the pattern in our results and suggest that individual cell type gene expression profiles should be investigated.

It is well known that RIG-I is essential for recognition of a series of ssRNA viruses and can activate IRF-regulated genes, and consequently induce a strong IFN expression (Kawai *et al.*, 2008). Thus, it was expected that RIG-I expression would be upregulated in DF&DHF/ND infection demonstrating the involvement of RIG-I in recognition of the virus for the different cells line. However we observed that RIG-I expression was higher in ND than DF or DHF only samples (Figure 2),

CLEC5A gene has been pointed out as an important candidate for studies on the prognosis of DHF and plasma leakage (Chen *et al.*, 2008; Coffey *et al.*, 2009). Here, CLEC5A expression level was higher in ND than DENV (DF&DHF) infected patients (Figure 1) and there was no significant difference in expression of this gene between DF and DHF patients (Figure 3).

Comparing primary and secondary infections, 6 genes with expression levels significantly different between these two infection stages were observed (Figure 4). Tang *et al.* (2010) presented this type of analyzes, comparing primary to secondary infection and showed that all dengue infected patients had secreted higher level of IFN- α than uninfected healthy controls, however our results shows higher in secondary infection. About IFN- β no statistical difference were observed, again same in Tang *et al.* (2010), while IFN- γ shows lower expression than no dengue patients, opposite to Tang *et al.* (2010). However, the results from Tang *et al.* (2010) were from a cohort of DENV-1 infected, DF patients only (comprising both primary and secondary infection stages), which is different to our cohort of DENV-2 and 3 infected, DF and DHF patients. The contrasting results may be explained by variability of dengue serotype and clinical form of the disease.

The limitations of this study include the small sample size as PBMC samples were quantified only from 28 patients and they were from a restricted geographical region (Recife metropolitan), thus may not be applicable to the large dengue infected population. However, this study provides preliminary clinical data on gene expression profiles of dengue patients that is supported, directly or indirectly, by studies of others, while the novel findings may serve as guide for further investigation and validation in the future. Another limitation is the use of *ex vivo* PBMCs in this study, however, results from *in vivo* and *ex vivo* PBMCs have been shown to be significant similarity (Hibberd *et al.*, 2006).

CONCLUSION

In this study, we demonstrated that there are different gene expression patterns in patients with DF and DHF and also between primary and secondary dengue infection stages. We also observed that DENV may use more than one single intracellular pathway to induce IFN production; not only through TLRs, but also involving cytoplasmic genes, such as MDA5 and RIG-I. The insights on influence of genes in the interferon pathway could contribute to better understand the DENV interaction with these genes and the delay in the innate immune response inducing manifestation of different clinical forms. We suggest a focus on future studies for cell type specific expression profiles.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the patients who participated in this study, the Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development – CNPq, Coordenação de Pessoal de Nível Superior – CAPES, National Institute of Health – NIH/ USA and the Programa de Desenvolvimento Tecnológico e Insumos para a Saúde (PDTIS/FIOCRUZ) for the use of its facilities. We thank Rita de Cássia (UFRPE), and Jefferson Santos (CPqAM) for critical comments on the manuscript.

REFERENCES

- Calzavara-Silva CE, et al. 2009. Early molecular markers predictive of dengue hemorrhagic fever. *An Acad Bras Cienc.* 81(4):671-7.
- Chen S et al. 2008. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* 453(7195):672-6.
- Coffey L, et al. 2009. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microb Infect* 11(2): 143-56
- Colina R et al. 2008 Translation control of the innate immune response through IRF-7. *Nature*, 452(7185):323-8.
- Conceição TM et al. 2010. Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response. *J Infect*, 60: 65 – 75.
- Cordeiro MT et al. 2007. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* : 77: 1128 – 1134.
- Cordeiro MT et al. 2009. Reliable Classifier to Differentiate Primary and Secondary Acute Dengue Infection Based on IgG ELISA. *PLoS ONE* 4(4): e4945.
- Diamond M et al., 2009. The host immunologic response to West Nile encephalitis virus. *Front Biosci.* 1;14:3024-34.
- Fields et al. 2007. Innate Responses to Viral Infections In DM Knipe & P Howley, *Virology*. 5 ed., By Lippincott Williams & Wilkins Publishers p. 250-255.
- Fink J. et al. 2007. Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Negl Trop Dis* 21:1e86.
- Gomes et al. 2010. Classification of dengue fever patients based on gene expression data using support vector machines. *PLoS One* 23;5(6):e11267.
- Guiducci C et al. 2008. Signalling pathways leading to IFN- α production in human plasmacytoid dendritic cell and the possible use of agonists or antagonists of TLR7 and TLR9 in clinical indications. *J Intern Med.* 265: 43–57.
- Halstead SB, 2007. Dengue. *Lancet* 370 (9599): 1644 – 1456.

