



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA**

FRANCISCO MARCIO PEREIRA DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMO NOS GENES
DAS CITOCINAS TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-6, E IL-10
EM PACIENTES COM FEBRE HEMORRÁGICA DA
DENGUE**

FORTALEZA/CE

2010

FRANCISCO MÁRCIO PEREIRA DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMO NOS GENES
DAS CITOCINAS TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-6, E IL-10
EM PACIENTES COM FEBRE HEMORRÁGICA DA
DENGUE**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia, área de concentração em Dengue, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

FORTALEZA-CE

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

S58i Silva, Francisco Marcio Pereira da.
Investigação de polimorfismo nos genes das citocinas $\text{tnf-}\alpha$, $\text{ifn-}\gamma$, $\text{tgf-}\beta$, il-6 , e il- em pacientes com febre hemorrágica da dengue. / Francisco Marcio Pereira da Silva. – 2010.
69 f.: il. color., enc.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2010.

Área de Concentração: Patologia.

Orientação: Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior.

1. Dengue. 2. Dengue Grave. 3. Citocinas. I. Título.

CDD 616.921

INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMO NOS GENES DAS CITOCINAS
TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-6, E IL-10 EM PACIENTES COM FEBRE
HEMORRÁGICA DA DENGUE

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Patologia.

Aprovada em 17/08/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Telmo Valença Junior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^a. Dr^a. Aline Maria Araújo Martins (Mestre)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^a. Dr^a. Danielle Malta Lima
Universidade de Fortaleza

Prof. Dalgimar Beserra de Menezes (Livre Docente)
Universidade Federal do Ceará-UFC

A Maria José, Sarah, Adriana Augusta e Matheus com incondicional carinho e amor.

Para Adalberto e Adelaide, sem eles meus estudos seriam "limitados", não haveria
sonhos de mudanças.

A Reges, que foi meu espelho, de luta, na busca de um amanhã melhor.

Para Socorro e Eládio, pela convivência e os momentos felizes.

A Rosemiro, Elza, pela amizade e pela
distinção nos estudos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela felicidade, pelo amor, pela possibilidade, enfim por tudo que somos.

Ao Prof. Dr. José Telmo Valença Junior, por sua atenção e paciência com a minha pessoa, nos momentos de maior necessidade.

Aos colegas da Pós-Graduação pelo apoio nas dificuldades existentes durante o curso, em especial ao Paulo Henrique, pelo apoio dado no laboratório.

Ao Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas, pelo apoio nos momentos críticos da execução da dissertação.

A todos os professores do curso pelo estímulo e por terem repassado de forma fiel, seus conhecimentos.

À Prof. Dra. Silvia Helena, bem como a Prof. Dra. Cristiane Cunha, por terem apoiado e disponibilizado os Laboratórios que gerenciam para a realização das análises.

As amigas Valeska e Cibele, pela disponibilidade incondicional nos momentos de ensinamento nas atividades do laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia pelo apoio financeiro através do PROAP.

Enfim, a todos que de forma direta ou indiretamente deram sua contribuição para que este estudo fosse realizado.

***“Equivoca-se quem imagina
que já não existe espaço
para a utopia”.***

Celso Furtado

RESUMO

Atualmente a Febre Hemorrágica da Dengue – FHD, tem tido um contínuo aumento em sua incidência, de forma geral em todo o país, juntamente com esse aumento de casos vem se apresentando uma letalidade preocupante em relação à FHD. Algumas doenças apresentam respostas imunológicas diferentes diante de polimorfismo em genes de citocinas. Este estudo tem por objetivo identificar fatores genéticos relacionados com o agravamento da doença em pacientes com FHD. Tal investigação se dá na possibilidade do polimorfismo dos genes das citocinas: TNF- α -308 G→A, TGF- β códon 10 e códon 25, IL-10 -1082 G→A, -819 C→T, -592 A→C, IL-6 -174G→C, e IFN- γ +874 T→A com a FHD. O local do estudo transversal de caso-controle, foi em Fortaleza, Ceará, Brasil, em 2009, com pacientes que foram diagnosticados como FHD, clínica e laboratorialmente, de acordo com as normas do MS, estes perfazendo um total de 48 pessoas envolvidas no grupo FHD. As pessoas que fizeram parte do grupo controle foram num total de 85 doadores voluntários de sangue do HEMOCE. As amostras do material colhido, 5mL de sangue, foram utilizadas para extração de DNA, utilizando kits PureLink (Invitrogen), e posteriormente foi feito o processo de tipificação, utilizado-se o kit Cytgen (One-Lambda, Canoga Park, CA, EUA). Após os processos e análises laboratoriais, obtivemos como resultados as frequências dos genótipos do TNF- α , -308 G/G, com maior predominância no grupo FHD (85,4%). Na citocina IFN- γ +874, o genótipo mais frequente foi o T/A, no grupo FHD (47,9%), no TGF- β códon 10 e códon 25, o genótipo predominante foi o T/C G/G (41,7%) no grupo FHD, na IL-6 -174, o genótipo mais frequente foi G/G no grupo FHD (58,3%), salientamos porém, que apesar destas frequências, nas citocinas citadas não foi encontrada associação genotípica e nem alélica entre polimorfismo e agravamento da dengue. Ao analisarmos o genótipo IL-10 -1082, -819 e -592, obtivemos maior predominância no genótipo GCC/ACC do grupo FHD (35,5%), e uma significância estatística associada ao fator de proteção no genótipo GCC/GCC (21,0%) de frequência no grupo controle. Esta citocina apresentou associação de proteção ao agravamento da doença. Concluimos, portanto, que o estudo do polimorfismo de genes das citocinas na Febre Hemorrágica da Dengue, demonstrou diferenças genotípicas e alélicas na IL-10, como fator de proteção.

Palavras-chave: Dengue; Febre Hemorrágica da Dengue; Citocinas IL-10.

ABSTRACT

Currently, Dengue Hemorrhagic Fever - DHF has had a continuous increase in its incidence in general across the country along with the increase of cases has been presenting an alarming fatality rate for DHF. Some conditions have different immune responses in the face of polymorphism in cytokine genes, this study aims to identify genetic factors related to worsening of the disease in patients with DHF. This investigation is the possibility of polymorphisms of cytokines genes: TNF- α -308 G \rightarrow A, TGF- β codon 10 and codon 25, IL-10 -1082 G \rightarrow A, -819 C \rightarrow T, -592 A \rightarrow C, IL-6-174G \rightarrow C, and IFN- γ +874 T \rightarrow A with DHF. The location of cross-sectional study of case-control takes place in Fortaleza, Ceará, Brazil in 2009, with patients who were diagnosed as DHF, laboratory and clinical ways, according to the rules of MS being a total of 48 persons in the DHF group. People who took part in the control group were a total of 85 voluntary blood donors of Hemoce. Samples of material collected, 5mL of blood were used for DNA extraction, using kits PureLink (Invitrogen) and subsequently made the process of typing, which was used Cytgen kits (One-Lambda, Canoga Park, CA, USA). After the procedures and laboratory tests, it was obtained results as the genotype frequencies of TNF- α , -308 G/G, with predominance in the DHF group (85.4%). In the cytokine IFN- γ +874, the most frequent genotype was T / A in the DHF group (47.9%) in the TGF- β codon 10 and codon 25 genotype was the predominant T/C G/G (41.7%) in group DHF. In IL-6 -174, the most frequent genotype was G/G in the DHF group (58.3%), we note however that despite these frequencies, the cytokines mentioned no association and genotypic nor between allelic polymorphism and worsening of dengue. When analyzing the genotype IL-10 -1082, -819 and -592, we found a predominance of genotype GCC/ACC DHF group (35.5%), and associated with a statistically significant protective factor in the genotype GCC/GCC (21.0%) frequency in the control group. This cytokine showed an association to protect the worsening of the disease. We conclude therefore that the study of polymorphisms of cytokine genes in Dengue Hemorrhagic Fever, showed allelic and genotypic differences in IL-10 as a protective factor.

Keywords: Dengue, Dengue Hemorrhagic Fever; cytokines IL-10.

LISTA DE GRÁFICOS FIGURAS TABELAS E ANEXOS

GRÁFICO 1	Número de casos e incidência de dengue, no Ceará, 1986 a 2010.....	19
GRÁFICO 2	Razão de forma clássica e Hemorrágica de Dengue 1999 a 2010.....	21
FIGURA 1	Árvore Filogenética da família <i>Flaviviridae</i> : divisão em gêneros; b) organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero <i>Flavivirus</i> . Adaptado de Van Regenmortel <i>et al.</i> , 2000.....	23
FIGURA 2	Esquema da partícula viral imatura (A) e madura (B) do <i>Dengue vírus</i> . A figura da direita corresponde à uma reconstrução de microscopia eletrônica de congelamento das partículas de um isolado de Dengue vírus. Adaptado de Van Regenmortel <i>et al.</i> , 2000.....	24
FIGURA 3	Visualização das bandas através de eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando o controle interno de amplificação de 440 pb (β - globina) e os genótipos. 1 e 2: TNF- α G/G; 3 a 6: TGF- β T/T G/G ; 7 a 11: IL-10 GCC/ACC; 12 e 13 IL-6 G/G; 14 e 15: IFN- γ A/A.....	39
QUADRO 1	Polimorfismos dos genes das citocinas tipificados.....	37
TABELA 1	Distribuição da população estudada por sexo.....	40
TABELA 2	Distribuição dos indivíduos que fazem uso contínuo de medicamentos.....	40
TABELA 3	Frequência dos genótipos de TNF- α -308 nos indivíduos dos grupos estudados.....	41
TABELA 4	Frequência dos alelos de TNF- α -308 nos indivíduos dos grupos estudados.....	41
TABELA 5	Frequência dos genótipos de IFN- γ +874 nos indivíduos dos grupos estudados.....	42
TABELA 6	Frequência dos alelos de IFN- γ +874 nos indivíduos dos grupos estudados.....	42
TABELA 7	Frequência dos genótipos de TGF- β 1 códon 10 e códon 25 nos indivíduos dos grupos estudados.....	43
TABELA 8	Frequência dos alelos de TGF- β 1 códon 10 e códon 25 nos indivíduos dos grupos estudados.....	44
TABELA 9	Frequência dos genótipos de IL-6 -174 nos indivíduos dos grupos	

	estudados.....	44
TABELA 10	Frequência dos alelos de IL-6 -174 nos indivíduos dos grupos estudados.....	45
TABELA 11	Frequência dos genótipos de IL-10 -108, -819, -592 nos indivíduos dos grupos estudados.....	45
TABELA 12	Frequência dos alelos de IL-10 -1082, -819, -592 nos indivíduos dos grupos estudados.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
C	Citosina
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
Ce	Ceará
DC	Dengue Clássica
DCs	Células Dendríticas
D-mix	Solução de Citosina, Guanina, Adenina, Timina e primers
EDTA	Ácido Etileno-Diamino-Tetra-Acético
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
G	Guanina
HPA	<i>Human platelet antigens</i>
IgA	Imunoglobulina A
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IFN- γ	Interferon gama
LACEN	Laboratório Central
LPS	Lipopolissacáride
MS	Ministério da Saúde
NF κ B	Fator Nuclear de Transcrição
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de Bases
PBMCs	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossômico

SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeo Único
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Th1	Células T <i>Helper 1</i>
Th2	Células T <i>Helper 2</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Dengue – o contexto atual.....	17
1.2	Dengue hemorrágica e seu quadro epidemiológico.....	20
1.3	O vírus da dengue.....	22
1.4	O vírus e suas variações genéticas.....	25
1.5	Dengue clássica e febre hemorrágica da dengue.....	25
1.6	Patogênese da dengue e suas teorias.....	26
1.6.1	Teoria da virulência viral.....	27
1.6.2	Teoria da facilitação dependente de anticorpo.....	27
1.6.3	Teoria do mimetismo molecular.....	28
1.6.4	Teoria do “Pecado original”.....	28
1.6.5	Teoria da interação multifatorial.....	28
1.6.6	Teoria do polimorfismo genético.....	28
1.7	Citocinas e dengue.....	29
1.8	A imunopatologia da dengue.....	30
2	JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DO ESTUDO.....	33
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Objetivo Geral.....	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	Local do estudo.....	35
4.2	População de estudo.....	35
4.3	Crerios de elegibilidade.....	35
4.4	Coleta das amostras de sangue periférico.....	36
4.5	Processo de Extração do DNA.....	36
4.6	Processo de tipificação do polimorfismo de citocinas.....	37
4.7	Processo de análise dos fragmentos de DNA em gel de agarose.....	38
4.8	Análise e interpretação da amplificação.....	38
4.9	Análise estatística das interpretações obtidas.....	39
4.10	Considerações éticas.....	39
5	RESULTADOS.....	40
5.1	Caracterização da população estudada.....	40

5.2	TNF-α	42
5.3	IFN-γ	42
5.4	TGF-β1	43
5.5	IL-6	44
5.6	IL-10	45
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue – o contexto atual

A dengue tem se destacado mundialmente entre as enfermidades reemergentes e é considerada a mais importante das doenças virais transmitidas por artrópodes (WHO, 1997; RIGAU-PÉREZ *et al.*, 1998). A doença manifesta-se, clinicamente, sob duas formas principais: a dengue clássica (DC), também conhecida como febre de dengue; e a forma hemorrágica, ou febre hemorrágica de dengue (FHD), e às vezes com síndrome de choque de dengue (FHD/SCD). (MARTINEZ-TORRES, 1998).

Por muitos anos a dengue e a febre hemorrágica de dengue constituíram um problema restrito a alguns países do Sudeste Asiático e da Oceania. Este quadro começou a ser modificado a partir da década de 1980, quando a doença disseminou-se pelas Américas. (MARTINEZ, 1990).

Na atualidade a doença ocorre em mais de 100 países e 2,5 bilhões de pessoas estão expostas a contraí-la nas áreas urbanas, Peri urbanas e rurais dos trópicos e subtropicais. A dengue é endêmica na África, nas Américas, no Leste do Mediterrâneo, no Sudeste Asiático e no Oeste do Pacífico. Existe um aumento significativo na incidência de dengue e dengue hemorrágica nas Américas. Até 1970, somente nove países registraram epidemias de FHD – Febre Hemorrágica da Dengue. Em 1995, este número tinha aumentado quatro vezes mais. Em 1950, eram notificados, em média, 900 casos de FHD/ano, entre 1990 a 1998, as notificações já eram mais de 500 mil casos/ano. Em 1998, um total de 1,2 milhões de casos de dengue e FHD foram reportados à OMS, com 15.000 mortes. (WHO, 2003).

Nas Américas, em 2003, foram notificadas cerca de 483 mil casos de dengue, dos quais, dez mil eram dengue hemorrágica, aproximadamente. Destes, mais de 250 mil casos eram da América do Sul, onde, apesar de a Região Andina notificar um número em torno de 50 mil casos, nela se concentram 80% dos casos de dengue hemorrágica. (OPS, 2004).

No Brasil, a dengue se apresenta com um padrão sazonal, com maior incidência de casos nos primeiros cinco meses do ano, período mais quente e úmido, típico dos climas tropicais. (FUNASA, 1999).

