

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

ALESSANDRA VILAS BOAS TERRA GOMES

**ANÁLISE DO PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO DO DNA E DO
PROMOTOR DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA E DO INTERFERON
GAMA EM PACIENTES INFECTADOS PELO *Dengue virus***

Alfenas/MG

2015

ALESSANDRA VILAS BOAS TERRA GOMES

**ANÁLISE DO PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO DO DNA E DO PROMOTOR DO
FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA E DO INTERFERON GAMA EM
PACIENTES INFECTADOS PELO *Dengue virus***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Alfenas/MG
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Gomes, Alessandra Vilas Boas Terra

Análise do perfil global de metilação do DNA e do promotor do fator de necrose tumoral alfa e do interferon gama em pacientes infectados pelo *Dengue virus* / Alessandra Vilas Boas Terra Gomes. -- Alfenas/MG, 2015.

77 f.

Orientador: Luiz Felipe Leomil Coelho
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. Vírus da Dengue. 2. Repressão Epigenética. 3. Metilação de DNA. I. Coelho, Luiz Felipe Leomil. II. Título.

CDD-616.9

ALESSANDRA VILAS BOAS TERRA GOMES

ANÁLISE DO PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO DO DNA E DO
PROMOTOR DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA E DO
INTERFERON GAMA EM PACIENTES INFECTADOS PELO *Dengue virus*

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

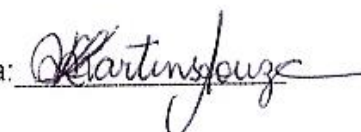
ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Aprovada em: 03 de agosto de 2015

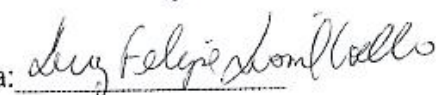
Prof. Dr. Jônatas Santos Abrahão
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Assinatura: 

Prof^ª. Dr^ª: Raquel Lopes Martins de Souza
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Aos meus pais, Sandra e Valério, e ao meu namorado Henrique, por me apoiarem nos dias bons e maus, e por todo amor, que me ajudou a vencer mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter guiado meus passos em cada instante; por me amparar nos momentos de dificuldade e me acolher nos momentos de alegria. E à Nossa Senhora pela fiel intercessão e por passar à frente de todos os obstáculos.

À Universidade Federal de Alfenas e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos e experiências.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, pela paciência, pelos ensinamentos, pela competência e pelo exemplo de dedicação e profissionalismo que foram essenciais na conclusão de mais esta etapa de minha vida.

Ao Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias e aos demais professores do Programa por compartilharem seus conhecimentos e dedicarem seu tempo na formação de novos profissionais.

Aos meus pais, Sandra e Valério, ao meu irmão, Guilherme, ao meu namorado, Henrique e toda a sua família, por todo amor, carinho, apoio e confiança, sem os quais eu não conseguiria ter chegado até aqui.

À toda minha família (a melhor do mundo!), pela união em todos os momentos, e por serem meu porto seguro e garantia de que tudo iria dar certo.

A todos os meus amigos do Laboratório de Vacinas, Andressa, Bianca, Gabriel, Isabella, Juliane, Júlio, Lauana, Lauro, Luiz Gustavo, Marcílio, Naiara, Paola, Sérgio e Stella, pela disposição em ajudar sempre, e por tornarem melhor o meu dia-a-dia. De maneira especial, à Raissa, por ter trilhado este caminho junto comigo, por cada palavra, pelos conselhos e risadas, que levarei para sempre comigo.

A todos os meus amigos, de maneira especial aos irmãos do GOU por me ensinarem que a perseverança deve sempre prevalecer, e às Viletas, por serem minha família em Alfenas.

Aos colegas de mestrados por compartilharem as experiências vividas durante estes dois anos.

Aos técnicos, auxiliares e a todos os funcionários da Unifal, que colocaram sua ajuda à disposição em todos os momentos.

*“Buscai em primeiro lugar o reino de Deus
e a Sua justiça e todas as coisas vos serão
dadas em acréscimo”*

Mateus 6, 33

RESUMO

A dengue é uma infecção viral sistêmica, autolimitada, transmitida para os humanos através da picada de mosquitos fêmeas infectadas do gênero *Aedes sp.* Trata-se de uma doença com grandes impactos na economia e na saúde pública, e estima-se que entre 50 a 100 milhões novas infecções ocorram anualmente em mais de 100 países. A dengue é causada pelo *Dengue virus* (DENV), um vírus pertencente à família *Flaviviridae*, com genoma composto de uma única molécula de RNA, fita simples com polaridade positiva. A infecção pelo DENV pode ser assintomática ou apresentar diferentes manifestações clínicas, como febre do dengue (FD), febre hemorrágica do dengue (FHD) e Síndrome do Choque do dengue (SCD). Dados da literatura indicam que algumas infecções virais podem causar alterações epigenéticas em seus hospedeiros, principalmente a metilação do DNA. Assim, o propósito deste trabalho foi investigar a influência da infecção pelo DENV no perfil global de metilação dos pacientes, através da técnica de MethELISA, e analisar o padrão de metilação no promotor dos genes fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ). Os resultados obtidos indicam uma tendência na diminuição do percentual relativo de metilação após a infecção pelo DENV, sugerindo uma influência da infecção viral nos mecanismos epigenéticos do hospedeiro. Observou-se também uma maior taxa de desmetilação do promotor do TNF- α dos pacientes infectados em relação ao grupo controle. Em relação ao IFN- γ , não foi observada diferença no padrão de metilação do gene entre os dois grupos analisados. A meta-análise de microarranjos de DNA obtidos de pacientes infectados pelo DENV indica um aumento na expressão dos genes da Timina DNA Glicosilase (TDG) e das DNA Metiltransferases 1 e 3 (DNMT1 e DNMT3) nos pacientes infectados. Estes dados sugerem que o DENV é capaz de interferir com os mecanismos epigenéticos do hospedeiro.

Palavras-chave: *Dengue virus*. Epigenética. Metilação do DNA. TNF- α . IFN- γ .

ABSTRACT

Dengue fever is a systemic viral infection, self-limited, transmitted to humans through the bite of infected female mosquito from *Aedes genus*. It is a disease with major impacts on the economy and public health, and it is estimated that between 50 to 100 million new dengue infections occur annually in more than 100 countries. Dengue fever is caused by *Dengue virus* (DENV), a single strand positive sense RNA virus belonging to the *Flaviviridae* family. The DENV infection may be asymptomatic or present different clinical manifestations, such as dengue fever (DF), hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Published data indicate that some viral infections can cause epigenetic changes in their hosts, especially in the DNA methylation. Thus, the aim of this study was to investigate the influence of DENV infection in global methylation profile of DENV infected patients by MethELISA technique, and analyze the pattern of methylation in the promoter of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ) genes. The results obtained show a decrease the relative methylation percentage after DENV infection, suggesting an influence of viral infection in the epigenetic mechanisms of the host. There was also detected a higher rate of demethylation of TNF- α promoter in infected patients if compared to the control group. No difference was found in the methylation frequency between the two analyzed groups regarding the IFN- γ promoter. Meta-analysis of DNA microarray indicates that patients infected with DENV shows an increase in the expression of Thymine DNA Glycosylase (TDG) and DNA methyltransferases 1 and 3 (DNMT1 and DNMT3) genes, all involved in epigenetic regulation. So, these data indicated that DENV is able to interfere with the host epigenetic mechanisms.

Keywords: *Dengue virus*. Epigenetics. DNA methylation. TNF- α . IFN- γ .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Média do número de casos de dengue reportados à Organização Mundial de Saúde entre 1955 e 2007 e o número de casos reportados recentemente, de 2008 a 2010.....	20
Figura 2 - Média do número de casos de Dengue nos 20 países mais endêmicos, como reportado à OMS, 2004-2012.....	21
Figura 3 - <i>Aedes aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> , respectivamente.....	22
Figura 4 - Genoma do <i>Dengue virus</i>	24
Figura 5 - Estrutura do dímero do <i>Dengue vírus</i> na partícula viral madura.....	25
Figura 6 - Ciclo de Replicação do <i>Dengue vírus</i>	26
Figura 7 - Reação de metilação do DNA.....	34
Figura 8 - Metilação <i>de novo</i> e de manutenção do DNA.....	36
Figura 9 - Maquinaria da desmetilação ativa do DNA.....	37
Figura 10 - Exemplos de desmetilação ativa do DNA.....	38
Figura 11 - Representação do fragmento de 139 pb do gene SMAD-9 utilizado como controle negativo do MethELISA.....	45
Figura 12 - Conversão do DNA com Bissulfito de Sódio.....	46
Figura 13 - Princípio da Reação em Cadeia da Polimerase Metilação-Específica (MSP).....	47
Figura 14 - Padronização do MethELISA	50
Figura 15 - Relação entre a média dos valores de D.O. obtidos do controle positivo e o cut-off para as diferentes diluições de anticorpo primário e tampões de adsorção.....	51
Figura 16 - Construção da Curva-Padrão para a análise do perfil de metilação das amostras de DNA	52
Figura 17- Porcentagem global de metilação de pacientes não infectados e de pacientes infectados pelo DENV.....	53
Figura 18 - Porcentagem global de metilação dos pacientes não infectados pelo DENV e de pacientes infectados que apresentaram ou não os sintomas da doença.....	53
Figura 19 - Resultados representativos do MSP da região promotora do TNF- α	

e do IFN- γ , realizado a partir do DNA extraído do sangue total de pacientes infectados e não infectados pelo DENV.....	54
Figura 20 - Mapa de aquecimento para os 8 genes relacionados ao processo de metilação e demetilação de dinucleotídeos CpG.....	57
Figura 21 - Níveis de expressão gênica dos genes TDG, DNMT1, DNMT3B e AICDA.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos casos de Dengue, de acordo com a OMS (2009)	29
Tabela 2 - Construção da curva de porcentagem demetilação.....	45
Tabela 3 - Localização dos sítios CpGs, sequências dos primers, temperaturas de anelamento e tamanho dos produtos do MSP.....	48
Tabela 4 - Frequência de metilação da região promotora do TNF- α e IFN- γ em pacientes infectados e não infectados pelo DENV.	
Tabela 5 - Teste de Correlação de Pearson entre a expressão dos genes relacionados à metilação e demetilação e a infecção pelo DENV.....	55
Tabela 6 - Condições da Reação em Cadeia da Polimerase Metilação Específica para os genes TNF- α e IFN- γ	55
	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AICDA	- Citidina Desaminase Induzida por Ativação
ALT	- Alanina Aminotransferase
Anti-5mC	- Anticorpo anti 5-metilcitosina
AST	- Aspartato Aminotransferase
REB	- Reparo por Excisão de Bases
CH₃	- Grupo metil
CN	- Controle Negativo
CP	- Controle Positivo
CpG	- Dinucleotídeo formado por uma citosina seguida por guanina
DCSA	- Dengue Com Sinais de Alarme
DENV	- <i>Dengue virus</i>
DG	- Dengue grave
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DNMT	- DNA metiltransferases
DO	- Densidade Óptica
EDTA	- Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
TNF-α	- Fator de necrose tumoral alfa
FD	- Febre do Dengue
FHD	- Febre Hemorrágica do Dengue
GEO	- Gene Expression Omnibus
HBV	- Vírus da Hepatite B
HBx	- Proteína x do virus da Hepatite B
HCV	- Vírus da Hepatite C
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
INF-γ	- Interferon gama
IL-1β	- Interleucina 1 β
IL-6	- Interleucina 6
IL-8	- Interleucina 8
IL-10	- Interleucina 10
MBD4	- Proteína Ligadora do Dominio Metil-CpG
miRNA	- Micro RNA

MBP	- Proteínas Ligadoras Do Domínio Metil
MSP	- Reação em cadeia da Polimerase Metilação-Específica
NI	- Pacientes não infectados pelo <i>Dengue virus</i>
NS	- Proteínas não estruturais do <i>Dengue virus</i>
OMS	- Organização Mundial da Saúde
OPD	- O-fenilenodiamina
pb	- Pares de Bases
PBS	- Tampão Fosfato Salino
PCR	- Reaçõ em cadeia da Polimerase
prM	- Proteína precursora da Membrana
RNA	- Ácido Ribonucleico
SAH	- S-adenosil-homocisteína
SAM	- S-adenosilmetionina
SCD	- Síndrome do Choque da Dengue
TBS	- Tampão Salino Tris
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDG	- Timina DNA Glicosilase
TET	- Desmetilases (<i>Ten-Eleven Translocation</i>)
TLD	- Desmetilação Induzida Pela Lesão
TMD	- Desmetilação Induzida Por Modificação
UPEC	- <i>Escherichia coli Uropatogênica</i>
UTR	- Região não traduzida
5-caC	- 5-carboxilcitosina
5-fC	- 5-formilcitosina
5-hmC	- 5-hidroximetilcitosina
5-mC	- 5-metilcitosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	A DENGUE.....	19
2.1.1	Histórico e epidemiologia	19
2.1.2	Transmissão	22
2.1.3	O Dengue vírus (DENV)	23
2.1.4	Ciclo de multiplicação do DENV	25
2.1.5	Manifestações da dengue	26
2.1.6	Imunopatogênese da dengue	31
2.1.7	Prevenção e tratamento	31
2.2	EPIGENÉTICA.....	32
2.2.1	Modulação epigenética: metilação do DNA	33
2.2.2	Modulação epigenética: desmetilação do DNA	36
2.2.3	Interações epigenéticas entre vírus e hospedeiro	39
3	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVO GERAL.....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	AMOSTRAS.....	43
4.2	OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	43
4.3	TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO PERCENTUAL DE METILAÇÃO GLOBAL EM AMOSTRAS DE DNA (MethELISA).....	44
4.4	ANÁLISE DA METILAÇÃO NOS PROMOTORES DAS CITOCINAS TNF- α E IFN- γ	46
4.4.1	Conversão do DNA com bissulfito de sódio	46
4.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase Metilação- Específica (MSP)	47
4.5	ANÁLISES DOS RESULTADOS.....	48
4.6	META-ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO PROCESSO DE METILAÇÃO E DEMETILAÇÃO DE CITOSINAS EM MICROARRANJOS DE DNA.....	49
5	RESULTADOS	50

5.1	PADRONIZAÇÃO DO MethELISA.....	50
5.2	ANÁLISE DO PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO DE PACIENTES COM DENGUE.....	52
5.3	ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES TNF- α e IFN- γ PELA TÉCNICA DO MSP.....	54
5.4	META-ANÁLISE DE MICROARRANJOS DE DNA DE PACIENTES INFECTADOS PELO DENV.....	55
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	APÊNDICE.....	75
	ANEXO.....	76

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença com grandes impactos na economia e na saúde pública, e estima-se que entre 50 a 100 milhões novas infecções ocorram anualmente em mais de 100 países. Nos últimos 50 anos, a incidência aumentou 30 vezes com o avanço da expansão geográfica para novos países e, na presente década, houve a propagação das áreas urbanas para áreas rurais (WHO, 2012). A doença é atualmente endêmica em 112 países da África, Américas, Mediterrâneo, Sudeste Asiático e Pacífico Oeste (FIGUEIREDO, 2007; WHITEHEAD et al., 2007). Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que 40% da população mundial (2,5 bilhões de pessoas) vivem em áreas de risco para dengue. A dengue é uma arbovirose transmitida ao ser humano através da picada de fêmeas do mosquito do gênero *Aedes* infectadas (principalmente *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*), sendo que os seres humanos figuram como o principal hospedeiro viral (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2009).

O *Dengue virus* (DENV) é um vírus envelopado, possui RNA fita simples senso positivo e é pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. A dengue tem um amplo espectro de apresentações, muitas vezes com evolução clínica e resultados imprevisíveis. As infecções pelo vírus da dengue foram agrupadas em três categorias: assintomática, febre da dengue (FD) e febre hemorrágica da dengue (FHD). A FHD foi classificada em quatro graus de gravidade, com os graus III e IV sendo definidos como síndrome de choque da dengue (SCD) (WHO, 2009). Os indivíduos com FD podem apresentar febre, dor de cabeça, dores oculares, mialgias, prostração, manchas na pele, linfadenopatia e leucopenia. Já a forma mais grave da dengue (FHD) pode causar plaquetopenia, hemoconcentração, presença de sangramento espontâneo, insuficiência circulatória e choque, podendo levar o paciente a óbito (OISHI et al., 2008; RIGAU-PEREZ et al., 1998). O desenvolvimento das formas graves da doença pode ser explicado pela alteração no nível de citocinas que são capazes de aumentar a permeabilidade vascular e causar disfunção endotelial. Dentre as citocinas envolvidas com a imunopatogênese da dengue podem ser destacadas o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o interferon gama (IFN- γ) (SIERRA et al., 2012; SOUNDRAVALLY et al., 2014).

A epigenética é descrita como o estudo de modificações hereditárias na regulação da expressão do gene sem alteração na sequência de bases de DNA. As modificações epigenéticas tais como metilação do DNA e acetilação de histonas constituem um mecanismo especial de regulação da expressão gênica envolvido em muitas situações patológicas. (FACKLER et al., 2004; RANDO, 2006; USHIJIMA, 2005).

Como a metilação do DNA é uma marca epigenética herdável e modificável, a manutenção e a transmissão corretas desses padrões às células filhas são processos essenciais do ciclo celular. Portanto, a identificação dos processos epigenéticos, tais como a metilação ou desmetilação do DNA, está se tornando uma ferramenta importante para a compreensão tanto da expressão gênica normal como em diferentes doenças. O conhecimento dos eventos moleculares que iniciam e mantêm o silenciamento epigenético pode levar ao desenvolvimento de novas abordagens relacionadas à identificação de marcadores diagnósticos e prognósticos para as doenças humanas (BAYLIN; OHM, 2006; POLO; ALMOUZNI, 2005).

Os vírus evoluíram com os seus hospedeiros de tal forma que eles desenvolveram mecanismos para evadir do sistema de defesa do organismo parasitado. Além dos mecanismos mutagênicos, os vírus também desenvolveram mecanismos epigenéticos pelos quais eles podem inativar a resposta imune do hospedeiro a seus antígenos (ADHYA; BASU, 2010). Alguns estudos sugerem que o DENV é capaz de regular a maquinaria epigenética da célula hospedeira (QI et al., 2013; ZHANG et al., 2013). Sendo assim, neste trabalho foi proposta a análise da influência da infecção pelo DENV no perfil global de metilação e na região promotora dos genes TNF- α e IFN- γ dos indivíduos infectados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Atualmente existem inúmeros dados a respeito dos grandes avanços no estudo da dengue. Após a análise de diversas publicações, algumas destas informações foram dispostas neste capítulo.

2.1 A DENGUE

A dengue é uma infecção viral sistêmica, auto-limitada, transmitida entre humanos através da picada de mosquitos fêmeas infectadas do gênero *Aedes*. A rápida expansão global da dengue é um desafio para a saúde pública com um encargo econômico que ainda não foi resolvido pela ausência de vacinas licenciadas, agentes terapêuticos específicos ou estratégias de controle eficientes (SIMMONS et al., 2012).

