

## SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS LABORATÓRIO DE VIROLOGIA

ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E A IMUNOPATOGÊNESE DE AGENTES INFECCIOSOS DE NATUREZA VIRAL (VÍRUS DA DENGUE, HTLV-1 E HTLV-2) E BACTERIANA (CHLAMYDIA TRACHOMATIS E CHLAMYDIA PNEUMONIAE)

ROSIMAR NERIS MARTINS FEITOSA

BELÉM-PARÁ 2010

#### ROSIMAR NERIS MARTINS FEITOSA

ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E A IMUNOPATOGÊNESE DE AGENTES INFECCIOSOS DE NATUREZA VIRAL (VÍRUS DA DENGUE, HTLV-1 E HTLV-2) E BACTERIANA (CHLAMYDIA TRACHOMATIS E CHLAMYDIA PNEUMONIAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ishak

### Feitosa, Rosimar Neris Martins

Associação entre marcadores da resposta inflamatória e a imunopatogênese de agentes infecciosos de natureza viral (Vírus da dengue, HTLV-1 e HTLV-2) e bacteriana (*Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae*), Belém-Pará, 2010, 174p, Tese de Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

1. HTLV-1 e 2 2. Vírus da dengue 3. Chlamydia 4. Polimorfismo de citocinas

#### ROSIMAR NERIS MARTINS FEITOSA

ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E A IMUNOPATOGÊNESE DE AGENTES INFECCIOSOS DE NATUREZA VIRAL (VÍRUS DA DENGUE, HTLV-1 E HTLV-2) E BACTERIANA (CHLAMYDIA TRACHOMATIS E CHLAMYDIA PNEUMONIAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ishak

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Banca Examinadora: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Profa. Dra. Maristela Gomes da Cunha

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Profa. Dra. Karla Tereza Silva Ribeiro

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues de Lemos

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Profa. Dra. Marluísa de Oliveira Guimarães Ishak (Suplente)

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

BELÉM-PARÁ

29 de novembro de 2010

"Não há vento favorável para quem não sabe aonde ir" Lucius Annaeus Seneca (Filósofo do Império Romano)

#### **AGRADECIMENTOS**

Deus eu te agradeço, por estar presente em todos os momentos de minha vida sempre à frente de minhas decisões.

Aos meus pais, Maria e José (*in memorian*), pelo amor incondicional a mim dedicado e pela educação que me deram.

Aos meus irmãos Jelson, Wudison, Rosineia e Alex pelo incentivo ao longo de minha jornada pessoal e profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Ishak, pelo carinho, amizade e atenção, assim como pela confiança em mim depositada durante a elaboração desta tese.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Marluísa de Oliveira Guimarães Ishak, pelo carinho e respeito com que me acolheu e por todas as orientações, durante minha passagem pelo Laboratório de Virologia da UFPA.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto, pela atenção que sempre deu a este trabalho e pelo apoio e contribuição com seus conhecimentos durante a realização das técnicas de biologia molecular.

A Prof<sup>a</sup>. MSc. Vânia Nakauth Azevedo, pelo companheirismo e pela ajuda durante a realização dos ensaios de quantificação dos níveis séricos das citocinas.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado, por sua cooperação e pelas palavras carinhosas de incentivo que contribuiram muito ao longo da conclusão deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Virologia e do Laboratório de Microbiologia da UFPA pelo carinho e ajuda durante a realização deste trabalho.

A minha amiga, Prof<sup>a</sup>. Dra. Simone Conde, pelo carinho e cumplicidade durante a superação dos obstáculos que surgiram ao longo deste trabalho e pelas longas horas de ajuda dedicadas à realização dos ensaios de quantificação dos níveis séricos das citocinas e das técnicas de biologia molecular.

Aos meus grandes amigos MSc. Rogério Valois Laurentino e MSc. Janice Costa Nina que me acompanharam desde a graduação e me ajudaram, mesmo de longe, a alcançar meus objetivos ao longo desta jornada.

Ao meu esposo Henoque Feitosa pelo amor, respeito, paciência e, principalmente, pela compreensão e companheirismo nos momentos em que mais precisei de sua ajuda.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários pela oportunidade de desenvolvimento profissional que me foi concedida.

Ao Ambulatório do Laboratório de Arbovírus do Instituto Evandro Chagas, ao Núcleo de Medicina Tropical e ao Hospital de Clínicas Gaspar Viana pela realização das coletas de amostras de sangue periférico.

Ao Laboratório Central do Estado do Pará, na presença do Diretor Kleyffson Alves de Miranda pela compreensão e apoio que me permitiram alcançar a conclusão desta tese.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 VÍRUS DA DENGUE	18
1.2 VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS – HTLV	25
1.3 CHLAMYDIA	30
1.4 FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF)	33
1.5 INTERFERON GAMA (IFN-γ)	37
1.6 PROTEÍNA C REATIVA (PrtCR)	39
1.7 ASSOCIAÇÕES ENTRE MARCADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E	
AGENTES INFECCIOSOS	41
1.8 OBJETIVOS	46
1.8.1 Objetivo Geral	46
1.8.2 Objetivos Específicos	46
2 MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1 GRUPOS POPULACIONAIS E COLETA DAS AMOSTRAS	48
2.2 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR VÍRUS DA DENGUE, HTLV-1 e HTLV-2,	
C. TRACHOMATIS E C. PNEUMONIAE	49
2.3. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DAS CONCENTRAÇÕES DE TNF-α,	
TNF-β, IFN-γ E PrtCR NO SANGUE PERIFÉRICO	51
2.4 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DE CITOCINAS	52
2.4.1 Extração do DNA	52
2.4.2 Genotipagem	54
2.4.2.1 Polimorfismo do TNF-α	54
2.4.2.2 Polimorfismo do TNF-β	56

2.4.2.3 Polimorfismo do IFN-γ	5
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	5
2.6 COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA	5
3 RESULTADOS	6
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS ENVOLVIDOS	6
3.1.1 Grupo Dengue	6
3.1.2 Grupo HTLV	6
3.1.3 Grupo Doença Coronariana	6
3.1.4 Grupo Controle	6
3.2 DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS TNF-α, TNF-β,	
IFN-γ E PrtCR, NO SANGUE PERIFÉRICO DE ACORDO COM OS GRUPOS	
ESTUDADOS	6
3.2.1 Grupo Dengue	(
3.2.2 Grupo HTLV	•
3.2.3 Grupo Doença Coronariana	-
3.3 DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES	
$TNF-\alpha$ , $TNF-\beta \to IFN-\gamma$ , DE ACORDO COM OS GRUPOS ESTUDADOS	,
3.3.1 Grupo Dengue	,
3.3.2 Grupo HTLV	8
3.3.3 Grupo Doença Coronariana	8
3.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DAS CITOCINAS E AS	
CARACTERÍSTICAS DE ESPÉCIE/SOROTIPO/GENÓTIPO VIRAL OU	
BACTERIANO	;
3.4.1 Grupo Dengue	;
3.4.2 Grupo HTLV	8
3.4.3 Grupo Doença Coronariana	
3.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DAS	
CITOCINAS E AS CARACTERÍSTICAS DE ESPÉCIE/SOROTIPO/GENÓTIPO	
VIRAL OU BACTERIANO	1

3.5.1 Grupo Dengue	100
3.5.2 Grupo HTLV	102
3.5.3 Grupo Doença Coronariana	104
4 DISCUSSÃO	107
4.1 GRUPO DENGUE	109
4.2 GRUPO HTLV	117
4.3 GRUPO DOENÇA CORONARIANA	122
5 CONCLUSÕES	129
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
ANEXOS	

# LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Morfologia do vírus da dengue	19
Figura 2 - Estrutura genômica do vírus da dengue	19
Figura 3 - Estrutura morfológica do HTLV	25
Figura 4 - Micrografía eletrônica de HTLV-1 em cultura de linfócitos obtidos de	
um paciente infectado	26
Figura 5 - Representação esquemática da organização genômica do HTLV	27
Figura 6 - Micrografia eletrônica de célula infectada por C. trachomatis, onde se	
observam três estados do ciclo de desenvolvimento: (A) corpo reticulado,	
(B) forma intermediária entre corpo elementar e corpo reticulado e (C) corpo	
elementar	31
Figura 7 – Representação esquemática da localização de polimorfismos do gene	
TNF-lpha	35
Figura 8 - Representação esquemática da localização de polimorfismos do gene	
<i>TNF-β</i>	36
Figura 9 - Representação esquemática da localização de polimorfismos do gene	
<i>IFN-γ</i>	38
Figura 10 - Representação esquemática da localização de polimorfismos do gene	
da PrtCR	40
Figura 11 - Níveis séricos de TNF-α nos grupos dengue positivo, dengue negativo	
e grupo controle.	66
Figura 12 - Níveis séricos de TNF-β nos grupos dengue positivo, dengue negativo	
e grupo controle	67
Figura 13 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-β dos	
pacientes dengue positivo (1), dengue negativo (2) e grupo controle (3)	67
Figura 14 - Níveis séricos de IFN-γ nos grupos dengue positivo, dengue negativo e	
grupo controle	68

Figura 15 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de IFN-γ dos
pacientes dengue positivo (1), dengue negativo (2) e grupo controle (3)
Figura 16 - Níveis séricos de PrtCR nos grupos dengue positivo, dengue negativo
e grupo controle
Figura 17 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de PrtCR dos
pacientes dengue positivo (1), dengue negativo (2) e grupo controle (3)
Figura 18 - Níveis séricos de TNF-α nos grupos pacientes sintomáticos,
portadores assintomáticos da infecção pelo HTLV e grupo controle
Figura 19 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF- $\alpha$ dos
pacientes sintomáticos (1), portadores assintomáticos (2) e grupo controle (3)
Figura 20 - Níveis séricos de TNF-β nos grupos de portadores sintomáticos do
HTLV, portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle
Figura 21 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-β dos
portadores sintomáticos do HTLV (1), portadores assintomáticos do HTLV (2) e
grupo controle (3)
Figura 22 - Níveis séricos de IFN-γ nos grupos de portadores sintomáticos do
HTLV, portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle
Figura 23 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de IFN-γ dos
portadores sintomáticos do HTLV (1), portadores assintomáticos do HTLV (2) e
grupo controle (3)
Figura 24 - Níveis séricos de PrtCR nos grupos de portadores sintomáticos do
HTLV, portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle
Figura 25 - Níveis séricos de TNF-α nos grupos de pacientes com doença
coronariana e sorologia positiva para Chlamydia, pacientes com doença
coronariana e sorologia negativa para Chlamydia e grupo controle
Figura 26 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-α dos
pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para Chlamydia (1),
pacientes doença com coronariana e sorologia negativa para Chlamydia (2) e
grupo controle (3)

Figura 27 - Níveis séricos de TNF-β nos grupos de pacientes com doença
coronariana e sorologia positiva para Chlamydia, pacientes com doença
coronariana e sorologia negativa para Chlamydia e grupo controle
Figura 28 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-β dos
pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para Clamydia (1),
pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para Clamydia (2) e grupo
controle (3)
Figura 29 - Níveis séricos de IFN-γ nos grupos de pacientes com doença
coronariana e sorologia positiva para Chlamydia, pacientes com doença
coronariana e sorologia negativa para Chlamydia e grupo controle
Figura 30 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de IFN-γ dos
pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para Chlamydia (1),
pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para Chlamydia (2) e
grupo controle (3)
Figura 31 - Níveis séricos de PrtCR nos grupos de pacientes com doença
coronariana e sorologia positiva para Chlamydia, pacientes com doença
coronariana e sorologia negativa para Chlamydia e grupo controle
Figura 32 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de PrtCR dos
pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para Chlamydia (1),
pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para Chlamydia (2) e
grupo controle (3)
Figura 33 - Níveis séricos de TNF-α no grupo dengue positivo de acordo com a
espécie e grupo controle
Figura 34 - Níveis séricos de TNF-β no grupo dengue positivo de acordo com a
espécie e grupo controle
Figura 35 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-β dos
pacientes DEN 1 (1), DEN 2 (2), DEN 3 (3) e grupo controle (4)
Figura 36 - Níveis séricos de IFN-γ no grupo dengue positivo de acordo com a
espécie e no grupo controle