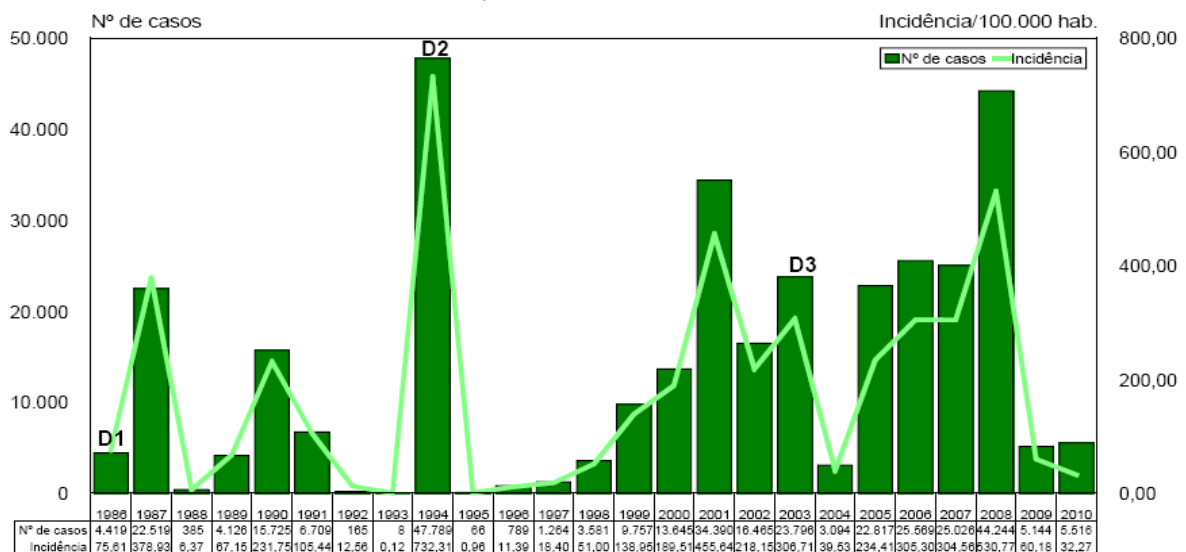
Faz-se referência à dengue no Brasil desde o ano de 1846, mas foi a partir de 1986, que a dengue adquiriu importância epidemiológica, quando da epidemia no Estado do Rio de Janeiro, e a circulação do sorotipo 1 – DEN1, que rapidamente alcançou a Região Nordeste. (SCHATZMAYR, 2000; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002). E daí por diante tornou-se endêmica no Brasil. No período de 1986 a 1990, as epidemias de dengue se restringiram a alguns estados da região sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais) e Nordeste (Pernambuco, Alagoas, Ceará e Bahia). (FUNASA, 1999). Em 1990, a introdução de um novo sorotipo – DENV-2, também no Rio de Janeiro, agravou a situação da doença no Brasil de uma forma geral.

A análise epidemiológica da tendência da transmissão de dengue no Brasil, até o ano de 1999, mostra que, excluindo-se o evento da capital de Roraima, Boa Vista, em 1981, do DEN-1 e DEN-4, contido rapidamente, distinguem-se três ondas epidêmicas. A primeira, entre o período de 1986 a 1987, que apresentou incidências entre 35,2 e 65,1/100.000 hab., respectivamente. A segunda, no biênio 1990-1991, apresentou maior risco à população do Ceará (249,1 casos/100.000 hab.) e do Rio de Janeiro (613,8 casos/100.000 hab.). Em 1994, ocorreu uma rápida dispersão do vetor em uma vasta extensão territorial, o que provocou uma rápida ascensão da doença, culminando em uma terceira onda epidêmica, em 1997-1998. Em 2001, o DEN-3 foi introduzido no Rio de Janeiro, sendo também detectado em Roraima. Atualmente o DEN-3 circula em 25 das 27 unidades federadas. Em 2002, foram notificados cerca de 800 mil casos de dengue, correspondente a 80% dos casos de toda a América no mesmo período, com 150 óbitos por FHD. (MS, 2003).

O estado do Ceará notifica casos de dengue desde 1986, com isolamento do sorotipo DENV-1. (Quadro 1). Nesses últimos 22 anos a dengue se manifestou de forma endêmica com o registro de quatro picos epidêmicos nos anos de 1987, 1994, 2001 e 2008. Destacam-se as epidemias de 1994, pelo maior número de casos confirmados, e 2008 com o maior número de casos hemorrágicos da doença. Em 1994, o principal fator para ocorrência dos primeiros casos hemorrágicos foi a circulação do sorotipo DENV-2. O sorotipo DENV-3 foi isolado no ano de 2002 no Ceará, aumentando significativamente o risco da ocorrência de casos graves de dengue. Desta forma, com a circulação simultânea de três sorotipos e um grande número de municípios infestados pelo *Aedes aegypti*, já a partir do ano de 2001 o número de casos graves da doença começa a aumentar. Dados ainda parciais de 2008 revelam que 92,9% dos municípios realizaram pelo menos 5 ciclos de visitas domiciliares e destes, 42,4% alcançaram a meta do Ministério da Saúde, de 6 ciclos de visitas domiciliares. Na

última avaliação desses ciclos, 76% dos municípios encontrava-se com infestação vetorial inferior a 1%, meta preconizada pelo Ministério da Saúde do Brasil. No ano de 2008 o Ceará apresentou o segundo maior número de casos de dengue desde 1986. Isso ocorreu principalmente em virtude de elevadas infestações pelo *Aedes aegypti*, a circulação simultânea de três sorotipos virais com predomínio do sorotipo DENV2 e um grande contingente populacional susceptível à doença. Chamou atenção o mês de abril, com quase 13.000 casos confirmados. Além disso, mais de 80% dos casos clássicos ocorreram em apenas 34 municípios do Estado. A incidência de dengue nesse ano foi superior a 300/100.000 habitantes em 33 municípios. Outros 34 municípios apresentaram incidência entre 101 e 300/100.000 habitantes, 79 municípios entre 1 e 100/100.000 habitantes e 38 municípios com incidência inferior a 1 para cada 100.000 habitantes. (SESA, 2009).

Número de casos e incidência de dengue, no Ceará, de 1986 à 2010*



Fonte: SESA/COPROM/NUVEP
* Dados sujeitos à revisão.

Gráfico 01 – Número de casos e incidência de dengue, no Ceará, de 1986 à 2010.

Foram notificados 9.713 casos suspeitos de dengue em 148 municípios, distribuídos em 21 Coordenadorias Regionais de Saúde. Destes, 5.516 casos foram confirmados em 79 municípios e 4.197 amostras foram negativas. Destaca-se o município de Tauá, com 1.337 casos, que começou a apresentar um aumento de notificações já no final de 2009.

Foram notificados 66 casos suspeitos de Febre Hemorrágica da Dengue. Destes, 25 casos (1 óbito) confirmados de FHD, 32 casos (2 óbitos) de Dengue com complicação. Foram descartados outros 7 casos, e continuam sob investigação 2 casos destes (1 óbito) em Fortaleza. (SESA, 2010).

1.2 Dengue hemorrágica e seu quadro epidemiológico

O perfil epidemiológico da FHD, no Brasil vêm sofrendo mudanças, visto as epidemias que têm ocorrido com o passar dos anos e em diferentes locais. (DONALISIO, 1999). Em meados de 1950, a FHD foi descrita, pela primeira vez, nas Filipinas e Tailândia. Após a década de 60, a circulação do vírus do dengue intensificou-se nas Américas. (FUNASA, 2001).

Em 1963, houve circulação dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 em vários países. Em 1977, o sorotipo DENV-1 foi introduzido nas Américas, pela Jamaica. A dispersão da FHD nas Américas ocorreu nos seguintes países: Brasil (1982/1986-1996), Bolívia (1987), Paraguai (1988), Equador (1988), Peru (1990) e Cuba (1977/1981). A FHD afetou Cuba em 1981 e este foi um evento de extrema importância na história da doença nas Américas, visto que essa epidemia foi causada pelo sorotipo DENV-2, tendo sido o primeiro relato de febre hemorrágica da dengue ocorrido fora do Sudoeste Asiático e Pacífico Ocidental. (FUNASA, 2001).

A Venezuela foi a protagonista do segundo surto, em 1989, e, em 1990/1991, alguns casos foram notificados no Brasil (Rio de Janeiro), bem como em 1994 (Fortaleza - Ceará). No Brasil, há referências de epidemias em 1916, em São Paulo, e em 1923, em Niterói, sem diagnóstico laboratorial. A primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista - Roraima, causada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4. A partir de 1986, foram registradas epidemias em diversos estados. (FUNASA, 2001).

A incidência de dengue hemorrágica, nos adultos no Rio de Janeiro, contrariou o quadro epidemiológico apresentado na Ásia e em Cuba, onde a maior incidência foi em crianças, mudança no comportamento da endemia pode ser argumentada a partir da seguinte

hipótese: A “virgindade imunológica” da população carioca, ou seja, a população adulta exposta de forma mais intensa à re-infecção. (VALDÉS, 1999).

No estado do Ceará, em 2009 apesar de 180 (97,8%) municípios apresentarem infestação pelo *Aedes aegypti* e de 112 (60,9%) municípios terem transmissão comprovada de dengue ocorreu uma redução no número de casos clássicos notificados, em relação ao ano anterior. Por outro lado, a letalidade de FHD foi de 34,6% (9/26) e por Dengue com Complicação foi de 45% (31/69). Essa situação ocorreu em virtude da maior circulação do sorotipo DENV-2 e a um grande contingente populacional já sensibilizado pelos outros sorotipos virais (DENV-1 e DENV-3). (SESA, 2010).

No ano 2000 havia o registro de 1 caso de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) para 3.411 casos de dengue clássica. (Gráfico 2). Em 2008, com os dados ainda não encerrados essa proporção foi de 100 casos clássicos para cada caso hemorrágico. Além do aumento na proporção de casos hemorrágicos, destacamos a diminuição na faixa etária dos pacientes acometidos. A cada ano aumenta, proporcionalmente, o número de casos acometendo crianças e adolescentes. A mediana de idade dos pacientes decresceu de 38 anos em 2001, para 18 anos em 2008. (SESA, 2010).



Fonte: SESA/COPROM/NUVEP

Gráfico 02 – Razão de forma clássica e Hemorrágica de Dengue 1999 a 2010.

1.3 O vírus da dengue

A Dengue é causada pelo agente etiológico *Dengue vírus*, o qual pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Esta família compreende 3 gêneros distintos: *Flavivirus* (ao qual pertence o vírus da Febre Amarela e uma série de encefalites transmitidas por artrópodes), *Pestivirus* (vírus encontrados em suínos e ruminantes) e *Hepacivirus* (vírus da Hepatite C em humanos). Estes gêneros são antigenicamente distintos entre si, mas em relação a sua organização genômica são bastante semelhantes, é composto de RNA de fita simples sentido positivo que codifica uma única fase aberta de leitura (ORF - *open reading frame*). As proteínas virais são sintetizadas como uma poliproteína que é clivada co-traducionalmente e pós-traducionalmente por proteases celulares e virais (FAUQUET *et al.*, 2005). (Figura 1)

Especificamente o vírus da dengue é um vírus envelopado, com material genético em uma fita de RNA sentido positivo que possui cap na região 5' mas não apresenta cauda poli-A na região 3' (HENCHAL; PUTNAK, 1990). Seu genoma consiste de 10.644 nucleotídeos organizados em uma única fase de leitura aberta que codificam uma única poliproteína de 3.386 aminoácidos flanqueada por duas regiões não traduzidas (5' e 3' UTR – "*untranslated regions*") (ZHANG *et al.*, 1988). A poliproteína é processada para formação de três proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (pré-M) e envelope (E); e sete proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5. (KELLY *et al.*, 2000).

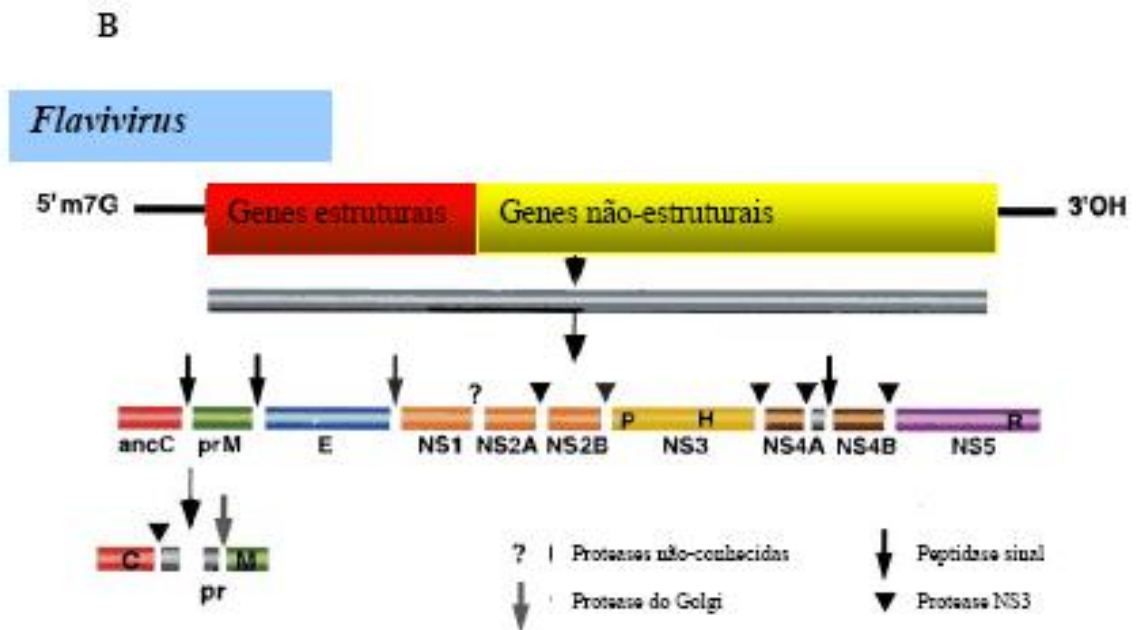
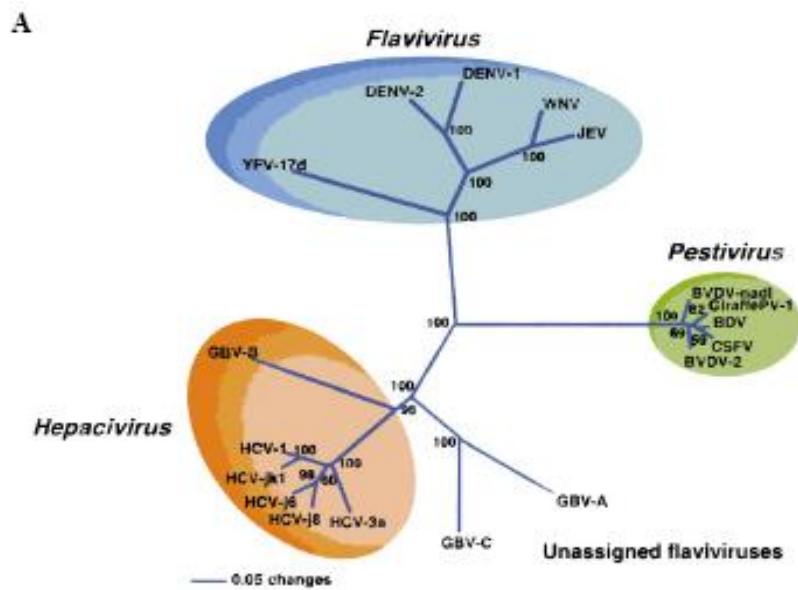


Figura 01 - a) Árvore Filogenética da família *Flaviviridae*: divisão em gêneros; b) organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*. Adaptado de Van Regenmortel *et al.*, 2000

A partícula viral madura apresenta as três proteínas estruturais juntamente com uma bicamada lipídica empacotando o genoma de RNA viral. A proteína C, do nucleocapsídeo. Envolve o RNA, mas que é permeável a RNases, fazendo o papel de proteção do envelope lipídico mais importante. A proteína E e a proteína pré-M encontram-se imersas na bicamada lipídica (HENCHAL; PUTNAK, 1990) (Figura 02). Assim como acontece com os vírus da influenza e os alphavirus, os flavivirus entram na célula por endocitose mediada por receptor. O ambiente ácido fílico do endossomo é responsável por desencadear uma mudança conformacional nas glicoproteínas de fusão (REY, 2003). Neste caso, a mudança ocorre na glicoproteína do envelope (E) que é a responsável tanto pela ligação ao receptor quanto pelo processo de fusão com a membrana celular do endossomo e liberação dos componentes virais no citoplasma celular. Assim sendo, a correta organização do envelope viral é essencial durante as fases de adsorção e penetração (HENCHAL; PUTNAK, 1990). A bicamada lipídica é obtida no retículo endoplasmático celular, por brotamento, tem em sua composição a proteína do envelope (E) e a proteína precursora da membrana (pré-M). A partícula passa pela via secretória, a pré-M é clivada por uma furino-protease e passa a assumir a sua forma madura constituindo a proteína de Membrana (M). A clivagem permite que as partes da proteína E que se projetam do vírus fiquem mais evidentes e a saída do vírus ocorre por exocitose (MODIS *et al.*, 2003). A clivagem de pré-M em M é fundamental para a infectividade do vírus, pois partículas imaturas não são capazes de promover a fusão do vírus com membranas celulares, inclusive com a do endossomo. Entretanto, a maturação da partícula a torna mais lábil e menos resistente sendo a partícula imatura inerte mais estável (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

Morfologia

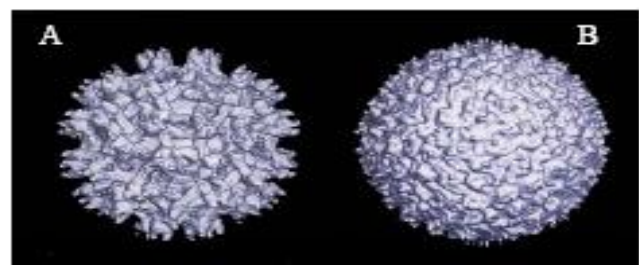
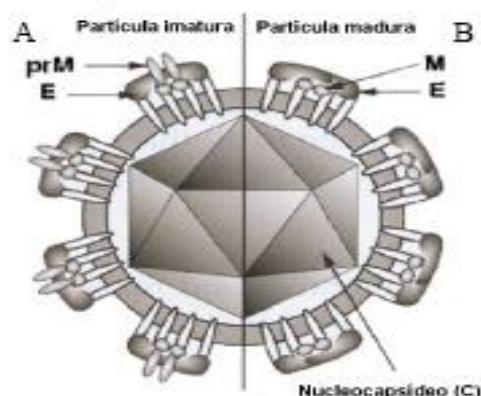


Figura 02 - Esquema da partícula viral imatura (A) e madura (B) do *Dengue vírus*. A figura da direita corresponde à uma reconstrução de microscopia eletrônica de congelamento das partículas de um isolado de *Dengue vírus*. Adaptado de Van Regenmortel *et al.*, 2000.