2.1.1 Histórico e epidemiologia

Os primeiros dados disponíveis sugerindo potenciais casos de febre do dengue são encontrados em uma enciclopédia chinesa escrita entre os anos 265 e 420. Séculos depois, os primeiros surtos de uma doença compatível com a dengue clássica aconteceram no Caribe, em 1635 e 1699, muito antes das epidemias simultâneas relatadas em 1779 e 1780, que ocorreram na Ásia, África e América do Norte. Em 1789, Benjamin Rush relatou o primeiro caso da doença e cunhou o termo “febre quebra ossos”. Desde então, inúmeros surtos de dengue têm sido descritos mundialmente (GUZMAN, 2010; VASILAKIS, 2008). Durante a Segunda Guerra Mundial foram observados grandes estudos da dengue, e relata-se um considerável progresso no controle de doenças infecciosas de todos os tipos, especialmente daquelas transmitidas por vetores (SABIN, 1952).

Nos últimos 50 anos, a incidência da dengue aumentou 30 vezes com o avanço da expansão geográfica para novos países (FIGURA 01). Na presente década, houve a propagação das áreas urbanas para áreas rurais, e estima-se que entre 50 a 100 milhões de novas infecções ocorram anualmente em mais de 100 países, considerados atualmente endêmicos para a doença (WHO, 2012).

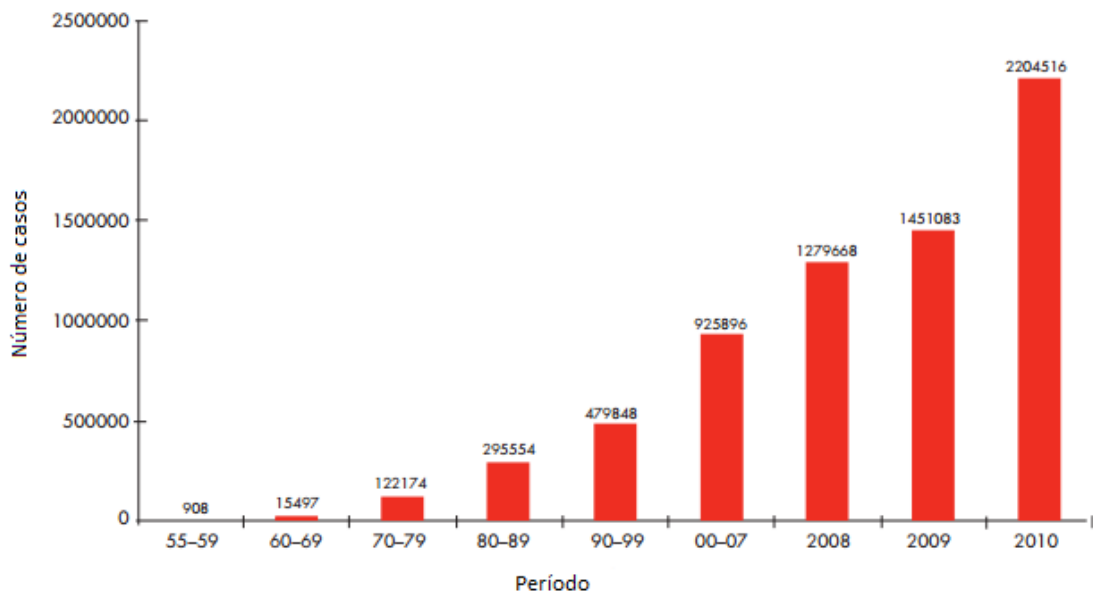


Figura 1 - Média do número de casos de dengue reportados à Organização Mundial de Saúde entre 1955 e 2007 e o número de casos reportados recentemente, de 2008 a 2010.
Fonte: WHO, 2012

A dengue está presente em países tropicais e subtropicais e se comporta de maneira epidêmica quando existem condições apropriadas, tais como a presença de grandes territórios com infestação do mosquito *Aedes* sp. e a introdução e/ou circulação de um ou mais sorotipos do *Dengue virus* (TABACHNICK, 2009).

Atualmente a doença é endêmica em mais de 100 países da África, Américas, Mediterrâneo, Sudeste Asiático e Pacífico Oeste e quase metade da população mundial vive em áreas de risco da dengue, sendo que o Brasil é o país com maiores números de casos da doença no mundo, como pode ser observado na Figura 02 (GUZMAN; HARRIS, 2015; WHO, 2012).

De acordo com o Ministério da Saúde, em 2015 foram registrados 745.957 casos notificados de dengue no Brasil até o mês de abril, ou seja, 367,8 casos a cada 100 mil habitantes. No mesmo período do ano de 2014 foram 223.227 casos. A região Sudeste teve o maior número de casos notificados (489.636 casos; 66,2%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (97.591 casos; 11,5%),

Centro-Oeste (85.340 casos; 12,4%), Sul (46.360 casos; 5,8%) e Norte (27.030 casos; 4,1%). O sorotipo viral mais identificado durante os quatro primeiros meses de 2015 foi o DENV-1, encontrado em 92,7% das amostras analisadas (BRASIL, 2015).

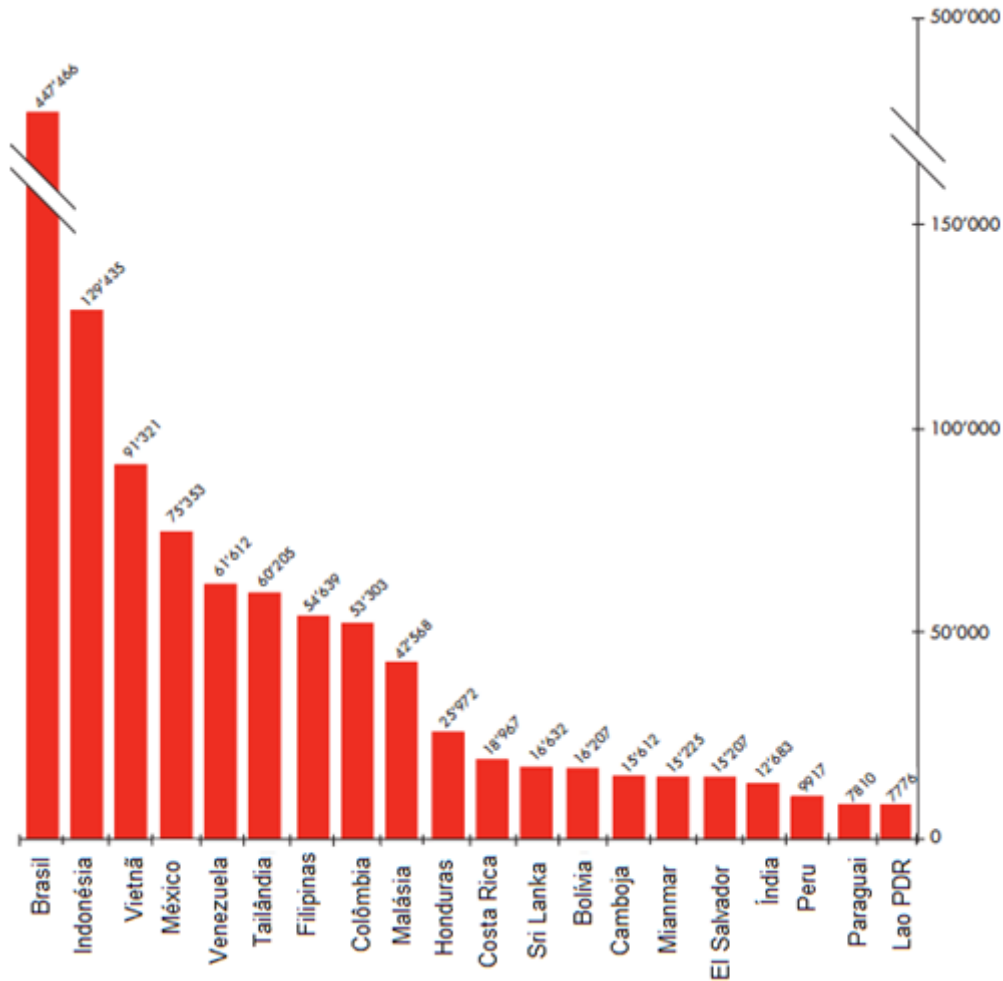


Figura 2 - Média do número de casos de Dengue nos 20 países mais endêmicos, como reportado à OMS, 2004-2012.

Fonte: Adaptado de WHO, 2012.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2012 a dengue posicionou-se como a doença viral transmitida por mosquitos mais importante do mundo. Os surtos exercem um alto impacto nas populações, nos sistemas de saúde e na economia da maioria dos países tropicais. A emergência e a propagação dos sorotipos do *Dengue virus* da Ásia para as Américas, África e o Mediterrâneo Ocidental representam uma ameaça de pandemia global (WHO, 2012).

2.1.2 Transmissão

A fêmea do mosquito *Aedes aegypti* é a vetora primária da dengue. Ela adaptou-se para se acasalar, alimentar, repousar e depositar seus ovos ao redor da habitação humana. O *Aedes aegypti* possui hábitos alimentares diurnos sendo que a maior frequência de picadas ocorre no início da manhã e antes do anoitecer. As fêmeas do mosquito normalmente picam várias pessoas durante cada período de alimentação, favorecendo assim, a transmissão da doença (WHO, 2012). As fêmeas do *A. aegypti* depositam seus ovos em recipientes artificiais de água como pneus, garrafas e vasilhas de plantas. Devido à necessidade de água para a reprodução, o pico da densidade de mosquitos aumenta durante estações mais úmidas, com uma consequência direta no aumento do número de casos de dengue (TUISKUNEN, 2013).



Figura 3 - *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, respectivamente: os principais vetores da dengue. Fonte: Florida Medical Entomology Laboratory, Universidade da Flórida. Disponível em: <http://fme1.ifas.ufl.edu/research/exotic.shtml>. Acesso em: 18 fev 2015.

O mosquito *Aedes albopictus*, um vetor secundário da dengue na Ásia, espalhou-se para as Américas e Europa, devido, principalmente, ao comércio internacional de pneus usados (um habitat de reprodução do mosquito) e de outros bens. O mosquito é capaz de hibernar e tolerar temperaturas abaixo de congelamento, o que facilita sua propagação. Além destas duas espécies bem

estabelecidas, o *Aedes polynesiensis* (na Polinésia Francesa e nas Ilhas Wallis e Fortuna), e o *Aedes scutellaris* (na Nova Guiné) também foram também caracterizados como vetores da doença (WHO, 2012).

2.1.3 O Dengue vírus (DENV)

A dengue é uma arbovirose causada pela infecção pelo *Dengue vírus* (DENV), um vírus pertencente à família *Flaviviridae*, que é composta de vírus envelopados icosaédricos que infectam vertebrados e frequentemente causam infecções sérias em seres humanos. A família *Flaviviridae* é dividida nos gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivírus*. Além do DENV, o gênero *Flavivirus* inclui o vírus *West Nile* e o vírus causador da febre amarela (*Yellow fever virus*) (ZHANG et al., 2003).

Até o presente momento foram descritos quatro diferentes sorotipos do DENV: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Em uma tentativa de esclarecer ou unificar a atual classificação de genótipos de dengue entre sorotipos, são descritas filogenias dos quatro sorotipos utilizando nucleotídeos de toda a região codificadora da proteína do envelope ou do genoma viral inteiro (CLYDE et al., 2006; RICO-HESSE, 2003).

O genoma do DENV é composto de uma única molécula de RNA, fita simples com polaridade positiva (FIGURA 04). Este consiste de aproximadamente 10.700 nucleotídeos e codifica um precursor poliproteico de 3.411 aminoácidos contendo três proteínas estruturais (capsídeo [C], precursor da membrana [prM] e envelope [E]) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5). As proteínas estruturais são componentes da partícula viral madura, enquanto que as proteínas não-estruturais são expressas apenas na célula infectada e não são detectáveis em partículas maduras, estando as mesmas envolvidas no processo de replicação viral e resistência aos efeitos antivirais induzidos pelos interferons. As proteínas estruturais não estão envolvidas na replicação do genoma viral (ALVAREZ et al., 2006; THOMAS et al., 1990).

A região aberta de leitura é flanqueada por duas regiões não traduzidas (5'e 3' UTR) de cerca de 95 a 135 e 114 a 650 nucleotídeos, respectivamente. A

extremidade 5' contém um *cap* tipo I, semelhante ao RNA mensageiro celular, e o RNA viral é traduzido por um *cap* de iniciação dependente da região 5'-UTR. A extremidade 3' não tem uma cauda poli A. Tanto a 5' e 3'UTR são necessários para uma tradução e replicação eficientes do RNA viral (GAMARNIK, 2010).

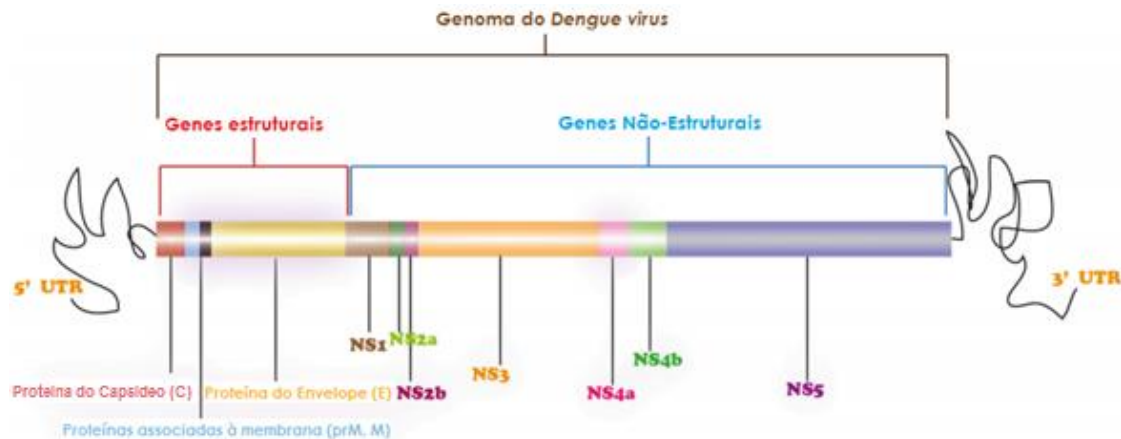


Figura 4 - Genoma do *Dengue virus*.

Fonte: IDREES, ASHFAQ, 2012.

Nota: O genoma do *Dengue virus* codifica 10 proteínas virais, incluindo 3 proteínas estruturais (C, M e E), responsáveis pela estrutura viral e pela adesão à célula hospedeira, e 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NSS) que estão envolvidas na replicação viral e outras funções celulares.

Partículas maduras e infecciosas do DENV apresentam forma geodésica e simetria icosaédrica, e medem cerca de 50 nm de diâmetro. As proteínas estruturais, juntamente com uma bicamada lipídica, envolvem o genoma viral, sendo que, durante o ciclo de replicação do vírus, a proteína do capsídeo se reúne com o RNA viral na face citosólica da membrana do retículo endoplasmático. O capsídeo montado atravessa a membrana do retículo endoplasmático, adquirindo, assim, um envelope que contém a principal glicoproteína do envelope, denominada proteína E, e a proteína precursora de membrana, denominada prM. A partícula passa por uma etapa de secreção em que uma protease cliva a prM para a proteína M, em um compartimento trans-Golgi (MODIS et al., 2003).

A proteína E, que participa da fusão e da ligação ao receptor, é também denominada proteína de fusão viral da classe II. A proteína E do *Dengue virus* apresenta a forma dimérica tanto em solução quanto na superfície da membrana viral. Ela apresenta três domínios, sendo que um deles, o domínio II, apresenta uma região em sua extremidade com uma sequência hidrofóbica que é altamente conservada entre os *Flavivirus* (FIGURA 05) (MODIS et al., 2004).

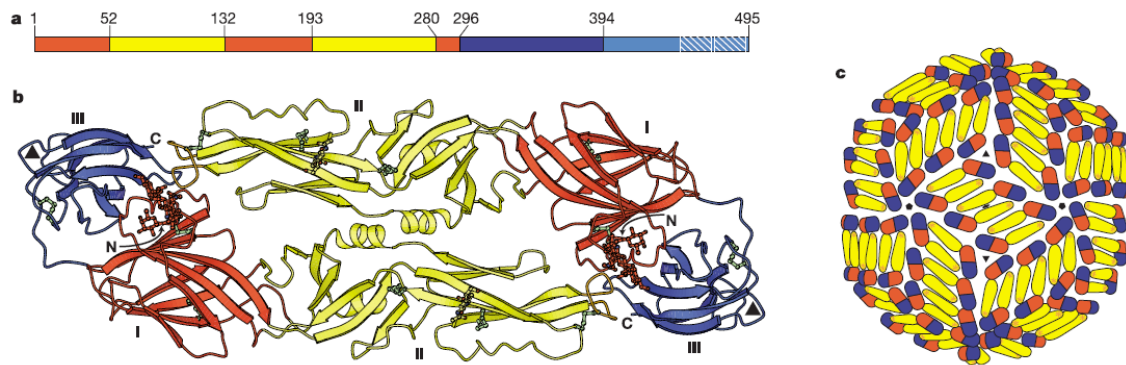


Figura 5 - Estrutura do dímero do *Dengue vírus* na partícula viral madura.

Fonte: MODIS et al., 2004

Nota: **a)** os três domínios do dímero: o domínio I é representado pela cor vermelha, o domínio II pela amarela e o domínio III pela azul. **b)** A conformação do dímero na partícula viral madura. **c)** Representação da superfície viral apresentando a simetria icosaédrica.

2.1.4 Ciclo de multiplicação do DENV

Após a ligação do vírus com o receptor, através da interação com o domínio III da glicoproteína do envelope viral, ocorre a endocitose mediada pelo receptor e redução do pH do endossomo. Essa mudança de pH resulta em uma alteração na conformação da proteína E, o que promove a fusão da membrana viral à membrana do endossomo, com consequente liberação do capsídeo de RNA viral no citoplasma da célula hospedeira (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009).

A tradução do RNA gera uma poliproteína que é processada pela serina protease (NS2B/NS3), codificada pelo vírus, e por proteases codificadas pelo hospedeiro, incluindo sinalase e furina, para produzir as proteínas estruturais e as não-estruturais, sendo que estas iniciam a replicação do genoma viral. O RNA recém-sintetizado é rodeado pela proteína C para formar o capsídeo (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010; RICE, 1985; SAMPATH; PADMANABHAN, 2009).

As proteínas prM e E formam heterodímeros que são orientados para dentro do lúmen do retículo endoplasmático. Em seguida, os heterodímeros prM/E se associam em trímeros, e essa interação oligomérica induz o brotamento da partícula viral. A prM é processada em proteína M madura por uma furina celular, após a secreção pelo compartimento de Golgi, sendo que esta etapa de maturação é

necessária para a produção de uma partícula infecciosa. O peptídeo pr permanece associado à partícula viral até que esta seja liberada por exocitose para infectar novas células (CLYDE et al., 2006; RODENHUIS-ZYBERT, WILSCHUT, SMIT, 2010).