Figura 37 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de IFN-γ dos
pacientes DEN 1 (1), DEN 2 (2), DEN 3 (3) e grupo controle (4)
Figura 38 - Níveis séricos de PrtCR no grupo dengue positivo de acordo com a
espécie e no grupo controle
Figura 39 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de PrtCR dos
pacientes DEN 1 (1), DEN 2 (2), DEN 3 (3) e grupo controle (4)
Figura 40 - Níveis séricos de TNF-α de acordo com o tipo de HTLV entre os
portadores sintomáticos e assintomáticos do vírus e no grupo controle
Figura 41 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-α nos
grupos HTLV-1 sintomático (1), HTLV-2 sintomático (2), HTLV-1 assintomático
(3), HTLV-2 assintomático (4) e grupo controle (5)
Figura 42 - Níveis séricos de TNF-β de acordo com o tipo de HTLV entre os
portadores sintomáticos e assintomáticos do vírus e no grupo controle
Figura 43 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF- $\beta$ nos
grupos HTLV-1 sintomático (1), HTLV-1 assintomático (2), HTLV-2
assintomático (3) e grupo controle (4)
Figura 44 - Níveis séricos de IFN-γ de acordo com o tipo de HTLV entre os
portadores sintomáticos e assintomáticos do vírus e no grupo controle
Figura 45 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de IFN-γ nos
grupos HTLV-1 sintomático (1), HTLV-2 sintomático (2), HTLV-1 assintomático
(3), HTLV-2 assintomático (4) e grupo controle (5)
Figura 46 - Níveis séricos de PrtCR de acordo com o tipo de HTLV entre os
portadores sintomáticos e assintomáticos do vírus e no grupo controle
Figura 47 - Níveis séricos de TNF-α no grupo de pacientes com doença
coronariana e sororreatividade para C. trachomatis e C. pneumoniae, no grupo
positivo apenas para C. trachomatis e no grupo controle
Figura 48 - Níveis séricos de TNF-β no grupo de pacientes com doença
coronariana e sororreatividade para C. trachomatis e C. pneumoniae, no grupo
positivo apenas para <i>C. trachomatis</i> e no grupo controle

Figura 49 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-β no
grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para C. trachomatis
e C. pneumoniae (1), no grupo positivo apenas para C. trachomatis (2) e no grupo
controle (3)
Figura 50 - Níveis séricos de IFN-γ no grupo de pacientes com doença coronariana
e sororreatividade para C. trachomatis e C. pneumoniae, no grupo positivo apenas
para C. trachomatis e no grupo controle
Figura 51 – Comparação estatística entre os níveis séricos médios de IFN-γ no
grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para C. trachomatis
e C. pneumoniae (1), no grupo positivo apenas para C. trachomatis (2) e no grupo
controle (3)
Figura 52 - Níveis séricos de PrtCR no grupo de pacientes com doença
coronariana e sororreatividade para C. trachomatis e C. pneumoniae, no grupo
positivo apenas para C. trachomatis e no grupo controle
Figura 53 - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de PrtCR no
grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para C. trachomatis
e C. pneumoniae (1), no grupo positivo apenas para C. trachomatis (2) e no grupo
controle (3)

# LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Relação dos polimorfismos nos genes das citocinas estudadas	58
Tabela 2 - Sororreatividade para o vírus da dengue de acordo com as	
características demográficas do grupo examinado	61
Tabela 3 - Classificação molecular do HTLV de acordo com as características	
demográficas do grupo examinado	62
Tabela 4 - Sororreatividade para Chlamydia de acordo com as características	
demográficas do grupo examinado	64
Tabela 5 - Sororreatividade para as espécies C. pneumoniae e C. trachomatis (de	
acordo com os sorotipos)	65
Tabela 6 - Características demográficas do grupo controle	65
Tabela 7 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene	
$TNF-\alpha$ (-308) nos grupos dengue positivo, dengue negativo e controle	79
Tabela 8 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $\mathit{TNF-\beta}$	
(+252) nos grupos dengue positivo, dengue negativo e controle	80
Tabela 9 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $\mathit{IFN-\gamma}$	
(+874) nos grupos dengue positivo, dengue negativo e controle	80
Tabela 10 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $TNF-lpha$	
(-308) nos grupos de portadores do HTLV (sintomáticos e assintomáticos) e grupo	81
controle	
Tabela 11 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene TNF-β	
(+252) nos grupos de portadores do HTLV (sintomáticos e assintomáticos) e	
grupo controle	82
Tabela 12 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene <i>IFN-γ</i>	
(+874) nos grupos de portadores do HTLV (sintomáticos e assintomáticos) e	
grupo controle	82
<u> </u>	

Tabela 13 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $TNF-\alpha$
(-308) nos grupos com doença coronariana e positivos para Chlamydia, doença
coronariana e negativos para Chlamydia e controle
Tabela 14 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $TNF-\beta$
(+252) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para
Chlamydia, pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para
Chlamydia e grupo controle
Tabela 15 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $\mathit{IFN-\gamma}$
(+874) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para
Chlamydia, pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para
Chlamydia e grupo controle
Tabela 16 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $TNF-\alpha$
(-308) nos grupos DEN 1, DEN 2, DEN 3 e grupo controle
Tabela 17 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $TNF-\beta$
(+252) nos grupos DEN 1, DEN 2, DEN 3 e grupo controle
Tabela 18 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $\mathit{IFN-\gamma}$
(+874) nos grupos DEN 1, DEN 2, DEN 3 e grupo controle
Tabela 19 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $TNF-\alpha$
(-308) nos grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos de acordo com o
tipo de HTLV e no grupo controle
Tabela 20 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $TNF-\beta$
(+252) nos grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos de acordo com o
tipo de HTLV e no grupo controle
Tabela 21 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $\mathit{IFN-\gamma}$
(+874) nos grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos de acordo com o
tipo de HTLV e no grupo controle

Tabela 22 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $TNF-\alpha$	
(-308) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para	
C. trachomatis e C. pneumoniae, no grupo positivo apenas para C. trachomatis e	
no grupo controle	104
Tabela 23 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene $TNF-\beta$	
(+252) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para	
C. trachomatis e C. pneumoniae, no grupo positivo apenas para C. trachomatis e	
no grupo controle	105
Tabela 24 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene <i>IFN-γ</i>	
(+874) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para	
C. trachomatis e C. pneumoniae, no grupo positivo apenas para C. trachomatis e	
no grupo controle	106

#### **RESUMO**

A base genética das doenças é frequentemente estudada a partir dos polimorfismos dos genes de citocinas. O presente estudo investigou marcadores da resposta inflamatória associados a infecções virais e bacterianas que possam influenciar o curso da infecção. Foram medidos os níveis séricos (por ensaio imunoenzimático) e os polimorfismos de TNF-α (-308), TNF-β (+252), IFN-γ (+874) e da proteína C reativa, por meio de PCR e RFLP ou PCR alelo específico, em grupos de pessoas infectadas pelo vírus da dengue (n=80), com doença febril, não infectados (100), um grupo de infectados pelo HTLV (30 sintomáticos e 47 assintomáticos), um grupo com doença coronariana (58 com sororreatividade para Chlamydia e 31 com sorologia negativa) e um grupo controle (99 pessoas com sorologia negativa para dengue, HTLV e Chlamydia). Nenhum grupo mostrou associação com informações demográficas. O Vírus da dengue 3 (66,2%) e o HTLV-1 (90% em sintomáticos e 76,6% em assintomáticos) foram os agentes mais frequentes dentre os grupos respectivos. A maioria com doença coronariana (65,1%) apresentou anticorpos para Chlamydia (39,6% para C. trachomatis e C. pneumoniae, 58,6% apenas para C. trachomatis e 1,7% somente para C. pneumoniae). Foram significantes as diferenças encontradas entre: (i) os níveis séricos de TNF-β, IFN-γ e PrtCR dos grupos dengue positivo e dengue negativo com o grupo controle (p < 0.01); (ii) os níveis séricos de TNF- $\alpha$ , TNF-β, e IFN-γ dos grupos de HTLV (incluindo os tipos) e grupo controle; (iii) os níveis séricos de TNF-α, TNF-β, IFN-γ e PrtCR entre os pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* e o grupo controle; (iv) a presença de anticorpos para *C*. trachomatis e C. pneumoniae e o grupo controle na comparação com a TNF-β, IFN-γ e PrtCR. As distribuições de frequências genotípicas foram estatisticamente significantes para os polimorfismos: (i) dos genes TNF- $\alpha$  (p=0,0494) e IFN- $\gamma$  (p= 0,0008), entre os grupos dengue positivo, dengue negativo e controle e para o IFN- $\gamma$  (p= 0,0007) entre os grupos DEN 1, DEN 2 e DEN 3 e o controle; (ii) do gene IFN- $\gamma$  (p=0.0023) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para C. trachomatis e C. pneumoniae, assim como nos monoreativos na comparação entre a positividade para *C. trachomatis* e o grupo controle.

#### **ABSTRACT**

The genetic basis of diseases is frequently studied aiming the polymorphisms of cytocine genes. The present study investigated markers of the inflammatory response associated to the course of infection and disease caused by viruses and bacteria. Serum levels (measured by an ELISA assay) and the polymorphisms (using PCR, RFLP and allele specific PCR) of TNF- $\alpha$  (-308), TNF- $\beta$  (+252), IFN- $\gamma$  (+874) and C reactive protein were measured among persons with febrile disease, infected by dengue virus (n=80), not infected by DV (100), a group of HTLV infected (30 symptomatic and 47 asymptomatic), a group with coronary disease (58 seroreactive to *Chlamydia* and 31 with negative serology) and a control group (99 persons with no reaction to DV, HTLV and *Chlamydia*). No group showed association with demographic informations. Dengue virus 3 (66.2%) and HTLV-1 (90% symptomatic and 76.6% asymptomatic persons) were the most frequent agents found among their groups. The majority of those with coronary disease (65.1%) presented antibodies to Chlamydia (39.6% to C. trachomatis and C. pneumoniae, 58.6% solely to C. trachomatis and 1.7% to C. pneumoniae). Statistically significant levels of differences were found among: (i) serum levels of TNF-β, IFN-γ and PrtCR of positive and negative dengue and control groups (p< 0,01); (ii) serum levels of TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  and IFN- $\gamma$  of HTLV (including its types) and control groups; (iii) serum levels of TNF-α, TNF-β, IFN-γ and PrtCR among patients with coronary disease, serum reactive to *Chlamydia*, and the control group; (iv) the presence of antibodies to C. trachomatis and C. pneumoniae and the control group comparing TNF-β, IFN-γ and PrtCR. Genotypic frequency distributions were statistically significant for the polymorphisms: (i) of TNF- $\alpha$  (p=0,0494) and IFN- $\gamma$ (p=0.0008) genes among positive, negative and control dengue groups and to IFN- $\gamma$ (p= 0,0007) among groups DEN 1, DEN 2, DEN 3 and controls; (ii) of IFN- $\gamma$  gene (p=0.0023) among the group of patients with coronary disease and sero reactivity to C. trachomatis e C. pneumoniae, as well as to the mono reactants in the comparison between the positivity to *C. trachomatis* and the control group.

# 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 VÍRUS DA DENGUE (VD)

Os vírus da dengue são membros da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, cujo material genético é constituído de uma molécula de RNA de fita simples, de polaridade positiva. São quatro espécies, *Vírus da dengue 1* (DEN 1), *Vírus da dengue 2* (DEN 2), *Vírus da dengue 3* (DEN 3) e *Vírus da dengue 4* (DEN 4) com morfologias semelhantes entre si, que se apresentam como partículas esféricas, com tamanhos entre 40-50 nm, recobertas por envelope (Figura 1) (Chambers *et al.*, 1990; Vorndam *et al.*, 1994).

O genoma viral possui aproximadamente 11.000 Kb, contendo uma única região de leitura aberta, a qual codifica uma poliproteína precursora, flanqueada por duas regiões não traduzidas (5' e 3' UTR). A clivagem desta poliproteína por proteases virais e da célula hospedeira resulta em três proteínas estruturais (capsídio C, pré-membrana prM e envelope E) e sete proteínas não estruturais chamadas NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, as quais estão envolvidas na replicação viral e outras funções vitais *in vivo* (Figura 2). A glicoproteína do envelope é responsável pela adsorção e entrada do vírus, sendo o alvo antigênico para a formação de anticorpos neutralizantes (Chambers *et al.*, 1990; Rothman, 2004).