1.4 O vírus e suas variações genéticas

A detecção dos quatro sorotipos do DENV foi feita por critérios sorológicos. A escala evolutiva teve o DENV-4 como o primeiro a se diferenciar, seguido pelo DENV-2, DENV-3 e DENV-1 (MACKENZIE; GUBLER *et al.*, 2004). Rico-Hesse (1990), descreveu baseados no seqüenciamento de 240 nucleotídeos na região E/NS1, cinco grupos genotípicos para o DENV-1 e também para o DENV-2. Em estudos semelhantes foram descritos quatro grupos genéticos para o DENV-3 e dois para o DENV-4 (LANCIOTTI; LEWIS *et al.*, 1994; LANCIOTTI; GUBLER *et al.*, 1997). O genótipo asiático do DENV-2 está intimamente ligado à dispersão de FHD no Sudeste Asiático, aqui na América o genótipo Americano foi isolado em pacientes com FD. (RICO-HESSE; HARRISON *et al.*, 1997).

A partir de 1943, pesquisadores utilizaram camundongos recém-nascidos para amplificar o vírus por inoculação intracerebral, e a partir destes estudos os quatro sorotipos do vírus da Dengue começaram a ser descritos. (HENCHAL; PUTNAK, 1990). Devido à dificuldade de estabelecer *in vitro* o vírus da dengue, os anticorpos de pacientes serviram de base para uma classificação dos sorotipos, o que ocorre por anticorpos neutralizantes produzidos pelo organismo em resposta à infecção, reagindo contra a proteína E e as proteínas não-estruturais NS1 e NS3 (STEPHENSON, 2005). Os anticorpos anti-E inibem a ligação do vírus à célula e a produção de anticorpos anti-NS1 promove ativação do sistema complemento e conseqüente lise da célula infectada (CHATURVEDI *et al.*, 2005). Quando ocorre uma infecção subsequente com um segundo sorotipo, o indivíduo se torna mais susceptível ao desenvolvimento de Dengue hemorrágica. (LEITMEYER *et al.*, 1999).

1.5 Dengue clássica e febre hemorrágica da dengue

A DC é uma doença infecciosa aguda que pode ocorrer tanto nas infecções primárias como nas infecções secundárias, afetando pessoas em todas as idades. A característica da DC é o surgimento súbito de febre alta, dor de cabeça, dor retro-orbital, artralgia, mialgia, anorexia e desconforto abdominal. Eritemas maculo-papulares podem ser detectados em alguns casos. A febre em alguns casos é bifásica, podendo durar de 2 a 7 dias. Manifestações hemorrágicas podem ocorrer, como petéquias, epistaxe, gengivorragias, sangramento gastrointestinal, hematúria, hematêmese, apesar de incomuns na DC, podem ocorrer em alguns casos (GUBLER, 1998; MALAVIGE *et al.*, 2004).

A FHD no início é indistinguível da Dengue Clássica, manifestando-se com febre, cefaléia, dor retro-orbitária e mialgia. A diferença é que no momento da defervescência ocorrem alterações fisiopatológicas graves que a diferenciam da DC. Essas alterações são decorrentes de um aumento da permeabilidade vascular, resultado das citocinas, que leva ao extravasamento de plasma para o interstício, manifestado por hemoconcentração, levando ao choque hipovolêmico em aproximadamente metade dos casos. A FHD é também caracterizada por anormalidades hemostáticas multifatoriais, incluindo trombocitopenia e diátese hemorrágica mais severa que na DC, freqüentemente manifestando-se com petéquias, epistaxe, hematêmese, melena ou hematoquezia. (GONZALEZ *et al.*, 2001.) Em muitos pacientes ocorrem manifestações hemorrágicas mínimas presentes apenas à prova do laço (CUNHA, 1997).

Dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, hepatomegalia dolorosa, derrames cavitários, prova do laço positiva, petéquias, púrpura, hematoma, gengivorragia, epistaxe, metrorragia, sangramentos importantes, hipotensão arterial (sistólica ≤ 90 mmhg), hipotensão postural (diferença de ≥ 10 mmhg entre a PA sistólica em duas posições); diminuição da diurese, agitação ou letargia, pulso rápido e fraco, extremidades frias e cianosadas, diminuição brusca da temperatura associada à sudorese, taquicardia intensa e lipotímia, são sinais clínicos considerados como alerta para FHD. (LUM; 2002).

1.6 Patogênese da dengue e suas teorias

A diversidade nas manifestações clínicas causadas pelo DENV induziu a formulação de teorias propostas, que buscam explicar as diferentes reações ao vírus nas formas de DC e FHD, mas antes se faz necessário entendermos como o vírus se comporta ao ser inoculado no organismo. O vetor inocula o vírus no espaço subcutâneo ou no intradérmico. A replicação viral ocorre provavelmente nas células retículo-endoteliais, células de Langerhans ou nos fibroblastos, as quais levam o vírus até os linfonodos regionais, favorecendo a disseminação no sangue, nos monócitos preferencialmente (ROTHMAN, 1997). Monócitos humanos inoculados *in vitro* confirmaram a susceptibilidade deles à replicação viral do DENV (ESPINA *et al.*, 2003; NEVES-SOUZA *et al.*, 2005). Wu e colaboradores (2000) confirmaram que células dendríticas (DCs) intersticiais e células de

Langerhans são mais permissivas ao vírus que monócitos e macrófagos, fazendo das DCs principais alvos do DENV.

O desenvolvimento da doença é multifatorial e envolve tanto o modo de infecção viral e suas variações até a reação do indivíduo hospedeiro e a resposta do seu sistema imunológico à infecção. Estudos filogenéticos sugerem que vírus contendo algumas seqüências genômicas específicas, que caracterizam os vírus em genótipos distintos, apresentam maior virulência e acabam por influenciar na evolução da doença para a dengue hemorrágica. Os genótipos mais virulentos são de vírus oriundos do sudeste da Ásia que produzem viremias com títulos virais maiores e são capazes de infectar mais mosquitos vetores. Essa classificação em genótipos é relativamente nova, já que a variabilidade do vírus era antes descrita apenas por sorotipos, referentes aos anticorpos neutralizantes produzidos na fase pós-virêmica (COLOGNA *et al.*, 2005).

1.6.1 Teoria da virulência viral

A extensa variação genética do DENV possibilita a classificação desse vírus em grupos denominados genótipos (RICO-HESSE, 1990). Estudos filogênicos e epidemiológicos comprovam que genótipos específicos são capazes de produzir maior incidência de DC e/ou FHD em população de estado imunológico variado. (LEITMEYER *et al.*, 1999; WATTS *et al.*, 1999; COLOGNA *et al.*, 2005).

1.6.2 Teoria da facilitação dependente de anticorpo

Esta teoria explica porque indivíduos que têm infecção secundária de DENV têm maior propensão de desenvolverem FHD em relação aos indivíduos de infecção primária. Isso ocorreria devido a linhagem monocítica ser o principal alvo de infecção dos DENV e pelos mesmos disporem de alta expressão de receptores FcRy. Sendo assim, os anticorpos não-neutralizantes, da primeira infecção, ligados aos vírus, seriam atraídos para a superfície celular através da ligação da porção Fc da imunoglobulina com o FcRy, aproximando o vírus de seu receptor e tendo como resultado o aumento da infecção das células (HALSTEAD, 2003).

1.6.3 Teoria do mimetismo molecular

A comparação entre o gene da proteína E e de proteínas da coagulação humana revelaram trechos com homologia entre eles (BIELEFELDT-OHMANN, 2000), o que levaria anticorpos de reatividade cruzada a influenciarem nas cascatas de coagulação e a presença desses anticorpos foi correlacionada com as manifestações hemorrágicas, mas não com a FHD (CHUNGUE *et al.*, 1994).

1.6.4 Teoria do “Pecado original”

Esta teoria também é utilizada para outras doenças, ocorre que durante a priminfecção uma expansão clonal de células T com maior afinidade pelos epítomos presentes no sorotipo infectante, ocasionando a formação de células de memória para o sorotipo. Entretanto na segunda infecção as células de memórias geradas na primeira infecção seriam ativadas e se expandiriam mais rapidamente que as células virgens específicas para o sorotipo infectante, e por terem menor afinidade pelos antígenos virais presentes, os clones de células T de memória seriam menos efetivos na eliminação viral, porém teriam alta capacidade de liberação de citocinas pró-inflamatórias, influenciando na imunopatologia da doença (MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003).

1.6.5 Teoria da interação multifatorial

Existem alguns autores que acreditam que os riscos do desenvolvimento da FHD são resultantes multifatoriais (sorotipo, virulência viral, idade, sexo, status do sistema imunológico, fatores nutricionais e fatores genéticos do hospedeiro) estes interagem para o nível de resposta contra a infecção, sendo ela benéfica ou prejudicial ao hospedeiro (GUZMAN; KOURI, 2002; MALAVIGE *et al.*, 2004).

1.6.6 Teoria do polimorfismo genético

Observou-se que indivíduos de etnia negra têm maior resistência à FHD. Fatores que suportam esta hipótese são encontrados no Haiti, onde ocorre transmissão hiperendêmica

da FHD. Ocorre uma co-circulação dos quatro sorotipos na África, com freqüentes epidemias de DC, mesmo assim são observados poucos casos de FHD (HALSTEAD; STREIT *et al.*, 2001). Também foi descrito polimorfismo nos genes do antígeno leucocitário humano (Human Leukocyte Antigen – HLA) o qual foi correlacionado com o aumento ou diminuição da suscetibilidade a FHD (LOKE; BETHELL *et al.*, 2001) Outro estudo demonstrou a ocorrência nos genes do fator de necrose tumoral-TNF- α , e do receptor IIA de FcRy que foram correlacionados alguns alelos com a ocorrência de FHD (LOKE; BETHELL *et al.*, 2002; FERNANDEZ-MESTRE; GENDZEKHADZE *et al.*, 2004). Em alguns grupos étnicos tailandeses foi demonstrada uma associação entre um alelo do promotor da molécula DC-SING e a freqüência de DC e FHD (SAKUNTABHAI; TURBPAIBOON *et al.*, 2005).

1.7 Citocinas e dengue

As citocinas são produzidas por tipos celulares diferentes, particularmente, pelas células mononucleares, atuando de forma complexa e coordenada, podendo estimular ou inibir sua própria síntese, assim como, de outras citocinas e de seus receptores. Além disso, as citocinas atuam em conjunto, sendo comum haver sobreposição e redundância nas funções de cada citocina isoladamente (FRASER; LILL; FINGLIN, 1996). Algumas citocinas têm ação primordialmente pró-inflamatória, enquanto outras são predominantemente antiinflamatórias. Assim, o resultado final do equilíbrio entre as citocinas pró e antiinflamatórias pode, aparentemente, influenciar no desenvolvimento clínico de doenças auto-imunes, infecciosas ou neoplásicas (HÄSSIG *et al.*, 1998; CUNHA-NETO *et al.*, 1998; CLERICI *et al.*, 1998; WU; KURMAN, 1997). Dessa forma, o polimorfismo dos genes responsáveis pela produção das citocinas poderia influenciar seus níveis de expressão e a resposta imune (BIDWELL *et al.*, 1999). Foram descritos vários polimorfismos nos genes do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), do interferon- γ (IFN- γ), do fator β de crescimento e transformação (TGF- β), da interleucina-6 (IL-6) e da interleucina-10 (IL-10) (BIDWELL *et al.*, 1999).

Pesquisadores taiwaneses descobriram um modo de evitar que a dengue clássica assuma as formas mais graves - a dengue hemorrágica ou a síndrome do choque da dengue. A chave para compreender as formas mais letais da doença é uma substância, a CLEC5A, presente na membrana das células infectadas pelo vírus da dengue. Ela reconhece a presença do invasor e dispara um complexo mecanismo imunológico que culmina na liberação de

citocinas pró-inflamatórias, proteínas capazes de inflamar tecidos. O problema ocorre quando o organismo perde o controle sobre o processo. (CHEN *et al.*, 2008).

Diferenças na susceptibilidade e gravidade da doença não podem ser atribuídas exclusivamente à virulência do vírus; as variações na resposta imune, frequentemente associadas com polimorfismo no genoma humano, já podem ser detectados. Apesar dos extensos estudos, a patogênese da FHD é ainda não completamente compreendida. (CHATURVEDI; NAGAR; SHRIVASTAVA, 2006).

Estudos recentes demonstraram que o polimorfismo do gene MBL2, protege contra o desenvolvimento de trombocitopenia associada ao fenótipo de dengue grave. (SANTOS; SEGAT *et al.*, 2008). Soundravally e Hoti (2007), obtiveram como resultados de seu estudo, que padrões genéticos homozigotas e heterozigotas das HPA1 são mais comuns em pacientes com FHD e SCD. Assim, a auto-imunidade contra esses “antígenos”, mediado pela ligação do complexo anticorpo-vírus da dengue para o HPA a glicoproteínas, poderia ser uma das razões da destruição plaquetária na infecção por dengue.

Outro estudo demonstrou que os níveis de citocinas foram superiores a três vezes no grupo de infectados com dengue vírus do que no grupo controle, com significância estatística apenas para IL-6 e IFN- γ . (RESTREPO; ISAZA *et al.*, 2008).

1.8 A imunopatologia da dengue

Estudos fornecem indícios do papel patológico de componentes da resposta imunológica à infecção pelo DENV no desenvolvimento da FHD. Como sabemos o vírus infecta monócitos, macrófagos e células dendríticas que são células apresentadoras de antígenos e podem produzir diferentes citocinas e outros fatores solúveis quando infectadas. Em 1991, foi demonstrado que os pacientes com FHD apresentavam altos níveis de TNF- α , sendo sugerido um papel fundamental no choque hipovolêmico (VITARANA *et al.*, 1991). Altos níveis do TNF- α foram correlacionados com as manifestações hemorrágicas (BRAGA; MOURA *et al.*, 2001).