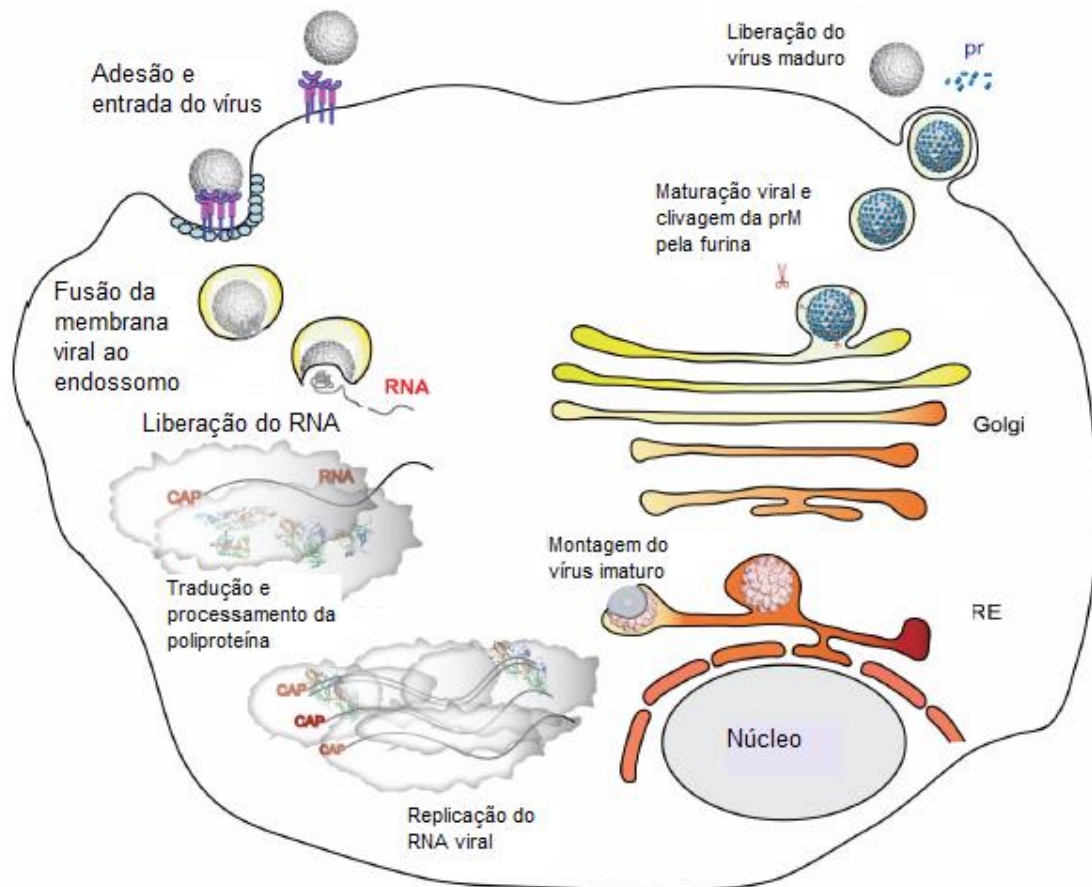


Figura 6 - Ciclo de Replicação do *Dengue vírus*.

Fonte: Adaptado de SAMPATH, PADMANABHAN, 2009

Nota: Após a infecção, a partícula viral se liga ao receptor celular e há endocitose mediada pelo receptor. Ocorre a redução do pH do endossomo, o que promove a fusão da membrana viral à membrana do endossomo e liberação do RNA no citoplasma celular. Em seguida, as proteínas virais são traduzidas e o vírus se replica. A montagem viral ocorre na membrana do retículo endoplasmático (RE). Em seguida, a prM é clivada por uma furina e os vírus maduros são liberados no citoplasma.

2.1.5 Manifestações da dengue

A infecção pelo *DENV* pode ser assintomática ou apresentar diferentes manifestações clínicas, inclusive a morte. Fatores relacionados tanto ao vírus

quanto ao hospedeiro determinam a gravidade da doença. As manifestações clínicas da doença podem caracterizá-la como febre do dengue (FD), febre hemorrágica do dengue (FHD) e síndrome do choque do dengue (SCD). O período de incubação do vírus no hospedeiro humano é de 4 a 7 dias (podendo variar de 3 a 14 dias), sendo que o vírus geralmente não é detectado no sangue após um período de 5 dias depois do aparecimento dos sintomas (RIGAU-PÉREZ et al., 1998; WHITEHEAD et al., 2007; WHO, 2009).

A maioria das infecções, especialmente em crianças abaixo dos 15 anos, são assintomáticas ou minimamente sintomáticas. Estudos populacionais indicam uma relação entre a severidade da doença e as características clínicas da FD com o aumento na idade do paciente e com infecções repetidas (BURKE et al., 1988; KUBERSKI et al., 1977; RIGAU-PÉREZ et al., 1998). Lactentes e crianças jovens normalmente apresentam uma doença febril indiferenciada com uma erupção cutânea maculopapular. Crianças mais velhas e adultos podem apresentar desde uma doença febril indiferenciada ou até a forma grave da doença (RIGAU-PÉREZ et al., 1998).

A dengue é uma doença muito incapacitante, porém apresenta diagnóstico favorável. Tipicamente, a dengue se apresenta com um início súbito de febre acompanhada de dor de cabeça frontal, dor atrás dos olhos, mialgias generalizadas e artralgias, rubor na face, anorexia, dor abdominal e náuseas. O período febril da dengue normalmente persiste por 5 a 7 dias, e pode levar o paciente a se sentir cansado por mais alguns dias (GUZMÁN; KOURÍ, 2001; RIGAU-PÉREZ et al., 1998; WHITEHEAD et al., 2007,).

Acredita-se que, após a inoculação através da picada do mosquito, o vírus replica-se nas células dendríticas locais, com uma infecção subsequente sistêmica de macrófagos e linfócitos, seguida pela entrada do vírus na corrente sanguínea (WHITEHEAD et al., 2007). Um elevado título de viremia (entre 10^5 e 10^6 unidades infecciosas por ml de sangue) ocorre durante o período febril, atingindo outros órgãos do corpo, como por exemplo o fígado (JESSIE et al., 2004).

A presença de erupção cutânea é muito comum nos casos de dengue, com uma incidência em mais de 80% dos casos. A erupção é mais comumente observada no tronco, na parte interior dos braços e coxas e nas superfícies plantares e palmares. Nas infecções sintomáticas pelo DENV podem ser observadas algumas alterações em exames laboratoriais, como leucopenia, trombocitopenia e

elevação de transaminases. Espera-se uma recuperação total dos pacientes com FD, porém alguns casos de dengue sem manifestações de severas já foram fatais (SABIN, 1952; WHITEHEAD et al., 2007;).

Na FHD os pacientes infectados pelo DENV podem apresentar extravasamento de plasma nos espaços intersticiais, trombocitopenia e manifestações hemorrágicas (KURANE, 2007). Tipicamente a FHD é ocasionada em decorrência de infecções secundárias com um DENV de sorotipo diferente da infecção primária (SMITH et al., 2014; WHITEHORN; SIMMONS, 2011;).

O período de incubação da FHD é similar ao da FD. A doença se inicia com febre, mal-estar, vômitos, dor de cabeça, anorexia e tosse. Uma rápida deterioração clínica ocorre após 2 a 5 dias. Após este período, os pacientes apresentam extremidades frias e úmidas, irritabilidade, agitação, dores no estômago, podendo evoluir para pulsação rápida e hipotensão; a crise dura entre 24 e 36 horas (GUBLER, 1998, SMITH et al., 2014)

As manifestações hematológicas observadas na FHD incluem aumento no hematócrito, trombocitopenia, tempo de sangramento prolongado e aumento no tempo de protrombina. A temperatura retorna ao normal quando ocorre extravasamento capilar. A Organização Mundial da Saúde categoriza a FHD em quatro graus, do menos severo (grau 1) ao mais severo (grau 4) (KURANE, 2007; WHO, 2009).

A SCD é definida como uma FHD com sinais de insuficiência circulatória, incluindo a pressão de pulso estreito (<20 mm Hg), hipotensão ou choque, e ocorre quando um volume crítico de plasma é perdido. Dentro da classificação da OMS, os graus 3 e 4 de FHD são definidos como SCD (KURANE, 2007; RIGAU-PÉREZ et al., 1998; WHO, 2009). A viremia normalmente é 10 a 100 vezes maior na FHD e SCD do que na FD (WHITEHEAD et al., 2007).

Os sinais de um choque iminente são intensos: dor abdominal prolongada; vômitos persistentes; agitação ou letargia; e uma súbita mudança de febre à hipotermia com sudorese e prostração. Com um choque prolongado, a hipoperfusão do organismo resulta em comprometimento de órgãos, acidose metabólica e coagulação intravascular disseminada. Isto, por sua vez, leva a uma hemorragia grave causando o decréscimo do hematócrito (RIGAU-PÉREZ et al., 1998; WHO, 2009). Ao contrário da leucopenia normalmente relatada nesta fase da dengue, o

número total de células brancas pode aumentar em pacientes com sangramento severo (MARTINÉZ-TORRES et al., 2008)

O paciente pode se recuperar rapidamente após reposição sanguínea, mas o choque pode reaparecer durante o período de permeabilidade capilar excessiva. A prognose da SCD depende da prevenção ou do reconhecimento antecipado e tratamento do choque (RIGAU-PÉREZ et al., 1998).

Em 2014, o Brasil começou a adotar a nova classificação de casos de dengue segundo Organização Mundial de Saúde. Atualmente os casos são classificados como dengue, dengue com sinais de alarme (DCSA) e dengue grave (DG), descritos na tabela 1:

Tabela 1 - Classificação dos casos de Dengue, de acordo com a OMS (2009).

(Continua)

Tipos de Dengue e suas principais características

Provável Dengue

Pessoa que viva ou tenha viajado nos últimos 14 dias para área onde esteja ocorrendo transmissão de dengue ou tenha a presença de *Aedes sp.*, que apresente febre, usualmente entre 2 e 7 dias, e apresente duas ou mais das seguintes manifestações:

- Náusea, vômitos;
- Exantema;
- Mialgias, artralgia;
- Cefaleia, dor retroorbital;
- Petéquias ou prova do laço positiva;
- Leucopenia.

Dengue com Sinais de Alarme

É todo caso de dengue que, no período de fervescência da febre, apresenta um ou mais dos seguintes sinais de alarme:

- Dor abdominal intensa e contínua, ou dor à palpação do abdômen;
- Vômitos persistentes;
- Acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico);
- Sangramento de mucosas;
- Letargia ou irritabilidade;
- Hipotensão postural (lipotímia);
- Hepatomegalia maior do que 2 cm;
- Aumento progressivo do hematócrito

Tabela 1 - Classificação dos casos de Dengue, de acordo com a OMS (2009).

(Conclusão)

Tipos de Dengue e suas principais características

Dengue Grave

É todo caso de dengue que apresenta um ou mais dos seguintes resultados:

- Choque
 - Extremidades frias;
 - Pulso débil ou indetectável, pressão diferencial convergente ≤ 20 mm Hg;
 - Hipotensão arterial;
 - Acúmulo de líquidos com insuficiência respiratória;
 - Sangramento grave, segundo a avaliação do médico;
 - Comprometimento grave de órgãos, tais como: fígado (AST ou ALT >1000), sistema nervoso central (alteração da consciência) e coração (miocardite).
-

Fonte: WHO, 2009

2.1.6 Imunopatogênese da dengue

Apesar dos grandes avanços nos últimos anos para o entendimento da biologia do DENV, ainda não existe um consenso sobre o desenvolvimento das formas graves da doença, parcialmente em decorrência da falta de um modelo animal que recrie com precisão as consequências da infecção viral observada em humanos (SIMMONS et al., 2012). Algumas das hipóteses postuladas sobre a imunopatogênese da dengue incluem a teoria dos Anticorpos Potencializadores da Infecção e a teoria da Reação Cruzada de Células T de Memória.

A teoria dos Anticorpos Potencializadores da Infecção afirma que em uma infecção primária pelo DENV, além dos anticorpos neutralizantes também são produzidos anticorpos não neutralizantes. Em uma infecção secundária por um sorotipo de DENV diferente da primária, os anticorpos não neutralizantes se ligam ao vírus, formando então o complexo vírus-anticorpo. Este complexo consegue se ligar às células que possuem o receptor para imunoglobulina do tipo FC γ RII (monócitos e macrófagos), por meio da porção Fc das imunoglobulinas, aumentando então a adsorção viral nessas células. Em decorrência deste fato, ocorreria um

aumento da viremia e uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias (HALSTEAD et al., 1970; BOONNAK et al., 2011).

As células T de memória de reatividade cruzada também podem contribuir para a imunopatologia da dengue por alterarem o perfil das citocinas durante uma infecção secundária. Esta teoria postula que tais células são menos eficientes na eliminação de um vírus de sorotipo diferente da infecção primária. Assim, elas não conseguem conter a replicação viral e produzem excesso de citocinas pró-inflamatórias, favorecendo o desenvolvimento das formas mais graves da doença (DONG et al., 2007; MALAVIGE et al., 2012; MONGKOLSAPAYA et al., 2006). Portanto, uma das consequências da infecção secundária pelo DENV e a ativação de células T com reatividade cruzada é a alteração no nível sérico tanto de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon gama (INF- γ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 8 (IL-8) e a interleucina 1 β (IL-1 β), quanto de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 10 (IL-10) (STEPHENSON, 2005).

Citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α e o IFN- γ encontram-se particularmente elevadas na dengue grave e este fato tem sido associado com a severidade da doença (SOUNDRAVALLY et al., 2014). De acordo com Anderson e colaboradores (1997), o fator de necrose tumoral alfa é a principal citocina ativadora de células endoteliais envolvida na patogênese da dengue e pode estimular a secreção de IL-1 β e IL-6. Além de afetar as células epiteliais, o TNF- α também participa de outras manifestações da FHD/SCD como trombocitopenia, hemorragia e extravasamento do fluido do compartimento vascular, progredindo para o choque hipovolêmico (TRACEY et al., 1986). De acordo com Kittigul e colaboradores (2000) os níveis elevados de TNF- α nos pacientes com FD e com FHD são um indicativo de que a produção de TNF- α está ativada durante a infecção pelo DENV, e de que a citocina está diretamente relacionada com os mecanismos imunopatológicos da FHD/SCD.

2.1.7 Prevenção e tratamento

Na ausência de uma vacina efetiva e de um tratamento antiviral para a dengue, a única estratégia para prevenir a doença é através do controle dos principais vetores, por meio de ações como a redução dos criadouros artificiais das larvas do mosquito, redução da quantidade de mosquitos adultos e evitando o contato entre humanos e mosquitos (EISEN et al., 2009; ROHANI et al., 2011).

O método ideal para o controle da infestação é através da eliminação dos locais onde os ovos poderiam ser depositados. Como as larvas são aquáticas, é muito mais fácil controlar a população de mosquitos no estágio larval do que no adulto. As políticas de saúde pública tem utilizado vários métodos de controle do mosquito, principalmente pelo uso de inseticidas como organoclorados e organofosforados. No entanto, esta abordagem ainda não tem sido muito bem-sucedida devido a fatores humanos, ambientais, econômicos, técnicos e operacionais (GHOSH et al., 2012).

Nos últimos anos, o uso de muitos inseticidas em operações de controle do mosquito tem sido limitado devido ao alto custo de inseticidas sintéticos, a preocupação com a sustentabilidade ambiental, sua natureza não biodegradável, os efeitos nocivos à saúde humana e o aumento de taxas de resistência (AHBIRAMI et al., 2014; GHOSH et al., 2012).

Como a dengue tem um amplo espectro de apresentações, muitas vezes apresenta evolução clínica e resultados imprevisíveis. A reidratação intravenosa é a terapia de escolha, sendo que esta intervenção pode reduzir a letalidade para menos de 1%. O grupo em progressão da doença não-grave para a grave é difícil de ser definido, mas esta é uma preocupação importante, uma vez que o tratamento adequado pode prevenir o desenvolvimento de condições clínicas mais graves nestes pacientes (WHO, 2009).

2.2 EPIGENÉTICA

Após grandes avanços na área da genética, entre eles o sequenciamento completo do genoma humano, as pesquisas científicas focaram-se no estudo da epigenética (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007). As modificações epigenéticas são caracterizadas pela alteração na estrutura da cromatina que não

afetam a sequência dos nucleotídeos. Estas alterações são herdáveis durante a divisão celular e podem ser reversíveis (BIRD, 2002; FEINBERG; TYCKO, 2004; MOMPARDLER, 2003).

As alterações epigenéticas são descritas como um conjunto de processos moleculares que podem ativar, inativar ou reduzir a atividade gênica, sendo que as alterações epigenéticas mais estudadas atualmente são a metilação de citosinas no DNA, a remodelação da estrutura da cromatina (em particular a acetilação ou metilação das histonas) e a regulação da expressão gênica mediada por RNA's não codificantes (BERGER, 2007; FEINBERG; TYCKO, 2004).

2.2.1 Modulação epigenética: metilação do DNA

Uma das modificações epigenéticas mais estudadas atualmente é a metilação do DNA (FIGURA 07). A metilação do DNA é um processo molecularmente descrito como a adição do grupamento metil (CH_3) no carbono 5' de citosinas, formando, desta maneira, a 5'-metilcitosina (5-mC). O principal radical metil envolvido no processo de metilação do DNA é proveniente de um doador universal denominado de S-adenosilmetionina (SAM) e a reação é catalisada por uma DNA metiltransferase (DNMT) (SZYF, 2014).

A transcrição gênica pode ser fortemente inibida pela adição de radical metil nas citosinas, já que a presença deste radical em uma citosina que precede a uma guanina pode inibir a ligação de fatores de transcrição a essas regiões. As proteínas ligadoras do domínio metil (MBP), ligam-se a dinucleotídeos CpG localizados nas regiões promotoras e impedem o acesso dos fatores de transcrição aos seus sítios e conseqüentemente na diminuição dos níveis de transcrição gênica (ATTWOOD et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2010).

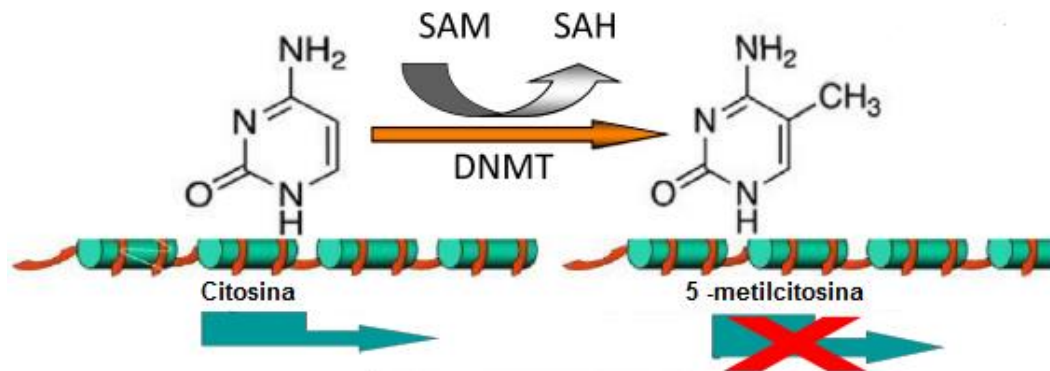


Figura 7 - Reação de metilação do DNA.

Fonte: Adaptado de SZYF, 2014.

Nota: As citosinas são metiladas por uma reação enzimática catalisada por uma DNA-metiltransferase (DNMT), que transfere o grupo metil do doador S-adenosilmetionina (SAM). A SAM é então convertida a S-adenosil-homocisteína (SAH). A metilação de regiões promotoras dos genes pode silenciar a transcrição (indicada pelas setas azuis).