- Hibberd M et al., 2006. A genomics approach to understanding host response. *Novartis Found Symp* 277: 206 - 214.
- Honda et al. 2005. IRF-7 is the master regulator of type - I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434: 772 – 777.
- Jones M, et al. 2005. Dengue Virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol* 79: 5414-5420.
- Kawai T, Akira S 2008. Toll-like receptors and RIG-I-like Receptors signaling. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 1143: 1-20.
- Kin Wet al. 2007. Interferon-Stimulated genes response in endothelial cells following Hantaan virus infection. *J Korean Med Sci* 22: 987 – 992.
- Kruif M, et al. 2008. Differential Gene Expression Changes in Children with Severe Dengue Virus Infections. *PLoS Negl Trop Dis* 2(4): e215.
- Kyle JL and Harris E 2008. Global Spread and persistence of Dengue. *Annu Rev Microbiol* 62: 71 – 92.
- Livak KJ, Schmittgen TD 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25: 402-408.
- Long T, et al. 2009. Pattern of gene transcript abundance in the blood of children with severe or uncomplicated dengue highlight differences in disease evolution and host response to dengue virus infection. *J Infect Dis* 199(4):537-46.
- Loo Y et al. 2008. Translation control of the innate immune response through IRF-7. *J Virol* 82: 335 – 345.
- McKenna K et al. 2005. Plasmacytoid dendritic cells: Linking innate and adaptative immunity. *J Virol* 79: 17-27.
- Monath MD et al. 2007. Dengue and yellow fever – Challenges for the development and use of vaccines. *N Engl J Med* 357 (22): 2222-2225.
- Muñoz-Jordán, JL 2010. Subversion of Interferon by Dengue Virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 338: 35 – 43.

- Nascimento E. 2009 Gene Expression Profiling During Early Acute Febrile Stage of Dengue Infection Can Predict The Disease Outcome. *Plos One*, 19;4(11):e7892.
- Nguyen TH 2004. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis*.189(2): 221 - 232.
- Platanias L 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5: 375 – 386.
- Simmons C, et al. 2007. Patterns of Host Genome–Wide Gene Transcript Abundance in the Peripheral Blood of Patients with Acute Dengue Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* 195: 1097–107.
- Sun P et al. 2009. Functional characterization of ex vivo blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after infection with dengue virus. *Virology* 383: 207-215.
- Taylor P. et al. 2006. IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells. *Cell Research*, 16:134-140.
- Tang Y. et al. 2010. Both viremia and cytokine levels associate with the lack of severe disease in secondary dengue 1 infection among adult Chinese patients. *PLoS one* 5 (12) e15631.
- Tsai Y et al. 2009. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cell Microbiol. Cell Microbiol.* 11(4):604-15.
- Ubol S, et al. 2008. Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 197: 1459 – 67.
- Umareddy I et al. 2008. Dengue virus regulates type I interferon signaling in a strain-dependent manner in human cell lines. *J Gen Virol* 89: 3052 – 3062.
- Villas-Bôas CS. et al. 2009. Dengue virus-induced regulation of the cell translational machinery. *Braz J Med Biol Res* 42: 1020 – 1026.
- WHO.int [homepage on the internet]. Geneva: Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, second ed. *World Health Organization*, ISBN 92 4 154500 3 [1997]. Available from: <http://www.who.int/en>