Pacientes com FHD apresentam altos níveis de IL-6, e vários autores correlacionam a presença dessas citocina com a gravidade da doença (JUFFRIE; MEER *et al.*, 2001; AVILA-AGUERO *et al.*, 2004; CHEN; LEI *et al.*, 2006).

Elevados níveis de IL-10 e de IFN- γ , foram relatados em pacientes com DC e FHD, a geração de citocinas antiinflamatórias estaria ocorrendo na tentativa de balancear a inflamação (AZEREDO; ZAGNE *et al.*, 2001; NGUYEN; LEI *et al.*, 2004). Foram descritos também altas concentrações de IFN- α , em pacientes com DC e FHD. O IFN- α é uma citocina que induz resistência aos vírus por ativar vias intracelulares não citolíticas que limitam a dispersão viral e atenuam a infecção (GRANDVAUX; TENOEVEVER *et al.*, 2002). Estudo relata que o IFN- α imita a replicação do DENV no sistema nervoso central de camundongos (SHRESTA; KYLE *et al.*, 2004). Outro estudo indica que o DENV inibe a ação do IFN- α e não do IFN- γ , através da diminuição da expressão do transdutor de sinal e ativador de transcrição 2 (STAT-2) (JONES; DAVIDSON *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que células CD4+ e CD8+ específicas para o DENV produzem predominantemente altos níveis de IFN- γ , TNF- α e TNF- β , além de quimiocinas, após interação com células apresentadoras de antígenos infectadas (GAGNON; ENNIS *et al.*, 1999).

De uma forma geral o reconhecimento dos patógenos intracelulares, ativa as vias de produção de citocinas pró-inflamatórias pelas DCs, que atuam de forma autócrina e parácrina, induzindo assim mais produção de citocinas. Ocorrendo desta forma na DC e FHD.

TNF- α – Considerada uma citocina multifuncional, é o mais importante mediador inflamatório. Induz a produção de outras citocinas e quimiocinas, induz a expressão de moléculas de adesão, aumenta a permeabilidade do endotélio, o que propicia maior número de células mononucleares no local da inflamação (VASSALLI, 1992; CERAMI, 1993). Esta citocina induz as vias de produção dos reativos do oxigênio, e sua ligação aos seus receptores pode ativar a via das caspases e desencadear o processo de apoptose celular (HEHLGANS; PFEFFER, 2005). Quando liberado em altas concentrações pode causar danos teciduais, e ser o responsável pelos quadros de hipotensão, supressão do miocárdio, extravasamento plasmático e estimulação de cascatas de coagulação em condições patológicas como na sepse bacteriana e na Febre da Dengue (PINTO; OLIVEIRA *et al.*, 1999; PFEFFER, 2003).

IFN- γ – É produzido nas células T helper 1, e são responsáveis pela manutenção da resposta imune celular. Age sobre os macrófagos, estimulando a fagocitose e os

mecanismos de ativação celular, levando a uma maior produção de TNF- α , que fortalece a ativação macrófaga, atuando em um mecanismo sinérgico cíclico (ANTAS *et al.*, 2004).

TGF- β – Esta citocina tem ação supressora sobre macrófagos, inibe a produção de TNF- α e reduz a produção de IFN- γ , dessa forma podendo contribuir para a continuidade da infecção (WARWICK-DAVIEIS *et al.*, 1995).

IL-6 – É considerada uma citocina pleiotrópica, e auxilia na regulação da reatividade imunológica, na fase aguda, na inflamação, na oncogênese e na hematopoiese. Níveis plasmáticos de IL-6 foram correlacionados com mortalidade no choque séptico (SONG; KELLUM, 2005).

IL-10 – Possui a função de modulação imunológica, diminui a expressão dos marcadores de maturação das DCs, diminui a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-12, bem como a expressão das moléculas co-estimulatórias (WALLET; SEM *et al.*, 2005). Nos quadros de sepse, no início da doença existem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias que são seguidas por um perfil de citocinas imunossupressoras no desenvolvimento da doença, sendo assim não se sabe ao certo se a IL-10 seria um mecanismo compensatório ou imunopatológico. (SCUMPIA; MOLDAWER, 2005).

2 JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

A endemicidade da Dengue no Brasil, somado aos óbitos que continuam ocorrendo atualmente, já justificava a importância do estudo. E considerando a possibilidade do agravamento da doença esta correlacionado a alterações em diversas regiões genômicas de algumas citocinas, e ao buscarmos detectar estas alterações, nos colocamos um passo a frente do desenvolvimento da doença.

O processo patológico da dengue é bastante complexo e poligênico, existe por tal a extrema necessidade de se aprofundar acerca das variações existentes nos genes, correlacionando-os com o agravamento da doença. Sabemos que existem diferenças populacionais em relação ao perfil genético de susceptibilidade ou de proteção. Estamos, portanto, dando nossa colaboração com outros estudos que buscam elucidar alguns pontos ainda obscuros no processo de desenvolvimento da FHD, visto a possibilidade de se ter correlação existente nos genes das citocinas com polimorfismo, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-6 e IL-10, no agravamento da doença de pacientes com FHD.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar polimorfismo das citocinas TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-6 e IL-10 relacionados com o agravamento da doença em pacientes com Febre Hemorrágica da Dengue – FHD, em Fortaleza, Ceará.

3.2 Específicos

1. Relacionar os polimorfismos dos genes das citocinas TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-6 e IL-10, em pacientes com Febre Hemorrágica da Dengue – FHD, e seus respectivos controles, através de PCR.
2. Identificar alelos de susceptibilidade ou proteção para FHD, nos genes das citocinas citadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do estudo

O estudo foi realizado em Fortaleza, no período de maio de 2009 a maio de 2010. Fortaleza é a capital do Estado do Ceará, atualmente tem uma população estimada em 2.505.552 habitantes (IBGE, 2009), com uma densidade demográfica de 7.851,3 Hab/Km², pólo turístico com intensa circulação de pessoas de outros municípios, estados e países.

4.2 População de estudo

Foram incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico clínico/laboratorial de FHD, que satisfaçam os critérios de inclusão e que aceitaram participar do estudo. Selecionamos dois grupos: um de casos-índice e outro de controle, pessoas que não desenvolveram clinicamente a doença.

O grupo caso-índice foi composto de 48 indivíduos das mais diversas faixas etárias, para os menores de idade obtivemos autorização dos pais e/ou responsáveis, que tenham tido notificação e confirmação de caso conforme os critérios estabelecidos pelo MS de casos confirmados de FHD. (MS, 2002).

Os dados epidemiológicos foram obtidos a partir de instrumento de coleta padrão, o qual foi preenchido no momento da coleta do material (sangue periférico).

O grupo controle, 85 indivíduos, foi obtido a partir de pessoas que foram doar sangue no HEMOCE. Salientando que os mesmos foram plenamente esclarecidos sobre o estudo.

4.3 Critérios de elegibilidade

Todos os indivíduos que foram considerados elegíveis, tinham sido diagnosticados e confirmados com FHD, sob os critérios de definição de casos do Ministério

da Saúde. (MS, 2002). Os indivíduos do grupo controle, foram obtidos a partir de pessoas que doaram sangue no HEMOCE, e que aceitaram os termos contidos no TCLE.

4.4 Coleta das amostras de sangue periférico

A coleta da amostra do sangue periférico das pessoas envolvidas no estudo, com o consentimento dos mesmos, foi feita em Fortaleza, e encaminhado a amostra ao Laboratório de Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará-UFC, para ser feita a extração do DNA, e tipificação do polimorfismo das citocinas estudadas. De cada indivíduo envolvido no estudo foram coletados 3ml de sangue por punção venosa, sendo utilizados para isto tubos vacutainer com EDTA como anticoagulante.

4.5 Processo de Extração do DNA

A lise celular para extração do DNA é feita com o seguinte processo, mas se observa antes o volume, de sangue, a ser processado, e caso este sejafor $> 200 \mu\text{l}$, é preciso acrescentar, até o volume descrito, Genomic lise, contido no kit PureLink™ (Invitrogen). Em seguida preparar o “banho maria” a 55°C . No tubo estéril colocar o sangue fresco ou descongelado até o volume de $200 \mu\text{l}$, adicionar $20 \mu\text{l}$ de Proteinase K (fornecido com o kit), adicionar $20 \mu\text{l}$ de RNase A (kit), homogeneizar em vortex. Em seguida deixar à temperatura ambiente por 2 minutos, adicionado $200 \mu\text{l}$ de PureLink™ Genomic lise, homogeneizar em vortex, e incubar até 55°C durante 10 minutos para promover a digestão protéica. Após este tempo acrescentar $200 \mu\text{l}$ de etanol a 96-100%, homogeneizar por 5 seg. em vortex. Remover o lisado e passar para a “coluna spin” do kit. O lisado deverá ter um volume semelhante a $640 \mu\text{l}$; em seguida centrifugar a 10.000 rotações por 1 minuto. O tubo é descartado com o produto da centrifugação, e a coluna spin é reutilizada, sendo colocado em outro tubo, acrescentando-se $500 \mu\text{l}$ de Buffer 1 (kit). Centrifugar a 10,000 rotações por 1 minuto em temperatura ambiente. Após isto, descartar o tubo e o produto da centrifugação, em seguida colocar $500 \mu\text{l}$, de Buffer 2 (kit), e centrifugar a 14.000 rotações por 3 minutos. Após isso, descartar a coleção da centrifugação e reutilizar a coluna spin, que será adicionada de 25 à $200 \mu\text{l}$ de PureLink™ Genomic Elution Buffer, dependendo do resultado a ser obtido, centrifugar a 14.000 rotações por 1 minuto. O resultado do material centrifugado contem o DNA extraído.

4.6 Processo de tipificação do polimorfismo de citocinas

Os Polimorfismo de Nucleotídeo Único - SNPs, dos genes das citocinas (TNF- α -308 G \rightarrow A, IFN- γ +874T \rightarrow A, TGF- β 1 códon 10 e códon 25 , IL-6 -174G \rightarrow A e IL-10 -1082G \rightarrow A, -819C \rightarrow T, -592A \rightarrow C), para a tipificação foi utilizado a técnica de PCR - reação de cadeia da polimerase, utilizando-se iniciadores de seqüência específica, no qual foi empregado kit da One-Lambda (Canoga Park, CA, USA).

Quadro 1 – Polimorfismo dos genes das citocinas tipificados.

Gene	Polimorfismo
TNF- α	-308 G \rightarrow A
IFN- γ	+874 T \rightarrow A
TGF- β	Códon 10 e códon 25
IL-6	-174 G \rightarrow A
IL-10	-1082 G \rightarrow A, -819 C \rightarrow T, -592 A \rightarrow C

O kit é composto por quatro placas de 96 poços cada, sendo uma placa suficiente para tipificar as citocinas acima citadas.

O material utilizado na tipificação das amostras foi levado à temperatura ambiente dentre eles, amostras de DNA, placas, tubos com D-Mix e água miliQ, com exceção da enzima Taq Polimerase (Invitrogen) que foi mantida sob congelamento até seu uso.

Foram identificados os tubos com D-Mix com os respectivos números das amostras, bem como a placa de tipificação (kits Cytgen, One-Lambda), adicionando-se 1 μ L de água MiliQ ao poço de controle negativo da placa. Foram adicionados 1 μ L de Taq polimerase (5U/ μ L) a cada tubo com D-Mix, fechando-os e homogeneizando por 5 seg. em vortex, logo após foi adicionado 9 μ L da mistura D-Mix + Taq polimerase ao poço de controle negativo. Após homogeneizar as amostras de DNA em vortex, foi adicionado 19 μ L da amostra ao tubo com D-Mix + Taq polimerase, fechando-os e agitando-os em vortex por 5 segundos. Nesse momento foram aliqüotados 10 μ L da solução de DNA-Taq polimerase-D-Mix, para cada um dos 15 poços restantes da placa contendo os iniciadores de seqüência-específica, em que os primers encontram-se liofilizados em cada poço da placa, que foi levada ao termociclador “Gene Amp PCR System 9700” (Applied Biosystems) e o DNA foi amplificado por intermédio da (PCR-SSP) usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial à 96°C por 130 segundos, 63°C por 60 segundos,

seguido por 9 ciclos de 96⁰C por 10 segundos, 63⁰C por 60 segundos e 20 ciclos de desnaturação à 96⁰C por 10 segundos, anelamento à 59⁰C por 50 segundos, extensão à 72⁰C por 30 segundos e logo após 4⁰C antes da utilização.

4.7 Processo de análise dos fragmentos de DNA em gel de agarose

Em gel de agarose à 1,5%, com tampão TBE 1X, foi colocado o DNA amplificado, nos poços do gel. A análise do produto de amplificação foi feita após eletroforese, utilizando-se corrente elétrica de 150V, 400mA por 7 minutos (Electrophoresis Power Supply EPS 600 – Pharmacia Biotech), para em seguida ser visualizado em transiluminador luz UV (GE Healthcare) à 304nm, após adição de brometo de etídio na concentração final de 0,5µg/mL ao gel. Em seguida o gel foi fotografado para documentação, sendo tipificados os polimorfismos de genes das citocinas (TNF- α -308 G→A, IFN- γ +874T→A, TGF- β 1 códon 10 e códon 25, IL-6 -174G→A e IL-10 -1082G→A, -819C→T, -592A→C).

4.8 Análise e interpretação da amplificação

A interpretação foi baseada na presença ou ausência da amplificação do alelo ou do grupo específico, isto é, não foi considerado o tamanho do fragmento amplificado e sim sua presença. Para controle interno da amplificação, foi utilizado um par de iniciadores não alélicos, responsáveis pela amplificação do gene da β -globina, gerando um produto de amplificação de 440 pares de bases (pb). A análise se dá basicamente na presença ou não, considerava-se positivo para o grupo de alelos ou do alelo presente. (Figura 3).

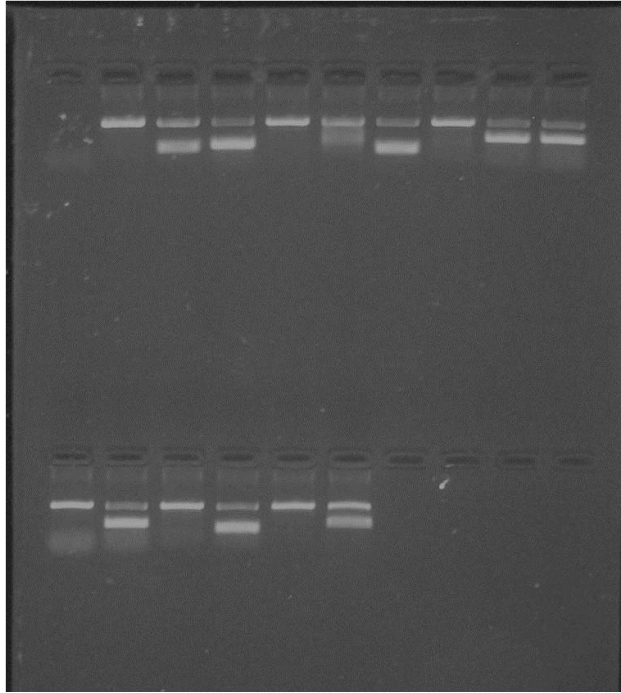


Figura 3 - Visualização das bandas através de eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando o controle interno de amplificação de 440 pb (β - globina) e os genótipos. 1 e 2: TNF- α G/G; 3 a 6: TGF- β T/T G/G ; 7 a 11: IL-10 GCC/ACC; 12 e 13 IL-6 G/G; 14 e 15: IFN- γ A/A.

4.9 Análise estatística das interpretações obtidas

Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5., para a análise estatística. Para a frequência dos alelos e genótipos foi feito o teste exato de Fisher bicaudal. Os valores de p foram calculados para cada comparação, sendo considerados significantes os valores de $p < 0,05$ com intervalo de confiança de 95%.