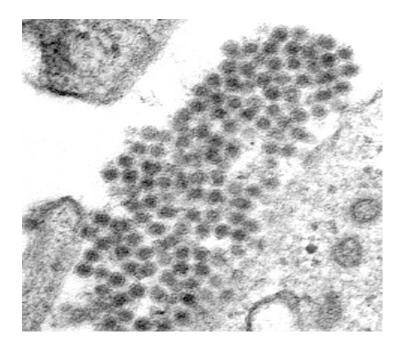
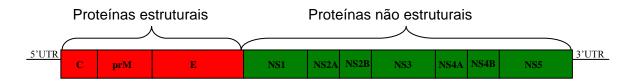


Figura 1 - Morfologia do vírus da dengue (<a href="http://www.stanford.edu/group/virus/flavi/2000/dengue.htm">http://www.stanford.edu/group/virus/flavi/2000/dengue.htm</a>).



**Figura 2** - Estrutura genômica do vírus da dengue (adaptado de Pang *et al.*, 2001).

Entre os flavivírus transmitidos por mosquitos, as quatro espécies dos vírus da dengue apresentam uma relação filogenética com o grupo de agentes relacionados ao *Vírus da encefalite japonesa* e mais distantemente com o *Vírus da febre amarela* (Kuno *et al.*, 1998). Alguns estudos filogenéticos têm demonstrado que o DEN 4 é o mais divergente, seguido pelo DEN 2, sendo os DEN 1 e DEN 3 mais relacionados entre si

(Zanotto, 1996; Twiddy *et al.*, 2003). Análises filogenéticas de cepas endêmicas/epidêmicas sugerem que cada espécie emergiu separadamente de um ancestral silvestre (Wang *et al.*, 2000), o que pode ter ocorrido há cerca de 125-320 anos, variando de acordo com a espécie (Twiddy *et al.*, 2003).

O DEN 1 é dividido em quatro genótipos, incluindo um clado silvestre (Zhang *et al.*, 2005; Diaz *et al.*, 2006). O DEN 2 apresenta seis genótipos, designados de silvestre, americano, cosmopolita, asiático 1, asiático 2 e asiático-americano (Holmes & Twiddy, 2003; Twiddy *et al.*, 2003; Diaz *et al.*, 2006). O DEN 3 possui quatro genótipos denominados de I-Filipinas, II-Tailândia, III-Sri Lanka e IV-Porto Rico (Holmes & Twiddy, 2003; Messer *et al.*, 2003). E o DEN 4 está dividido em três genótipos (I, II e III) (Holmes & Twiddy, 2003; Twiddy *et al.*, 2003; Diaz *et al.*, 2006).

A infecção pelos quatro agentes ocasiona uma doença conhecida como dengue, a arbovirose de maior incidência no mundo, que é endêmica em todos os continentes, exceto na Europa. A dengue é endêmica em 112 países ocasionando cerca de 100 milhões de casos de doença febril anualmente e 500.000 casos de febre hemorrágica (Guha-Sapir & Schimmer, 2005).

Cerca de dois terços da população mundial vivem em áreas infestadas com mosquitos capazes de transmitir os agentes. O principal vetor da dengue é o *Aedes aegypti*, uma espécie antropofílica bem adaptada ao ambiente urbano, de hábitos diurnos que pode ser encontrada dentro ou fora das residências e utiliza preferencialmente depósitos de água limpa para deposição de ovos, os quais apresentam alta capacidade de resistir à dessecação (Gubler, 1998).

O *Aedes albopictus* é um vetor secundário da dengue no Sudeste da Ásia, no Oeste do Pacífico e com frequência cada vez maior nas Américas Central e do Sul (Gratz, 2004), já tendo sido descrito como o vetor principal em algumas epidemias de dengue ocorridas em Bangladesh e Hawai (Ali *et al.*, 2003; Effler *et al.*, 2005).

O mosquito adquire o vírus ao picar o homem infectado durante a fase virêmica, e após um período de replicação (período de incubação extrínseca) em que o vírus se multiplica, por um período de oito a doze dias e, a seguir, migra para as glândulas salivares, o vetor torna-se competente para transmitir a doença a outros seres humanos, até o final da vida, que é de seis a oito semanas para o *Aedes aegypti*, dentro do ciclo homemmosquito-homem (Jessie *et al.*, 2004).

O vírus é inoculado através da picada do mosquito, e faz a replicação primária em células musculares estriadas e lisas, em fibroblastos e em linfonodos locais. A multiplicação do vírus no sangue periférico (viremia) favorece a sua disseminação por todo o organismo. Os vírus podem circular livres, ou no interior de monócitos/macrófagos e células fagocitárias, as quais são os maiores sítios de replicação viral (Chambers *et al.*, 1990; Kurane & Eennis, 1992).

Entre as manifestações clínicas associadas ao vírus da dengue estão a febre da dengue clássica e a febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue.

A dengue clássica é uma doença autolimitada com quadro febril debilitante caracterizado por sinais inespecíficos como dor de cabeça, dor retrorbital, mialgia, artralgia e fraqueza, os quais surgem após o período de incubação de dois a sete dias, coincidindo com a viremia (Halstead, 2007). Esses sintomas relacionam-se aos níveis séricos elevados

de citocinas liberadas por macrófagos ao interagirem com linfócitos T auxiliares ativados (Kurane & Eennis, 1992).

A febre hemorrágica caracteriza-se pelo aumento da permeabilidade vascular, trombocitopenia e manifestações hemorrágicas, incluindo petéquias e lesões purpúricas, sendo classificada em graus I (o mais leve) a IV (o mais grave) baseados na apresentação clínica e nos achados laboratoriais. A síndrome do choque da dengue ocorre quando a perda de fluido dentro do espaço intersticial resulta em choque hipovolêmico, que sem tratamento apropriado, pode levar à morte (Gubler, 1998; Halstead, 2007).

Entre os vários mecanismos descritos para explicar a patogênese da febre hemorrágica da dengue o mais estudado é o que se refere à mudança do perfil de secreção de citocinas por linfócitos T auxiliares (Chaturvedi *et al.*, 1999a; Chaturvedi *et al.*, 2000). Os linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1) secretam interferon gama (IFN-γ), interleucina 2 e fator de necrose tumoral (TNF) e são responsáveis pelas reações mediadas por células, danos teciduais em infecções e doenças autoimunes. Os linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2) secretam as interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13 e são importantes durante a produção de anticorpos pelos linfócitos B (Chaturvedi *et al.*, 1999a; Chaturvedi *et al.*, 2000).

Uma mudança de resposta predominantemente Th1 observada em casos de febre da dengue para Th2 em casos graves de febre hemorrágica foi descrita por Chaturvedi *et al.*, (1999b), sendo encontrados níveis séricos elevados de interleucinas 4, 6 e 10, principalmente em casos de febre hemorrágica de graus III e IV. Contudo, os níveis de IFN-γ e interleucina 2 foram maiores em casos de febre da dengue. O perfil individual de citocinas de pacientes com febre da dengue demonstrou um perfil típico de resposta Th1,

enquanto que em pacientes com febre hemorrágica da dengue foi observado um perfil típico de resposta Th2.

Em estudo para observação da sequência de aparecimento de citocinas tipo Th1 e Th2 em cultura de leucócitos do sangue periférico humano de doadores saudáveis infectados *in vitro*, as citocinas que foram detectadas no primeiro dia após a infecção, no sobrenadante da cultura, foram o fator citotóxico humano (hCF), TNF-α, IL-2 e IL-6. O IFN-γ apareceu no segundo dia. Os níveis destas citocinas diminuíram rapidamente exceto para hCF e IL-2. As interleucinas 10 e 5 apareceram no quarto dia e a IL-4 somente no sexto dia. Estas observações demonstraram que o vírus da dengue induziu uma resposta tipo Th1 durante os três primeiros dias de infecção de leucócitos do sangue periférico *in vitro* que foi substituída por uma resposta tipo Th2 posteriormente (Chaturvedi *et al.*, 1999a).

Na resposta imunológica humoral, os anticorpos da classe IgM específicos são detectáveis a partir do quarto dia, após o início dos sintomas, atingindo níveis mais elevados por volta do sétimo dia e declinando lentamente, não sendo mais detectáveis após alguns meses. Anticorpos da classe IgG específicos são observados em níveis baixos a partir do quarto dia após o início dos sintomas, elevando-se gradualmente, atingindo altos níveis em duas semanas e mantendo-se detectáveis por vários anos, provavelmente conferindo imunidade duradoura contra a espécie infectante por toda a vida (Innis *et al.*, 1989; Guzman & Kouri, 2002).

A resposta imunológica celular citotóxica mediada por linfócitos T ocorre sob estímulo das proteínas NS1, NS3 e E dos VD. O linfócito T auxiliar atua na presença

de células infectadas que expressam receptores HLA tipo II, produzindo IFN-γ, IL-2 e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos. Os linfócitos citotóxicos agridem diretamente as células infectadas que expressam receptores HLA tipo I, lisando-as (Chambers *et al.*, 1990; Kurane & Eennis, 1992).

A dengue foi reintroduzida no Brasil em uma epidemia extensa, causada pelos DEN 1 e DEN 4 em 1980 (Pinheiro & Nelson, 1997). A expansão da distribuição geográfica da dengue no Brasil continuou a partir de epidemias contínuas, anuais, a partir de 1986 no Rio de Janeiro, causada pelo DEN 1. Em 1990/1991, durante nova epidemia, com a introdução do DEN 2, notificaram-se 1.952 casos de dengue hemorrágica, com 24 mortes (Nogueira *et al.*, 1999). Ao final do ano 2000, foi isolado, no Rio de Janeiro, o DEN 3, considerado a mais agressiva das espécies. Em 2001, o Estado do Rio de Janeiro foi atingido por mais uma grande epidemia, que atingiu níveis de incidência assustadores no verão de 2002, estendendo-se a outros Estados e ocasionando mais de trinta mortes por dengue hemorrágica (Schatzmayr, 2000; 2001).

A introdução do vírus no Estado do Pará ocorreu em 1995, na região sudeste do Estado, nos municípios de Redenção e Rondon do Pará. Os primeiros casos autóctones de dengue no município de Belém foram registrados em outubro de 1996, pela detecção de anticorpos IgM para DEN, e em novembro foi isolado e identificado o DEN 1 (Travassos da Rosa *et al.*, 1997). Em outubro de 1997 isolou-se o DEN 2, que passou a circular simultaneamente com o DEN 1 no Estado (Travassos da Rosa *et al.*, 2000).

### 1.2 VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS – HTLV

O Vírus linfotrópico de células T humanas foi o primeiro retrovírus humano a ser descoberto, sendo classificado na família *Retroviridae* e no gênero *Deltaretrovirus*. Neste gênero também estão incluídos o *Vírus da leucemia bovina* e o *Vírus da leucemia de células T de símios* (Matsuoka & Jeang, 2007).

As partículas virais possuem forma esférica, medem cerca de 100 nm de diâmetro e são envolvidas por envelope lipoprotéico (Goff, 2007). O genoma é formado por duas moléculas iguais de RNA de fita simples, de aproximadamente nove kilobases, é envolvido por um capsídio, constituído pelas proteínas p15, p19 e p24 (Tangy, 1996). O nucleocapsídio possui ainda as enzimas protease e transcriptase reversa (que também funciona como integrase e RNAse H) (Goff, 2007). O envelope é obtido a partir da membrana plasmática da célula hospedeira, no qual estão inseridas as glicoproteínas virais gp21 e gp46 (Figuras 3 e 4) (Tangy, 1996; Goff, 2007).

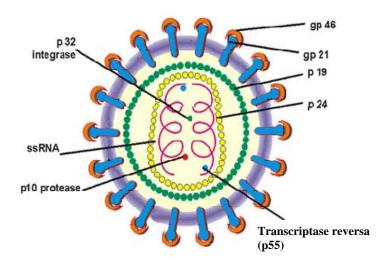
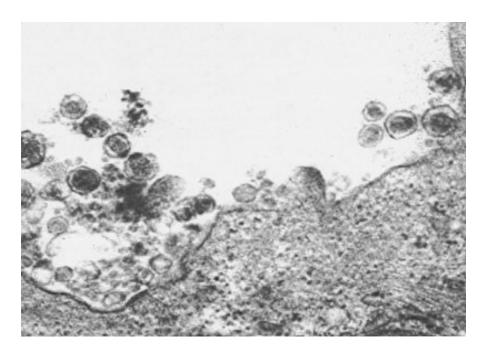


Figura 3 - Estrutura morfológica do HTLV (Fonte: http://www.htlv.com.br).