WHO.int [homepage on the internet]. Geneva: Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition. ISBN 978 92 4 1547871 [cited 2009 March 25]. Available from:

<http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?sesslan=1&codlan=1&codcol=15&codcch=3249>

Yoneyama M, Fujita T 2009. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev* 227:54-

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo da tese foi estudar o nível de expressão de genes relacionados com a indução da resposta imune inata em pacientes com dengue e relaciona-los com o desenvolvimento dos sintomas graves da doença.

Os resultados da tese foram apresentados e discutidos em três artigos. No primeiro artigo foram apresentados resultados acerca da expressão gênica de um grupo de 16 pacientes com diferentes formas clínicas da dengue. Esses pacientes foram agrupados e então pesquisados, de modo preliminar, a expressão de 6 genes (MYD88, FCGR3B, MT2A, PDCD4, HLA-F, PSBM9), a partir de qPCR, para sabermos se haveria diferença de expressão entre os grupos e dessa forma seria possível investigar a capacidade de prognósticos dos dados gerados no estudo.

Como resultado, ainda que preliminar, nós pudemos concluir que os genes selecionados e a metodologia escolhida poderiam fornecer informações acerca do prognóstico dos pacientes com dengue, a partir da diferença de expressão. Já nesse estudo preliminar foram identificados três genes (MYD88, PDCD4, FCGR3B) com forte capacidade de discriminar os grupos de pacientes testados. Os seis genes testados fazem parte da resposta imune e isso foi estimulante, uma vez que nos impulsionou a refinar a escolha dos pacientes e dos genes.

A estratégia seguinte foi selecionar 28 pacientes com dengue (15 DF e 13 DHF). As amostras foram coletadas entre o 3° e 5° dia de febre, ou seja, no período inicial da infecção onde a resposta imune inata está exacerbada no paciente frente à infecção.

O segundo artigo traz o resultado da expressão de 12 genes relacionados com a via de indução da resposta imune inata, mais especificamente com a via de ativação do IFN nesses pacientes. A análise dos resultados da qPCR foi realizada através da utilização do SVM, que é uma ferramenta da Inteligência Computacional. Nessa etapa concluímos que dos 12 genes selecionados para o estudo: a) Dois genes (MYD88 e TLR7) foram mais importantes para a classificação dos pacientes com dengue em DF e DHF; b) Cinco genes (TLR9, RIG1, IRF7, IFN- β and IFN- γ) foram considerados elementos que confundiam ou que dificultavam a classificação dos pacientes; c) Os outros cinco genes (TLR3, MDA5, IRF3, IFN- α , CLEC5A) pareciam não contribuir nem positiva e nem negativamente para a classificação, no entanto, quando associados ao MYD88 e ao TLR7, sabidamente importantes, houve aumento da acurácia do modelo de

SVM. Dessa forma, o resultado nos mostrou que o estudo baseado na expressão gênica dos sete genes (MYD88, TLR7, TLR3, MDA5, IRF3, IFN- α , CLEC5A) pode ser uma importante ferramenta no prognóstico e também na classificação dos pacientes com DF e DHF. Outra importante conclusão foi de que esses sete genes agem em associação e se influenciam entre si.

O segundo artigo destaca a importância da utilização da Bioinformática (associação entre a Inteligência Computacional e dados biológicos) uma vez que, de acordo com a metodologia escolhida poderão ser testados outros genes e outros grupos de pacientes sem necessidade de nova otimização dos padrões do SVM. A pré-existência da matriz permite que a mesma seja aumentada e calculado a capacidade discriminatória dos novos genes selecionados.