Os doadores de radical metil são obtidos pela dieta e são principalmente a metionina, o folato, a colina e a vitamina B12 (SZYF, 2007). Em vertebrados, a metilação de DNA ocorre quase que exclusivamente em citosinas (C) seguidas de guaninas (G), no chamado dinucleotídeo CpG, e a maioria dos CpGs do genoma estão metilados (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007; BIRD, 2002).

Os dinucleotídeos CpG aparecem esparsos pelos genomas eucariotos ou agrupados em regiões definidas como ilhas CpG. Essas ilhas são frequentes em regiões promotoras de certos genes, incluindo genes de expressão constitutiva. As ilhas CpG são caracterizadas como regiões do DNA com mais de 200 pares de bases, contendo aproximadamente 50% de bases C e G e com uma presença esperada de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG (MORGAN et al., 2004).

A regulação epigenética permite uma modulação dinâmica da expressão gênica por depositar marcas estáveis porém reversíveis no DNA e nas proteínas associadas a ele, e garante uma transmissão fiel dos padrões de expressão genética de cada célula filha após a divisão celular (memória epigenética) (NILLER et al., 2013). A regulação epigenética inclui as DNA metiltransferases (DNMTs), responsáveis pela transferência do agrupamento metil de seu doador universal (SAM) para a citosina. Existem quatro membros da família de DNMTs, sendo estas as DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. A DNMT3L, diferente das outras DNMTs não possui nenhuma atividade enzimática inerente (JIM; ROBERTSON, 2013; ROBERTSON, 2005).

Atualmente são descritos dois diferentes processos de metilação dentro da célula: a metilação *de novo*, que ocorre quando citosinas anteriormente não metiladas tornam-se metiladas (DOERFLER et al., 1997); e a metilação de manutenção, que é responsável pela cópia dos padrões de metilação do DNA durante a divisão celular, tendo preferência por DNA hemimetilado. Assim, quando uma nova sequência CpG é gerada pela replicação do DNA, um sítio hemimetilado é formado se o CpG da fita parental estiver metilado, servindo como substrato para a DNMT (NILLER, 2013; RAZIN; RIGGS 1980).

Dessa forma, a metilação *de novo* está relacionada com o estabelecimento de padrões de metilação de DNA. As DNMTs *de novo* (DNMT3a e DNMT3b em humanos) atuam preferencialmente em fitas completamente desmetiladas (NILLER, 2013; OKANO et al., 1999). Já a DNMT1 é a principal ativadora enzimática responsável pela metilação de manutenção do DNA em humanos. Após a replicação do DNA, a fita recém-sintetizada está desmetilada. Assim, rapidamente a DNMT1 verifica o DNA e deposita o grupamento metil na nova fita, em oposição aos grupos metil presentes na fita antiga, restaurando o padrão de metilação nas células-filhas (ISSA, 2004; JIM; ROBERTSON, 2013; NILLER, 2013). Os processos de metilação *de novo* e de manutenção estão descritos na Figura 08.

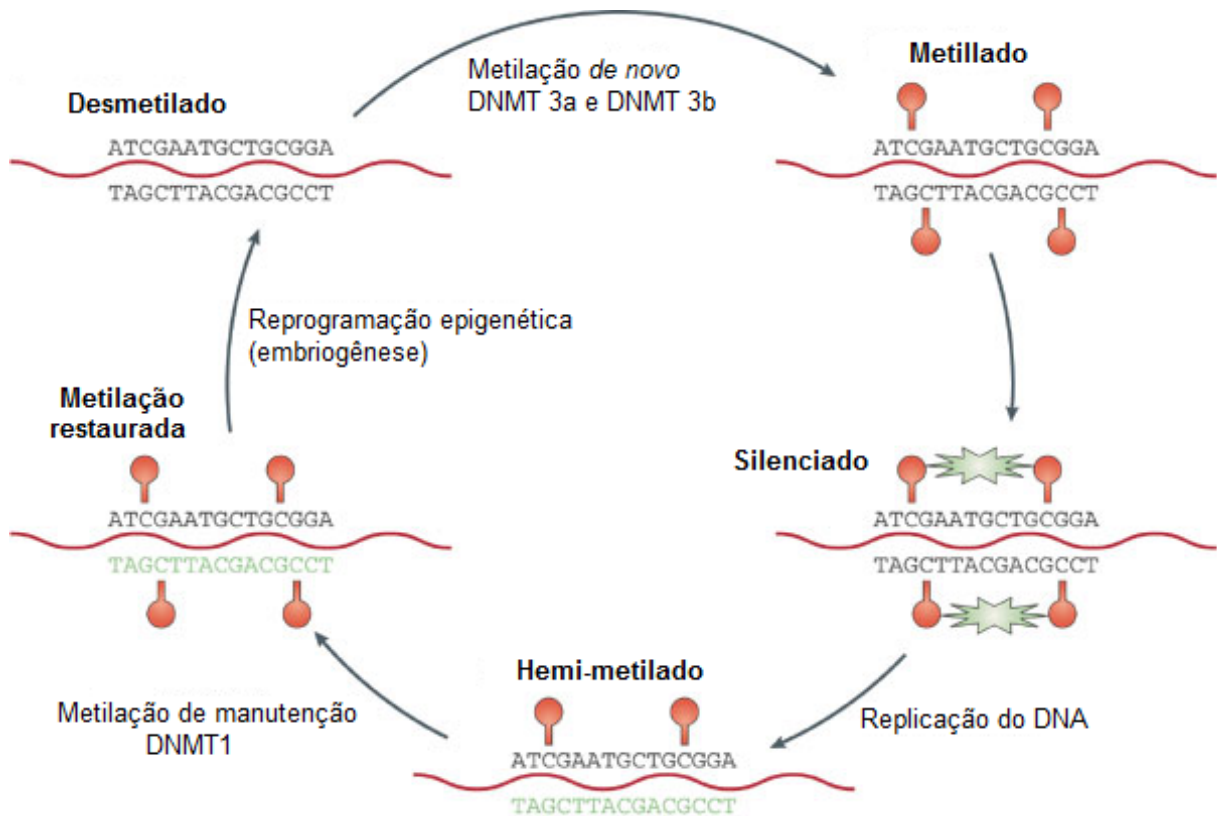


Figura 8 - Metilação *de novo* e de manutenção do DNA.

Fonte: ISSA, 2004.

Nota: Durante a embriogênese, o DNA é, em grande parte, desprovido de metilação (canto superior esquerdo). Inicia-se, então, a metilação *de novo* (círculos vermelhos), mediada pela DNMT3a e DNMT3b; a ligação de proteínas ligadoras do radical metil desencadeiam uma cascata de silenciamento. Após a replicação, o DNA recém-sintetizado (em verde) é desmetilado. No entanto, rapidamente a DNMT1 rastreia o DNA não metilado e deposita o grupo metil na nova fita, do lado oposto ao metil da fita antiga. Isso resulta na reprodução fiel dos padrões de metilação.

2.2.2 Modulação epigenética: desmetilação do DNA

A metilação da citosina é um processo reversível, sendo oposta pelas vias de desmetilação. A desmetilação é sujeita a regulação celular, aumentando a probabilidade de que vários tipos de efetores estão envolvidos em diferentes momentos do processo (FRANCHINI et al., 2012).

A remoção do agrupamento metil pode ocorrer por mecanismos ativos ou passivos. Na demetilação ativa ocorre uma perda da metilação por via enzimática na ausência de replicação do DNA. O grau de desmetilação ativa é variável, podendo ser global (isto é, em todo o genoma) ou gene-específica, possivelmente até mesmo

em apenas uma única citosina (FRANCHINI et al., 2012). Existem diversos fatores envolvidos na desmetilação ativa como a Timina DNA Glicosilase (TDG), a Proteína Ligadora do Dominio Metil-CpG (MBD4), a Citidina Desaminase Induzida por Ativação (AICDA), as desmetilases TET (*ten-eleven translocation*) e a DNMT1, que em condições específicas pode atuar na desmetilação de citosinas. Já a demetilação passiva pode ocorrer quando a metilação de manutenção é suprimida no decorrer da replicação do DNA ou quando a metiltransferase é impedida de interagir com seu substrato durante a divisão celular (HUANG; RAO, 2012; NILLER et al., 2013; RAZIN; RIGGS, 1980).

As proteínas que interagem diretamente na desmetilação podem ser divididas naquelas que são diretamente mutagênicas [desmetilação induzida pela lesão (TLD)] e aquelas que são não mutagênicas ou indiretamente mutagênicas [desmetilação induzida por modificação (TMD)] (FIGURA 09).

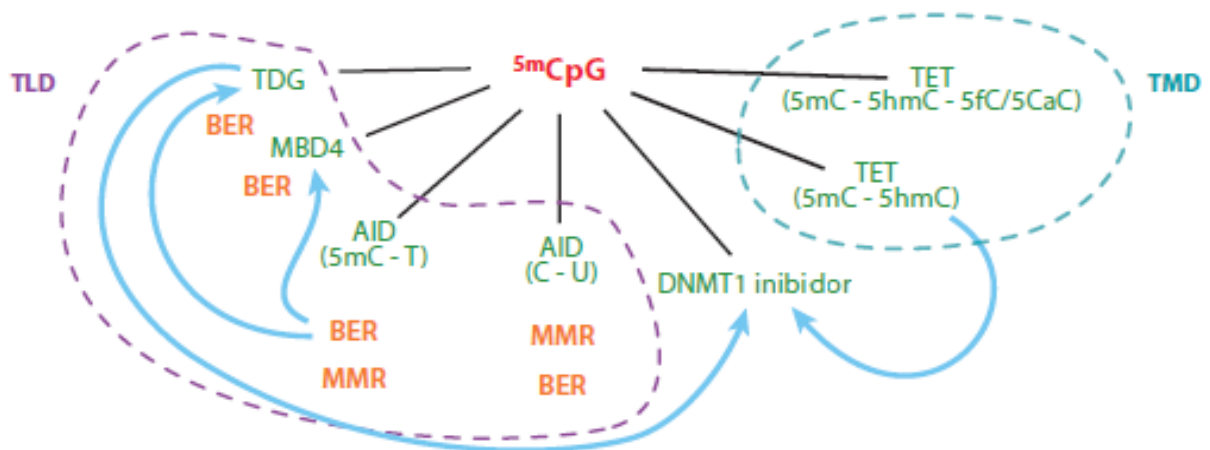


Figura 9 - Maquinaria da desmetilação ativa do DNA.

Fonte: FRANCHINI et al., 2012.

Nota: Proteínas (verde) e vias (laranja) que agem próximas ou na 5mCpG. Algumas proteínas são classificadas como TDL (desmetilação induzida pela lesão), e outras como TDM (desmetilação induzida por modificação). As proteínas TDL incluem TDG, MBD4 e AID, enquanto as TDM incluem as proteínas da família TET.

O primeiro grupo (TDL) inclui as proteínas que são capazes de induzir desmetilação no DNA mediante a introdução de uma lesão na 5mC ou próximo a ela; o grupo TDL inclui a TDG e a MBD4, que geram um sítio abásico, bem como as desaminases de DNA, como a AICDA, que produzem uma incompatibilidade T: G ou U: G. Estas vias requerem uma ativação eficiente e direta da máquina de reparo de DNA, através do reparo por excisão de bases (REB) ou da correção de erros (MMR).

Já a segunda categoria (TMD), da qual fazem parte as enzimas da família TET, envolve proteínas capazes de modificar diretamente a 5mC (FRANCHINI et al., 2012).

A família de TET desoxigenases (TET1, TET2 e TET 3) converte a 5-metilcitosina (5mC) em 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fmC) e 5-carboxilcitosina (5caC). Após a geração desta base "anormal", ela é retirada através das vias de reparo do DNA por excisão de base, exercido pela TDG (FRANCHINI et al., 2012; GOUVEIA, 2007; HUANG; RAO, 2012; NILLER et al., 2013). A TDG é uma enzima que, além de remover a 5caC, elimina as bases timina e uracila pareadas erroneamente com a guanina, através de hidrólise da sua ligação N-glicosídica. Estes nucleotídeos com erros de pareamento geralmente ocorrem pela desaminação hidrolítica da 5-metilcitosina, que forma timina (WATERS; SWANN, 1998) (FIGURA 10).

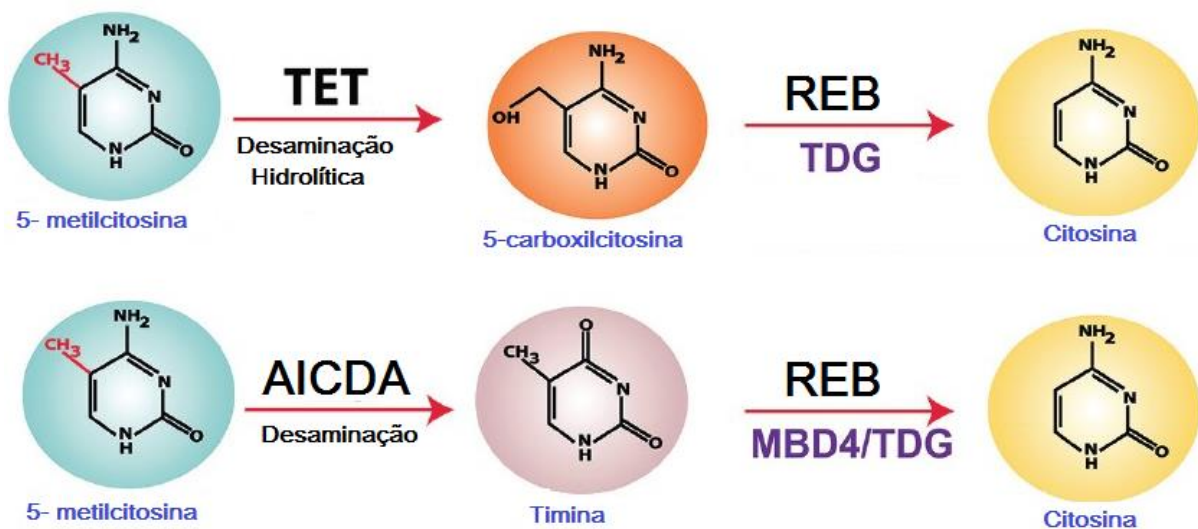


Figura 10 - Exemplos de desmetilação ativa do DNA.

Fonte: Adaptado de KUMAR *et al.*, 2014.

Nota: A família de enzimas TET desoxigenases converte a 5mC em 5caC, que pode ser removida por Reparo por Excisão de Bases (REB) pela TDG. A 5mC pode ser convertida em timina através do processo de desaminação catalisado pela AICDA. Em seguida, a timina é removida por REB pela TDG ou MBD4.

2.2.3 Interações epigenéticas entre vírus e hospedeiro

Os vírus co-evoluíram com seus hospedeiros, o que lhes deu a capacidade de ajustar e explorar o sistema do organismo parasitado para conseguirem se propagar. Os vírus desenvolveram inúmeras estratégias para evadirem da resposta imune do

hospedeiro, entre elas, a regulação epigenética de determinados genes do seu sistema imunológico (ADHYA; BASU, 2010). O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), por exemplo, foi o primeiro patógeno humano associado com a introdução de alterações epigenéticas no hospedeiro (MIKOVITS et al, 1998; NILLER et al., 2013). Mikóvits e colaboradores (1998), observaram que células TCD4 infectadas *in vitro* pelo HIV, apresentaram aumento na expressão da DNA metiltransferase 1, além da elevação do nível de metilação da região promotora do gene do IFN- γ .

Niller e colaboradores (2013) demonstram em seu trabalho que muitos micro-organismos são capazes de desregular os mecanismos epigenéticos da célula hospedeira, desencadeando, assim, mudanças patológicas no hospedeiro. Além dos vírus, uma grande variedade de bactérias como *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila*, *Porphyromonas gingivalis*, *Shigella flexneri*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Campylobacter rectus*, *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC) e *Helicobacter pylori* já foram descritas como capazes de interferir na maquinaria epigenética da célula hospedeira (NILLER et al., 2013).

Atualmente existem inúmeros estudos que relacionam epigenética e câncer. As principais classes de agentes causadores de câncer, incluindo bactérias, como a *Helicobacter pylori*, produtos químicos cancerígenos, hormônios, metais, vírus e radiação, suscitam alterações epigenéticas. Em relação aos vírus tumorais humanos, estudos iniciais focaram principalmente para as interações das oncoproteínas virais com proteínas envolvidas no controle da proliferação celular e da apoptose (NILLER, 2013). Estudos recentes demonstraram que as oncoproteínas virais, além das suas interações bem caracterizados com as vias de sinalização celular, podem afetar os sistemas de regulação epigenética de células infectadas e alterar (geralmente silenciar) a expressão de genes celulares e conjuntos de genes (MINÁROVITS, 2009).

Retrovírus e vários vírus de DNA são capazes de integrar o seu genoma viral ao genoma do hospedeiro. Uma vez no interior do genoma do hospedeiro, a expressão do gene viral pode ser regulada, já que o hospedeiro não consegue diferenciar o que é próprio do que é não-próprio. Os vírus de DNA utilizam não apenas os fatores de transcrição do hospedeiro, mas também reguladores epigenéticos. Dessa forma, através do controle epigenético da expressão gênica,

tais vírus são capazes de silenciar a resposta imune do hospedeiro (ADHYA; BASU, 2010).

O vírus da hepatite B (HBV), causador de hepatocarcinoma celular, é um exemplo de vírus que interage com a epigenética do hospedeiro. A proteína X do vírus (HBx), pode regular epigeneticamente a inativação da proteína supressora de tumor Rb, através da diminuição da ação da proteína p16INK4a, envolvida com a senescência celular. Essa repressão é uma das principais causas de câncer e de evasão imune do HBV (KIM et al., 2010). O Vírus da Hepatite C (HCV) também induz alterações epigenéticas do hospedeiro. O HCV consegue reprimir a expressão da E-Caderina (uma das principais moléculas de adesão celular, sendo considerada uma potente supressora tumoral) ao aumentar a expressão de DNMT1 e DNMT3b, o que leva à hipermetilação e inativação do promotor da E-Caderina (ARORA *et al.*, 2008).

QI e colaboradores apresentam dados que sugerem que o DENV também influencia a epigenética do hospedeiro. Os autores afirmam que após a infecção pelo DENV ocorre uma secreção excessiva de citocinas e mediadores inflamatórios devido, em parte, à atividade de microRNAs (miRNAs) que se ligam aos RNA's mensageiros correspondentes e assim regulam a resposta inflamatória. miRNAs específicos são capazes de afetar a expressão de certos reguladores epigenéticos, como DNMTs e histonas desacetilases, o que afetaria a expressão gênica (QI et al., 2013).

Assim, tendo em vista a variedade de alterações observadas em pacientes infectados com DENV, tais como secreção de citocinas e carga viral, é possível que, as modificações epigenéticas possam ter grande influência sobre o fenótipo do paciente e o desfecho clínico observado. As evidências recentes sugerem que o DENV e outros vírus influenciam os mecanismos epigenéticos, porém ainda são necessários muitos estudos para determinar a influência do DENV na maquinaria epigenética do hospedeiro. Sendo assim, este trabalho visa analisar o perfil global de metilação no DNA de pacientes infectados com DENV e não infectados pelo vírus, através de um teste imunoenzimático que quantifica o percentual relativo de metilação global em amostras de DNA.