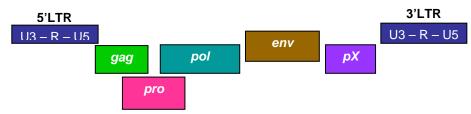
**Figura 4** - Micrografia eletrônica de HTLV-1 em cultura de linfócitos obtidos de um paciente infectado (Fonte: Shuh & Beilke, 2005).

O genoma viral integrado ao genoma da célula hospedeira é formado por três genes estruturais, *gag*, *pol* e *env*, flanqueados por duas regiões chamadas de *Long Terminal Repeats* (LTR), as quais possuem vários domínios funcionais, tal como iniciador, *enhancer* e finalizador da transcrição. As regiões LTR são constituídas por três domínios (U3-R-U5), em ambas as extremidades (Shimotohno *et al.*, 1985).

A região denominada *pro*, localizada de maneira sobreposta aos genes *gag* e *pol*, está envolvida na codificação da protease viral, enzima responsável pela clivagem do polipeptídeo de 55 kDa e de outras proteínas virais (Shimotohno *et al.*, 1985).

Na extremidade 3' há uma região única chamada *pX*, que contém quatro pequenas regiões de leitura aberta (*Open Reading Frames - ORFs*): X-I, X-II, X-III e X-IV

(Seiki *et al.*, 1983). As *ORF* X-III e X-IV codificam as proteínas reguladoras Rex e Tax, respectivamente (Figura 5).



**Figura 5** - Representação esquemática da organização genômica do HTLV (Adaptado de Feuer & Green, 2005).

São conhecidos quatro tipos de HTLV denominados de HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4 (Poiesz *et al.*, 1980; Hjelle, 1991; Calattini *et al.*, 2006; Switzer *et al.*, 2006; Mahieux & Gessain, 2009).

Com base na origem geográfica do vírus, na comparação das sequências e na análise filogenética de gp21 e da região *LTR*, o HTLV-1 apresenta seis subtipos genéticos denominados: HTLV-1a (Subtipo Cosmopolita), HTLV-1b (Subtipo África Central), HTLV-1c (Subtipo Áustralo-Melanésio), HTLV-1d (Novo Subtipo África Central), HTLV-1e e HTLV-1f (Miura *et al.*, 1994; Ureta-Vidal *et al.*, 1994; Van Dooren *et al.*, 2001). Da mesma forma, o HTLV-2 possui quatro subtipos moleculares: HTLV-2a, HTLV-2b, HTLV-2c e HTLV-2d (Hall *et al.*, 1992; Ishak *et al.*, 1995; Eiraku *et al.*, 1996; Vandamme *et al.*, 1998).

O HTLV-1 foi descrito inicialmente como o agente etiológico da Leucemia e linfoma de células T do adulto (LLcTA) (Poiesz *et al.*, 1980) e posteriormente, associado a uma doença neurológica crônica conhecida como Paraparesia espástica tropical/

Mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH) (Gessain et *al.*, 1985) e a uveítes (Watanabe *et al.*, 1997).

O HTLV-2 foi isolado inicialmente de uma linhagem de células T (Mo-T) derivada de um paciente com uma forma variante rara de leucemia de células pilosas (Kalyanaraman *et al.*, 1982) e, posteriormente, em um segundo paciente com uma leucemia de células T CD8<sup>+</sup> e coexistente leucemia de células B pilosas (Rosenblatt *et al.*, 1986).

Apesar do isolamento do vírus a associação entre leucemia de célula pilosa e HTLV-2 ainda não está bem esclarecida, assim como as mielopatias similares a PET/MAH. As associações do HTLV-2 com doenças têm sido esporádicas e inconclusivas (Kira *et al.*, 1991; Hjelle *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1997).

O HTLV-3 foi isolado em amostras de sangue de dois camaroneses assintomáticos, cujo material apresentou sorologia positiva quando testado por ELISA para HTLV-1 e HTLV-2, mas um perfil sorológico indeterminado quando testado por ensaios de western-blot (Calattini et al., 2006). Comparações do genoma completo e análises filogenéticas demonstraram que a organização genômica do HTLV-3 é similar ao HTLV-1 e ao HTLV-2 (Calattini et al., 2006; Switzer et al., 2006). O HTLV-4 foi isolado em uma única amostra também em Camarões (Switzer et al., 2006). Não se conhecem quadros clínicos associados aos HTLV-3 e HTLV-4.

O HTLV infecta predominantemente linfócitos T, levando a proliferação espontânea destas células e a produção de citocinas (Carvalho *et al.*, 2001). Sendo que o HTLV-1 tem tropismo por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e o HTLV-2 por linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Hall *et al.*, 1996).

A doença inflamatória PET/MAH é associada com circulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> ativados e elevada produção de citocinas incluindo interferon gama, fator de necrose tumoral alfa e interleucina 2 (Biddison *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2004).

Células mononucleares de indivíduos infectados pelo HTLV produzem grande quantidade de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Embora a quantidade de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em sobrenadante de cultura de linfócitos seja significantemente maior em pacientes com PET/MAH do que em portadores assintomáticos do HTLV-1, o nível sérico de IFN- $\gamma$  produzido em portadores assintomáticos do HTLV-1 é similar ao observado em pacientes com PET/MAH (Santos *et al.*, 2004).

Estudos epidemiológicos em regiões de alta prevalência têm demonstrado que as formas de transmissão do HTLV-1 e do HTLV-2 são similares. Assim sendo, as principais vias de transmissão desses vírus são a transfusão sanguínea, o compartilhamento de seringas e de agulhas contaminadas, o contato sexual e o aleitamento materno (Ishak *et al.*, 1995; Ferreira Jr. *et al.*, 1997; Manns *et al.*, 1999).

O HTLV-1 é endêmico no sudoeste do Japão (Matsuzaki *et al.*, 1993; Morofuji-Hirata *et al.*, 1993), partes da África, como Togo, Guiné-Bissau e Camarões (Holmgren *et al.*, 2003; Balogou *et al.*, 2000; Wolfe *et al.*, 2005), ilhas do Caribe e América do Sul (Ishak *et al.*, 1995; Bittencourt *et al.*, 2001; Gotuzzo *et al.*, 2000). A infecção por este vírus é rara na América do Norte e Europa (Taylor *et al.*, 2005), no entanto, é frequente na Melanésia, Papua Nova Guiné e ilhas Salomão, assim como em aborígenes australianos (Gessain *et al.*, 1993; Gessain *et al.*, 1993a; Furusyo *et al.*, 1999; Takao *et al.*, 2000; Cassar *et al.*, 2005).

A infecção por HTLV-2 é endêmica em várias populações nativas americanas e em usuários de drogas endovenosas em todo o mundo (Maloney *et al.*, 1992; Gessain *et al.*, 1993a; Madeleine *et al.*, 1993).

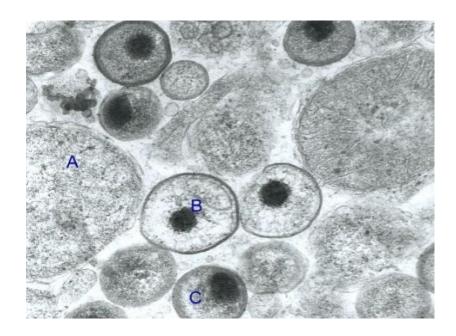
A distribuição geográfica do HTLV-2 na região Amazônica do Brasil ocorre principalmente entre grupos indígenas nativos e encontra-se em um processo epidemiológico de disseminação nas áreas urbanas. A endemicidade do HTLV-2 particularmente entre pequenas comunidades é mantida por um processo de latência do vírus, alternando com um período produtivo (Ishak *et al.*, 2001).

#### 1.3 CHLAMYDIA

As clamídias são bactérias imóveis, estruturalmente semelhantes a bactérias Gram negativo, são intracelulares, devido à incapacidade de gerar adenosina trifosfato (ATP), usando assim, fontes de energia da célula hospedeira. Pertencem à família Chlamydiaceae e compreendem um único gênero, *Chlamydia*, do qual fazem parte quatro espécies: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* e *C. pecorum*, que infectam seres humanos, aves e ruminantes (Manavi, 2006).

As clamídias possuem um ciclo de desenvolvimento bifásico. Durante a fase fora da célula alvo, estas bactérias formam estruturas celulares conhecidas como corpúsculos elementares, medindo cerca de 300 nm de diâmetro, que correspondem à forma extracelular infecciosa, porém não são capazes de replicar nesta forma (Matsumoto, 1982). Dentro das células alvo elas formam os corpúsculos reticulares, medindo cerca de 800 a 1.200 nm de diâmetro, que são formas não infecciosas que se replicam por fissão binária (Matsumoto, 1982). Após a multiplicação os corpúsculos reticulares diferenciam-se em

corpúsculos elementares, os quais são liberados das células por lise ou exocitose (Figura 6) (Moulder,1991; Manavi, 2006).



**Figura 6** - Micrografía eletrônica de célula infectada por *C. trachomatis*, onde se observam três estados do ciclo de desenvolvimento: (A) corpo reticulado, (B) forma intermediária entre corpo elementar e corpo reticulado e (C) corpo elementar (fonte: http://www.adn.es/.../IMA-0348-mundo-de-las-clamidias).

A *C. trachomatis* apresenta duas biovariantes chamadas de tracoma e linfogranuloma venéreo, os quais possuem 19 imunotipos (identificados por meio de reações entre anticorpos monoclonais e epítopos da proteína principal da membrana externa – MOMP) que são diretamente relacionados com as manifestações clínicas mais comuns que causam. Os sorotipos A, B, Ba e C são responsáveis pelo tracoma (Wright *et al.*, 2008), os sorotipos D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, Ja e K são associados a infecções sexualmente

transmissíveis e outras patologias (conjuntivite, pneumonite e sinusite) e L1, L2, L2a e L3 associados ao linfogranuloma venéreo (Spaargaren *et al.*, 2005; Pathela *et al.*, 2007).

O tracoma é caracterizado por uma ceratoconjuntivite folicular crônica recidivante mais proeminente na conjuntiva superior (Wright *et al.*, 2008). Clinicamente está dividido em doença ativa (estágio inicial), que acomete principalmente crianças e doença cicatricial (estágio tardio), o qual se desenvolve por volta da terceira década de vida. Devido a reinfecção, o tracoma ocasiona cicatrizes na conjuntiva, podendo levar à formação de entrópio e triquíase, as quais podem resultar em alterações irreversíveis da córnea, causando cegueira (Cook, 2008).

O linfogranuloma venéreo caracteriza-se pelo aparecimento de uma lesão genital de curta duração (de três a cinco dias), que se apresenta como uma ferida ou como uma elevação da pele. Essa lesão é passageira, não sendo facilmente identificada pelos pacientes. Após a cura da lesão primária, que acontece geralmente entre duas a seis semanas, surge um inchaço doloroso dos linfonodos inguinais de uma ou ambas as virilhas, denominado bubão. Se a infecção não for tratada adequadamente, evolui para o rompimento espontâneo e formação de feridas que drenam pus (Mabey & Peeling, 2002; Sethi *et al.*, 2009).

Devido ser um patógeno intracelular a infecção por *C. trachomatis*, induz uma resposta imunológica mediada por linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1) (Loomis & Starnbach, 2002). A presença de citocinas como interleucina 12, TNF-α e principalmente IFN-γ é importante na resolução da infecção primária por esta bactéria (Stagg *et al.*, 1998). Alguns estudos tem relacionado a presença de linfócitos T secretando IFN-γ antígeno-

específico com efeito protetor (Igietseme *et al.*, 2002) e um baixo número de linfócitos T ou secreção reduzida de IFN-γ com dano tecidual induzido pela presença de *C. trachomatis* (Debattista *et al.*, 2002).