4.10 Considerações éticas

O estudo INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMO NOS GENES DAS CITOCINAS TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-6, E IL-10 EM PACIENTES COM FEBRE HEMORRAGICA DA DENGUE, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital SÃO JOSÉ, sob protocolo nº 017/2009. CAAE: 0018.0.042.000-09.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população estudada

Na avaliação das 48 pessoas que participaram do estudo no grupo FHD, e das 85 pessoas do grupo controle, estão distribuídos na seguinte proporção no que diz respeito ao sexo: grupo FHD, vinte e oito (58,3%) pertencentes ao sexo feminino, e vinte (41,7%) do sexo masculino, no grupo controle esta distribuição se dá com trinta e quatro (40%) de pessoas do sexo feminino e cinquenta e um (60%) do sexo masculino (Tabela 1). Entre os indivíduos envolvidos no estudo observamos uma variação de 04 a 77 anos de idade. Salientamos aqui que não houve corte por faixa etária visto a não correlação desta variável com a presença de polimorfismo nos genes.

Tabela 1 – Distribuição da população estudada por sexo.

Sexo	Grupo FHD		Grupo Controle		valores de p
	N	(%)	N	(%)	
Feminino	28	58,3	34	40,0	> 0,05
Masculino	20	41,7	51	60,0	> 0,05
Total	48	100	85	100	

No grupo FHD, observamos uma variável que poderá, em estudos futuros, ser comparada e auxiliar no esclarecimento de outros fatores que podem influenciar no agravamento da doença. Sendo assim relacionamos os indivíduos do grupo FHD, com uso contínuo de medicamentos. (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição dos indivíduos que fazem uso contínuo de medicamentos.

Uso de medicamentos	Grupo FHD	
	N	(%)
Usa medicamentos	10	20,9
Não faz uso	38	79,1
Total	48	100

5.2 TNF- α

Os resultados das tipificações encontradas nos genótipos de TNF- α -308 nos indivíduos pesquisados se encontram na Tabela 3. O genótipo G/G foi o mais freqüente, quarenta e um (85,4%) no grupo FHD, o mesmo ocorrendo no grupo controle, onde sessenta e sete (78,8%) foi encontrado. O genótipo A/A não foi encontrado no grupo FHD e com baixíssima freqüência no grupo controle, onde se obteve, um (1,2%). Não ocorreram diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

Tabela 3 – Freqüência dos genótipos de TNF- α -308 nos indivíduos dos grupos estudados.

TNF- α -308	Grupo FHD		Grupo Controle		valores de p
	N	(%)	N	(%)	
A/A	0	0,0	1	1,2	> 0,05
G/A	7	14,6	17	20,0	> 0,05
G/G	41	85,4	67	78,8	> 0,05
Total	48	100	85	100	

Para determinação dos valores de p foi utilizado o teste de Fisher bicaudal.

No que diz respeito à freqüência dos alelos de TNF- α -308, foi detectado maior freqüência do alelo de TNF- α -308G, oitenta e nove (92,8%) no grupo FHD, o mesmo ocorrendo no grupo controle, cento e cinquenta e um (88,8%). Não ocorreu diferenças estatísticas significantes entre os grupos analisados.

Tabela 4 – Freqüência dos alelos de TNF- α -308 nos indivíduos dos grupos estudados.

TNF- α -308	Grupo FHD	Grupo Controle	valores de p
	n (%)	n (%)	
G	89 (92,8)	151 (88,8)	> 0,05
A	7 (7,2)	19 (11,2)	> 0,05

5.3 IFN- γ

As tipificações encontradas nos genótipos de IFN- γ +874 nos indivíduos da amostra pesquisada se encontram na Tabela 5. O genótipo T/A foi o mais freqüente no grupo FHD, vinte e três (47,9%), o mesmo ocorrendo no grupo controle, cinquenta (58,8%). O genótipo T/T, teve a menor freqüência, dez (20,9%) no grupo FHD, como também no grupo controle, oito (9,4%) . Não observamos diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Tabela 5 – Freqüência dos genótipos de IFN- γ +874 nos indivíduos dos grupos estudados.

IFN- γ +874	Grupo FHD		Grupo Controle		valores de p
	N	(%)	N	(%)	
A/A	15	31,3	27	31,8	> 0,05
T/A	23	47,9	50	58,8	> 0,05
T/T	10	20,8	8	9,4	> 0,05
Total	48	100	85	100	

Para determinação dos valores de p foi utilizado o teste de Fisher bicaudal.

No que diz respeito à freqüência dos alelos do IFN- γ +874, demonstramos os resultados na Tabela 6. Não observamos diferenças estatísticas significantes entre os grupos. O alelo mais freqüente foi o IFN- γ +874A, tanto no grupo FHD, cinquenta e três (55,2%) como no grupo controle, cento e quatro (61,2%).

Tabela 6 – Freqüência dos alelos de IFN- γ +874 nos indivíduos dos grupos estudados.

IFN- γ +874	Grupo FHD	Grupo Controle	valores de p
	n (%)	n (%)	
A	53 (55,2)	104 (61,2)	> 0,05
T	43 (44,8)	66 (38,8)	> 0,05

5.4 TGF- β 1

Na tabela 7, demonstramos os resultados das tipificações encontradas nos genótipos de TGF- β 1 códon 10 e códon 25 nos indivíduos da amostra pesquisada. O genótipo T/C G/G foi o mais freqüente no grupo FHD, vinte (41,7%), seguido do T/T G/G - onze (22,9%). No grupo controle ocorreu a repetição de freqüência nos dois genótipos respectivamente, trinta e dois (38,6%) e trinta (36,1%). Em ambos os grupos estudados não ocorreu detecção de alguns genótipos. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes.

Tabela 7 – Freqüência dos genótipos de TGF- β 1 códon 10 e códon 25 nos indivíduos dos grupos estudados.

TGF β códon 10 e códon 25	Grupo FHD		Grupo Controle		valores de p
	N	(%)	N	(%)	
T/T G/G	11	22,9	30	36,1	> 0,05
T/C G/G	20	41,7	32	38,6	> 0,05
T/C G/C	3	6,3	4	4,8	> 0,05
C/C G/G	9	18,8	14	16,9	> 0,05
T/T/ G/C	2	4,1	1	1,20	> 0,05
C/C G/C	0	0,0	0	0,0	> 0,05
C/C C/C	2	4,1	2	2,4	> 0,05
T/T C/C	0	0,0	0	0,0	> 0,05
T/C G/G	1	2,1	0	0,0	> 0,05
Total	48	100	83	100	

Para determinação dos valores de p foi utilizado o teste de Fisher bicaudal.

Ao observarmos a freqüência dos alelos do TGF- β 1 códon 10 e códon 25 (Tabela 8), concluímos que no grupo FHD, o alelo TGF- β 1 códon 10T, tem maior freqüência, cinquenta e um (53,1%), o mesmo ocorrendo no grupo controle, noventa e cinco (57,2%). O alelo TGF- β 1 códon 25G, no grupo FHD se encontra predominante, oitenta e três (86,4%), no grupo controle este alelo também tem predominância, cento e cinquenta e oito (95,2%). Não ocorreu diferença estatística significativa.

Tabela 8 – Frequência dos alelos de TGF- β 1 códon 10 e códon 25 nos indivíduos dos grupos estudados.

TGF β códon 10 e códon 25	Grupo FHD		Grupo Controle		valores de p
	n	(%)	n	(%)	
Códon 10 T	51	(53,1)	95	(57,2)	> 0,05
Códon 10 C	45	(46,9)	71	(42,8)	> 0,05
Códon 25 C	13	(13,6)	8	(4,8)	> 0,05
Códon 25 G	83	(86,4)	158	(95,2)	> 0,05

5.5 IL-6

As tipificações encontradas nos genótipos de IL-6 -174, nos indivíduos estudados estão contidas na Tabela 9. O genótipo G/G foi o mais freqüente no grupo FHD, vinte e oito (58,3%), o mesmo ocorrendo no grupo controle, quarenta e três (50,6%). O genótipo C/C foi menos freqüente nos dois grupos, dois (4,2%) e doze (14,2%), respectivamente. Não ocorreram diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

Tabela 9 – Frequência dos genótipos de IL-6 -174 nos indivíduos dos grupos estudados.

IL-6 -174	Grupo FHD		Grupo Controle		valor de p
	N	(%)	N	(%)	
G/G	28	58,3	43	50,6	> 0,05
G/C	18	37,5	30	35,3	> 0,05
C/C	2	4,2	12	14,12	> 0,05
Total	48	100	85	100	

Para determinação dos valores de p foi utilizado o teste de Fisher bicaudal.

Na Tabela 10, demonstramos a freqüência dos alelos da IL-6 -174, encontrados nos indivíduos da amostra estudada. O alelo IL-6 -174G tem maior freqüência em ambos os grupos: FHD, setenta e quatro (77,1%) e controle, cento e dezesseis (68,2%). Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os dois grupos.

Tabela 10 – Frequência dos alelos de IL-6 -174 nos indivíduos dos grupos estudados.

IL-6 -174	Grupo FHD		Grupo Controle		valores de p
	n (%)		n (%)		
G	74 (77,1)		116 (68,2)		> 0,05
C	22 (22,9)		54 (31,8)		> 0,05

5.6 IL-10

As tipificações encontradas nos genótipos de IL-10 -108, -819, -592, nos indivíduos estudados estão inseridos na Tabela 11. O genótipo GCC/ACC, foi o de maior frequência no grupo FHD, dezessete (35,5%), seguido do genótipo ATA/ATA, onze (22,9%). No grupo controle se apresentou três genótipos com a mesma frequência GCC/GCC, GCC/ACC e GCC/ATA, com dezessete (21,0%). No genótipo GCC/GCC, do grupo FHD, foi observado uma diferença estatística considerável $p=0,009$ em relação ao grupo controle. Demonstrando que existe nele fator de proteção à FHD.

Tabela 11– Frequência dos genótipos de IL-10 -108, -819, -592 nos indivíduos dos grupos estudados.

IL-10 -1082 - 819, -592	Grupo FHD		Grupo Controle		valores de p
	N	(%)	N	(%)	
GCC/GCC	2	4,2	17	21,0	> 0,009
GCC/ACC	17	35,5	17	21,0	> 0,009
GCC/ATA	7	14,6	17	21,0	> 0,009
ACC/ACC	3	6,2	5	6,2	> 0,05
ACC/ATA	8	16,6	16	19,8	> 0,05
ATA/ATA	11	22,9	9	11,1	> 0,08
Total	48	100	81	100	

Para determinação dos valores de p foi utilizado o teste de Fisher bicaudal.

Na Tabela 12, demonstramos a frequência dos alelos da IL-10 -1082, -819, -592, dos indivíduos que participaram do estudo. O alelo IL-10 -1082A, foi mais frequente no grupo FHD, diferentemente do grupo controle que teve como mais frequente o alelo IL-10 -1082G, noventa e quatro (58,0%). Este alelo tem uma significância estatística muito considerável $p=0,0001$. Sendo um fator de susceptibilidade à FHD. O alelo IL-10 -819C foi

mais freqüente no grupo FHD, cinqüenta e nove (61,5%), diferentemente do grupo controle para o mesmo alelo, IL-10 -819T, cento e onze (68,5%). Neste alelo também foi verificado diferença estatística considerável $p=0,0001$, sendo assim um fator de proteção à FHD. O alelo IL-10 -592C é mais freqüente no grupo FHD, cinqüenta e nove (61,5%), diferentemente do grupo controle que tem o alelo -592A, como o mais freqüente, cento e onze (68,5%). Neste alelo, encontramos também uma significativa diferença estatística ($p=0,0056$), sendo assim um fator de proteção à FHD.

Tabela 12 – Frequência dos alelos de IL-10 -1082, -819, -592 nos indivíduos dos grupos estudados.

IL-10 -1082 -819 -592	Grupo FHD	Grupo Controle	valores de p
	n (%)	n (%)	
-1082A	75 (78,1)	68 (42,0)	> 0,0001
-1082G	21 (21,9)	94 (58,0)	> 0,0001
-819T	37 (38,5)	111 (68,5)	> 0,0001
-819C	59 (61,5)	51 (31,5)	> 0,0001
-592A	37 (38,5)	111 (68,5)	> 0,0056
-592C	59 (61,5)	51 (39,5)	> 0,005

6 DISCUSSÃO

A discussão dos resultados alcançados no estudo, será pautada em outros estudos realizados sobre as predisposições dos componentes genéticos que algumas doenças infecciosas causadas por patógenos intracelulares, bem como outras doenças podem sofrer durante seu desenvolvimento do processo patológico. Desconhecemos até a presente data, estudos específicos para dengue feitos nas citocinas TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6 e IFN- γ , aqui estudadas, o que nos leva a observar o que ocorre em outras doenças e não especificamente à DC ou FHD.

Ao analisarmos as frequências das tipificações do TNF- α -308, observamos que o nosso estudo corrobora com Ates et al. (2008), que tinha observado que o alelo G tem predomínio em ambos os grupos, com resultados em seu estudo de (92%) de frequência em pacientes, com tuberculose e (91%) no grupo controle. Em nosso estudo detectamos prevalência nos dois grupos, FHD (85,4%) e controle (78,8%). E em ambos os estudos não houve diferenças estatísticas. Estes mesmos resultados foram também percebidos por Amirzargar et al. (2006), no Irã, pacientes com tuberculose (80,0%), e controles (72,4%). Outro estudo feito com portadores de Doença de Crohn e pancreatite associaram o genótipo G/G à baixa produção de TNF- α , e os genótipos G/A e A/A, foram associados à alta produção de TNF- α (LOUIS *et al.*, 2002; POWELL *et al.*, 2001). Apesar de outro estudo mostrar que a FHD está associada com altos níveis de citocinas de células T, tais como IFN- γ e TNF- α , e indícios de ativação de células T (LIBRATY *et al.*, 2002), nosso estudo não obteve resultados estatísticos que correlacione a presença de polimorfismo nesta citocina para o agravamento da doença.

No que diz respeito ao TNF- α , estudos evidenciam que os níveis das citocinas pró-inflamatórias aumentaram significativamente durante a infecção por dengue em comparação com controles saudáveis, a elevação do TNF- α foi observada mais em casos com FHD. Evidenciou-se ainda prolongadas elevações dessa citocina pró-inflamatória, durante casos de infecção secundária, principalmente em pacientes com FHD. O estudo sugere uma associação do TNF- α com a gravidade da doença. (CHATURVEDI *et al.*, 1999; BRAGA *et al.*, 2001).

Existem associações feitas em outros estudos, da presença de polimorfismos no gene de TGF- β , com outras doenças, como carcinoma nasofaríngeo associado ao vírus

Epstein-Barr, fibrose pulmonar e hepatite. (HATTA *et al.*, 2007; AWAD *et al.*, 1998; FANG; LIU; HAN, 2008).

Em nosso estudo os resultados demonstraram que a frequência dos alelos de TGF- β , do alelo T códon 10 no grupo FHD foi de (53,1%) em relação aos controles (57,2%). Esses dados seguem os mesmos encontrados por Amirzagar *et al.* (2006), que observou uma frequência também menor no grupo de paciente com tuberculose (31,7%), em comparação aos (50,9%) dos controles. Estudos em pacientes transplantados associaram o alelo T, códon 10, à alta produção de TGF- β , enquanto o alelo C, códon 10, foi associado à baixa produção (PERREY *et al.*, 1998; BATHGATE *et al.*, 2000).

Analisando a frequência dos alelos de TGF- β no códon 25, observamos uma maior frequência do alelo G, no grupo FHD (86,4%), mas em comparação ao grupo controle (95,2%), esta frequência foi menor. Este alelo está associado à alta produção de TGF- β , enquanto o alelo C foi associado à baixa produção desta citocina (PERREY *et al.*, 1998; BATHGATE *et al.*, 2000).

Em nosso estudo os genótipos T/T G/G e T/C G/G foram os mais frequentes no grupo FHD, estes são associados à alta produção de TGF- β . Também observamos que os genótipos C/C G/C, e T/T C/C, que não foram tipificados, e estes estão associados à baixa produção desta citocina (PERREY *et al.*, 1998; BATHGATE *et al.*, 2000).