O passo seguinte foi então discutir a importância biológica dos genes que se mostraram relevantes e principalmente como a relação entre eles acontecia nos grupos dos pacientes estudados. Esses resultados fazem parte do terceiro artigo onde apresentamos que seis (TLR3, RIG-I, IRF3, IFN- α , IFN- β , IFN- γ) dos doze genes estudados são menos expressos nos pacientes com DHF e esse resultado pode ser explicado pela hipótese defendida por vários pesquisadores de que um atraso na resposta do tipo IFN I estaria envolvida com o prognóstico da DHF.

No terceiro artigo, a expressão dos dois genes - TLR7 e MYD88 - identificados no segundo artigo como os mais influentes no modelo de predição para DF e DHF, apresentou resultados onde ambos tem menor expressão em DF quando comparado com ND e entre os pacientes DF e DHF estão mais expressos em DHF. Esses resultados corroboram com os nossos resultados prévios, além de concordar com a literatura existente.

O gene CLEC5A foi incluído no estudo apesar de não ser um gene diretamente envolvido com a resposta imune inata antiviral por ter sido apontado como um importante candidato para o prognóstico da DHF. Os resultados demonstraram que em pacientes ND estavam mais expressos do que naqueles infectados pelo DENV e não foi possível identificar diferença significativa de expressão desse gene entre os pacientes DF e DHF. Apesar disso, no segundo artigo ele foi um dos sete genes que fez parte do modelo final de predição. Essa análise também nos mostrou que o vírus da dengue deve utilizar mais de uma estratégia de invasão celular, não só através dos receptores *toll-like* (3, 7 e 9), mas também genes citoplasmáticos, como RIG-I e MDA5.

Os dados de expressão gênica dos 28 pacientes foram então estratificados de acordo com o tipo de infecção (primária e secundária). Isso nos trouxe um novo resultado, onde seis genes

(TLR7, TLR9, MYD88, IRF3, IFN- α , IFN- β) apresentaram expressão significativamente diferente.

O pequeno número de amostras analisadas assim como o tipo de amostras (diferentes tipos de células mononucleadas do sangue periférico) são limitações do estudo, onde acreditamos que uma análise da expressão gênica em tipos celulares específicos poderá refinar as conclusões por nós sinalizadas até o momento.

Como perspectivas para a continuação do desenvolvimento dessa tese podemos sugerir a ampliação do número de amostras analisadas (inclusive de diferentes regiões geográficas, diferentes períodos cronológicos), inclusão de novos genes e refinar a análise a partir de dados de tipos celulares específicos.

Diante dos resultados e das conclusões apresentadas o presente trabalho tem como perspectiva ampliar o número de pacientes analisados, assim como incluir outros componentes da resposta imune na análise gênica. Dessa forma, as conclusões já apresentadas poderão ser reforçadas e um modelo mais robusto de classificação dos pacientes com dengue poderá ser proposto, contribuindo como uma ferramenta de apoio e suporte aos profissionais de saúde no prognóstico dos pacientes infectados.

REFERÊNCIAS

AIZERMAN M.; BRAVERMAN, E.; ROZONOER, L. Theoretical foundations of the potential function method in pattern recognition learning. Automation and Remote Control, Boston, v. 25, p. 821–837, 1964.

ALMEIDA, F. F. M. Support Vector Machine: – Relatório Técnico. 1 ed. Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande, 2007.

ALPAYDIN, E. Introduction to Machine Learning (Adaptive Computation and Machine Learning). 1ed. Massachussettes: MIT Press, 2004.

BANDYOPADHYAY, S.; LUM, L. C.; KROEGER, A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. Tropical Medicine and International Health, Oxford, v. 11p. 1238-1255, ago. 2008

BURGES, C. J. C. A tutorial on support vector machines for pattern recognition. Data Mining and Knowledge Discovery, Boston, v. 2, p. 121-167, jan/fev. 1998.

CHANG, C. C.; LIN, C. J. LIBSVM: a library for support vector machines. Boston, 20 de jun de 1998. Disponível em: <<http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/libsvm/>>. Acesso 10 fev 2009.

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

CHEN, S. T. et al. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. Nature, Londres, v. 456, p. 672-676, dez. 2008.