A *Chlamydia pneumoniae* é um patógeno do trato respiratório humano que causa doença respiratória aguda e contribui com 5 a 10% dos casos de pneumonia adquirida na comunidade, bronquite e sinusite (Kuo *et al.*, 1995). Esta bactéria foi associada também com outras doenças como doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, doença cardiovascular e aterosclerose (Kuo *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1998; Grayston, 2000).

Vários estudos têm relacionado a infecção crônica por *C. pneumoniae* como um fator importante na patogênese de doença arterial coronariana, a principal causa de morbidade e mortalidade em humanos, além de outras síndromes ateroscleróticas (Georges *et al.*, 2003; Goyal *et al.*, 2006; Kirbis *et al.*, 2005; Rugonfalvi-Kiss *et al.*, 2007; Wang, S.S. *et al.*, 2007).

### 1.4 FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF)

O TNF-α e o TNF-β são citocinas pró-inflamatórias que foram obtidas em 1984 e associadas (*in vitro* e *in vivo*) com a destruição de células tumorais (Pennica *et al.*, 1984). A superfamília TNF consiste de 19 membros produzidos por monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T auxiliares tipo 1 e outras células (Chaturvedi, 2006).

A principal função fisiológica do TNF é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção e ativar essas células para erradicar os

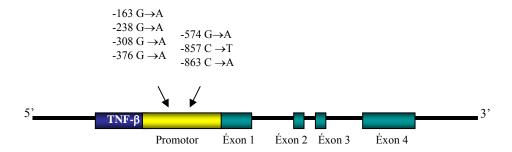
microrganismos, sendo responsável pela regulação da imunidade inata e mediando a inflamação aguda. O TNF estimula células endoteliais e macrófagos a secretar quimiocinas que acentuam a afinidade das integrinas leucocitárias por seus ligantes e induzem a quimiotaxia de leucócitos. O TNF também atua nos fagócitos mononucleares para estimular a secreção de interleucina 1, a qual age de forma semelhante ao TNF (Abbas *et al.*, 2008; Chaturvedi, 2006).

Os genes  $TNF-\alpha$  e  $TNF-\beta$  estão localizados no cromossomo 6, na região 6p23-q12, no complexo de histocompatibilidade principal (MHC) entre C2 da classe III e o HLA-B da classe I deste complexo. Pelo menos nove polimorfismos e cinco microsatélites no lócus TNF foram caracterizados e alguns deles foram fortemente associados com certos alelos HLA (Ruuls & Sedgwick, 1999).

O  $TNF-\beta$  possui homologia estrutural e cerca de 30% da sequência de aminoácidos idêntica ao  $TNF-\alpha$ , sendo, por isso, ambas as citocinas reconhecidas pelos mesmos receptores celulares de TNF amplamente distribuídos, e como consequências possuem vários efeitos similares (Abbas *et al.*, 2008).

Alguns estudos têm descrito polimorfismos de base única (*points mutations*) na região promotora do gene *TNF-α*, os quais podem ser importantes na sua expressão e produção da proteína. Entre eles destacam-se quatro polimorfismos comuns: uma substituição G→A na posição −308 (Wilson *et al.*, 1992), G→A na posição −238 (Kaluza *et al.*, 2000), C→T na posição −857 (D'Alfonso & Richiardi, 1994) e C→A na posição −863 (Herrmann *et al.*, 1998), além de três polimorfismos raros nas posições -163 (Uglialoro *et al.*, 1998), −376 (Uglialoro *et al.*, 1998) e −574 (Herrmann *et al.*, 1998). Os

mais estudados são os polimorfismos nas posições -238 (Kaluza *et al.*, 2000) e -308 (Wilson *et al.*, 1992), sendo nestes polimorfismos o alelo G o mais comum (Figura 7).



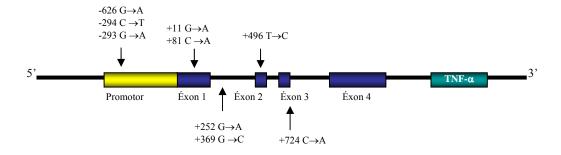
**Figura 7** - Representação esquemática da localização de polimorfismos do gene TNF- $\alpha$  (Fonte: Adaptado de Posch *et al.*, 2003).

A presença do alelo TNF-308A foi associada com suscetibilidade a uma série de doenças humanas como a malária (McGuire *et al.*, 1994; Sohail *et al.*, 2007), a leishmaniose mucocutânea (Cabrera *et al.*, 1995), a hanseníase (Roy *et al.*, 1997), o choque séptico (Mira *et al.*, 1999), a pancreatite aguda grave (Zhang *et al.*, 2003) e a doença celíaca (Cataldo *et al.*, 2005), todas associadas com altos níveis de TNF-α circulante no sangue periférico.

O polimorfismo na posição -238 (alelo A) está associado com a diminuição da transcrição do TNF-α (Santos 2000; 2002). Em pacientes com artrite reumatóide (Kaijzel *et al.*, 1998) e câncer (Jang *et al.*, 2001) a presença do alelo mutante TNF-238A está relacionada à proteção, assim como com a suscetibilidade a doenças como as hepatites B e C crônicas (Hohler *et al.*, 1998; Yee *et al.*, 2000), esclerose múltipla (Huizinga *et al.*, 1997) e psoríase em homens (Reich *et al.*, 1999). Muitas dessas doenças podem apresentar

uma base genética e o gene *TNF* é um candidato em potencial à predisposição genética dessas doenças.

Com relação ao gene TNF- $\beta$  foram descritos nove polimorfismos de base única. Na região promotora foram descritos três polimorfismos: nas posições -626 (G $\rightarrow$ A), -294 (C $\rightarrow$ T) e -293 (G $\rightarrow$ A). No éxon 1 foram localizados polimorfismos nas posições +11 (G $\rightarrow$ A) e +81 (C $\rightarrow$ A). Dois polimorfismos foram encontrados no primeiro íntron: na posição +252 (G $\rightarrow$ A) e +369 (G $\rightarrow$ C). No éxon 2 encontra-se um polimorfismo na posição +496 (T $\rightarrow$ C) e no éxon 3 localiza-se o polimorfismo na posição +724 (C $\rightarrow$ A) (Messer et al., 1991; Abraham et al., 1991; Ferencik et al., 1992; Knight et al., 2003 – Figura 8).



**Figura 8** - Representação esquemática da localização de polimorfismos do gene *TNF-β* (Fonte: Adaptado de Posch *et al.*, 2003).

O polimorfismo descrito na posição +252 no primeiro íntron, através de digestão utilizando-se a enzima de restrição *Nco*I, resulta na variação de um aminoácido na sequência do TNF-β na posição 26 que é uma asparagina para o TNFβ1 e uma treonina para o TNFβ2 (Messer *et al.*, 1991). A análise de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos homozigotos para TNFβ1, quando estimuladas com

fitohemaglutinina, demonstrou uma produção aumentada de TNF-β, enquanto indivíduos homozigotos para TNFβ2 mostraram uma produção maior de TNF-α e interleucina 1 (Messer *et al.*, 1991; Pociot *et al.*, 1991).

Cabrera *et al.*, em 1995 observaram um risco relativo elevado em pacientes com leishmaniose mucocutânea portadores do alelo B2 para o polimorfismo do gene  $TNF-\beta$  (+252) comparado ao grupo controle.

# 1.5 INTERFERON GAMA (IFN-γ)

O interferon-γ é um homodímero composto de subunidades de aproximadamente 25 KDa, sendo secretados pelos linfócitos T auxiliares (Th) e T citotóxico (Tc), bem como pelas células *natural killer* (NK) ativadas. Os interferons são conhecidos por sua ação antiviral e o IFN-γ não é exceção, apresentando ainda papéis imunológicos distintos (Abbas *et al.*, 2008).

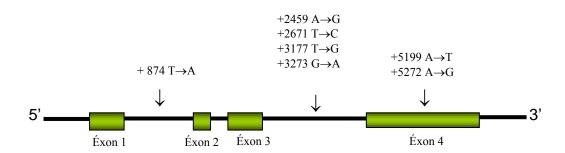
O gene  $IFN-\gamma$  humano está localizado no cromossomo 12, na região 12q24.1, possuindo quatro éxons e três íntrons (Cicarone et~al., 1990).

A sequência do DNA do gene *IFN-γ* humano mostra a presença de uma repetição CA, de comprimento variável, no primeiro íntron do gene. Pravica *et al.*, 1999, investigaram a distribuição alélica deste gene e identificaram cinco alelos diferentes. Entre estes, o alelo 2 mostrou uma significante associação com o aumento da produção de IFN-γ *in vitro*.

Um polimorfismo de base única, com substituição de T para A na posição +874 foi descrito no primeiro íntron do gene *IFN-γ*, o qual coincide com um provável sítio

de ligação NF-kB que pode representar um papel importante na produção elevada de IFN-γ. A associação dos alelos com uma baixa (AA), média (AT) e alta (TT) produção de citocina foi demonstrada *in vitro* (Pravica *et al.*, 2000).

Iwasaki *et al.*, em 2001, sequenciaram o gene *IFN-γ* e descreveram seis polimorfismos de base única, sendo quatro localizados no terceiro íntron: A→G na posição +2459, T→C na posição +2671, T→G na posição +3177 e G→A na posição +3273. Os polimorfismos A→T na posição +5199 e o A→G na posição +5272 foram localizados no éxon 4 (Figura 9).



**Figura 9** - Representação esquemática da localização de polimorfismos do gene *IFN-γ* (Fonte: Adaptado de Iwasaki *et al.*, 2001).

Kamali-Sarvestani *et al.*, em 2005, observaram uma frequência significantemente maior do genótipo TT (IFN-γ +874) em pacientes com câncer de mama do que no grupo controle, sugerindo a presença deste genótipo como um fator de risco para o desenvolvimento deste tipo de câncer em mulheres iranianas.

Cataldo *et al.*, em 2005, não encontraram associação significativa entre os genótipos do polimorfismo do IFN-γ comparando-se o grupo de pacientes com doença celíaca e grupo controle.

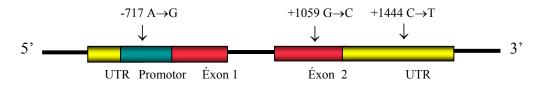
Vallinoto *et al.*, em 2010, avaliando os níveis séricos e o polimorfismo do IFN-γ na posição +874, em pacientes com tuberculose, observaram associação estatisticamente significante entre a presença do alelo +874A e o genótipo +874AA em pacientes com tuberculose, sugerindo uma associação entre o polimorfismo do IFN-γ +874T/A e a suscetibilidade a infecção por *M. tuberculosis* na população estudada.

# 1.6 PROTEÍNA C REATIVA (PrtCR)

A proteína C reativa é um membro da família das pentraxinas, assim denominadas em razão de sua estrutura pentamérica. Essa estrutura consiste de cinco subunidades de 206 aminoácidos cada, ligadas de forma não covalente, organizadas simetricamente em torno de um poro central. A PrtCR foi originalmente descrita no plasma de pacientes com infecções agudas devido à sua capacidade de reagir com o polissacarídeo C do *Pneumococcus* (Gabay & Kushner, 1999).

A ação da PrtCR consiste na neutralização de antígenos agressores, controlando danos teciduais e promovendo reparos nos tecidos (Zimmerman *et al.*, 2003). Atua ainda como uma opsonina para bactérias invasoras e complexos imunes circulantes e também ativa a ação das proteínas do complemento. Estas funções promovem a fagocitose, aceleram a quimiotaxia e ativam as plaquetas circulantes (Steel & Whitehead, 1994).

O gene da *PrtCR* está localizado no cromossomo 1 na região 1q23.2 (Walsh *et al.*, 1996) e consiste de dois éxons separados por um íntron que contém uma sequência de repetições polimórficas GT. Vários polimorfismos neste gene como o -717A→G, localizado na região promotora, o +1444 C→T, localizado na região não traduzida e o +1059G→C, localizado no éxon 2 foram associados com doença coronariana (Figura 10) (Cao & Hegele, 2000; Brull *et al.*, 2003).



**Figura 10** - Representação esquemática da localização de polimorfismos do gene da *PrtCR* (Fonte: Adaptado de Chen *et al.*, 2005; Hage & Szalai, 2007).