Ao analisarmos as frequências dos alelos de TGF- β , códons 10 e 25, não obtivemos diferenças estatísticas significantes, apesar de estudos citados acima associarem esta citocina ao agravamento da doença. Existe certo sentido na análise, em vista do efeito desativador de macrófagos promovido pelo TGF- β .

Em relação a IL-10, estudos demonstram que TNF- α e IL-10 formam um laço auto regulatório, em que o TNF- α é um indutor da IL-10 e a IL-10 é um supressor de TNF- α (POWRIE; COFFMAN, 1993; VAN DER POLL *et al.*, 1994; PEREZ *et al.*, 1995; MOSMANN; SAD, 1996). Estudos associaram o polimorfismo existente na IL-10 com outras doenças, como: artrite reumatóide (HAJEER *et al.*, 1998), lúpus eritematoso sistêmico (MOK *et al.*, 1998).

Níveis elevados de IL-10 têm sido relatados em pacientes com DC e FHD, possuindo um papel imunomodulador e que pode ser capaz de inibir a função apresentadora de células dendríticas infectadas com DENV (PALMER; SUN *et al.*, 2005). A IL-10 é tida como a citocina chave e esta associada com a FHD, bem como na mudança da resposta do tipo Th1 na DC, para o tipo Th2, na FHD, e com aumento dos níveis de IL-10 e IL-4 (CHATURVEDI *et al.*, 1999).

Os polimorfismos -1082, -819, -592 de IL-10 analisados em nosso estudo, demonstraram que a frequência dos alelos de IL-10 -1082 apresentou significativa redução do alelo G (21,9%) no grupo FHD, em comparação ao grupo controle (58,0%), com uma considerável significância estatística. Ao observamos outro estudo, o alelo -819G, também demonstra uma frequência de (37,7%) em pacientes com tuberculose em comparação a (23,0%) nos controle (ORAL, *et al.* 2006). O alelo -819A, teve predominância em relação ao alelo -819G, (78,1%). O que demonstra concordância com os resultados observados por OH *et al.*, (2007), onde foi obtido uma frequência de (72,0%) do alelo -819A em relação ao alelo -819G, na Coreia, em portadores de tuberculose.

O alelo -819T, apresentou predominância no grupo controle (68,5%) em comparação ao grupo FHD (38,5%), demonstrando assim uma significância estatística alta. O -592A, também teve predominância no grupo controle (68,5%) versus (38,5%) do grupo FHD, este alelo também teve significância estatística alta, associando estes alelos a fator de proteção à FHD.

O genótipo GCC/ACC, teve mais frequência no grupo FHD (35,5%), em comparação ao grupo controle (21,0%). O Genótipo GCC/GCC, teve maior frequência no grupo controle (21,0%), em relação ao grupo FHD (4,2%), com uma alta significância estatística, dando a esse genótipo um fator de proteção à FHD.

Ao observamos os resultados encontrados dos genótipos GCC/GCC em pacientes com tuberculose, notamos que a frequência dos pacientes foi de (20,0%) em comparação aos controles (7,0%) (ATES *et al.*, 2008), diferentemente do ocorrido em nosso estudo com pacientes com FHD.

Em relação a IL-6, foi demonstrado que seu maior nível sérico esta relacionado com o inicio da DC, e que tinha correlação com os sintomas da dengue, quando da

apresentação da FHD, seu nível volta a subir, sugerindo que ela esteja correlacionada com a severidade da FHD (JUFFRIE *et al.*, 2001; HOBBER *et al.*, *et al.*, 1993; KURANE; ENNIS, 1997).

Pinto *et al.*, (1999), relata também o aumento de IL-6 e os níveis séricos de TNF- α , em pacientes com dengue, em comparação com o grupo saudável.

Diversos estudos já associam o polimorfismos de IL-6 na região -174 com produção desta citocina, bem como já se encontrou este polimorfismo associado a outras patologias, tais como: doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral (FERNANDEZ-REAL *et al.*, 2001) artrite reumatóide juvenil sistêmica (FISHMAN *et al.*, 1998), linfoma de Hodgkin (COZEN *et al.*, 2004) e lupus eritematoso sistêmico (LINKER-ISRAELI, 1999).

Obtivemos como resultado em nosso estudo a predominância do alelo de IL-6 -174G, no grupo FHD (77,1%) em comparação ao grupo controle (68,2%), não ocorreu diferença estatística neste alelo, como também no alelo IL-6 -174C onde a predominância foi do grupo controle (31,8) em relação ao grupo FHD (22,9%). Nosso estudo está corroborando com HENAO *et al.* (2006), em que não houve associação significativa na tipificação dos genótipos de IL-6 -174 G \rightarrow C em pacientes com tuberculose e controles.

O IFN- γ , *in vitro*, pode aumentar a permeabilidade do endotélio e ativar a expressão de receptores Fc γ , pelos monócitos e macrófagos (ROTHMAN; ENNIS, 1999; MALAVIGE *et al.*, 2004) Outro estudo relata que IFN- γ aumenta a infecção pelo vírus da dengue nos monócitos e regula a expressão de HLA de classe I e II, o que pode resultar em um maior número de células infectadas e assim facilitar o reconhecimento do antígeno do vírus da dengue pela célula T específica. (KURANE *et al.*, 1991).

Os resultados das tipificações dos alelos de IFN- γ +874, ao serem analisados apresentaram menor frequência no alelo +874A, no grupo FHD (55,2%) em relação ao grupo controle (61,2%). Enquanto que o alelo IFN- γ +874T, apresentou maior frequência no grupo FHD (44,8%), em comparação ao grupo controle (38,8%). Estes resultados divergem dos obtidos por DING *et al.* (2008) que encontrou uma redução do alelo T em pacientes chineses (21,1%) em relação aos controles (28,7%) e uma maior frequência do alelo A em pacientes com TB pulmonar (78,9%) em comparação aos controles (71,3%). Contrapondo, um estudo

feito no Paquistão observou maior frequência e associou o alelo +874T com a presença de tuberculose pulmonar (ANSARI *et al.*, 2009).

Apesar de níveis de IL-2 e IFN- γ , serem mais altos em pacientes com FHD, não há diferença estatisticamente significativa quando comparado aos casos de DC (KURANE *et al.*, 1991).

Ao analisarmos as tipificações dos genótipos de IFN- γ , foi observado que o genótipo T/A teve maior frequência no grupo FHD (47,9%), o grupo controle teve o resultado de (58,8%), diferentemente dos resultados de Rossow *et al.* (2003), que obteve uma frequência de (59,0%) do genótipo A/A em pacientes com tuberculose quando comparada aos controles (47,0%), mas corroborando com outro estudo feito na Croácia que obtiveram predominância do genótipo T/A na população estudada (54,3%) (ETOKEBE *et al.*, 2006). O genótipo T/T apresentou a menor frequência nos dois grupos, (20,8%) no grupo FHD e (9,4%) no grupo controle, a mesma observação foi descrita no estudo realizado por Amim *et al.* (2007) onde foram obtidas as frequências dos genótipos de IFN- γ +874T \rightarrow A, demonstrando que o genótipo A/A foi o mais freqüente (45,0%), vindo após o genótipo T/A (32,0%) seguindo o genótipo T/T (23,0%).

Ao analisarmos os resultados alcançados das tipificação dos genótipos de IFN- γ , não obtivemos significância estatísticas que nos leve a associarmos o polimorfismo deste genótipo ao agravamento da doença.

A originalidade do estudo faz com que possamos criar inter-relações com outros pontos de pauta na problemática da dengue, quando voltamos o olhar para a questão de gastos em uma epidemia nos deparamos com situações gigantescas, de todos os tipos de custos, do econômico ao social, e o preço da dengue é alto. A internação de um paciente em hospital público custa, em média, R\$ 300, no caso da forma clássica da doença, e R\$ 500 no da variante hemorrágica. Isso sem mencionar os gastos, ainda mais altos, quando se trata de hospitais privados ou conveniados à planos de saúde.(SESCSP, 2010).

Ainda não temos dados relativos aos dias de trabalho perdidos por causa de uma epidemia, bem como ainda não foi quantificar os danos reais para a economia do país provocados por uma epidemia. Um estudo realizado na Malásia, mostra que o prejuízo anual

com dengue no sudeste asiático, onde há uma pandemia, equivale a 940 mil dias de trabalho. (SUAYA *et al.*, 2009).

No Brasil, o governo somente informou ter determinado um aporte extra de R\$ 128 milhões ao Teto Financeiro de Vigilância em Saúde, orçado em R\$ 1,02 bilhão. Esse montante é destinado às campanhas de prevenção de todas as doenças epidêmicas. No caso específico da dengue, foram gastos R\$ 55 milhões em campanhas na mídia, compra e distribuição de equipamentos, estoque estratégico de medicamentos, diagnóstico, treinamento e capacitação de profissionais da vigilância epidemiológica. (SESCSP, 2010).

Sendo assim, considerando os custos de uma epidemia, sem mencionar as vidas perdidas para a dengue, visualizamos a possibilidade de se ter nos serviços públicos exames moleculares voltados para detecção de polimorfismo, que possam prever o risco de cada paciente, na ausência do fator de proteção aqui detectado. Esta possibilidade se dá ao compararmos os custos versus os benefícios, considerando que os gastos com esta técnica comparados aos gastos com as internações hospitalares são insignificantes.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas tipificações das citocinas TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-6, e em seus alelos demonstraram que não tiveram diferenças estatísticas significativas, o que não nos permite associarmos esses polimorfismos com o agravamento da dengue.

A presença dos genótipos, GCC/GCC de IL-10, no grupo controle, estatisticamente demonstram associação como fator de proteção contra a FHD.

Os alelos da IL-10 -1082G, -819T e -592A, estatisticamente se associam como fator de proteção ao agravamento da doença, quando comparados aos seus respectivos controles..

De uma forma geral, considerando todas as citocinas aqui estudadas, observamos que o estudo do polimorfismo de genes é um avanço no que diz respeito a obtermos associações de fatores de proteção ou de susceptibilidade no agravamento da dengue. Especificamente aqui, obtivemos significância estatísticas, que nos permite associarmos o polimorfismo existente na IL-10 como um fator proteção ao agravamento da doença. Estudos posteriores podem vir a corroborar com nossos resultados.

REFERÊNCIAS

- AMIN, LUCIA H. L. V.; PACHECO, ANTONIO G.; FONSECA-COSTA, JOSEANE.; LOREDO, CARLA. S.; RABAHI, MARCELO. F.; MELO, MARIA. H.; RIBEIRO, FERNANDO. C. V.; MELLO, FERNANDA C. Q.; OLIVEIRA MARTHA M.; LAPA e SILVA, JOSÉ, R.; OTTENHOFF, TOM. H.; KRITSK, AFRÂNIO L.; SANTOS, ADALBERTO, R.; Role of IFN- γ T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol. Biol. Rep.*, v. 35, p. 563-566, 2007.
- AMIRZARGAR, A. A.; REZAEI, N.; JABBARI, H.; DANESH, A. A.; KHOSRAVI, F.; HAJABDOLBAGHI, M.; YALDA, A.; NIKBIN, B. Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *Eur. Cytokine Netw.*, v.17, n. 2, p. 84-89, 2006.
- ANSARI, A.; TALAT, N.; JAMIL, B.; HASAN, Z.; RAZZAKI, T.; DAWOOD, G.; HUSSAIN, R. Cytokine Gene Polymorphisms across Tuberculosis Clinical Spectrun in Pakistan Patients. *Plos one.*, v.4, n. 3, p 1-7, 2009.
- ATES, O.; MUSSELLIM, B.; ONGEN, G.; TOPAL-SARIKAYA, A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-a gene polymorphisms in tuberculosis. *J. Clin. Immunol.*, v. 28, p. 232-236, 2008.
- ATES, O.; MUSSELLIM, B.; ONGEN, G.; TOPAL-SARIKAYA, A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-a gene polymorphisms in tuberculosis. *J. Clin. Immunol.*, v. 28, p. 232-236, 2008.
- AWAD, M. R.; EL GAMEL, A.; HASLETON, P.; TURNER, D.M.; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, L. V. Genotipic variation in the transforming growth factor-beta 1 gene: Association with transforming growth factor-beta 1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation*, v. 66, n. 8, p 1014-1020, 1998.
- AZEREDO, E. L., S.M. ZAGNE, et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology*. V.204, n.4, Dec, p.494-507, 2001.
- BATHGATE, A. J.; PRAVICA, V.; PERREY, C.; THERAPONDOS, G.; PLEVIS, J. N.; HAYES, P. C.; HUTCHINSON, I. V. The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta 1 genes in acute hepatic allograft rejection. *Transplantation*, v. 69, n. 7, p. 1514-1517, 2000.
- BIELEFELDT-OHMANN. H. Measuring virulence without a atrget. *Trends Microbiol*, v.8, n.6, Jun, p.265-6, 2000.
- BIDWELL J, KEEN L, GALLAGHER G, KIMBERLY R, HUIZINGA T, MCDERMOTT MF, OKSENBERG J, MCNICHOLL J, POCIOT F, HARDT C & D'ALFONSO S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun*. 1: 3-19, 1999.
- BRAGA, E. L., P. MOURA, et al., Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.96, n.2, Feb, p.229-32. 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. FUNASA. Dengue: diagnóstico e manejo clínico.

Brasília: 2002.

CERAMI, A. Tumor necrosis factor as a mediator of shock, cachexia and inflammation. *Blood Purif.* V.11, n.2, p.108-17. 1993.

CHATURVEDI UC, RAGHUPATHY R, PACSA AS, ELBISHBISHI EA, AGARWAL R, NAGAR R, *et al.* Shift from a Th1-type response to Th-2 type response in dengue haemorrhagic fever. *Curr Sci*; 76 : 63-9, 1999.

CHATURVEDI UC, NAGAR R & SHRIVASTAVA R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS immunol Med Microbiol* 47, 155-166, 2006.

CHATURVEDI, U.C.; SHIVASTAVA, R.; NAGAR, R. Dengue vaccines: Problems & prospects. *The Indian Journal of Medical Research* v. 121, p. 639-652, 2005.

CHEN, I. C., H. Y. LEI, *et al.*, Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*, v.74, n.1, Jan, p.142-7. 2006.

CHEN ST, LIN YL, HUANG MT, WU MF, CHENG SC, LEI HY, *et al.* CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature*. 453: 672-76, 2008.

CHUNGUE, E., L. POLI, *et al.*, Correlation between detection of plasminogen cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection. *J. Infect Dis*, v.170, n.5, Nov, p.1304-7, 1994.

CLERICI M, SHEARER GM, CLERICI E. Cytokine dysregulation in invasive cervical carcinoma and other human neoplasias: time to consider the TH1/TH2 paradigm. *J NatlCancer Inst*; 90:261–3, 1998.

COLOGNA, M.; ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Selection for virulent Dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *Journal Of Virology* v. 79(2), p. 853–859. 2005.

COZEN, W.; GILL, P. S.; INGLES, S. A.; MASOOD, R.; MARTINEZ-MAZA, O.; COCKBUM, M. G. GAUDERMAN, W. J.; PIKE, M. C.; BERNSTEIN, L.; NATHWANI, B. N.; SALAM, M. T.; DANLEY, K. L.; WANG, W.; GAGE,; GUNDELL-MILLER, S.; MACK, T. M. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. *Blood*, v. 8, p. 3216-3221, 2004.

CUNHA-NETO,E., RIZZO,L.V., ALBUQUERQUE,F., ABEL,L., GUILHERME,L., BOCCHI,E., BACAL,F., CARRARA,D., IANNI,B., MADY,C. *et al.* Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 31:133-137. 1998.

CUNHA, R. V. Aspectos clínicos epidemiológicos da infecção pelo vírus da dengue em áreas endêmicas do Brasil. Rio de Janeiro, 1997. Disponível em: <http://bases.bireme.br> em 09/10/06.

DONALISIO, Maria Rita. *O Dengue no espaço habitado*. São Paulo: HUCITEC: FUNCRAF, 1999.

DING S, LI F, WANG J *ET al.* Interferon gamma receptor 1 gene polymorphism in patients with tuberculosis in China. *Scand. J. Immunol.* 68: 140–44, 2008.