3 OBJETIVOS

Serão apresentados o objetivo principal e os objetivos específicos deste trabalho.

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil global de metilação do DNA e do promotor do fator de necrose tumoral e interferon gama em pacientes infectados pelo *Dengue virus*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o percentual relativo de metilação global em amostras de DNA obtidas de pacientes com dengue;
- b) Verificar o padrão de metilação em regiões do promotor dos genes TNF- α e IFN- γ em amostras de DNA obtidas de pacientes com dengue.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção será descrita a metodologia empregada no desenvolvimento da pesquisa.

4.1 AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas nas cidades de Divinópolis e Alfenas, Minas Gerais. A coleta do sangue foi realizada após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelos participantes ou responsáveis. Após o consentimento do paciente ou responsável, 5 mL de sangue venoso foram coletados em tubos com EDTA para extração do DNA das células sanguíneas e 3 mL coletados em tubos com ativador de coágulo, para obtenção do soro.

As amostras que apresentavam sorologia positiva para dengue ou foram positivas na detecção do genoma do DENV por biologia molecular foram consideradas como amostras derivadas de pacientes infectadas pelo DENV. A caracterização sorológica das amostras foi feita através do teste imunocromatográfico, utilizando Kit Panbio® Dengue Duo Cassette (ALERE, Austrália) conforme instruções do fabricante.

O processo de obtenção das amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São João del Rei (012/2010) e da Universidade Federal de Alfenas (08410912.90000.5142) (ANEXO A).

4.2 OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico dos pacientes foi extraído do sangue total utilizando o Kit Wizard Genomic DNA Purification® (PROMEGA, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria

através do aparelho NanoDrop 2000/2000c (THERMO SCIENTIFIC, EUA), em um comprimento de onda de 260 nanômetros (nm). Neste estudo foram somente utilizadas as amostras consideradas puras, avaliadas de acordo com as informações obtidas através do nanoespectrofotômetro, ou seja, foram utilizadas somente as amostras que apresentavam uma boa relação 260/280 (acima ou igual a 1,80) e uma boa relação 260/230 (acima de 2,00).

4.3. TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO PERCENTUAL DE METILAÇÃO GLOBAL EM AMOSTRAS DE DNA (MethELISA)

As amostras de DNA utilizadas no MethELISA foram obtidas de pacientes que apresentavam a forma assintomática da dengue (n= 19), ou apresentavam a forma sintomática (n= 19), além de 25 pacientes não infectados pelo DENV.

A técnica que quantifica o perfil global de metilação em amostras de DNA descrita neste trabalho foi baseada no ensaio desenvolvido por Kremer e colaboradores (2012), entretanto, foram realizadas algumas modificações. Para a padronização do MethELISA foram testados três tipos de tampão para favorecer a adsorção do DNA na placa: Tampão Salina Tris (TBS: Tris 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,5); Tampão Fosfato Salino (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄.2H₂O 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH7,4); e Tampão Carbonato/Bicarbonato (0,05M; pH 9,6). Para a escolha do melhor tampão de adsorção foi calculada a relação entre a média do controle positivo e o cut-off das densidades ópticas obtidas em cada tampão.

Também foram testadas três diferentes diluições de anticorpo primário anti-5 metilcitosina (anti-5 mC; ABCAN, EUA), sendo elas: 1/500, 1/1000 e 1/2000.

Em cada ensaio para avaliação do perfil global de metilação no DNA, foram utilizados controles positivos (DNA metilado) e negativos (DNA não metilado). Para o controle positivo de metilação foi utilizada uma amostra de genoma completo de DNA humano artificialmente metilado através do uso da enzima CpG Methyltransferase M.SssI (New England BioLabs®, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Como controle negativo foi utilizado um DNA resultante de amplificação por PCR do gene SMAD-9, sendo que o fragmento possui 139 pb e apresenta seis

dinucleotídeos CpG, de acordo com a ferramenta MethPrimer (LI; DAHIYA, 2002). A Figura 11 é um esquema do fragmento amplificado, delimitado pelos oligonucleotídeos F1 (5'ATTTTGGGAAGTTAAGGTAGGTGGAT 3') e R1 (5'CAAATAACTAAAACACTACAAACACCC 3'), em que podem ser visualizados os dinucleotídeos CpG (destacados em amarelo).

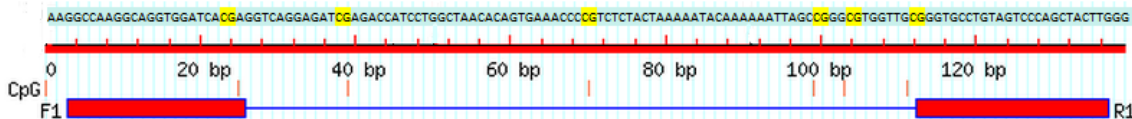


Figura 11 - Representação do fragmento de 139 pb do gene SMAD-9 utilizado como controle negativo do MethElisa.

Fonte: Adaptado dos resultados obtidos a partir da ferramenta MethPrimer (LI; DAHIYA, 2002).

Nota: A região foi selecionada por apresentar seis dinucleotídeos CpGs, de acordo com a ferramenta MethPrimer (destacados em amarelo).

As amostras de DNA testadas foram diluídas no tampão de adsorção em uma concentração de 0,5 ng/μl em um volume final de 100,0 μL, totalizando 50 ng por poço. Antes da adsorção na placa, as amostras foram aquecidas a 95°C por 10 minutos em um termociclador para ocorrer a desnaturação das fitas de DNA e, em seguida, mantidas em gelo por mais 5 minutos. Após esta etapa, foram adicionados 100,0 μl do DNA diluído no tampão de adsorção em cada poço de uma placa Nunc MaxiSorp® (eBIOSCIENCE, EUA) de 96 poços. A placa foi então incubada a 4° C durante 16-24 horas. Após este tempo, a placa foi lavada três vezes com 200 μl de PBS/Tween-0,05% em cada poço. Em seguida, foram adicionados, 200,0 μl de leite em pó desnatado diluído a 5% em PBS/Tween-0,05% em cada poço, e a placa foi incubada por duas horas a 37° C para ocorrer o bloqueio de sítios inespecíficos.

A placa foi então lavada novamente três vezes com 200,0 μl de PBS/Tween-0,05% em cada poço e seguiu-se com a adição do anticorpo primário anti-5mC na concentração desejada. A placa ficou incubada por mais 01 hora a 37°C. Lavou-se novamente a placa três vezes com 200,0 μl de PBS/Tween-0,05% em cada poço e adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG murino conjugado com a peroxidase (SIGMA-ALDRICH, EUA) diluído 1:2000, e incubou-se a placa a 37° C por 1 hora. Após uma nova lavagem da placa (três vezes com 200 μl de PBS/Tween-0,05% em cada poço), foi adicionado o substrato O-fenilenodiamina (OPD) diluído em Tampão Citrato (Ácido cítrico 0,1 M, Fosfato de Sódio 0,1 M; pH 4,5). A reação foi parada

com uma solução de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4 : 0,05 M) e a leitura da densidade óptica das amostras foi realizada a 492 nm.

Para cálculo da porcentagem global de metilação do DNA, foi necessária a construção de uma curva padrão relativa onde cada ponto da curva consiste na leitura de densidade óptica de uma amostra com diferentes porcentagens de metilação. Para tal, foram utilizados os controles positivo e negativo de metilação (DNA metilado artificialmente e o produto de PCR, respectivamente) em diferentes proporções, como pode ser observado na tabela a seguir:

Tabela 2 - Construção da curva de porcentagem de metilação. CP: Controle Positivo, CN: Controle Negativo

% DE METILAÇÃO	VOLUME DE DNA POR POÇO (50ng)
100	100 μl de CP
90	90 μl de CP e 10 μl de CN
75	75 μl de CP e 25 μl de CN
50	50 μl de CP e 50 μl de CN
25	25 μl de CP e 75 μl de CN
10	10 μl de CP e 90 μl de CN
0	100 μl de CN

Fonte: Do autor

4.4 ANÁLISE DA METILAÇÃO NOS PROMOTORES DAS CITOCINAS TNF- α e IFN- γ .

Também foi realizada a análise do padrão do metilação de duas citocinas envolvidas na imunopatogênese da dengue, o TNF- α e o IFN- γ , através da Reação em Cadeia da Polimerase Metilação-Específica (MSP).

4.4.1 Conversão de DNA com bissulfito de sódio

Para a realização do MSP é necessário que o DNA seja primeiramente tratado com bissulfito de sódio (Frommer *et al.*, 1992). Este protocolo está baseado na desnaturação do DNA pelo hidróxido de sódio (NaOH) e incubação deste com bissulfito de sódio e hidroquinona. Assim, as citosinas não metiladas são convertidas

em uracilas, enquanto que as citosinas metiladas permanecem como citosinas (FIGURA 12). Neste estudo foi utilizado o kit EZ DNA Methylation-Gold™ (ZYMO Research Corp., USA) para a conversão do DNA com bissulfito de sódio, seguindo as orientações do fabricante.

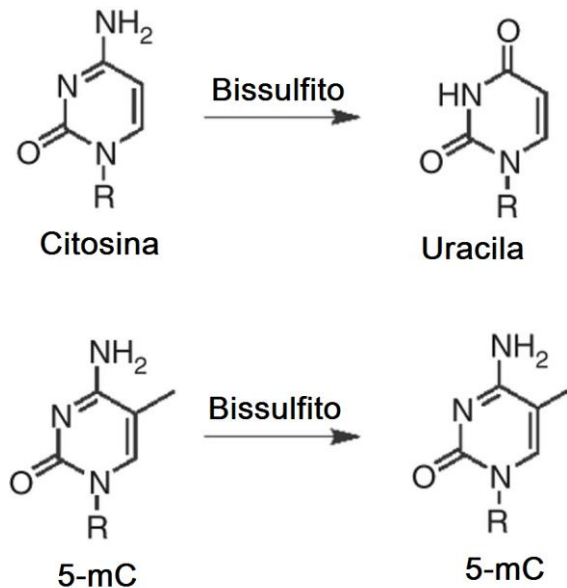


Figura 12 - Conversão do DNA com Bissulfito de Sódio.

Fonte: Adaptado de Huang *et al*, 2012.

Nota: Após o tratamento, citosinas não metiladas são convertidas em uracila e citosinas metiladas (5-mC) permanecem como citosinas.

4.4.2 Reação em cadeia da Polimerase Metilação-Específica (MSP)

O MSP foi realizado para avaliar o padrão de metilação da região promotora dos genes de TNF- α e IFN- γ , baseado nas alterações produzidas após o tratamento do DNA com bissulfito de sódio. A técnica do MSP, primeiramente descrita por Herman e colaboradores (1996), consiste em um método simples e rápido, além de ser sensível e específico para qualquer dinucleotídeo CpG. O MSP é baseado na utilização de dois pares de primers que amplificarão separadamente a região de interesse: um que se liga especificamente à sequência metilada, e outro que se liga apenas à sequência não metilada, modificada pelo tratamento com o bissulfito de sódio (HERNANDEZ *et al*, 2013) (FIGURA 13).

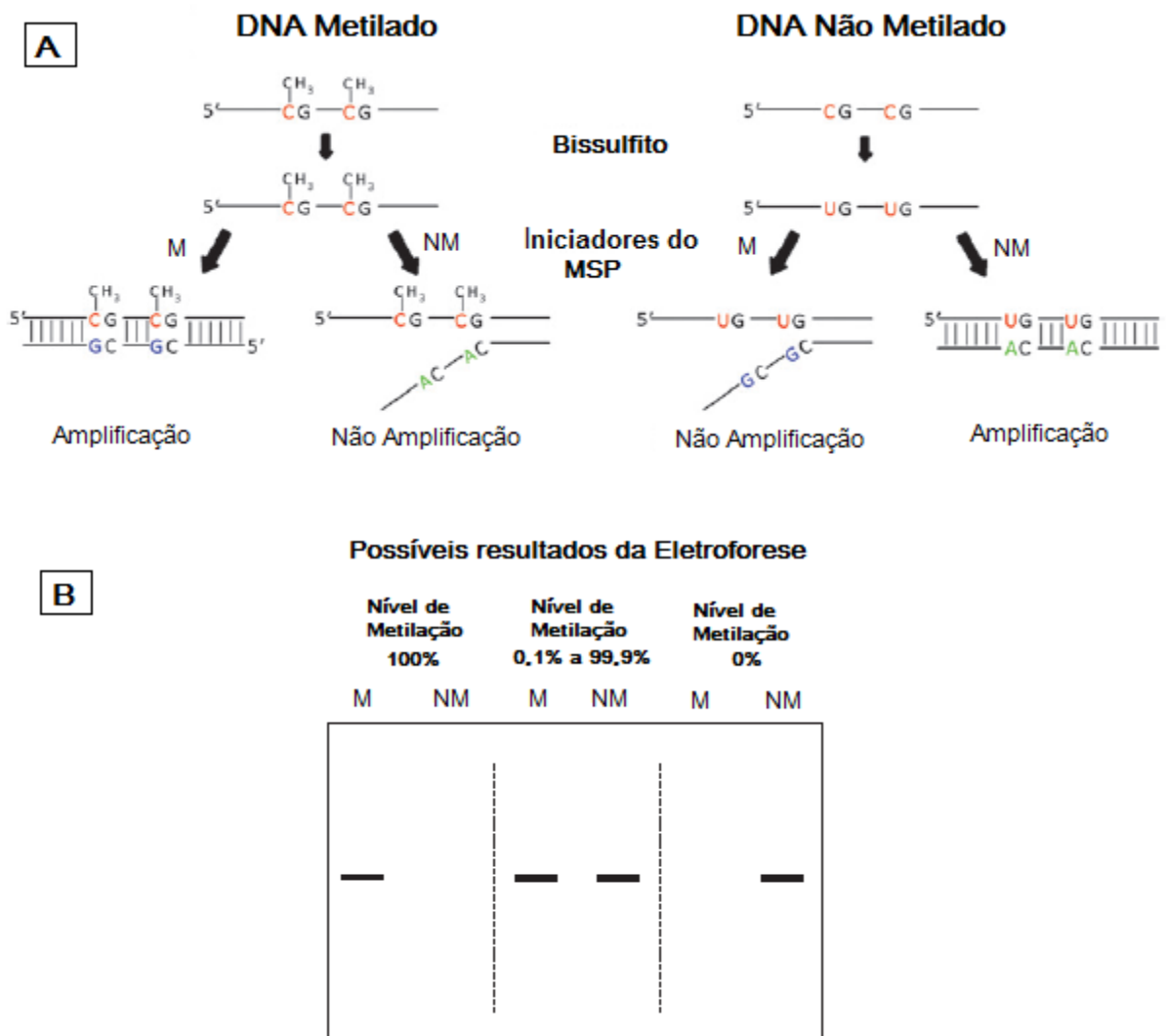


Figura 13 - Princípio da Reação em Cadeia da Polimerase Metilação-Específica (MSP).

Fontes: ZHANG *et al*, 2009; HERNANDEZ *et al*, 2013.

Nota: **(A)** Após o tratamento do DNA com bissulfito de sódio as citosinas não metiladas são convertidas em uracila, e as citosinas metiladas permanecem como citosinas. Primers específicos conseguem amplificar apenas regiões metiladas (M) ou não metiladas (NM). **(B)** Diagrama dos possíveis resultados de um MSP após a corrida eletroforética.

A reação de MSP para TNF- α e IFN- γ foi realizada de acordo com as condições já descritas na literatura (CORDERO *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2014) (APÊNDICE A). As sequências dos primers, a localização dos sítios CpGs, as temperaturas de anelamento e o tamanho do fragmento esperado estão descritos na tabela 3:

Tabela 3 - Localização dos sítios CpGs, seqüências dos primers, temperaturas de anelamento e tamanho dos produtos do MSP.

Gene	Sítio CpG	Seqüência	Temp. de anel.	Tamanho do fragm.
TNF-α	- 245	5' TTAGAAGATTTTTTCGGAATC 3' MS	57°C	120 pb
	- 239	5' TATCTCGATTTCTTCTCCATCG 3' MR		
		5' GGTTTAGAAGATTTTTTTTGGAAAT 3' NMS	57°C	120 pb
		5' TCTATCTCAATTTCTTCTCCATCAC 3' NMR		
IFN-γ	-295	5' AAGAGTTAATATTTTATTAGGGCGA 3' MS	52°C	156 pb
	-143	5' TAAACTCCTTAAATCCTTTAACGAT 3' MR		
		5' TGAAGAGTTAATATTTTATTAGGGTGA 3' NMS	52°C	154 pb
		5' TAAACTCCTTAAATCCTTTAACAAT 3' NMR		

Fonte: Do autor

Nota: MS: primer metilado senso; MR: primer metilado reverso; NMS: primer não metilado senso; NMR: primer não metilado reverso

Para o MSP foram utilizadas 40 amostras de DNA pacientes infectados pelo DENV e 14 amostras de pacientes não infectados (grupo controle). Como controle positivo de amplificação pelo primer metilado foi utilizada a amostra metilada artificialmente descrita no item 4.3 e como controle positivo de amplificação pelo primer não metilado foi utilizada uma amostra não metilada. Foram realizadas duas reações independentes de cada amostra para o mesmo gene e as duplicatas cujos resultados foram divergentes entre si foram reportadas como indeterminadas e excluídas da análise. Para a análise dos resultados do MSP estabeleceu-se que a amplificação apenas para primers não metilados foi interpretada como não metilação. As amplificações apenas para primers metilados ou para ambos (metilados e não metilados) foram consideradas como metilação.

Após a realização do MSP foi feita a eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os produtos da amplificação foram corados com GelRed (Uniscience, EUA) e visualizados por fotodocumentação através de um transluminador de luz ultravioleta.

4.5 ANÁLISES DOS RESULTADOS

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas pelo software GraphPadPrism® 4.0. Os resultados do MethELISA foram avaliados através da análise multivariada de Kruskal-Wallis, seguido de um pós-teste de Dunn. Para os resultados do MSP foi utilizado o Teste Exato de Fisher. O nível mínimo de significância aceito foi de 5% ($p < 0,05$) em ambos os casos.

4.6 META-ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO PROCESSO DE METILAÇÃO E DEMETILAÇÃO DE CITOSINAS EM MICROARRANJOS DE DNA

Para estudar a expressão dos genes relacionados ao processo de metilação e desmetilação do DNA em amostras de sangue de pacientes com dengue, foi obtido uma planilha de dados (datasets) do site Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Esta planilha (GEO# GDS5093) foi escolhida por apresentarem dados de expressão gênica obtidas de amostras de sangue total de indivíduos controles (não infectados; $n=9$), pacientes com FD ($n= 18$) e com FHD ($n=10$). A planilha foi acessada e obtida os valores normalizados de expressão de genes envolvidos na metilação (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, DMAP1) e desmetilação de dinucleotídeos CpG (TDG, MBD4 e AICDA).