Chen *et al.*, em 2005, analisaram o polimorfismo da PrtCR na posição -717 e não encontraram correlação entre este polimorfismo e níveis séricos desta proteína, porém observaram que a frequência do alelo -717A foi significantemente maior em pacientes com doença coronariana do que no grupo controle.

Brull *et al.*, em 2003, não encontraram associação estatisticamente significante para o polimorfismo da PrtCR (-717) comparando o grupo de pacientes com doença coronariana e o grupo controle.

# 1.7 ASSOCIAÇÕES ENTRE MARCADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E AGENTES INFECCIOSOS

A patogênese da doença causada pelo vírus da dengue ainda não está completamente esclarecida. Vários estudos têm relatado associações entre elevados níveis de citocinas e diferentes manifestações clínicas (Hober, *et al.*, 1993; Chaturvedi *et al.*, 2000; Braga *et al.*, 2001; Leitmeyer *et al.*, 2002). Foi demonstrado também que vários genes de citocinas contêm polimorfismos localizados nas regiões promotoras, que podem afetar a transcrição do gene, causando variações na produção da citocina e ser associados com o resultado da doença infecciosa (Reynard *et al.*, 2000; Fernández-Mestre *et al.*, 2004).

O TNF-α e o IFN-γ estão entre as primeiras citocinas que aparecem em ambos soro e cultura de células mononucleares do sangue periférico humano de indivíduos infectados pelos vírus da dengue (Chaturvedi *et al.*, 1999; Chaturvedi *et al.*, 2000), sendo o TNF-α detectado a partir do primeiro dia em cultura de células, atingindo o pico máximo no segundo dia e declinando após o quinto dia. O IFN-γ foi detectado a partir do segundo dia em cultura de células, atingindo o pico máximo no terceiro dia, não sendo mais detectado após o sexto dia (Chaturvedi *et al.*, 1999).

Um significante aumento do alelo TNF-308A, que geneticamente predispõe para a expressão de níveis elevados de TNF, foi observado em pacientes com quadros de febre hemorrágica pela dengue (Fernández-Mestre *et al.*, 2004).

Chakravarti & Kumaria, em 2006, realizando estudos sobre a associação entre níveis séricos de TNF-α e IFN-γ e a infecção pelo VD observaram que a concentração

sérica de ambas as citocinas foi mais elevada em pacientes com a doença do que no grupo controle saudável.

Um estudo comparando níveis séricos de IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , em crianças com menos de um ano de idade com e sem dengue, mostrou níveis de citocinas mais elevados em crianças com dengue, demonstrando resultados estatisticamente significantes, para IL-6, e IFN- $\gamma$ , sendo os níveis destes marcadores mais elevados nos casos de febre clássica da dengue. No entanto, os níveis de TNF- $\alpha$  foram mais elevados em pacientes com febre hemorrágica da dengue. Os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  foram maiores em pacientes com infecção secundária, enquanto que o nível de IFN- $\gamma$  foi maior em pacientes com infecção primária (Restrepo *et al.*, 2008).

Levy *et al.*, em 2010, avaliando os níveis séricos de PrtCR em 36 pacientes com dengue clássica, 34 pacientes com febre hemorrágica e 10 indivíduos saudáveis (grupo controle), observaram níveis desta proteína aumentados em pacientes com febre hemorrágica comparados aos outros grupos, sendo associado ainda com a ocorrência de infecção secundária pelo vírus.

Nishimura *et al.*, em 2000, investigaram a presença de polimorfismos dos genes das citocinas  $TNF-\alpha$  e  $TNF-\beta$  em pacientes japoneses com PET/MAH, LLcTA, portadores assintomáticos e um grupo controle saudável e observaram que a frequência do genótipo -857 T/C para o polimorfismo do TNF- $\alpha$  foi significantemente maior em pacientes com PET/MAH do que no grupo controle. Encontraram também diferença estatisticamente significante para o polimorfismo no primeiro íntron do gene  $TNF-\beta$  entre

pacientes com PET/MAH e portadores assintomáticos do HTLV, sendo o mesmo observado também entre pacientes com PET/MAH e o grupo controle.

Tsukasaki *et al.*, em 2001, analisando a associação entre o polimorfismo do TNF-α (-857) e o desenvolvimento de leucemia/linfoma de células T do adulto em portadores do HTLV-1 observaram que o alelo TNF-α-857T foi mais frequente em pacientes com LLcTA do que em portadores assintomáticos.

Em estudo de associação entre a carga pró-viral do HTLV-1 e polimorfismos de citocinas como TNF-α e TNF-β, IL-6 e IL-10 não foi demonstrada correlação significante da presença destes marcadores tanto em pacientes com PET/MAH como em portadores assintomáticos do vírus (Nishimura *et al.*, 2003). No entanto, Goon *et al.*, 2003, usando citometria de fluxo demonstraram frequências significantemente maiores de células T CD4<sup>+</sup> HTLV-1-específicas positivas para TNF-α e IL-2 em pacientes com PET/MAH que em portadores assintomáticos do HTLV-1.

Santos *et al.*, (2004), avaliaram o nível sérico médio de TNF-α em 17 pacientes com PET/MAH, 36 portadores assintomáticos do HTLV e 15 indivíduos saudáveis (controle negativo), sendo encontrados níveis mais elevados de TNF-α em pacientes com PET/MAH comparado com portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle, no entanto, não houve associação significante quando comparados os três grupos.

Best *et al.*, em 2006 realizando uma análise univariada observaram associação significante entre PET/MAH e alguns marcadores como níveis séricos de IFN-γ e a carga pró-viral do HTLV-1, mas após a análise de regressão logística múltipla somente a carga pró-viral permaneceu associada significantemente com PET/MAH.

No Brasil, Montanheiro *et al.*, em 2009, analisaram a concentração de TNF-α em 68 portadores assintomáticos do HTLV, 44 pacientes com PET/MAH e 32 controles saudáveis e não encontraram níveis significantemente elevados desta citocina comparando ambos os grupos de pacientes com o grupo controle, no entanto, encontraram concentrações de IFN-γ significantemente mais elevadas em pacientes com PET/MAH que em portadores assintomáticos e controles saudáveis.

Talledo *et al.*, em 2010, no Peru, avaliaram o polimorfísmo do gene *TNF-α* (-863) em 71 pacientes com PET/MAH e 94 portadores assintomáticos do HTLV e não encontraram nenhuma diferença significativa tanto na distribuição dos genótipos quanto dos alelos nos grupos envolvidos.

Conway *et al.*, em 1997, estudando polimorfismos do TNF-α demonstraram uma frequência maior da presença do alelo TNF-308A em pacientes com tracoma do que no grupo controle, sendo esta associação estatisticamente significante. Para o alelo TNF-238A apesar da frequência elevada em pacientes não foi observada associação estatisticamente significante.

Mozzato-Chamay *et al.*, em 2000, investigando o polimorfismo do gene TNF-α, na posição -376, em 238 pacientes com tracoma e 239 indivíduos do grupo controle não encontraram diferenças significantes tanto na frequência genotípica quanto alélica de ambos os grupos.

Georges et *al.*, em 2003, avaliaram os níveis de TNF-α em 991 pacientes com doença coronariana e em 333 indivíduos saudáveis (grupo controle) e encontraram níveis desta citocina mais elevados em pacientes do que no grupo controle, porém, não

encontraram associação entre as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo de TNF- $\alpha$  (-308) entre os grupos.

Natividad *et al.*, em 2007, investigaram polimorfismos de citocinas em pacientes com tracoma e correlacionaram a presença do alelo TNF-308A com produção aumentada de TNF em culturas de linfócitos estimuladas com antígeno de corpos elementares de clamídia.

Atik *et al.*, em 2008, avaliando o polimorfismo do TNF-α (-308) e do *TNF-β* (+252), em 339 pacientes com tracoma e 232 pacientes do grupo controle encontraram associação estatisticamente significante entre a presença dos genótipos TNF-α-308AG e TNF-α-308AA e risco diminuído de tracoma, assim como associação entre a presença do alelo *TNF-β*+252B2 e a ocorrência de tracoma.

Ohman *et al.*, em 2009, analisaram polimorfismos de citocinas em amostras de mulheres com quadro de infertilidade tubária associado à inflamação crônica por *C. trachomatis* e observaram uma associação significante entre a presença do alelo TNF-308A e o risco de dano tubário grave nestas pacientes.

#### 1.8 OBJETIVOS

# 1.8.1 Objetivo Geral

Caracterizar marcadores da resposta inflamatória do hospedeiro humano e marcadores dos agentes virais e bacterianos que possam influenciar o curso da infecção, utilizando-se abordagens soroepidemiológica, imunológica e molecular.

# 1.8.2 Objetivos Específicos

- (i) Descrever informações demográficas e sociais dos grupos envolvidos e das pessoas infectadas;
- (ii) Descrever a concentração de marcadores da resposta inflamatória no sangue periférico (TNF-α, TNF-β, IFN-γ e PrtCR), em grupos populacionais distintos, acometidos de infecções pelo vírus da dengue, HTLV-1 e HTLV-2, *C. trachomatis* e *C. pneumoniae*.
- (iii) Descrever a presença e a frequência de polimorfismos nos genes  $TNF-\alpha$ ,  $TNF-\beta$  e  $IFN-\gamma$ , nos diversos grupos populacionais envolvidos;
- (iv) Associar a concentração dos marcadores no sangue periférico com a patogenicidade em grupos populacionais humanos infectados de acordo com suas manifestações clínicas tais como quadros de doença febril (grupos infectados e não infectados pelo VD), quadros de doença neurológica (PET/MAH) e infecção assintomática (HTLV-1 e HTLV-2) e quadros de doença coronariana (*C. trachomatis* e *C. pneumoniae*);
- (v) Associar a frequência dos polimorfismos dos marcadores acima com a patogenicidade nos grupos populacionais estudados;

(vi) Associar os marcadores (no sangue periférico e polimorfismos) de resposta inflamatória humana às características de espécie/sorotipo/genótipo viral ou bacteriano;

# 2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1 GRUPOS POPULACIONAIS E COLETA DAS AMOSTRAS

Após a aceitação em participar do projeto (vide seção 2.6) foram coletadas amostras de sangue periférico em um sistema de colheita a vácuo (5mL), em tubos contendo EDTA como anticoagulante, de acordo com os grupos a seguir:

# A) Grupo Dengue:

Foram coletadas 180 amostras de pacientes que apresentavam doença com manifestação de quadro febril no Ambulatório do Laboratório de Arbovirologia, do Instituto Evandro Chagas, no período de outubro de 2006 a abril de 2007. Destas, 80 amostras foram positivas e 100 amostras foram negativas para o vírus da dengue, em cultura de células.

# B) Grupo HTLV:

Foram utilizadas 77 amostras de pacientes com suspeita clínica de infecção por HTLV oriundas do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) tanto que faziam parte da soroteca do laboratório de virologia da UFPA, assim como as amostras coletadas no período de outubro de 2006 a abril de 2007. Destas 30 pertenciam à pacientes com infecção sintomática pelo HTLV (22 com sintomas neurológicos e 08 com sintomas dermatológicos) e 47 amostras eram de portadores assintomáticos deste vírus.

# C) Grupo Doença Coronariana:

Foram coletadas 89 amostras de pacientes com doença coronariana no Hospital de Clínicas Gaspar Viana (HCGV), no período de outubro de 2006 a abril de

2007. Após testes sorológicos, as amostras foram divididas em dois grupos: 58 amostras de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* e 31 amostras de pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para esta bactéria.

# D) Grupo controle:

Foi composto por 99 amostras, sendo 37 de voluntários saudáveis que assinaram o TCLE e concordaram participar do projeto (no período de outubro de 2006 a abril de 2007) e 62 amostras de militares do sexo masculino pertencentes à soroteca do Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Pará. Estas últimas foram utilizadas sob a permissão da chefia do laboratório, reconhecendo que não se poderia entrar em contato direto com estes indivíduos, assim como respeitando os TCLE assinados por estes, no momento de sua pesquisa original, autorizando a utilização do material biológico em outros projetos desde que devidamente aprovados por órgão competentes.

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, onde as mesmas foram centrifugadas e separadas em alíquotas de soro, plasma e sangue total que foram congeladas à -20°C até o momento do uso.