CHIEN, L. J. et al. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 44, p. 1295 – 1304, out. 2006.

COFFEY, L. L. et al. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. Microbes and infection/ Institut Pasteur, Paris, v. 11, p. 143-156, set. 2009.

CONCEIÇÃO, T. M. et al. Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response. Journal of Infection, Londres, v. 60, p. 65-75, nov. 2010

CONZELMAN, K. K, Transcriptional Activation of Alpha/Beta Interferon Genes: Interference by Nonsegmented Negative-Strand RNA Viruses, Journal of Virology, Baltimore, v. 79, n. 9, p. 5241–5248, set. 2005.

CORDEIRO, M. T. et al. Characterization of dengue patient cohort in Recife. The American Journal Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 77, p. 1128-1134, set. 2007.

CORDEIRO, M. T. Evolução da dengue no estado de Pernambuco, 1987-2006: epidemiologia e caracterização molecular dos sorotipos circulantes. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

DEAUVIEAU, F. Innate immune responses in human dendritic cells upon infection by chimeric yellow-fever dengue vaccine serotypes 1-4, The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 76, p. 144-154, 2007.

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

DERVEAUX, S.; VANDERSOMPELE, J. O.; HELLEMANS, J. A. N. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. Methods, San Diego, v. 50, p. 227 – 230, abr. 2010.

DIAMOND, M. et al. The host immunologic response to West Nile encephalitis virus. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, New York, v. 14, p. 3024 – 3040, set. 2009

DURBIN A. P. et al. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. Virology, New York, v. 376, p. 429 – 435, maio. 2008.

FIGUEREDO, R. M. P. et al. Dengue Virus type 4, Manaus, Brazi. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 14, p. 667 – 669, abr. 2008.

FINK, J. et al. Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients, PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 1, p. 86-93, dez. 2007.

FRAGA, D.; MEULIA, T.; FENSTER, S. Real-Time PCR, Current Protocols Essential Laboratory Techniques. 3 ed, Baltimore: John Wiley & Sons, Inc. 2008.

GOMES, A. L. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers for the identification of dengue virus serotypes. Journal of Virology Methods, Amesterdam, v. 145, p. 76-79, jun. 2007.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clinical microbiology reviews, Washington, v. 11, p. 480-496, jul. 1998.

GUHA-SAPIR, D.; SCHIMMER, B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. Emerging Themes in Epidemiology, London, v. 2, p. 1-8, mar. 2005

GURUKUMAR, K. R. et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of dengue viruses. Virology Journal, London, v. 1, p. 6-10, nov. 2009.

GUZMÁN, N. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. International Journal of Infectious Diseases, Hamilton, v. 8, p. 69 – 80, out. 2004.

HALLER, O.; KOCHS, G.; WEBER, F. The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses, Virology, New York, v. 344, p. 119-130, dez. 2006.

HALSTEAD, S. B. Dengue. The Lancet, Minneapolis, v. 370, p. 1644-1652, maio. 2007.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypothesis and discussion Yale Journal of Biology and Medicine, New Haven, v. 42, p. 348-350, abr. 1970.

HARRIS, E. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 36, p. 2634 – 2639, ago. 1998.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; LANCIOTTI, R. S. Serotype-specific detection of dengue viruses in a multiplex real-time reverse transcriptase PCR assay. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 43, p. 4977 - 4983. 2005.

KAO, C. L. et al. Laboratory Diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, Taiwan, v. 38, p. 5 – 16, jan. 2005.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and RIGI-like Receptors signaling. Annals of the New York Academy of Science, New York, v. 1143, p. 1-20, fev. 2008

KNUTH, D. Fundamental Algorithms - Basic concepts. In: KNUTH, D. The Art of Computer Programming. 3 ed. Massachusetts: Addison-Wesley, v.1, cap. 1. 1997.

KONG, Y. Y. et al. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. Journal of Virological Methods, Amsterdam, v. 138, p. 123 – 130, maio. 2006.