Para realizar a meta-análise da expressão dos genes selecionados, os dados de expressão obtidos para cada gene e amostra foram organizados em planilha excel, convertidos posteriormente em arquivo do tipo *txt* tabulados e utilizados para análise no pacote de ferramentas para análises de dados pelo software *Array Mining* (<http://www.arraymining.net/>). A expressão gênica dos genes citados anteriormente foi realizada pela ferramenta "*Gene Selection*" utilizando o método "Ensemble" implantando nesta ferramenta. A determinação da correlação entre a expressão do gene e a infecção por dengue foi realizada através do cálculo de Correlação de Pearson. Os resultados desta análise foram representados por gráficos de box-plots e mapas de aquecimento (*HeatMaps*).

5 RESULTADOS

Serão apresentados os resultados obtidos após o desenvolvimento da pesquisa.

5.1 PADRONIZAÇÃO DO MethELISA

Como descrito anteriormente, para a padronização do teste foram utilizados três diferentes tampões de adsorção: TBS, PBS e tampão Carbonato/Bicarbonato. Como pode ser observado na Figura 14, o tampão que apresentou melhores resultados foi o tampão carbonato/bicarbonato, pois a densidade ótica (D.O.) do controle positivo foi maior do que a D.O. observada nos outros dois tampões utilizados.

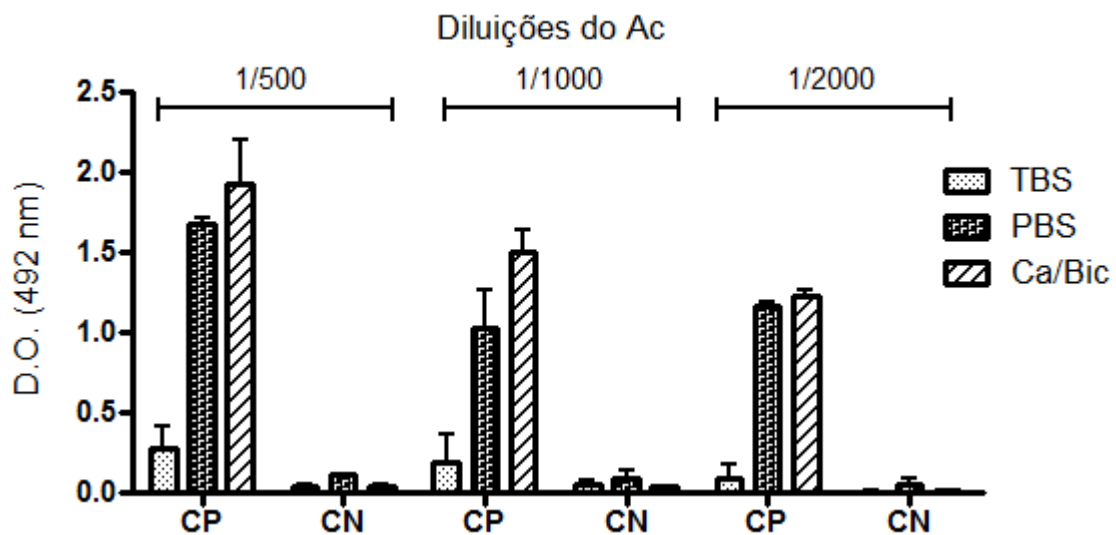


Figura 14 - Padronização do MethElisa.

Fonte: Do autor.

Nota: Podem ser observados os resultados apresentados pelo uso de três diferentes tampões de adsorção (TBS, PBS e Carbonato/Bicarbonato), sendo que o tampão Carbonato/Bicarbonato apresentou os melhores resultados. Também foram testadas três diferentes diluições do anticorpo primário anti 5-mC (1/500, 1/1000 e 1/2000). CP: controle positivo, CN: controle negativo

Na Figura 14 verifica-se também os resultados apresentados pelas diferentes diluições de anticorpo primário (anti-5mC), ou seja, 1/500, 1/1000 e 1/2000. Os resultados foram bastantes similares em relação ao valor obtido de D.O. entre as diferentes diluições usadas e para uma melhor análise, foi feito o cálculo da relação entre o valor da média da densidade óptica dos controles positivos e o cut-off dos resultados (FIGURA 15). Para o cálculo do cut-off somou-se a média dos controles negativos com o dobro do desvio padrão destas amostras. A diluição 1/500 foi a que apresentou a maior relação, cujo valor foi da média do controle positivo foi 34,1 vezes maior que o cut-off. A diluição 1/2000 apresentou resultados similares, com uma relação de 31,9, seguida pela diluição 1/1000, cuja relação foi de 31,7. Portanto, como as relações foram muito próximas, optou-se por utilizar a diluição do anticorpo primário de 1/2000.

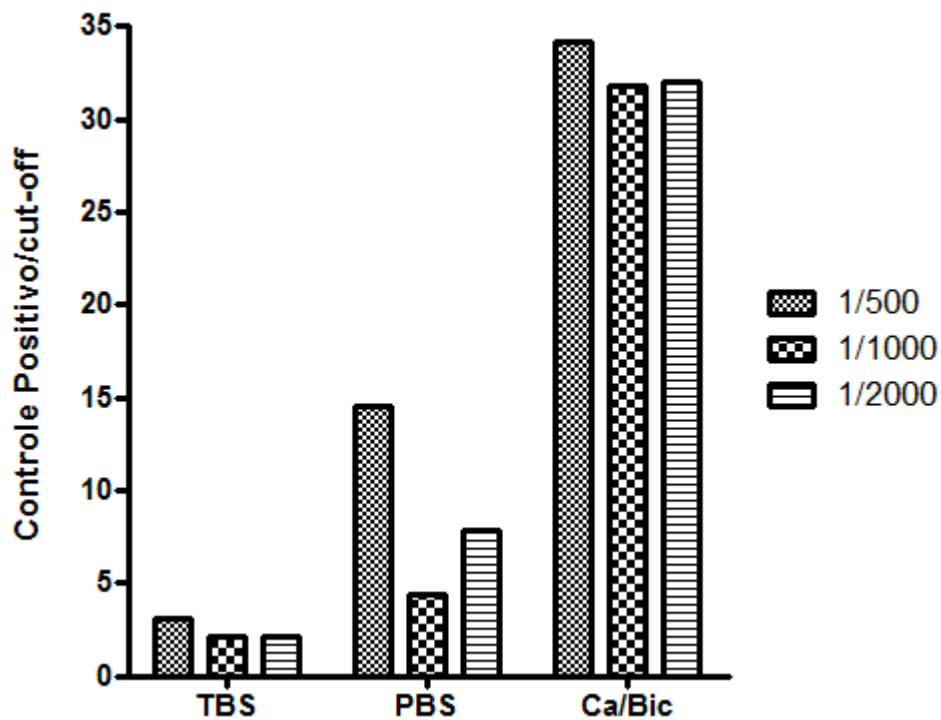


Figura 15 - Relação entre a média dos valores de D.O. obtidos do controle positivo e o cut-off para as diferentes diluições de anticorpo primário e tampões de adsorção.

Fonte: Do autor

Para a avaliação do perfil global de metilação das amostras de DNA foi construído o gráfico que relaciona a densidade óptica com a porcentagem de metilação, de acordo com a curva descrita no item 4.3 (FIGURA 16).

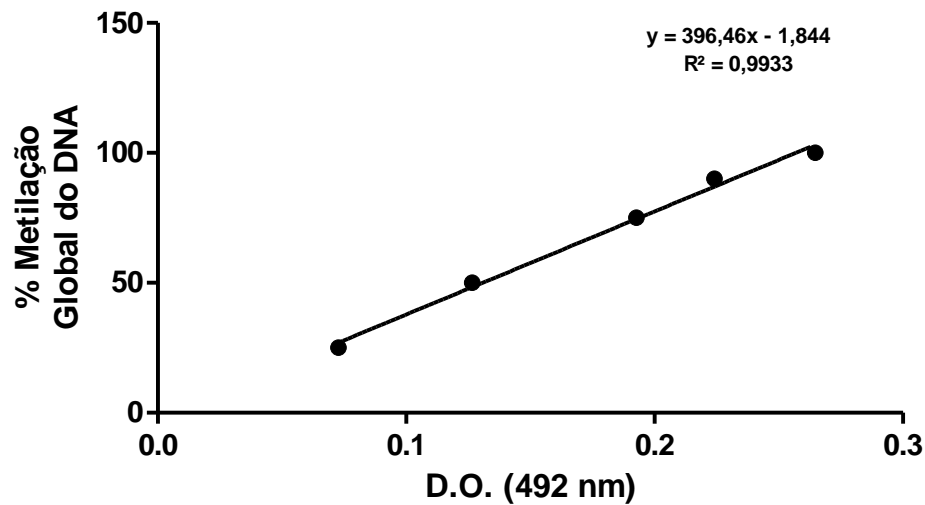


Figura 16 - Construção da Curva-Padrão para a análise do perfil de metilação das amostras de DNA.

Fonte: Do autor

5.2 ANÁLISE DO PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO DE PACIENTES COM DENGUE.

Após a padronização da técnica foram testadas as amostras de pacientes com dengue. Foram testadas amostras de pacientes não infectados e os pacientes infectados pelo DENV, independentemente da presença ou ausência de sintomas. Como pode ser observado na Figura 17, existe uma diminuição do perfil global de metilação após a infecção pelo DENV, já que houve diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de metilação dos dois grupos ($p < 0,05$). A análise da média da porcentagem de metilação dos grupos estudados mostrou que os pacientes de grupo controle apresentaram $78,5\% \pm 14,8$ de metilação do DNA, enquanto os infectados apresentaram uma média de $71,2\% \pm 14,4$ de metilação do DNA.

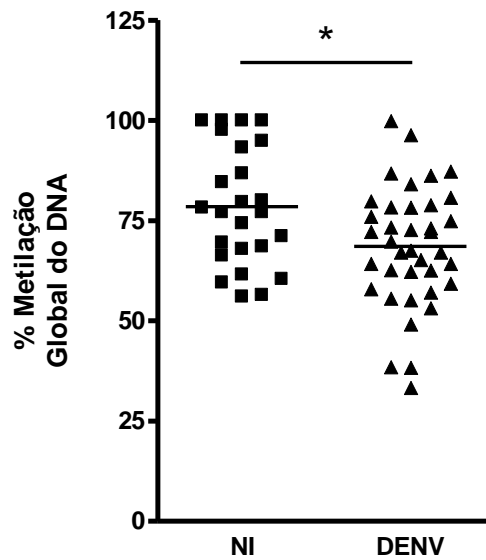


Figura 17 - Porcentagem global de metilação de pacientes não infectados (NI) e de pacientes infectados pelo DENV (INFECC).

Fonte: Do autor
Nota: *: $p < 0,05$.

Também foi feita uma análise comparativa entre os pacientes que apresentaram os sintomas típicos da doença ($n = 19$), de pacientes assintomáticos ($n = 19$) e de indivíduos não infectados ($n = 25$) (FIGURA 18).

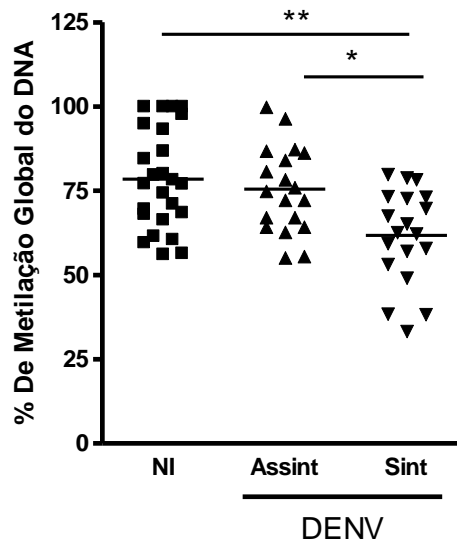


Figura 18 - Porcentagem global de metilação dos pacientes não infectados pelo DENV e de pacientes infectados que apresentaram (Sint.) ou não os sintomas da doença (Assint).

Fonte: Do autor
Nota: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

As amostras de DNA dos pacientes não infectados (NI) pelo DENV (78,5%±14,8) e dos pacientes infectados que não apresentaram os sintomas da doença exibiram uma maior porcentagem de metilação (75,5%±12,7) em relação aos pacientes infectados pelo DV que apresentaram os sintomas da dengue (61,7%±14,1) ($p < 0,05$). O teste estatístico revelou uma diferença significativa no perfil global de metilação entre os pacientes NI e os sintomáticos ($p < 0,01$), e entre os assintomáticos e os sintomáticos ($p < 0,05$), como pode ser observado no Figura 18.

5.3 ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES TNF- α e IFN- γ PELA TÉCNICA DO MSP.

Após a análise dos resultados do MSP, foi observado que existe uma associação entre a infecção pelo DENV e a desmetilação do promotor do gene TNF- α . Os dados obtidos demonstram que 32,5% dos pacientes infectados pelo DENV (13/40) mostraram uma ausência na metilação da ilha CpG da região testada do promotor do TNF- α ($p = 0.0128$). Em relação à análise do promotor do IFN- γ , observou-se uma alta frequência de metilação dos pacientes infectados pelo DENV (96,7%), assim como no grupo controle (100%), sem nenhuma diferença estatística. Não houve diferença estatística entre os grupos sintomáticos e assintomáticos nos dois genes analisados (dados não mostrados) (TABELA 4; FIGURA 19).

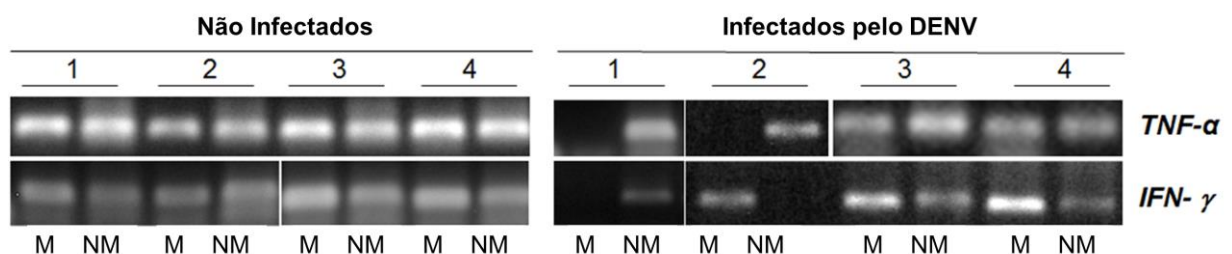


Figura 19 - Resultados representativos do MSP da região promotora do TNF- α e do IFN- γ , realizado a partir do DNA extraído do sangue total de pacientes infectados e não infectados pelo DENV.

Fonte: Do autor.

Nota: Um produto de PCR visível nas colunas M indica a presença do alelo metilado. O produto de PCR nas colunas NM indicam a presença do alelo não metilado. Os números acima demonstram a identificação dos pacientes e indivíduos controles.

Tabela 4 - Frequência de metilação da região promotora do TNF- α e IFN- γ em pacientes infectados e não infectados pelo DENV.

	TNF- α			IFN- γ		
	NM	M	p-valor	NM	M	p-valor
Não infectados	0 (0%)	14 (100%)	p= 0.0128	0 (0%)	14 (100%)	1.0
Infectados	13 (32.5%)	27 (67.5%)		1 (3.03%)	32 (96.97%)	
Total	13	41		1	46	

Fonte: Do autor

Nota:NM: Não Metilado; M: Metilado.

5.4 META-ANÁLISE DE MICROARRANJOS DE DNA DE PACIENTES INFECTADOS PELO DENV

Com objetivo de identificar possíveis alterações na transcrição gênica de genes relacionados com a metilação/demetilação de CpG, foi realizada uma meta-análise em planilhas de dados de experimentos de microarranjos de DNA de pacientes infectados com o DENV. Os resultados indicaram uma forte correlação positiva entre a expressão de TDG e a infecção pelo DENV (TABELA 5). Isso é verificado pelo valor obtido no teste de correlação de Pearson, que mostra que valores acima de 0,7 apresentam forte correlação entre a expressão do gene a o evento avaliado, que no caso é a infecção pelo DENV. Ainda existe uma correlação moderada positiva entre a expressão dos genes DNMT1 e DNMT3B e a infecção pelo DENV. Os outros genes analisados apresentaram fraca correlação positiva (DMAP1, DNMT3A) e negativa (AICDA, MBD4 e DNMT3L).

Tabela 5 - Teste de Correlação de Pearson entre a expressão dos genes relacionados à metilação e demetilação e a infecção pelo DENV.

Gene	Correlação de Pearson (expressão gênica vs. infecção)	Estatística-F	Valor de Q
TDG	0.72	21.49	0
DNMT1	0.55	17.54	0
DNMT3B	0.51	9.16	5e-04
AICDA	-0.38	1.69	0.0772
DMAP1	0.29	4.74	0.0112
DNMT3A	0.25	3.49	0.021
MBD4	-0.1	2.55	0.0383
DNMT3L	-0.16	0.46	0.2279

Fonte: Do autor

A correlação se torna mais evidente ao analisar o mapa de aquecimento (*heat map*) (FIGURA 20) e os gráficos de box-plots (FIGURA 21) para os genes escolhidos. Conforme observado, podemos verificar que a maioria das amostras de pacientes com dengue apresentaram maior expressão dos genes TDG e DNMT1 do que as amostras do grupo controle, as quais por sua vez apresentaram sempre menores níveis de expressão. Na Figura 21, podemos verificar que dentre os quatro genes que apresentaram maior índices de "Correlação de Pearson", os genes TDG, DNMT1 e DNMT3B apresentaram uma expressão aumentada em pacientes infectados com DENV se comparada com os controles não infectados. Entretanto, apenas os genes TDG e DNMT3B apresentam uma maior expressão nos pacientes com FHD. A Figura 21 também mostra uma diminuição da expressão da enzima AICDA em pacientes infectados com DENV se comparado aos não infectados.