# 2.2 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR VÍRUS DA DENGUE, HTLV-1 e HTLV-2, C. TRACHOMATIS E C. PNEUMONIAE

O diagnóstico da infecção pelo VD (realizado no laboratório de Arbovirologia do Instituto Evandro Chagas) foi feito pela tentativa de isolamento do vírus, por meio da inoculação em cultura de células de *Aedes albopictus* clone C6/36. As

monocamadas celulares inoculadas foram deixadas à temperatura ambiente (em torno de 28 °C) e observadas diariamente em microscópio óptico invertido até o 10° dia após a infecção celular, na busca de efeito citopático (ECP).

As células infectadas, com ou sem a presença de ECP, foram coletadas e a multiplicação viral confirmada primeiramente pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando fluídos ascíticos hiperimunes de camundongo (FAI) polivalente para flavivírus (anti-flavivírus) e para alfavirus (anti-alfavirus), sendo este último utilizado como controle de especificidade. Os casos positivos foram posteriormente confirmados e discriminados de acordo com a espécie, por meio de uma IFI, utilizando anticorpos monoclonais específicos para DEN 1, DEN 2, DEN 3 e DEN 4.

As amostras foram triadas para a presença de anticorpos contra o HTLV-1 e HTLV-2 por um ensaio imunoenzimático do tipo ELISA (HTLV-1/HTLV-2 *Ab-Capture ELISA Test System, ORTHO*, Raritan, New Jersey), conforme instruções do fabricante. A sororreatividade foi confirmada por w*estern blot* (HTLV Blot 2.4, w*estern blot assay* MP Diagnostics ®, Geneva, Switzerland) ou por meio da reação em cadeia mediada pela polimerase amplificando o gene pX.

A detecção de anticorpos totais para o gênero *Chlamydia* foi realizada usando-se um ensaio imunoenzimático do tipo ELISA (*Microwell ELISA Chlamydia IgG*, *Diagnostic Automation, Inc. Calabasas, USA*), de acordo com as instruções do fabricante. A discriminação da reatividade de anticorpos para *C. pneumoniae* e os 15 sorotipos de *C. trachomatis* foi feita por microimunofluorescência (Ishak & Ishak, 2001).

# 2.3 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DAS CONCENTRAÇÕES DE TNF-α, TNF-β, IFN-γ E PrtCR NO SANGUE PERIFÉRICO

A determinação quantitativa das concentrações de TNF-α, TNF-β e IFN-γ no plasma ou soro foi realizada utilizando um ensaio imunoenzimático (*Human ELISA Ready-SET-Go, EBioscience*, Inc. *California, San Diego, USA*). Este teste utiliza um anticorpo monoclonal específico para a detecção de cada um dos marcadores acima.

A curva padrão para TNF-α e IFN-γ foi feita utilizando cinco pontos de referência a partir de uma solução estoque (500 pg/mL) realizando-se uma diluição seriada para obtenção das seguintes concentrações: 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL e 62,5 pg/mL. O diluente de teste 1X serviu como padrão zero (0 pg/mL). Para ambos o limite mínimo de detecção foi de 4 pg/mL.

Para a curva padrão para TNF-β foram utilizados cinco pontos de referência a partir de uma solução estoque (1.000 pg/mL) realizando-se uma diluição seriada para obtenção das seguintes concentrações: 1.000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL e 125 pg/mL. O diluente de teste 1X serviu como padrão zero (0 pg/mL). O limite mínimo de detecção foi de 8 pg/mL.

Para determinar quantitativamente a concentração de PrtCR nas amostras de plasma ou soro foi utilizado um ensaio imunoenzimático (*Microwell ELISA C –Reactive Protein, Diagnostic Automation, Inc. Calabasas, USA*). Este teste utiliza um anticorpo monoclonal específico para PrtCR.

A curva padrão para PrtCR foi feita utilizando seis pontos de referência a partir da reconstituição de cada padrão com as seguintes concentrações: 0,100 mg/L, 0,050

mg/L, 0,025 mg/L, 0,010 mg/L, 0,005 mg/L e 0 mg/L. O limite de detecção variou de 0,1 pg/mL a 10 mg/L. As amostras com concentrações de PrtCR superiores a 10 mg/L foram diluídas 1:1000 e testadas novamente.

Todos os testes foram executados de acordo com as instruções dos fabricantes.

# 2.4 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DE CITOCINAS

# 2.4.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído de leucócitos do sangue periférico pelo método do Fenol-Clorofórmio. O procedimento ocorreu de acordo com as seguintes etapas:

- LISE DE HEMÁCIAS (Solução A: Cloreto de Amônio [1.0M], EDTA [0.1M], H<sub>2</sub>O destilada; Solução B: Bicarbonato de Amônio [1.0M], H<sub>2</sub>O destilada).
  - 1. Em um tubo de 2 mL adicionar 300  $\mu$ L de sangue e 900  $\mu$ L de solução de lise de hemácias.
  - 2. Agitar por inversão durante 20 minutos.
  - 3. Centrifugar (14.000 rpm) por 3 minutos.
  - 4. Descartar o sobrenadante e acrescentar 900  $\mu L$  da solução de lise de hemácias novamente.

- 5. Agitar por inversão durante 20 minutos.
- 6. Centrifugar (14.000 rpm) por 3 minutos.
- 7. Descartar o sobrenadante.
- LISE DE LEUCÓCITOS (Tris-HCl [100mM], EDTA [20mM], NaCl [200mM], SDS 0,5 %, H<sub>2</sub>O destilada).
  - 1. Acrescentar ao precipitado 500 μL de solução de lise de leucócitos.
  - 2. Agitar no vortex até dissolver o precipitado.
  - 3. Incubar em banho maria (55°C) por 30 minutos.
- PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS (Acetato de Amônio [7,5M], H<sub>2</sub>O destilada).
  - 1. Acrescentar 200 μL de solução de precipitação de proteínas.
  - 2. Agitar brevemente no vortex.
  - 3. Levar ao banho maria (55°C) por 30 minutos.
  - 4. Centrifugar (14.000 rpm) por 10 minutos.
  - 5. Transferir o sobrenadante para um tubo de 2 mL limpo (descartar o tubo com o precipitado de proteínas).
  - 6. Adicionar 500 µL de Fenol-Clorofórmio álcool isoamílico.

- 7. Agitar por inversão por 10 minutos.
- 8. Centrifugar (14.000 rpm) por 10 minutos.
- 9. Transferir o sobrenadante para um tubo de 2 mL limpo.
- 10. Acrescentar ao sobrenadante 1,5 mL de Isopropanol (2-propanol).
- 11. Visualizar o *pellet* de DNA. (Verificar conforme a quantidade de DNA formado a quantidade de H<sub>2</sub>O para hidratá-lo).
- 12. Centrifugar (14.000 rpm) por 10 minutos.
- 13. Desprezar o sobrenadante.
- 14. Adicionar 200 μL de Etanol a 70% lavando a parede do tubo.
- 15. Desprezar o etanol e deixar secando até evaporar completamente o álcool.
- 16. Adicionar H<sub>2</sub>O para hidratá-lo.

# 2.4.2 Genotipagem

# 2.4.2.1 Polimorfismo do TNF-α

O polimorfismo -308G $\to$ A na região promotora do gene *TNF-\alpha* foi investigado utilizando-se a reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) seguida da

análise com enzimas de restrição, RFLP (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*). As amplificações foram realizadas no equipamento termociclador *Peltier Thermal Cycler* (BIOCYCLER).

A reação foi realizada em um volume final de 25μL, contendo 50 ng de DNA total extraído, 0,2 μM de cada dNTP, 05 pmol/μL de cada iniciador, MgCl<sub>2</sub> 1,5 μM, KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase. Os iniciadores empregados nesta reação foram: TNF-FW: 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' e TNF-R: 5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3', os quais amplificaram um segmento de 107 pb (Allen *et al.*, 2000).

A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 1 minuto à 94°C (desnaturação), 1 minuto à 58°C (hibridização), 1 minuto à 72°C (extensão) e uma extensão final de 5 minutos à 72°C.

O produto da amplificação foi digerido pela enzima de restrição *Nco*I (*Invitrogen*, Brasil) a 37°C por 5 horas, em uma reação contendo 7μL do produto amplificado, 3 unidades da enzima (0,3 μL), 2,5μL de tampão 10X e 8μL de água estéril.

Durante a PCR é amplificado um fragmento de 107pb que pode ou não conter um sítio de restrição para a enzima *Nco*I. Em portadores do alelo G, esse sítio de restrição é mantido, o que resulta, após digestão, na formação de dois fragmentos menores, um de 87 bp e outro de 20 bp. Nos portadores do alelo A, o sítio de restrição é perdido, mantendo-se assim o fragmento íntegro com 107 bp (Tabela 1).

Os produtos das amplificações e da digestão enzimática foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 4%, em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque – TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na<sub>2</sub> 40 mM/1000 mL água deionizada), contendo 5 µL de brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta.

# 2.4.2.2 Polimorfismo do TNF-β

O polimorfismo do TNF-β na posição +252, no primeiro íntron, foi investigado através da PCR e de digestão enzimática.

A reação foi realizada em um volume final de 50 μL, contendo 50 ng de DNA total extraído, 0,2 μM de cada dNTP, 10 pmol/μL de cada iniciador, MgCl<sub>2</sub> 1,5 μM, KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 1,0 U de *Taq* DNA polimerase. O par de iniciadores empregado nesta reação foi: TNF-β F: 5'-CCG TGC TTC GTG GTT TGG ACT-3' e TNF-β R: 5'-AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT C-3', os quais amplificaram um segmento de 782 pb (Majetschak *et al.*, 2002).

A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 37 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 55°C, 1 minuto à 72°C e uma extensão final de 10 minutos à 72°C.

O produto amplificado foi submetido à digestão com a enzima de restrição NcoI em um volume total de 20  $\mu$ L, contendo 15  $\mu$ L do produto amplificado, 0,1  $\mu$ L de NcoI (uma unidade), 2  $\mu$ L de tampão (B3\*) e 2,9  $\mu$ L de água estéril, o qual foi incubado a 37°C por 5 horas.

A enzima *Nco*I pode clivar o produto da digestão em três fragmentos de 782 pb, 586 pb e 196 pb (heterozigose G/A), em dois fragmentos de 586 pb e 196 pb (homozigose para o alelo G), ou não clivar o produto (homozigose para o alelo A) (Tabela 1).

Os produtos das amplificações e das digestões enzimáticas foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 1,5%, em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque – TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na<sub>2</sub> 40 mM/1000 mL água deionizada), contendo 5 µL de brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta.

# 2.4.2.3 Polimorfismo do IFN-y

O polimorfismo do IFN-γ na posição +874, no primeiro íntron, foi investigado pela PCR, utilizando iniciadores alelo específico (ASO-PCR).

A reação foi realizada um volume final de 30 μL, contendo 50 ng de DNA total extraído, 0,2 μM de cada dNTP, 05 pmol/μL de cada iniciador, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 1,0 U de *Taq* DNA polimerase. Os iniciadores empregados nesta reação foram: IFN-γ (+874) PC: 5'-TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA-3'; IFN-γ (+874) T: 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT-3'ou IFN-γ (+874) A: 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA-3', os quais amplificaram um segmento de 262 pb (Pravica *et al.*, 2000).

A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 40 segundos à 94°C, 40 segundos à 56°C, 50 segundos à 72°C e uma extensão final de 5 minutos à 72°C.

A interpretação do resultado foi determinada pela presença ou ausência do produto amplificado conforme o iniciador alelo específico utilizado (Tabela 1).

Os produtos das amplificações foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 4,0%, em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque – TrisBase 1,6, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na<sub>2</sub> 40 mM/1000 mL água deionizada), contendo 5 µL de brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta.

**Tabela 1** – Relação dos polimorfismos nos genes das citocinas estudadas.

Citocina	Polimorfismo	Método	Iniciadores	Tamanho dos alelos
TNF-α	-308 G→A	PCR e RFLP	TNF- FW: 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3'	G: 87bp e 20bp A: 107 bp
			TNF R - 5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3'	
TNF-β	+252 G→A	PCR e RFLP	TNF-β F: 5'-CCG TGC TTC GTG GTT TGG ACT-3' TNF-β R: 5'-AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT C-3'	G: 586 pb e 196 pb A: 782 pb
IFN-γ	+874 A→T	ASO-PCR	Primer comum: 5'-TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA-3' Alelo T: 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT-3' Alelo A: 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA-3'	A ou T: 262 pb

#### 2 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007), usando para a comparação entre as dosagens séricas das citocinas, testes estatísticos paramétricos da ANOVA de um critério para os casos de análise de variância de mais de duas amostras e o teste de Qui-quadrado ou G (quando indicado) para análise dos polimorfismos das citocinas.