KRUIF, M. D. et al. Differential Gene Expression Changes in Children with Severe Dengue Virus Infections. PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 2, p. e215, abr. 2008.

KWAN, W. H. Dendritic cell precursors are permissive to dengue virus and human immunodeficiency virus infection. Journal of Virology, Washington v. 79, p. 7291 – 7299, dez. 2005.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global Spread and persistence of Dengue. Annual review of microbiology, Palo Alto, v. 62, p. 71 – 92, out. 2008.

KYLE, J.L.; BEATTY, R.; HARRIS, E. Dengue virus infects macrophages and dendritic cell in a mouse model of infection, The Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 195, p.1808-1817, mar. 2007.

KANEHISA LABORATORIES. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Kyoto, 2010. Disponível em http://www.genome.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04620&keyword=TOLL%20LIKE%20RECEPTORS. Acesso em: 12 jan 2010.

LAI, Y. L. et al. Cost-effective real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for dengue virus followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for serotyping of the virus. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 45, p. 935 – 941, jul. 2007.

LANCIOTTI, R.S. et al. Rapid Detection and Typing of Dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase Polymerase chain Reaction. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 30, p. 545 – 551, 1992.

LINDENBACH, B.; THIEL, H.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Theirs Replication. In: KNIPE, D. M. and HOWLEY, P. M. FIELDS VIROLOGY. 5 ed. Washington: Lippincott Williams & Wilkins Publishers. 2007. v. 2, p. 250-255.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantification PCR and $2^{-\Delta CT}$ method. Methods, San Diego, v. 25, p. 402 - 408, jan. 2001,

LONG, H. et al. Patterns of Gene Transcript Abundance in the Blood of Children with Severe or Uncomplicated Dengue Highlight Differences in Disease Evolution and Host Response to Dengue Virus Infection. The Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 199, p. 537 -546, fev. 2009.

LUGER, G.; STUBBLEFIELD, W. Artificial Intelligence: Structures and Strategies for Complex Problem Solving. 5 ed. Massachusetts: The Benjamin: Cummings Publishing Company, 2004.

MANUAL Abi prism 7000. Foster City, 2000.

MANUAL Abi prism 7500. Foster City, 2003.

MELO, F. L. ; ROMANO, C. M.; ZANOTTO, P. M. Introduction of Dengue Virus 4 (DENV-4) Genotype I into Brazil from Asia? PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 3, p. e390, out. 2009.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses - Review, Molecular Cell, Cambridge, v. 22, p. 561-569, nov. 2006.

MONATH, M. D. et al. Dengue and yellow fever – Challenges for the development and use of vaccines. The New England journal of medicine, Boston, v. 357 p. 2222 – 2225, out. 2007.

MORENO-ALTAMIRANO, M. M. B. et al. Gene expression in Human Macrophages infected with dengue virus serotype-2, Scandinavian Journal of Immunology, Oslo, v. 60, p. 631-638, ago. 2004.

NASCIMENTO, E. J. M. et al. Gene Expression Profiling during Early Acute Febrile Stage of Dengue Infection Can Predict the Disease Outcome. PLoS ONE, San Francisco, v. 4, p. e7892. out. 2009.

NASCIMENTO, R. F. .F. et al. O algoritmo Support Vector Machines (SVM): avaliação da separação ótima de classes em imagens CDD-CBERS-2. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 14., 2009, Natal. Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Natal, p. 2079-2086, abr. 2009.

NAVARRO-SANCHEZ, E.; DESPRÉS, P.; CEDILLO-BARRÓN, L. Innate immune responses to dengue virus, Archives of Medical Research, New York, v. 36, p. 425-435, abr. 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment and Prevention, Geneva, 1997. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/print.htm>>. Acesso em: 23 jan. 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition, Geneva, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/print.htm>>. Acesso em: 23 jan. 2010

PALUCKA, A. K. Dengue virus and dendritic cell, Nature Medicine, New York, v.6, n. 7, p. 748-749, jan. 2000.