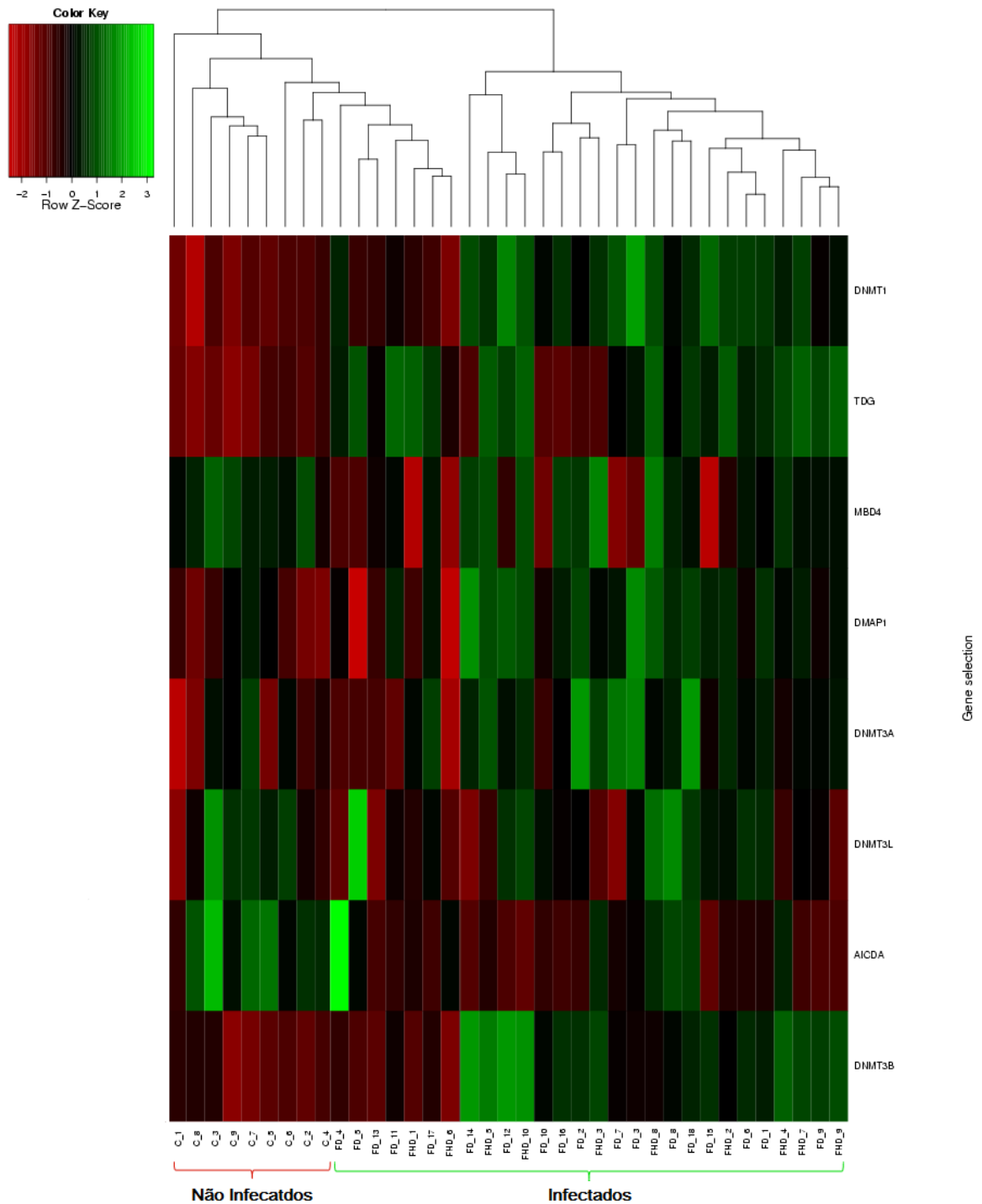


Figura 20 - Mapa de aquecimento para os 8 genes relacionados ao processo de metilação e desmetilação de dinucleotídeos CpG.

Fonte: Dados obtidos pelo autor através da ferramenta *Array Mining*. Disponível em: <<http://www.arraymining.net>>. Acesso em: 03 nov 2014.

Nota: Os níveis de expressão de cada gene em cada amostra foram extraídos da planilha de dados GEO# GDS5093 através do site Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). O mapa de aquecimento foi gerado pelo programa *Array Mining* (<http://www.arraymining.net/>) utilizando o método ENSEMBLE. As colunas correspondem às amostras utilizadas (controle/n=9; FD/n=17 e FDH/n=10) e as linhas aos genes avaliados.

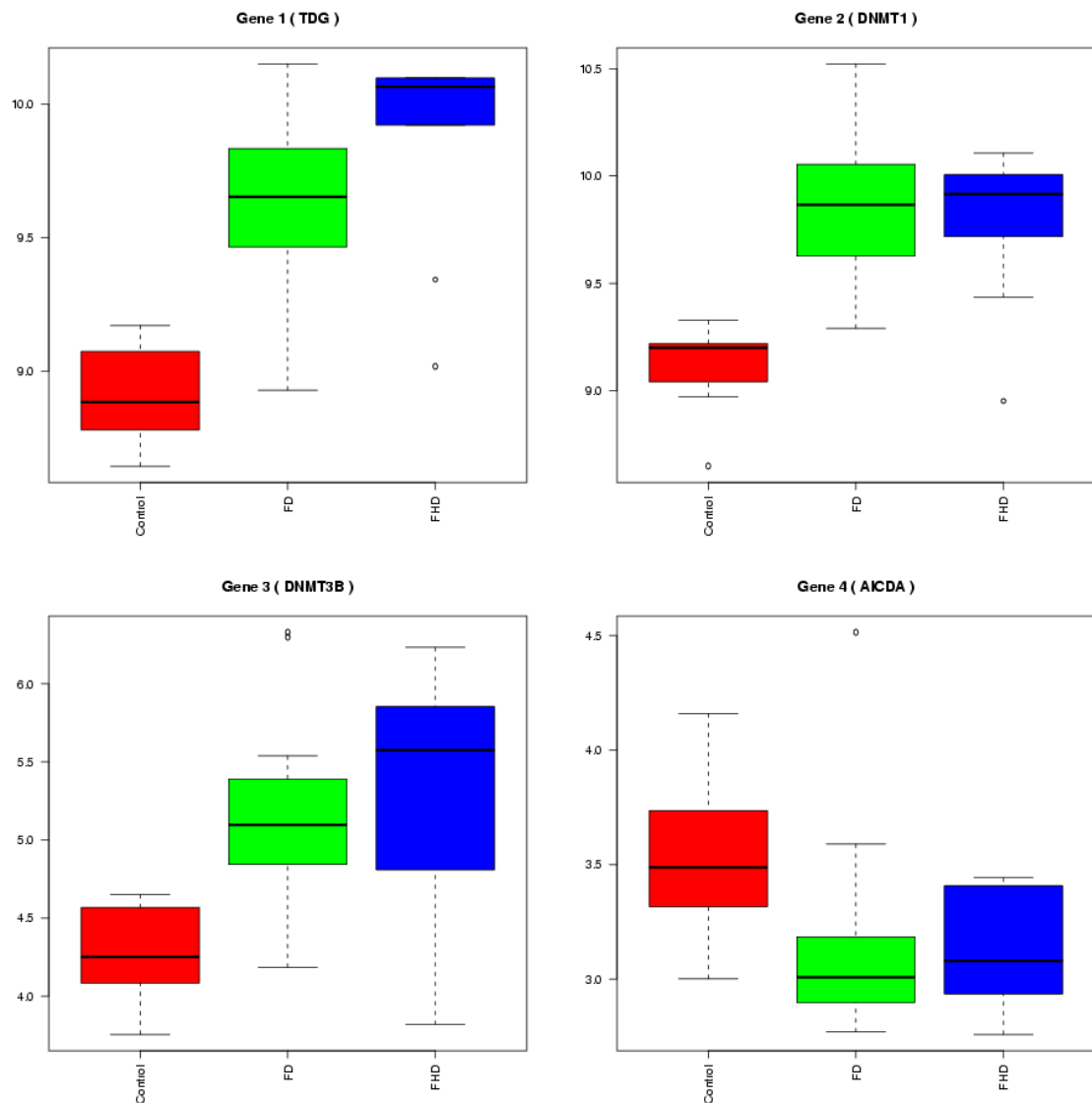


Figura 21 - Níveis de expressão gênica dos genes TDG, DNMT1, DNMT3B e AICDA.

Fonte: Dados obtidos pelo autor através da ferramenta *Array Mining*. Disponível em: <<http://www.arraymining.net>>. Acesso em: 03 nov 2014.

Nota: Os níveis de expressão de cada gene em cada amostra foram extraídos da planilha de dados GEO# GDS5093 através do site Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Os gráficos de box-plots dos quatro genes mais significativos foram gerados pelo programa *Array Mining* (<http://www.arraymining.net/>) utilizando o método ENSEMBLE.

6 DISCUSSÃO

A dengue tem emergido como um importante problema mundial de saúde pública ao longo das últimas quatro décadas e está intimamente ligada ao crescimento da população humana, urbanização, globalização e a falta de controle eficaz do vetor. O vírus causador, assim como o mosquito vetor da doença, tem se espalhado globalmente nos trópicos, resultando em um aumento da frequência e da magnitude das epidemias, além do surgimento da forma grave da doença, a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) (GUBLER, 1998, 2011).

Embora a maioria das infecções pelo vírus da dengue sejam assintomáticas, pode ocorrer uma grande variedade nas manifestações clínicas, variando de uma leve doença febril à uma doença grave e fatal (SIMMONS *et al.*, 2012). De acordo com a atual publicação da Organização Mundial da Saúde, os pacientes sintomáticos que se recuperam sem grandes complicações são classificados como tendo dengue, enquanto que aqueles que possuem qualquer outros sintomas são designados como tendo dengue grave, pois podem apresentar extravasamento de plasma, resultando em choque; acúmulo de líquido seroso suficiente para causar desconforto respiratório; hemorragia grave e danos graves em outros órgãos (fígado e cérebro) (SIMMONS *et al.*, 2012; WHO, 2009).

Atualmente, muitos estudos têm relacionado o desenvolvimento de inúmeras doenças aos fatores epigenéticos de cada indivíduo. Assim, a presença de metilação no DNA ou de acetilação de histonas, por exemplo, poderiam modular a transcrição gênica. Os fatores epigenéticos podem, portanto, influenciar a expressão fenotípica, e determinar a presença de doença ou traços normais (LEE, PAUSOVA, 2013; SFZY, 2014).

Também tem sido proposto que micro-organismos podem desregular a epigenética de seus hospedeiros. Os vírus Epstein-Barr ou da Hepatite B, por exemplo, são capazes de produzir proteínas que influenciam a atividade das DNA metiltransferases, podendo assim, promover a ativação ou silenciamento de determinados genes da célula hospedeira (NILLER *et al.*, 2013).

Desta forma, neste trabalho propusemos estabelecer uma relação entre a infecção pelo DENV e o perfil global de metilação do DNA, sugerindo que os pacientes infectados pelo DENV apresentam uma tendência na diminuição do

percentual relativo de metilação global. Para tal, utilizamos um ensaio imunoenzimático, baseado na técnica descrita por Kremer e colaboradores (2012), sendo inseridas algumas modificações em determinadas etapas do processo, que denominamos MethELISA. Além disso, verificamos o padrão de metilação da região promotora dos genes TNF- α e IFN- γ , duas importantes citocinas envolvidas na patogênese da dengue, através da técnica do MSP em amostras tratadas com bissulfito de sódio.

Com relação ao MethELISA, inicialmente foi testada a capacidade de adsorção do DNA à placa em três diferentes tampões, sendo eles: PBS, TBS e Carbonato/Bicarbonato. O tampão Carbonato/Bicarbonato foi selecionado por apresentar maiores densidades ópticas do controle positivo, como pode ser observado na Figura 14. Também foram testadas três diluições do anticorpo primário, o anti 5-metilcitosina (anti-5mC): 1/500, 1/1000 e 1/2000. De acordo com os dados apresentados nas Figuras 08 e 09, a diluição 1/500 apresentou a maior relação entre o valor da média da densidade óptica dos controles positivos e o cut-off dos resultados. Porém, optou-se pela diluição 1/2000, já que uma maior diluição favorece a ligação específica entre antígeno e anticorpo, e impede as ligações inespecíficas (BUTLER et al., 1978); além disso, o fator econômico foi levado em consideração durante a seleção da diluição do anticorpo primário.

Após a padronização do método, foram iniciados os testes com as amostras dos pacientes infectados e não infectados pelo DENV. Nossos resultados indicam uma tendência na diminuição no perfil global de metilação dos pacientes após a infecção pelo DENV. A diminuição no perfil de metilação pode ser um reflexo da inibição de DNA metiltransferases ou da ativação dos mecanismos de demetilação do DNA (HOWARD, 2008).

Dentre as proteínas não estruturais dos *Flavivirus*, a NS5 se destaca por ser a maior e mais conservada proteína estrutural dentro do gênero, e por apresentar um domínio de metiltransferases (MTase) dependente da S- adenosil-metionina (SAM). As metiltransferases de alguns *Flavivirus*, como o DENV, o Vírus West Nile e o Vírus da Febre Amarela são capazes de metilar o RNA viral na posição N-7 da guanina e 2' O da ribose, o que indica que este é um mecanismo geral dentro da família para garantir uma síntese eficiente do *cap* do RNA viral e conseqüentemente sucesso no ciclo de replicação do DENV (LIM; BODENREIDER; SHI; 2013; ZHOU et al., 2007.).

Assim, ZHOU e colaboradores (2007) demonstram a necessidade da presença da SAM para a doação do grupo metil durante a metilação do *cap* do RNA dos *Flavivirus*. O domínio MTase dependente de SAM é conservado entre os *Flavivirus* e o hospedeiro humano (DONG et al., 2014).

Os dados obtidos neste trabalho indicam uma diminuição global na metilação após a infecção pelo DENV. Esta diferença nos níveis globais de metilação podem ser reflexo da interação entre o DENV vírus e hospedeiro, em que a NS5 do DENV, através do domínio de MTase utiliza o agrupamento metil proveniente da SAM do hospedeiro para conseguir metilar seu próprio RNA. Isso levaria, provavelmente, a uma diminuição da SAM disponível para as metiltransferases do hospedeiro, tendo como consequência uma hipometilação global do DNA do hospedeiro.

Considerando que a severidade dos sintomas apresentados após a infecção pelo DENV está correlacionada com a carga viral do paciente (VAUGHN et al., 2000), os indivíduos sintomáticos podem apresentar maior carga viral do que os assintomáticos. Portanto, nos indivíduos sintomáticos haveria uma maior concentração de células infectadas e conseqüentemente maior expressão de NS5 e uso da SAM para metilação do RNA viral. Com menor disponibilidade de SAM para uso das DNMTs do hospedeiro, teríamos a diminuição da percentagem global de metilação do DNA.

Após a constatação de que indivíduos infectados pelo DENV possuem um menor nível de metilação global, verificamos especificamente que o promotor do TNF- α dos pacientes com dengue também apresenta menor taxa de metilação quando comparado ao grupo de indivíduos não infectados. A alteração na metilação do DNA já foi reconhecida como um importante componente no desenvolvimento de várias doenças inflamatórias, tais como artrite reumatóide (KLEIN; GAY, 2015), asma (HARB; RENZ, 2015) e doença periodontal (LARSSON et al., 2014). A infecção pelo DENV acarreta em elevada secreção de citocinas pró-inflamatórias no hospedeiro humano e vários trabalhos correlacionam a alta concentração destas citocinas com a patogênese da doença (ESPADA-MURAO; MORITA, 2011; GUZMAN; HARRIS, 2015; MANGIONE et al., 2014; MARTINA, 2014; VAN DE WEG et al., 2013;).

Diversos estudos relatam maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro dos pacientes com FHD/SCD, tais como o TNF- α e o IFN- γ , entre outras (BUTTHEP et al., 2012; CHAKRAVARTI et al., 2006; CHUNHAKAN et al., 2015;

SOUNDRAVALLY et al., 2014). Estas citocinas, especialmente o TNF- α , estão associadas ao aumento na severidade da doença por induzirem uma inflamação aguda e aumentarem a permeabilidade vascular em células endoteliais.

Estudos prévios com outras doenças, tais como a Doença de Crohn (NIMMO et al., 2012) e a Doença Periodontal (ZHANG et al., 2013) demonstraram que a metilação no promotor do TNF- α influencia a produção desta citocina, contribuindo para diferentes respostas imunes individuais aos estímulos inflamatórios. Além disso, alguns estudos *in vitro*, em que foram utilizadas células THP-1 tratadas com o inibidor da metilação do DNA (5-aza-2-deoxicitidina), demonstraram um aumento tempo-dependente nos níveis do mRNA de TNF- α . Quando estas células foram transfectadas com um gene repórter de luciferase contendo a sequência do promotor do TNF- α (-291~+34 pb), detectou-se uma diminuição de 2,6 vezes na atividade da luciferase quando comparado com o promotor não-metilado (ZHANG et al., 2013). O mesmo efeito foi observado em células HeLa transfectadas com o promotor do TNF- α metilado ou não metilado, clonado em um vetor repórter de luciferase (GOWERS et al., 2011).

O sítio CpG do promotor do TNF- α analisado pelo MSP do presente estudo é está inserido dentro das duas regiões presentes nasduas construções plasmídeais citadas anteriormente. Assim, a baixa taxa de metilação nesta posição também pode ter afetado a expressão de TNF- α . Além disso, a região promotora contém vários elementos de ligação para muitos fatores de transcrição, sugerindo que a metilação pode interferir na ligação destes fatores nas regiões regulatórias presentes no promotor do TNF- α (SULLIVAN et al., 2007).

Outro aspecto que deve ser considerado é o fato de que foram utilizadas amostras de DNA provenientes de sangue total. A heterogeneidade da população de células presentes em sangue total não nos permite identificar o nível de alteração na metilação do promotor do TNF- α induzida pelo DENV em cada tipo celular individualmente.

O resultado da meta-análise de microarranjos de DNA indica que a expressão de TDG é maior em pacientes infectados pelo DENV, em relação aos não-infectados. A TDG é responsável pelo processo de reparo por excisão de bases que ocorre durante a desmetilação (FRANCHINI *et al.*, 2012). Este reparo no DNA é consequência da remoção do agrupamento metil da citosina, já que a família de TET desoxigenases converte a 5-metilcitosina em 5-carboxilcitosina, uma base “anormal”

que deve ser removida (FRANCHINI et al., 2012). Portanto, o aumento na expressão de TDG após a infecção pelo DENV é coerente com a hipometilação global encontrada nestes pacientes.

Nossos estudos da meta-análise também indicam um moderado aumento na expressão das DNMTs em pacientes infectados pelo DENV. Alguns pesquisadores afirmaram que as DNMTs podem participar na desmetilação ativa do DNA (MÉTIVIER et al., 2008). Esta proposta foi baseada na observação *in vitro* de que a DNMT3a e a DNMT3b não conseguem metilar a citosina quando a concentração do doador do radical (como o SAM) está abaixo de um certo limiar. Assim, ao invés de metilar, elas iniciariam a desmetilação em uma 5-mC já formada. As etapas envolvidas neste processo ainda não estão totalmente esclarecidas. No entanto, de acordo com Franchini e colaboradores (2012), a possibilidade de que uma DNMT poder induzir uma desaminação de citosina e desta forma levar à desmetilação do DNA é plausível, já que esta atividade está relacionada com o reparo do DNA (MÉTIVIER et al., 2008, FRANCHINI et al., 2012)

Além disso, já foi demonstrado que uma interação entre a DNMT3 e o TDG pode influenciar suas atividades, já que a DNMT3a estimula a atividade de glicosilase da TDG, enquanto a TDG inibe a atividade de metilação da DNMT3a *in vitro* (Li et al., 2007). Também já foi comprovado que a infecção pelo DENV em *Ae. Aegypti* resulta em um aumento na expressão da DNA metiltransferase do mosquito (AaDNMT2), através da regulação por microRNAs (ZHANG et al. 2013), o que também indica que o DENV possui a capacidade de regular a maquinaria epigenética de seu hospedeiro.

Concluindo, nossos dados indicam que após a infecção pelo DENV ocorre uma diminuição do perfil global de metilação. Além disso, verificamos uma associação positiva entre a infecção pelo DENV e a desmetilação do promotor do gene TNF- α . Estes fatos podem ocorrer devido à diminuição de SAM disponível no hospedeiro, já que o DENV pode capturá-la para metilar seu próprio RNA, ou ainda devido ao aumento na expressão de TDG e DNMTs que estariam envolvidas no processo de desmetilação do hospedeiro. Entretanto, novos estudos são necessários para confirmar estas hipóteses.