ESPINA, L. M., N. J. VALERO, et al. Increased apoptosis and expressions of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of culture human monocytes with dengue virus. *Am J Trop Med. Hyg.*, v.68, n.1, Jan, p.48-53. 2003.

ETOKEBE GE, BULAT-KARDUM L, JOHANSEN MS, KNEZEVIC J, BALEN S, MATAKOVIC-MILEUSNIC N, et al. Interferon-gamma gene (T874A and G2109A) polymorphisms are associated with microscopypositive tuberculosis. *Scand J Immunol*, 63(2): 136-41. 2006.

FANG, J.; LIU, Z. W.; HAN, Q.Y. [Polymorphism of codon25 in signal peptide region of transforming growth factor beta 1 and its association with chronic hepatitis C virus infection]. *Chinese J. Hepatol.*, v. 16, n. 8, p. 586-589, 2008.

FRASER JK, LILL MC & FINGLIN RA. The biology of the cytokine sequence cascade. *Seminars in Oncology*. 23: 2-8, 1996.

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on taxonomy of Viruses*. Academic Press. 2005.

FERNANDEZ-REAL, J. M.; VENDRELL, J.; RICHART, C.; GUTIERREZ, C.; RICHART, W. Platelet count and interleukin 6 gene polymorphism in healthy subjects. *BMC Med. Genet.*, v. 2, p. 6, 2001.

FERNANDEZ-MESTRE, M. T., K. GENDZEHADZE, et al., NF-alpha-308^a allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens*. V.64,n.4, Oct, p. 469-72. 2004.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFERRY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDRIN, J. S.; HUMPHRIES, S.; WOO, P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J. Clin. Invest.*, v. 102, n. 7, p. 1369-1376, 1998.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil 1980-1998. *Boletim Eletrônico Epidemiológico Edição Especial*. Brasília: Funasa; 1999.

FUNASA/MS. Plano de Intensificação das Ações de Prevenção e Controle da Febre Amarela. Brasília, DF, 2001.

GAGNON, S. J., F. A. ENNIS, et al. Bystander target cell lysis and cytokine productions by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol*. V.73, n.5, May, p.3623-9. 1999.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*, v.11, n.3, Jul, p.480-96. 1998.

GONZALEZ, L. *Et al.* Evaluacion clínico-epidemiológica de la febre hemorrágica por dengue: emergência pediátrica Del HCSC julio-septiembre 2001.

GUZMAN, M. G. E G. KOURI. Dengue: na update. *Lancet Infect Dis.* V.2, n.1, Jan, p.33-42. 2002.

GRANDVAUX, N., B.R. TENOEVER, et al. The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr Opin Infect Dis.* V.15, n.3, Jun, p.259-67. 2002.

HAJEER, A. H.; LAZARUS, M.; TURNER D.; MAGEED, R. A.; VENCOVSKY, J.; SINNOTT, P.; HUTCHINSON, I. V.; OLLIER, W. E. IL-10 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.*, v. 27, n. 2, p. 142-145, 1998.

HALSTEAD, S. B., T.G.STREIT, et al., Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg.* V.65, n.3, Sep, p. 180-3. 2001.

HALSTEAD, S. B. E N. J. Marchette. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. *Am J. Trop Med Hyg.* v.69, n.6 Suppl. Dec, p.5-11. 2003.

HATTA, K.; MORIMOTO A.; ISHII, E.; KIMURA, H.; UEDA, I.; HIBI, S.; TODO, S.; SUGIMOTO, T.; IMASHUKU, S. Association of transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms with the development of Epstein-Barr virus-related hematologic disease. *Haematologica*, v.92, p.1470-1474, 2007.

HENCHAL, E.A. & PUTNAK, J.R. The Dengue Viruses. *Clinical Microbiology Reviews* . v. 3(4), p. 376-396, 1990.

HEHLGANS, T. E K. PFEFFER. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, v.115, n.1, May, p.1-20. 2005.

HENAO, M. I.; MONTES, C.; PARIS, S. C.; GARCIA, L. F. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with differential clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 86, p.11-19, 2006.

HÄSSIG A, KREMER H, LIANG WX & STAMPFI K. The role of the Th1 to Th2 shift of the cytokine profiles of CD4 helper cells in the pathogenesis of autoimmune and hypercatabolic diseases. *Med Hypotheses* 1998; 51: 59-63.

HOBER D, POLI L, ROBLIN B, GESTAS P, CHUNGUE E, GRANIC G, IMBERT P, PECARERE JL, VERGEZ-PASCAL R, WATTRE P, MANIEZ-MONTREUIL M. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1beta (IL-1beta) in dengue-infected patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48: 324-331, 1993.

JONES, M., A. DAVIDSON, et al. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J. Virol*, v.79, n.9, May, p.5414-20, 2005.

JUFFRIE, M., G. M. MEER, et al., Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive and secretory phospholipase A2. *Am J Trop Med Hyg*, v.65, n.1, Jul, p.70-5. 2001.

LANCIOTTI, R. S. et al. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *Journal of General Virology*, London, v. 75, p. 65-75, 1994.

LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J. & TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *Journal of General Virology*, 78: 2279-2286. 1997.

LEITMEYER, K.C.; VAUGHN, D.W.; WATTS, D. M.; SALAS, R.; VILLALOBOS DE CHACON, I.; RAMOS, C.; RICO-HESSE, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal Of Virology*, v. 73(6), p. 4738–4747, 1999.

LIBRATY, D.H., ENDY,T.P., HOUNG, H.S., GREEN, S., KALAYANAROOJ, S., SUNTAYAKORN, S., CHANSIRIWONGS, W., VAUGHN, D.W., NISALAK, A., ENNIS, F.A., ROTHMAN, A.L. Differing influences of viral burden and immune activation on disease severity in secondary dengue 3 virus infections. *J. Infect. Dis.* 185, 1213–1221, 2002.

LINKER-ISRAELI, M.; WALLACE, D. J.; PREHN, J.; MICHAEL, D.; HONDA, M.; TAYLOR, K. D.; PAUL-LABRADOR, M.; FISCHER-GHODSIAN, N.; FRASER, P. A.; KLINENBERG, J. R. Association of IL-6 gene alleles with systemic lupus erithematous (SLE) and with systemic elevated IL-6 expression. *Genes Immun.*, v.1, n. 1, p.45-53, 1999.

LOKE, H., D. BETHELL, et al., Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in Vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg*,v.67, n.1, Jul, p.102-6, 2002.

LOKE, H., D. BETHELL, et al., Strong HLA class I – restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis.* v.184, n.11, Dec 1, p.1369-73, 2001.

LOUIS, E.; VERMEIRE, S.; RUTGEERTS, P.; DE VOS,M.; GOSSUM, A. V.; PESCATORE, P.; FIASSE, R.; PELCKMANS, P.; REYNAERT,H.; D’HAENS, G.; MALAISE, M.; BELEICHE, J. A positive response to infliximab in Crohn’s disease: association with a higher systemic inflammation before treatment but not with -308 TNF gene polymorphism. *Scand. J. Gastroenterol.*, v. 37, n. 7, p. 818-824, 2002.

LUM, L. C. S. *et al.* Risk factors for hemorrhagic in severe dengue infections. *The Journal of Pediatrics.* Malaysia, vol. 140, n.5, p. 629-631, may 2002.

KELLY, E.P.; GREENE, J.J.; KING, A.D.; INNIS, B. L. Purified dengue 2 virus envelope glycoprotein aggregates produced by baculovirus are immunogenic in mice. *Vaccine.* v. 18, p. 2549-2559, 2000.

KURANE I, INNIS BL, NIMMANNITYA S, NISALAK A, MEAGER A, JANUS J, ENNIS FA. Activation of T Lymphocytes in Dengue Virus Infections. High Levels of Soluble Interleukin 2 Receptor, Soluble CD4, Soluble CD8, Interleukin 2 and Interferongamma in Sera in Children with Dengue. *The Journal of Clinical Investigation* 88: 1473-1480, 1991.

KURANE I, ENNIS FA. Immunopathogenesis of dengue virus infections. *In:* Guble DJ, Kuno G (eds) *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.* CAB International, London p. 273-290, 1997.

MALAVIGE, G.N., S. FERNANDO, et al. Dengue viral infections. *Postgrad Med. J.* v.80, n.948, Oct, p.588-601. 2004.

MARTINEZ-TORRES E. Dengue y dengue hemorrágico. Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes. Habana; 1998.

MACKENZIE, J.S., D.J. GUBLER, et al. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med*, v.10, n.12 Suppl, Dec, p.S98, Oct, p.588-601, 2004.

MARTINEZ EM. Dengue hemorrágico em niños. Habana: Ed. José Martí; 1990.

MS – MINISTERIO DA SAUDE - Secretaria de Vigilância em Saúde. Dados e indicadores selecionados. Coordenação: Departamento de Análise de Situação de Saúde, 2003. Brasília: Ministério da Saúde; 2003.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v. 100(12), p. 6986–6991, 2003.

MONGKOLSAPAYA, J., W. DEJNIRATTISAI, et al., Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med*, v.9, n.7, Jul, p.921-7. 2003.

MOSMANN TR, SAD S. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 17:138–146, 1996.

MOK, C. C.; LANCHBURY, J, S.; CHAN, D. W., LAU, C. S. Interleukin-10 promoter polymorphism in Southern Chinese patients with Systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, v. 41, n. 6, p. 1090-1095, 1998.

NEVES-SOUZA, P.C., E.L.I., AZEVEDO, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infect Dis*, v.5, p.64. 2005.

NGUYEN, T. H., H. Y. LEI, et al. Dengue hemorrhagic fever in infants a study of clinical and cytokine profiles. *J. Infect Dis.* V.189, n.2, Jan 15, p.221-32. 2004.

SUAYA, J. A., SHEPARD, D.S., SIQUEIRA, J.B., MARTELLI, C.T., LUM, L.C.S., TAN, L.H., KONGSIN, S., JIAMTON, S., GARRIDO, F., MONTOYA, R., ARMIEN, B., HUY, R., CASTILLO, L., CARAM, M., SAH, B.K., SUGHAYYAR, R., TYO, K.R., HALSTEAD, S.B. . "Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80. 5: 846-855, 2009.

OH, J. H.; YANG, C. S.; NOH, Y. K.; KWEON, Y. M.; JUNG, S. S.; SON, J. W.; KONG, S. J.; YOON, J. U.; LEE, J. S.; KIM, H. J.; PARK, J. K.; JO, E. K.; SONG, C. H. Polymorphisms of interleukin-10 and tumour necrosis factor- α genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis. *Respirology*, v. 12, p. 594-598, 2007.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Number of reported cases of Dengue & Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregión) [monograph on the Internet]. Washington (DC): OPS; 2004 [cited 2004 Feb. 31]. Available from: <http://paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2003.htm>.

ORAL, B. H.; BUDAK, F.; UZASLAN, E.K.; BASTÜRK, B.;BEKAR, A.; AKALIN, H.; EGE, E.; ENER, B.; GÖRAL, G. Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. *Cytokine*, v. 35, p. 143-147, 2006.

PALMER, D.R., P. SUN, et al. Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. *J.Virol*, v.79,n.4, Feb, p.2432-9. 2005.

PEREZ VL, LEDRER JA, LICHTMAN AH, ABBAS AK. Stability of Th1 and Th2 populations. *International Immunology* 7:869–875. 1995.

PERREY, C.; PRAVICA, V.; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, I. V. Genotyping for polymorphisms in the interferon-gama, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumor necrosis factor alpha genes: a technical report. *Transpl. Immunol.*, v. 6, n. 3, p. 193-197, 1998.

PINTO, L.M., S.A. OLIVEIRA, et al. Increased pro-inflammatory cytokine (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* V.94, n.3, May-Jun, p.387-94, 1999.

PFEFFER, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokine and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* v.14, n.3-4, Jun-Aug, p.185-91. 2003.

POWRIE F, COFFMAN RL. Cytokine regulation of T cell function: Potential for therapeutic intervention. *Immunology* 14: 270–275. 1993.

POWELL, J. J.; FEARON, K. C.; SIRIWARDENA, A. K.; ROSS, J. A. Evidence against a role for polymorphisms at tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist gene loci in the regulation of disease severity in acute pancreatitis. *Surgery*, v.129, n. 5, p. 633-640, 2001.

REY, F. A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: New insight into its interactions during viral entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v. 100(12), p. 6899–6901, 2003.

RESTREPO BN, ISAZA DM, SALAZAR CL, RAMIREZ R, OSPINA M, ALVAREZ LG. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gama in infants with and without dengue. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41 (1):6-10, 2008.

RIGAU-PÉREZ JG, CLARK GG, GUBLER DJ, REITER P, SANDERS EJ, VORNDAN AV. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Lancet.* 352:971-977. 1998.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, v.174, n.2, Feb, p.479-93. 1990.

ROTHMAN, A. L. Viral pathogenesis of dengue infections. In: D.J. Gubler e G. Kuno (Ed.). *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. New York: CAB International. Viral pathogenesis of dengue infections, p.245-270, 1997.

ROTHMAN AL, ENNIS FA. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology.* 257:1-6. 1999.

ROSSOW, M.; NEL, H. J.; COOKE, G. S.; VAN, HELDEM P. D.; HOAL, E. G. Association between tuberculosis and a polymorphic NFκB binding site in the interferon γ gene. *Lancet*, v. 361, p. 1871-1872, 2003.

SANTOS BA, SEGAT L, DHALIA R, et al. MBL2 Gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. *Human Immunology*. 69, 122-128, 2008.

SCHATZMAYR HG. Dengue situation by year 2000. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 95:179-181, 2000.

SCUMPIA, P. O. E L.L., MOLDAWER. Biology of interleukin-10 and regulatory roles in sepsis syndromes. *Crit Care Med*, v.33, n.12, Suppl. Dec, p.S468-71. 2005.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Dados e indicadores selecionados. Coordenação: Departamento de Análise de Situação de Saúde, 2003. Brasília: Ministério da Saúde; 2003.

SESA. Informe Semanal de Dengue - 2009, 13.03.2009.

SESA. Informe Semanal de Dengue - 2010, 11.06.2010.

SESCSP. Revista, Problemas brasileiros, n. 400, jul-ago, 2010.

SHRESTA, S., J. L. KYLE, et al. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J. Virol*. V.78, n.6, Mar, p.2701-10. 2004.

SILVA JR JB, SIQUEIRA JR JB, COELHO GE, VILARINHOS PT, PIMENTA JR FG. Dengue in Brazil: current situation and control actividades. *Epidemiological Bulletin*. 23(1):3-6. 2002.

SOUNDRAVALLY R, HOTI SL. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: Role of TAP and HPA gene polymorphism. *Human Immunology*. 68, 973-979, 2007.

STEPHENSON, J. R. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull World Health Organ* v. 83(4), p.308-314, 2005.

SAKUNTABHAI, A.C. TURBPAIBOON, et al., A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet*. Apr 17. 2005.

SONG, M. E J. A. Kellum. Interleukin-6. *Crit Care Med*, v.33, n.12, Suppl, Dec, p.S463-5. 2005.

VALDÉS, Luis et al. La epidemiología del dengue y del dengue hemorrágico en Santiago de Cuba, 1997. *Revista Panamericana de Salud Publica*, Washington, v. 6, n. 1, p. 16-25, 1999.

VAN REGENMORTEL, .M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. *Virus taxonomy*. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, 2000.

VAN DER POLL T, JANSEN J, LEVI M, TEN CATE H, TEN CATE JW, VAN DEVENTER SJH. Regulation of interleukin 10 release by tumour necrosis factor in humans and chimpanzees. *Journal of Experimental Medicine* 180: 1985-1988. 1994.

VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* V.10, p.411-52. 1992.

VITARANA, T., H. DE SILVA, et al., Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Ceylon Med. J.* v.36, n.2, Jun, p.63-5. 1991.

WALLET, M. A., P. SEN, et al. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res*, v.3, n.3, Aug, p.166-75. 2005.