RICH, E.; KNIGHT, K. Artificial intelligence. 2 ed. New York: Mc Graw-Hill, 1991, p. 476-478.

RIGAU-PEREZ, J. Severe dengue: the need for new case definitions. Lancet Infectious Diseases, London, v. 6, p. 297–302, jun. 2006

ROSEN, L. The empero's new clothers revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. The American Journal Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 26, p. 337-343, fev. 1977.

SAITO, T.; GALE, M. Principles of intracellular viral recognition. Current Opinion in Immunology, Filadélfia, v. 19, p. 17-23, maio. 2007.

SALVATORE, A. E. et al. Molecular Beacon Probes: Micro-Volume Fluorescence Measurement of HPLC Isolated Probes. Application Note, Washington, v. 4, cap2, 2008.

SETH, R. B. et al. Antiviral innate immunity pathways, Cell Research, Beijing, v. 16, p. 141-147, nov. 2006.

SHAWE-TAYLOR, J.; CRISTIANINI, N. Support Vector Machines and the other kernel-based learning methods. 1 ed. Cambridge,: University Press, 2000.

SILVA, A. M. Estudo de cinética de viremia do vírus dengue sorotipo 3 em formas clínicas da dengue com diferentes níveis de gravidade. 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães , Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

SIMMONS, S. et al. Patterns of Host Genome–Wide Gene Transcript Abundance in the Peripheral Blood of Patients with Acute Dengue Hemorrhagic Fever. The Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 195, p. 1097–1107, nov. 2007.

STEINWART, I.; CHRISTMANN, A. Support Vector Machines. 1 ed. New York: Springer-Verlag, 2008.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Recognition of viruses by innate immunity, Immunological Reviews, Copenhagen, v. 220, p. 214-224, fev. 2007.

THAYAN, R. et al. The use of two-dimension electrophoresis to identify serum biomarkers from patients with dengue haemorrhagic fever. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v.103, p. 413-419, abr. 2009.

TOO, H. P. et al. Real time quantification of GFR-2 alternatively spliced isoformas in murine brain and peripheral tissues. Molecular Brain Research, Amsterdam, v. 114, p. 146 – 154, 2003.

TSAI, Y.T. et al. TLR3 Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. Cell Microbiology, Oxford, v. 11, p. 604-615, abr. 2009.

TURING, A. M. Computing Machine Inteligence. Disponível em: <<http://www.nytimes.com/library/cyber/surf/1106surf-turing.html>>. Acesso em: 22 dezembro 2009.

UBOL, M. et al. Differences in Global Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells Indicate a Significant Role of the Innate Responses in Progression of Dengue Fever but Not Dengue Hemorrhagic Fever. The Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 197, p. 1459 – 67, ago. 2008.

VANGUILDER, H. H.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. BioTechniques, London, v. 44, p. 619 – 626, jan. 2008.

WANG, J. P. et al. Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. Journal of immunology, Baltimore, v.177, p.7114 – 7121, fev. 2006.

WIKIPEDIA link. File: Taqman.png. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Taqman.png>>. Acesso em: 23 dez 2010.

WU, S. et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection, Nature medicine, New York, v. 6, p. 816-820, nov. 2000.

ZHU, J.; HUANG, X.; YANG, Y. Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both toll-like receptors-dependent and independent pathways. Journal of Virology, Baltimore, v. 81, n. 7, p. 3170-3180, out. 2007.

Título do Projeto: Influência da expressão de genes humanos envolvidos na resposta imune inata no desenvolvimento da Febre Hemorrágica da Dengue: validação de marcadores moleculares preditivos para a forma severa da doença e alvos moleculares para intervenção.

Pesquisador responsável: Marli Tenório Cordeiro

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 20/07/2009

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 32/09

Registro no CAAE: 0030.0.095.000-09

PARECER Nº 44/2009.

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 25 de setembro de 2012. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 25 de setembro de 2009.




Giselle Camposana Gouveia
Farmacêutica
Coordenadora
Mat. SIAPE 0463376
CPqAm / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 25/09/2010.