7 CONCLUSÕES

1. Foi observado neste estudo que, após a infecção pelo DENV, existe uma diminuição no perfil global de metilação nos pacientes.
2. Os pacientes infectados que apresentaram os sintomas da dengue exibem menores percentuais de metilação global do que os pacientes assintomáticos.
3. Observou-se também uma maior taxa de desmetilação do promotor do TNF- α dos pacientes infectados pelo DENV quando comparados com o grupo controle. Em relação ao IFN- γ , não foi observada diferença no padrão de metilação do gene entre os dois grupos analisados.
4. De acordo com a meta-análise realizada, ocorre um aumento na expressão de TDG após a infecção pelo DENV. Também foi observada uma moderada correlação positiva entre a expressão dos genes DNMT1 e DNMT3B e a infecção pelo DENV.

REFERÊNCIAS

ADHYA, D.; BASU, A. Epigenetic modulation of host: new insights into immune evasion by viruses. **J. Biosci.** v. 35, n. 4, 2010.

ALVAREZ, D. E. et al. Structural and functional analysis of dengue virus RNA. **Novartis Found Symp.** v. 277, p. 120-32, 2006.

ANDERSON, R. et al. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. **J Virol.** v. 71, p. 4226-4232, 1997.

ARORA, P. et al. Hepatitis C virus core protein downregulates E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1 and 3b. **Cancer Letters.** v. 261, p. 244–252, 2008.

ATTWOOD, J.T. et al. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci.** v. 59, n. 2, p. 241-257, 2002.

BANERJEE, A. K. 5'-Terminal Cap Structure in Eucaryotic Messenger Ribonucleic Acids. **Microbiological Reviews.** v. 44, n. 2, p. 175-205, 1980.

BAYLIN, S.B.; OHM, J.E. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat Rev Cancer.** v. 6, n. 2, p. 107-116, 2006.

BERGER, S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription. **Nature.** v. 447, n. 7143, p. 407-412, 2007.

BERNSTEIN, B.E.; MEISSNER, A.; LANDER, E.S. The mammalian epigenome. **Cell.** v. 128; n. 4, p. 669-681, 2007.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev,** v. 16, n. 1, p. 6-21, 2002.

_____. Perceptions of epigenetics. **Nature.** v. 447, n. 7143, p. 396-398, 2007.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico.** Secretaria de Vigilância em Saúde Ministério da Saúde. v. 46, n. 14. ISSN 2358-9450, 2015.

BURKE, D.S. et al. A prospective study of dengue infections in Bangkok. **Am J Trop Med Hyg.** v. 38, p. 172–80, 1988

BUTLER J. E. et al. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa): A Measure Of Antibody Concentration Or Affinity ? **Immunochemistry.** v. 15, p. 131-136, 1978.

BUTTHEP P. et al. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. **Pediatr Infect Dis J.** v. 31, p. e232-238, 2012.

CHAKRAVARTI, A., KUMARIA, R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. **Indian J Med Res.** v. 123, p. 25-30, 2006.

CHUNHAKAN, S., et al. Vascular leakage in dengue hemorrhagic Fever is associated with dengue infected monocytes, monocyte activation/exhaustion, and cytokines production. **Int J Vasc Med.** 917143, 2015.

CLYDE; K. et al. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J Virol.** v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.

BOONNAK K. et al. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibodydependent enhancement of dengue virus infection. **J Virol.** v. 85, p. 1671–1683, 2011.

CORDERO P. et al. Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. **J Physiol Biochem** v. 67, p. 463-470, 2011.

DOERFLER W, et al. Integration of foreign DNA and its consequences in mammalian systems. **Trends Biotechnol.** v. 15, p. 297, 1997.

DONG, T. et al. High proinflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. **PLoS One** v. 2, p. e1192, 2007.

EISEN, L. et al. ProactiveVector control strategies and improved monitoring and evaluation practices for dengue prevention. **J. Med. Entomol.** v. 46, n. 6, p. 1245–1255, 2009.

ESPADA-MURAO, L.A., MORITA, K. Dengue and soluble mediators of the innate immune system. **Trop Med Health** v. 39, p. 53-62, 2011.

FACKLER, M.J. et al. Quantitative Multiplex Methylation – Specific PCR Assay for the Detection of Promoter Hypermethylation in Multiple Genes in Breast Cancer. **Cancer Res.** v. 64, p. 4442-4452, 2004.

FIGUEIREDO, L.T. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FEINBERG, A.P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics **Nature Reviews Cancer.** v. 4, p. 143-153, 2004.

FRANCHINI et al. 5-Methylcytosine DNA Demethylation: More Than Losing a Methyl Group **Annu. Rev. Genet.** v. 46, n. 46, p. 419–441, 2012.

FROMMER M. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 89, p. 1827–1831, 1992.

GAMARNIK, A. Role of the dengue virus 5' and 3' untranslated regions in viral replication. In: Hanley KA, Weaver SC, editors. *Frontiers in Dengue virus research.* **Caister Academic Press.** p. 55–78, 2010.

GOUVEIA, M. E. **Análise do padrão de metilação em genes supressores de tumor na Leucemia Mielóide Crônica.** 2007. 123f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

GHOSH, A.; CHOWDURY, N.; CHANDRA, G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. **Indian J. Med. Res.** v. 135, p. 581–598, 2012.

GOWERS, I.R. et al. Age-related loss of CpG methylation in the tumour necrosis factor promoter. **Cytokine.** v. 56, p. 792-797, 2011.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 11, p. 480–496, 1998.

_____. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st century. **Trop. Med. Health.** v. 39, p. 3–11, 2011.

GUZMAN, A.; ISTÚRIZ, R.E. Update on the global spread of dengue **International Journal of Antimicrobial Agents.** v. 36S, p. S40–S42, 2010.

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

GUZMÁN, M.G.; KOURÍ, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases.** v. 2, p. 33–42, 2001

HARB H, RENZ H. Update on epigenetics in allergic disease. **J Allergy Clin Immunol.** v. 135, p.15-24, 2015.

HALSTEAD, S.B. et al. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. **J Biol Med.** v. 42, p. 311–328, 1970.

HERNÁNDEZ, H.G. et al. Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. **Biotechniques.** v. 55, n. 4, p. 181-97, 2013.

HOWARD, G. et al. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. **Oncogene.** v. 27, p. 404–408, 2008.

HUANG, Y.; RAO, A. New functions for DNA modifications by TET-JBP. **Nature Structural & Molecular Biology.** v. 19, p. 1061–1064, 2012.

HUANG, Y. et al. The anti-CMS technique for genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine. **Nature Protocols.** v. 7, n. 10, p. 1897-1908, 2012.

IDREES, S.; ASHFAQ, U. A. A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. **Genetic Vaccines and Therapy.** v. 10, p. 6, 2012.

ISSA, J., P. CpG island methylator phenotype in cancer. **Nature Reviews Cancer.** v. 4, p. 988-993, 2004.

JESSIE, K., et al. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **J. Infect. Dis.** v. 189, p. 1411-1418, 2004.

LI, L.C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics.** v. 18, n. 11, p. 1427-31, 2002.

JIN, B.; ROBERTSON, K.D. DNA Methyltransferases (DNMTs), DNA Damage Repair, and Cancer. **Adv Exp Med Biol.** v. 754, p. 3–29. 2013.

LEE, K.K.; PAUSOVA, Z. Cigarette smoking and DNA methylation. **Frontiers in Genetics.** v. 4, n. 132, p. 1-11, 2013.

KIM Y. et al. Hepatitis B virus X protein overcomes stress-induced premature senescence by repressing p16INK4a expression via DNA methylation. **Cancer Lett.** v. 288, p. 226–235, 2010

KITTIGUL, L. et al. Determination of tumor necrosis factor-alpha levels in dengue virus infected patients by sensitive biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Virological Methods.** v. 90, p. 51–57, 2000.

KLEIN K., GAY S. Epigenetics in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol.** v. 27, p. 76-82, 2015.

KUMAR, R. et al. Biological Function of Activation-induced Cytidine Deaminase (AID). **Biomed J.** v. 37, p. 269-283, 2014.

KREMER, D. et al. Quantitative measurement of genome-wide DNA methylation by a reliable and cost-efficient enzyme-linked immunosorbent assay technique. **Analytical Biochemistry.** v. 422, p. 74–78, 2012.

KUBERSKI, T. et al. Clinical and laboratory observations on patients with primary and secondary dengue type 1 infections with hemorrhagic manifestations in Fiji. **Am J Trop Med Hyg.** v. 26, p. 775–783, 1977.

KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** v. 30, p. 329–340, 2007.

LARSSON, L., CASTILHO, R.M., GIANNOBILE, W.V. Epigenetics and its role in periodontal diseases - A State-of-the-art Review. **J Periodontol.** v. 21, p. 1-18, 2014.

LI, Y. Q., et al. Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair. **Nucleic Acids Res.** v. 35, n. 2, p. 390–400, 2007.

LIM, S.P. BODENREIDER, C., SHI, P. Detection and Quantification of Flavivirus NS5 Methyl-Transferase Activities . Ed. Edwin Yunhao Gong, Springer Science Business Media **Antiviral Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.** v. 1030, 2013.

MANGIONE, J.N.A. et al. The association of cytokines with severe dengue in children. **Trop Med Health.** v. 42, p. 137-144, 2014.

MARTINA, B.E. Dengue pathogenesis: a disease driven by the host response. **Sci Prog** v. 97, p. 197-214, 2014.

MA, D. et al. Methylation Patterns of the IFN- γ Gene in Cervical Cancer Tissues. **Sci. Rep.** v. 4, p. 6331, 2014.

MALAVIGE, G.N. et al. Cellular and Cytokine Correlates of Severe Dengue Infection. **PLoS One.** v. 7, n. 11, p. e50387, 2012.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? **J Immunol.** v.176, p. 3821–3829, 2006.

MARTINEZ-TORRES, E. et al. Why and how children with dengue die? **Revista cubana de medicina tropical,** v. 60, n.1, p. 40–47, 2008.

MÉTIVIER, R. et al. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. **Nature.** v. 452, p. 45–50, 2008.

MIKOVITS, J.A. et al. Infection with human immunodeficiency virus type 1 upregulates DNA methyltransferase, resulting in *de novo* methylation of the gamma interferon (IFN-gamma) promoter and subsequent downregulation of IFN-gamma production. **Mol. Cell Biol.** V. 18, n. 9, p. 5166–5177, 1998.

MINÁROVITS, J. Microbe-Induced Epigenetic Alterations In Host Cells: The Coming Era Of Patho-Epigenetics Of Microbial Infections A Review. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. v. 56, n. 1, p. 1–19, 2009.

MODIS, Y, et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **PNAS**. v. 100, n. 12, p. 6986–6991, 2003.

_____. Structure of the *Dengue virus* envelope protein after membrane fusion. **Nature**. v. 427, p. 313-19, 2004.

MOMPARLER, R.L. Cancer Epigenetics. **Oncogene**. v. 22, p. 6479-6483, 2003.

MORGAN, H.D. et al. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. **J BiolChem**. v. 279, n. 50, p. 52353–52360, 2004.

NILLER, H. H. et al. Update on microbe-induced epigenetic changes: bacterial effectors and viral oncoproteins as epigenetic dysregulators. **Future Virol**. v. 8, n. 11, p. 1111–1126, 2013.

NIMMO, E.R. et al. Genome-wide methylation profiling in Crohn's disease identifies altered epigenetic regulation of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. **Inflamm Bowel Dis**. v. 18, p. 889-899, 2012.

POLO, S.E.; ALMOUZNI G. Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. **Cancer Let**. v. 220, n. 1, p. 1-9, 2005.

OKANO, M. et al. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. **Cell**. v. 99, p. 247–257, 1999.

OISHI K. *et al*. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. **J Infect Chemother**. v. 13, p.125-133, 2007.

OLIVEIRA, N. F. P. et al. Metilação de DNA e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 56, n. 4, p. 493-499, 2010.

QI, Y. et al. microRNA expression profiling and bioinformatic analysis of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cells. **Molecular Medicine Reports**. v. 7, p. 791-798, 2013.

RANDO O, J. Chromatin structure in the genomics era. **Trends Genet.** v. 23, n. 2, p. 67-73, 2006.

RAZIN, A.; RIGGS, A. D. DNA methylation and gene function. **Science.** v. 210, p. 604-610, 1980.

RICE, C. M. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science.** v. 229, p. 726–733, 1985.

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Adv Virus Res.** v. 59, p. 315-41, 2003.

RIGAU-PEREZ J. G. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet.** v. 352, p. 971-977, 1998.

ROBERTSON, K.D. DNA methylation and human disease. **Nat Rev Genet.** v. 6, n. 8, p. 597–610, 2005.

RODENHUIS-ZYBERT, I.A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating Infectivity. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 67, p. 2773–2786, 2010.

ROHANI, A. et al. *Aedes* larval population dynamics and risk for dengue epidemics in Malaysia. **Trop. Biomed.** v. 28, p. 237–248, 2011.

SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 1, p. 30–50, 1952.

SAMPATH, A.; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug Discovery. **Antiviral Res.** v. 81, n. 1, p. 6–15, 2009.

SIMMONS, C.P. et al. Dengue. **N Engl J Med.** v. 366, p. 1423-1432, 2012.

SMITH, D. R. et al. Animal models of viral hemorrhagic fever Review. **Antiviral Research.** v. 112, p. 59–79, 2014.

SOUNDRAVALLY R. et al. Association between proinflammatory cytokines and lipid peroxidation in patients with severe dengue disease around defervescence. **Int J Infect Dis.** v. 18, p. 68-72, 2014.

SULLIVAN, K.E. et al. Epigenetic regulation of tumor necrosis factor alpha. **Mol Cell Biol.** v. 27, p. 5147-5160, 2007.

SIERRA, B. et al. Variation in Inflammatory/Regulatory Cytokines in Secondary, Tertiary, and Quaternary Challenges with Dengue Virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, n. 3, p. 538–547, 2012.

SZYF M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. **ToxicolSci.** v. 100, n. 1, p. 7-23, 2007.

_____. Epigenetics, a key for unlocking complex CNS disorders? Therapeutic implications. **European Neuropsychopharmacology.** 2014. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.01.009>>. Acesso em: 03 dez. 2014.

TABACHNICK, W. J. Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistystems in a changing world. *The Journal of Experimental Biology.* v. 213, p. 946-954, 2009.

THOMAS, C. J. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu Rev Microbiol.** v. 44, p. 649–88, 1990.

TRACEY, K.J. et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science.** v. 234, p. 470–474, 1986.

TUISKUNEN, B; LUNDKVIST, A. Dengue viruses an overview. **Infection Ecology & Epidemiology.** 2013. Disponível em: <<http://www.infectionecologyandepidemiology.net/index.php/iee/article/view/19839>>. Acesso em: 11 nov. 2014.

USHIJIMA, T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. **Nat Rev Cancer.** v. 5, p. 223-31. 2005.

VAN DE WEG, C.A. *et al.* Microbial translocation is associated with extensive immune activation in dengue virus infected patients with severe disease. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 7, p. e2236, 2013.

VASILAKIS, N. WEAVER, S. C. The history and evolution of human dengue emergence. **Adv Virus Res.** v. 72, p. 1-76, 2008.

VAUGHN, D.W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **J Infect Dis.** v. 181, p. 2-9, 2000.

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

_____. DNA methylation analysis on a droplet-in-oil PCR array. **Lab Chip.** v. 9, n. 8, p.1059–1064, 2009.

ZHANG, G. et al. Wolbachia uses a host microRNA to regulate transcripts of a methyltransferase, contributing to dengue virus inhibition in *Aedes aegypti*. **PNAS.** v. 110, n. 25, p. 10276-10281, 2013.

ZHOU, Y. et al. Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. **Journal of Virology.** v. 81, n. 8, p. 3891–3903, 2007.

WATERS, T. R.; SWANN, P. F. Glycosylase Kinetics of the Action of Thymine DNA genetics: synthesis, and molecular nucleic acids, protein. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 20007-20014, 1998.

WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat Rev Microbiol.** v. 5, n. 7, p. 518-28. 2007.

WHITEHORN, J.; SIMMONS, C.P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine.** v. 29, p. 7221– 7228, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Geneva, Switzerland: WHO. **Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.** 2009.

_____. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. Geneva, Switzerland. 2012.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Condições da Reação em Cadeia da Polimerase Metilação Específica

Tabela 6 - Condições da Reação em Cadeia da Polimerase Metilação Específica para os genes TNF- α e IFN- γ

Reagentes	Preparo do Mix (x1)		Características dos ciclos					
	TNF- α	IFN- γ	TNF- α				IFN- γ	
	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Nº ciclos	Temp.	Tempo	Nº ciclos
Tampão 10X	2,0 μ l	2,0 μ l	95°C	10 min.	1	95°C	3 min.	1
MgCl₂ (50 mM)	0,6 μ l	0,6 μ l	95°C	30 seg.	50	95°C	45 seg.	50
dNTP's (10mM)	0,4 μ l	0,4 μ l	57°C	1 min.	50	52°C	1 min.	50
Taq Pol. (5U/ μl)	2,0 μ l	2,0 μ l	72°C	1 min.	50	72°C	45 seg.	50
Oligos (F+R) (10 mM)	13,8 μ l	13,8 μ l	72°C	7 min.	1	72°C	10 min.	1
H₂O	1,0 μ l	1,0 μ l	4°C	∞		4°C	∞	
DNA	20,0 μ l	20,0 μ l						
Total								

Fonte: Do autor

ANEXO

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DO PERFIL DIFERENCIAL DE METILAÇÃO EM PACIENTES COM DENGUE CLÁSSICA E FEBRE HEMORRÁGICA DO DENGUE

Pesquisador: Luís Gustavo da Silva Fagundes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08410912.9.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 276.660

Data da Relatoria: 05/02/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto está apresentado em linguagem clara e objetiva. Constam os critérios de inclusão e exclusão dos voluntários. A metodologia laboratorial é pertinente aos objetivos propostos.

Objetivo da Pesquisa:

Traz como proposta a identificação de perfis diferenciais de metilação do DNA, a serem usados como biomarcadores associados a diferentes manifestações clínicas da Dengue (FD vs FHD). A metodologia laboratorial a ser adotada será MS-AP-PCR (Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed PCR).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O DNA genômico dos sujeitos da pesquisa será obtido de amostras de sangue proveniente de punção venosa. Embora mínimos, existem os riscos inerentes a tal procedimento.

Os benefícios advindos do estudo poderão atingir uma parcela considerável da população, uma vez que os biomarcadores poderão facilitar a execução de testes rápidos e precisos para o diagnóstico precoce da dengue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa proposta é parte integrante das exigências do curso de Mestrado em Biociências

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 276.660

Aplicadas à Saúde da Unifal-MG, no qual o pesquisador responsável é discente bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. O enfoque será dado ao estudo de possíveis biomarcadores de DNA associados a diferentes manifestações clínicas da dengue.

Como esta patologia ocorre predominantemente em locais com clima temperado, em regiões tropicais e subtropicais, e tem alta incidência associada às más condições de higiene e urbanização, constitui-se estudo de grande interesse para controlar a morbidade e mortalidade da patologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE adequado

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atende a Resolução

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP acata o parecer do relator.

ALFENAS, 20 de Maio de 2013

Assinador por:
Maria Betânia Tinti de Andrade
(Coordenador)

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br