WARWICK-DAVIES, J.; LOWRIE, D. B.; COLE, P. J. Selective deactivation of human monocyte functions by TGF-beta. *J. Immunol*, v.155, n.6, p.3186-3193, 1995.

WATTS, D. M., K. R. PORTER, et al., Failure os secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, v.354, n.9188, Oct 23, p. 1431-4. 1999.

World Health Organization. DengueNET – WHO`s Internet-based System for the Global Surveillance of Dengue Fever and Dengue Haemorrhagic Fever (Dengue/DHF) [monograph on the Internet]. Geneva: WHO; [cited 2003 Dec. 5]. Available from: <http://www.who.int/denguenet>, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Executive committee of the directing council the regional committee Pan American World Health 120th Meeting CE120/21. Geneva: HWO; 1997.

WU, S. J., G. GROUARD-VOGEL, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infections. *Nat. Med.* V.6, n.7, Jul, p.816-20. 2000.

WU T-C, KURMAN RJ. Analysis of cytokine profiles in patients with human papillomavirus-associated neoplasms. *J Natl Cancer Inst.* 89(3):185–187, 1997.

ZHANG, Y.; HAYES, E. P.; MCCARTY, T. C.; DUBIS, D. R.; SUMMERS, P. L.; ECKELS, K.H.; CHANOCK, R. M.; LAI, C. Immunization of mice with Dengue structural proteins and nonstructural protein NS1 expressed by Baculovirus recombinant induces resistance to Dengue Virus Encephalitis. *Journal of Virology* v. 62, p. 3027-3031, 1988.

ANEXO1

ANEXO 2: Distribuição dos genótipos de TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6, IFN- γ em pacientes com FHD, de acordo com idade, sexo e forma clínica

Amostra	Idade	Sexo	TNF-α	TGF-β	IL-10	IL-6	IFN-Y
1	12	M	G/G	T/C G/G	ACC/ACC	G/G	T/A
2	28	M	G/G	T/C G/G	GCC/ACC	G/C	T/T
3	58	M	G/G	T/C G/G	GCC/ACC	C/C	A/A
4	4	F	G/G	T/C G/G	ATA/ATA	G/G	T/A
5	6	M	G/G	T/T G/G	GCC/ACC	G/C	T/A
6	14	M	G/G	C/C G/G	ACC/ACC	C/C	T/T
7	6	M	G/A	C/C G/G	GCC/ATA	G/G	T/A
8	10	F	G/G	T/T G/G	ATA/ATA	G/C	T/A
9	39	M	G/G	T/C G/G	GCC/ATA	G/G	T/A
10	17	M	G/G	C/C G/G	GCC/ATA	G/G	A/A
11	13	M	G/G	T/T G/G	ATA/ATA	G/G	A/A
12	29	F	G/G	T/C C/C	GCC/ATA	G/G	T/A
13	12	M	G/G	T/T G/G	GCC/ATA	G/C	A/A
14	70	F	G/G	T/C G/G	ATA/ATA	G/C	T/A
15	13	M	G/A	C/C G/G	GCC/ATA	G/G	A/A
16	47	F	G/G	T/C G/G	ACC/ATA	G/G	A/A
17	9	M	G/G	T/C G/G	ACC/ATA	G/C	T/T
18	7	F	G/G;	T/T G/G	GCC/ATA	G/G	A/A
19	37	F	G/G	C/C G/G	ACC/ATA	G/G	T/A
20	6	F	G/G	T/C G/C	GCC/ACC	G/C	T/A
21	17	F	G/G	T/C G/G	GCC/ACC	G/G	T/A
22	55	F	G/A	T/T G/G	ATA/ATA	G/G	T/A
23	39	F	G/G	T/T G/G	GCC/ACC	G/C	T/T
24	35	F	G/G	T/C G/G	ATA/ATA	G/G	T/A
25	12	M	G/A	T/C G/G	GCC/ACC	G/C	T/T
26	28	F	G/G	T/T G/C	GCC/ACC	G/C	T/A
27	14	F	G/G	T/C G/G	ACC/ATA	G/G	T/A
28	9	F	G/G	T/T G/G	ATA/ATA	G/G	A/A
29	30	M	G/G	C/C G/G	GCC/ACC	G/G	A/A

30	9	M	G/G	T/C G/C	ACC/ATA	G/C	T/T
31	27	F	G/G	T/C G/G	GCC/ACC	G/G	T/A
32	9	F	G/G	C/C G/G	ACC/ACC	G/C	A/A
33	73	F	G/G	T/C G/G	GCC/GCC	G/C	T/A
34	30	F	G/G	T/C G/G	ATA/ATA	G/G	T/A
35	9	M	G/G	T/T G/G	GCC/ACC	G/G	T/T
36	41	F	G/G	T/C G/G	ATA/ATA	G/C	A/A
37	26	F	G/G	T/C G/C	GCC/ACC	G/G	T/A
38	9	M	G/G	T/C G/G	ATA/ATA	G/G	T/T
39	35	F	G/G	C/C G/G	ACC/ATA	G/G	A/A
40	12	F	G/G	T/T G/G	ACC/ATA	G/C	T/A
41	71	M	G/G	C/C G/G	ACC/ATA	G/G	T/A
42	14	M	G/G	T/T G/G	GCC/ATA	G/G	A/A
43	74	F	G/G	C/C G/G	GCC/ACC	G/G	T/T
44	16	F	G/G	T/T G/G	GCC/ATA	G/G	T/A
45	22	F	G/A	C/C G/C	GCC/GCC	G/C	T/A
46	51	F	G/A	C/C C/C	ACC/ATA	G/G	A/A
47	35	F	G/G	T/C G/G	ATA/ATA	G/G	T/T
48	36	M	G/A	T/C G/G	ACC/ATA	G/G	A/A

ANEXO 3: Distribuição dos genótipos de TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-6, IFN- γ em indivíduos controle, de acordo com idade e sexo

CONTROLE	IDADE	SEXO	TNF- α	TGF- β	IL-10	IL-6	IFN- γ
501	23	masc	G/G	C/C G/G	N.A	G/C	T/A
502	42	masc	G/G	T/T G/G	ATA/ATA	G/G	A/A
503	25	masc	G/G	C/C G/C	GCC/GCC	G/G	T/T
504	58	masc	G/G	T/C G/G	ACC/ATA	G/G	T/A
505	46	fem	G/G	T/C G/C	GCC/ATA	C/C	A/A
506	26	fem	G/G	T/T G/G	ATA/ATA	G/C	A/A
507	28	masc	G/G	T/T G/G	GCC/GCC	G/C	A/A
508	25	masc	G/G	T/T G/G	GCC/ACC	G/G	T/A
509	24	fem	G/G	C/C G/G	GCC/ATA	G/C	T/A
510	18	masc	G/A	T/T G/G	ACC/ACC	G/G	T/A
511	31	fem	G/G	C/C G/G	GCC/ATA	G/C	T/A
512	31	masc	G/G	T/C G/G	ATA/ATA	G/G	T/A
513	42	fem	G/G	T/T G/G	GCC/ATA	G/G	A/A
514	39	fem	G/G	C/C G/G	ACC/ATA	G/G	T/A
515	40	fem	G/A	T/T G/G	ACC/ATA	G/C	T/A
516	45	masc	G/A	T/T G/G	ACC/ATA	C/C	T/A
517	47	masc	G/A	C/C G/G	ACC/ATA	G/C	A/A
518	26	masc	G/A	T/C G/G	ACC/ATA	G/G	T/A
519	29	masc	G/A	T/C G/G	ACC/ATA	G/C	A/A
520	39	masc	G/G	T/C G/G	GCC/GCC	G/G	T/A
521	28	fem	G/A	T/C G/G	GCC/ATA	G/C	T/T
522	19	fem	G/G	C/C G/G	ACC/ACC	G/C	T/A
523	22	fem	G/A	T/C G/G	GCC/GCC	G/G	A/A
524	39	masc	G/G	T/T G/G	GCC/ATA	G/C	T/A
525	44	masc	G/G	T/C G/G	GCC/ACC	G/G	T/A
526	44	masc	G/G	C/C C/C	ACC/ATA	G/G	T/A
527	25	fem	G/G	T/T G/G	GCC/ACC	G/C	A/A
528	21	masc	G/G	T/T G/G	GCC/ATA	G/G	T/A
529	46	fem	G/G	T/C G/G	GCC/ACC	G/G	A/A

530	27	masc	G/G	T/C	G/G	GCC/GCC	G/G	T/A
531	55	fem	G/G	T/C	G/G	GCC/GCC	G/C	A/A
532	23	fem	G/G	T/C	G/G	ACC/ATA	G/G	A/A
533	30	masc	G/G	C/C	G/G	N.A*	C/C	A/A
534	19	fem	G/G	T/C	G/G	ACC/ATA	G/C	T/A
535	21	masc	G/G	C/C	G/G	GCC/ATA	G/G	A/A
536	48	masc	G/G	T/C	G/G	GCC/ATA	G/C	T/A
537	24	masc	G/G	T/T	G/G	GCC/ACC	G/C	T/A
538	28	masc	G/G	C/C	G/G	GCC/GCC	G/C	T/T
539	42	fem	G/G	T/T	G/G	ACC/ACC	G/C	T/A
540	37	masc	G/A	T/T	G/G	GCC/ACC	G/C	T/A
541	28	fem	G/G	T/C	G/G	ATA/ATA	G/G	T/A
542	27	fem	G/G	T/T	G/G	GCC/ATA	G/G	T/A
543	22	masc	G/G	T/C	G/G	GCC/ACC	G/G	A/A
544	28	masc	G/G	T/T	G/G	ATA/ATA	G/C	T/A
545	43	masc	G/G	T/T	G/G	GCC/ACC	G/G	A/A
546	31	masc	G/G	C/C	G/G	GCC/GCC	G/G	T/A
547	42	fem	G/G	T/T	G/G	GCC/GCC	G/G	T/A
548	23	masc	G/G	T/C	G/G	GCC/GCC	G/G	T/A
549	25	masc	G/G	T/C	G/G	ACC/ATA	G/C	A/A
550	24	fem	G/G	T/C	G/G	GCC/ATA	G/C	A/A
551	32	masc	G/G	T/C	G/G	ACC/ATA	G/C	T/A
552	24	fem	G/A	T/T	G/G	ATA/ATA	G/C	T/A
553	25	masc	G/G	T/C	G/G	GCC/ACC	G/G	A/A
554	42	masc	G/G	C/C	G/G	ACC/ATA	G/G	T/A
555	44	masc	G/G	T/C	G/G	ACC/ATA	G/G	A/A
556	23	masc	G/G	T/T	G/G	GCC/GCC	G/C	A/A
557	24	fem	G/G	C/C	G/G	GCC/ATA	G/C	A/A
558	32	masc	G/A	T/C	G/G	GCC/GCC	G/C	T/A
559	52	masc	G/G	T/T	G/G	GCC/ATA	G/G	T/A
560	20	fem	G/A	T/T	G/G	ACC/ATA	C/C	A/A
561	30	fem	G/G	T/T	G/G	GCC/ATA	G/G	T/A
562	23	masc	G/G	T/C	G/G	GCC/GCC	G/C	T/A
563	33	fem	G/G	T/C	G/G	ACC/ATA	G/C	T/A
564	35	masc	G/G	T/C	G/C	GCC/GCC	G/G	A/A
565	24	masc	G/G	T/T	G/G	ATA/ATA	G/G	T/A

566	18	fem	G/G	T/T	G/G	GCC/ACC	G/G	T/A
567	25	masc	A/A	T/C	G/G	ACC/ACC	C/C	T/T
568	22	masc	G/G	T/C	G/C	GCC/ACC	G/G	T/A
569	31	fem	G/A	C/C	G/G	GCC/ATA	G/G	T/A
570	20	masc	G/G	T/C	G/G	GCC/ACC	C/C	A/A
571	29	masc	G/G	T/T	G/G	N.A*	C/C	T/A
572	31	fem	G/G	T/T	G/G	ACC/ACC	G/C	T/A
574	41	masc	G/G	T/T	G/G	GCC/ACC	C/C	T/T
575	27	fem	G/A	T/T	G/G	ATA/ATA	G/G	T/T
576	21	fem	G/G	T/C	G/G	GCC/GCC	C/C	T/A
583	23	fem	G/G	C/C	G/G	GCC/ATA	G/G	A/A
584	25	masc	G/A	N.A*		GCC/ACC	C/C	T/A
593	40	fem	G/G	C/C	C/C	ATA/ATA	C/C	A/A
584	25	masc	G/A	N.A*		GCC/ACC	C/C	T/A
594	34	fem	G/G	T/C	G/G	GCC/ACC	G/G	T/T
595	18	fem	G/G	C/C	G/G	GCC/GCC	G/G	T/A
596	28	masc	G/A	T/T	G/G	GCC/GCC	G/G	T/A
598	33	masc	G/G	T/C	G/G	N.A*	G/G	T/A
599	19	masc	G/G	T/C	G/G	GCC/ATA	G/G	T/A
600	26	masc	G/G	T/C	G/G	GCC/ACC	G/G	T/T

ANEXO 4 : TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: **Investigação de Polimorfismo no Interferon-gama e na Interleucina-6, nos pacientes com FHD no município de Fortaleza-Ceara/2009**

Pesquisador Responsável: **Francisco Márcio Pereira da Silva**

Telefones para contato: **(085) 3101-5441** - **(085) 3101-5442** - **(088) 9961-4951**

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

Responsável legal (quando for o caso): _____

R.G. Responsável legal: _____

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMO NO INTERFERON-GAMA E NA INTERLEUCINA-6, NOS PACIENTES COM FHD NO MUNICÍPIO DE FORTALEZA-CEARA/2009, de responsabilidade do pesquisador FRANCISCO MARCIO PEREIRA DA SILVA.

Este projeto tem por objetivo geral avaliar a possibilidade de fatores genéticos existentes em algumas pessoas serem os responsáveis pela gravidade na Febre Hemorrágica de Dengue - FHD.

Caso você aceite participar da pesquisa como voluntário, após ter lido, entendido e assinado este termo, o procedimento será: retirar 5 ml de sangue, o qual será feito utilizando uma seringa. Primeiro será limpo o local, depois será introduzido uma seringa, que coletará 5 ml de sangue, o qual será enviado posteriormente ao laboratório.

As análises serão feitas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC. Todos os resultados obtidos ficarão sob a responsabilidade e guarda do pesquisador, as informações dos voluntários ficarão em segredo. Você tem a liberdade de posteriormente pedir pra seu exame não ser incluído na pesquisa, o que será atendido de imediato, sem que isto leve a você qualquer prejuízo posterior.

Os benefícios da pesquisa poderão auxiliar muitas pessoas acometidas de FHD no futuro. O pesquisador garante a você o direito de qualquer pergunta, esclarecimentos mais específicos dos procedimentos realizados e(ou) interpretação dos resultados obtidos.

O desconforto e risco existentes para você são mínimos, você sentirá uma leve dor no momento da introdução da agulha e existe a possibilidade de um pequeno hematoma no local da introdução da agulha, logo após a coleta do sangue.

Após ter recebido todas as informações relacionadas a pesquisa eu CERTIFICO que voluntariamente, aceito participar dela, pois reconheço que:

- 1º) foi-me fornecido uma cópia deste termo, contendo as informações pertinentes a pesquisa, a qual eu li e compreendi por completo;
- 2º) fui informado dos objetivos específicos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações do procedimento no qual estarei envolvido, dos riscos ou desconfortos previstos, e dos benefícios da pesquisa;
- 3º) ficou entendido que posso retirar-me da pesquisa a qualquer momento, e isto não afetará meus cuidados médicos ou de meus parentes no presente ou no futuro;
- 4º) que todas as informações a meu respeito serão confidenciais;
- 5º) fui informado que acaso haja danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico;
- 6º) foi-me garantido que não terei gastos em participar do estudo.
- 7º) sendo assim, concordo que meus dados clínicos também sejam utilizados no estudo.

Fortaleza-CE, ____ de _____ de 2009.

Assinatura do paciente ou seu responsável legal

Testemunha

Impressão Digital
(caso necessário)