Para a análise dos dados sócio demográficos foram utilizados o teste da ANOVA de um critério para comparação das idades e o teste de Qui-quadrado ou G (quando indicado) para comparação de sexo e procedência entre os grupos estudados. Estabeleceu-se em 0,05 (5 %) o nível de rejeição da hipótese de nulidade (valor de  $p \le 0,05$ ).

# 2.6 COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

O presente projeto foi submetido ao Comitê de ética em pesquisa da Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA), seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde), sendo aprovado em 10 de maio de 2006 (Anexo 1).

Todos os indivíduos foram informados previamente sobre os objetivos do projeto e os que aceitaram participar assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – anexo 2) e responderam a um questionário epidemiológico (anexo 3) cujas informações foram usadas posteriormente na análise dos dados demográficos e sociais.

#### **3 RESULTADOS**

# 3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS ENVOLVIDOS

#### 3.1.1 Grupo Dengue

Dos 80 pacientes positivos para dengue, 34 (42,5%) eram do sexo feminino, com idade variando entre 8 a 56 anos (média de 33 anos). Os 46 (57,5%) do sexo masculino tinham idade entre 7 a 67 anos (média de 33 anos) e para ambos os sexos a maioria (77,5%) residia em Belém (Tabela 2).

Foram identificadas 19 amostras como infectadas pelo DEN 1 (23,8%; 10 mulheres e 9 homens), 8 pelo DEN 2 (10%; 2 mulheres e 6 homens) e 53 pelo DEN 3 (66,2%; 22 mulheres e 31 homens).

Das 100 amostras pertencentes ao grupo de pacientes negativos para dengue, 47 (47%) eram do sexo feminino, com idade variando entre 3 a 63 anos (média de 31 anos). Nos 53 (53 %) pacientes do sexo masculino, a idade variou entre 4 a 73 anos (média de 31 anos) e para ambos a maioria residia em Belém (81%).

Não foi observada associação estatisticamente significante entre os grupos dengue positivo e dengue negativo em relação ao sexo ( $\chi^2$ =0,364 e p=0,5465), idade (F=0,8259 e p=0,6318) e procedência ( $\chi^2$ =0,017 e p=0,8958).

Quando comparados os grupos DEN 1, DEN 2 e DEN 3 também não foi observada associação estatisticamente significante com relação ao sexo (G=1,1630 e p=0,5591), idade (F=0,2063 e p=0,8160) ou a procedência (G=0,017 e p=0,7763).

**Tabela 2** - Sororreatividade para o vírus da dengue de acordo com as características demográficas do grupo examinado.

GRUPO	SEXO		MÉDIA DE	PROCEDÊNCIA		
	Masculino (%)	Feminino (%)	IDADE	Belém (%)	Ananindeua (%)	Outros (%)
Dengue Positivo (n=80)	46 (57,5)	34 (42,5)	33	62 (77,5)	12 (15,0)	06 (7,5)
Dengue 1 (n=19)	09 (47,4)	10 (52,6)	33	16 (84,2)	02 (10,5)	01 (5,3)
Dengue 2 (n=08)	06 (75,0)	02 (25,0)	33	06 (75,0)	01 (12,5)	01 (12,5)
Dengue 3 (n=53)	31 (58,5)	22 (41,5)	33	40 (75,5)	09 (17,0)	04 (7,5)
Dengue Negativo (n=100)	53 (53,0)	47 (47,0)	31	81 (81,0)	15 (15,0)	04 (4,0)

# 3.1.2 Grupo HTLV

Entre os 30 portadores sintomáticos do HTLV, 21 (70%) pertenciam ao sexo feminino, com idade variando entre 24 a 70 anos (média de 51 anos). Os 9 (30%) pacientes do sexo masculino tinham idade entre 33 a 69 anos (média de 54 anos). A média de idade geral deste grupo foi de 52 anos (Tabela 3).

A análise molecular revelou que das 21 amostras do sexo feminino 18 eram HTLV-1 (85,7%) e 3 eram HTLV-2 (14,3%). Todas as 9 amostras do sexo masculino foram identificadas como HTLV-1.

Com relação aos 47 portadores assintomáticos do HTLV, 34 (72,3%) pertenciam ao sexo feminino, com idade variando entre 12 a 74 anos (média de 47 anos). Os 13 (27,7%) pacientes do sexo masculino tinham idade entre 25 a 79 anos (média de 47 anos).

Após a análise molecular observou-se que das 34 amostras do sexo feminino 25 (73,5%) eram HTLV-1 e 6 (17,6%) eram HTLV-2 e 3 (8,8%) não foram identificadas. Entre as 13 amostras do sexo masculino 11 (84,6%) foram identificadas como HTLV-1 e 2 (15,4%) como HTLV-2.

Comparando-se os grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos do HTLV não foi encontrada associação estatisticamente significante com relação ao sexo ( $\chi^2$ =0,049 e p=0,8246) nem com a idade (F=0,2563 e p=0,6202).

Considerando-se o tipo de HTLV entre portadores sintomáticos e assintomáticos não houve associação estatisticamente significante quando comparados sexo (G=3,3634 e p=0,3389) ou idade (F=0,4870 e p=0,6966).

**Tabela 3** – Classificação molecular do HTLV de acordo com as características demográficas do grupo examinado.

	SE	XO		
GRUPO	Masculino (%)	Feminino (%)	MÉDIA DE IDADE	
HTLV Sintomático (n=30)	09 (30,0)	21 (70,0)	52	
HTLV 1 (n=27)	09 (100,0)	18 (85,7)	50	
HTLV 2 (n=03)	0	03 (14,3)	56	
HTLV Assintomático (n=47)	13 (27,7)	34 (72,3)	47	
HTLV 1 (n=36)	11 (84,6)	25 (73,5)	48	
HTLV 2 (n=08)	02 (15,4)	06 (17,6)	44	
Não identificado (n=03)	0	03 (8,8)	48	

# 3.1.3 Grupo Doença Coronariana

A detecção de anticorpos para o gênero *Chlamydia* mostrou que das 89 amostras de pacientes com doença coronariana 58 (65,1%) apresentaram

sororreatividade e 31 (34,8%) foram negativas, sendo que no grupo positivo 28 (48,3%) eram do sexo feminino e 30 (51,7%) do sexo masculino, com idade média de 64 anos e 22 (37,9%) procedentes de Belém (Tabela 4).

Das 58 amostras, 23 (39,6%) apresentaram reatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae*, 34 (58,6%) apenas para *C. trachomatis* e uma (1,7%) apresentou anticorpos somente para *C. pneumoniae*.

Entre as amostras negativas para o gênero *Chlamydia* 15 (48,4%) eram do sexo feminino e 16 do sexo masculino (51,6%), com idade média de 61 anos, sendo 19 (61,3%) procedentes de Belém.

Não foi observada associação estatisticamente significante entre os grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* e pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* em relação ao sexo ( $\chi^2$ =0,045 e p=0,8316), a idade (F=1,6743 e p=0,1984), ou à procedência ( $\chi^2$ =0,1671 e p=0,8701).

Quando comparados os grupos que apresentaram reatividade para C. trachomatis e C. pneumoniae e que reagiram apenas para C. trachomatis também não foi observada associação estatisticamente significante com relação ao sexo ( $\chi^2$ =0,026 e p=0,9132), a idade (F=0,3687 e p=0,5550) ou a procedência (G=0,1941 e p=0,6595).

**Tabela 4** - Sororreatividade para *Chlamydia* de acordo com as características demográficas do grupo examinado.

GRUPO	SEXO		MÉDIA	PROCEDÊNCIA		
	Masculino (%)	Feminino (%)	DE IDADE	Belém (%)	Ananindeua (%)	Outros (%)
DC Chlamydia positivo (n=58)	30 (51,7)	28 (48,3)	64	22 (37,9)	02 (3,4)	09(15,5)*
C. t + e C. p + (n=23)	12 (52,2)	11 (47,8)	66	08 (34,8)	01 (4,3)	05 (21,7)**
C. t + e C. p - (n=34)	17 (50,0)	17 (50,0)	63	13 (38,2)	01 (2,9)	04 (11,8)***
C. p <sup>+</sup> (n=01)	01	0	66	01	0	0
DC Chlamydia negativo (n=31)	16 (51,6)	15 (48,4)	61	19 (61,3)	01 (3,2)	02 (6,4)***

DC - Doença coronariana; C.t - *Chlamydia trachomatis*; C.p - *Chlamydia pneumoniae* Não informaram procedência: \* 25, \*\*09, \*\*\*16 e \*\*\*\* 09

A discriminação da sororreatividade de anticorpos para *C. pneumoniae* e 15 sorotipos de *C. trachomatis*, mostrou maiores prevalências para os sorotipos D (37,9%), E (39,6%), F (37,9%), I (31,%), J (44,8%) e *C. pneumoniae* (41,4%) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Sororreatividade para as espécies *C. pneumoniae* e *C. trachomatis* (de acordo com os sorotipos).

Sorotipo	C. trachomatis N (%)	C. pneumoniae N (%)		
A	17 (29,3)			
В	10 (17,2)			
Ba	16 (27,6)			
C	17 (29,3)			
D	22 (37,9)			
${f E}$	23 (39,6)			
$\mathbf{F}$	22 (37,9)			
G	17 (29,3)			
H	13 (22,4)			
I	18 (31,0)			
J	26 (44,8)			
K	15 (25,9)			
L1	11 (18,9)			
L2	09 (15,5)			
L3	07 (12,1)			
		24 (41,4)		

# 3.1.4 Grupo Controle

Das 99 amostras componentes do grupo controle 23 (23,2%) eram do sexo feminino e 76 amostras do sexo masculino (76,8%), com idade média de 26 anos, das quais 84,8% eram procedentes de Belém (Tabela 6).

Tabela 6 - Características demográficas do grupo controle.

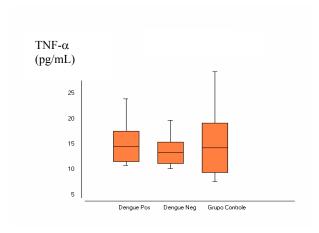
	SEXO		MÉDIA	PROCEDÊNCIA		
GRUPO	Masculino (%)	Feminino (%)	DE IDADE	Belém (%)	Ananindeua (%)	Outros (%)
Grupo controle (n=99)	76 (76,7)	23 (23,2)	26	84 (84,8)	12 (12,1)	03 (3,1)

3.2 DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS TNF-α, TNF-β, IFN-γ E PrtCR, NO SANGUE PERIFÉRICO DE ACORDO COM OS GRUPOS ESTUDADOS

# 3.2.1 Grupo Dengue

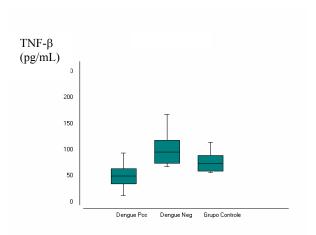
A média dos níveis séricos de TNF-α foi de 14,6±3,1 pg/mL nos portadores do vírus da dengue, de 13,3±2,1 pg/mL nos indivíduos doentes não portadores do vírus da dengue e de 14,3±4,9 pg/mL no grupo controle (Figura 11).

Não foi observada associação estatisticamente significante comparando-se os níveis séricos dos grupos dengue positivo e dengue negativo com o grupo controle (p=0.0558).



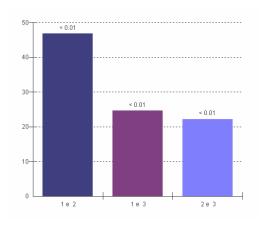
**Figura 11** - Níveis séricos de TNF- $\alpha$  nos grupos dengue positivo, dengue negativo e grupo controle.

A média dos níveis séricos de TNF-β foi de 49,3±14,9 pg/mL nos portadores do vírus da dengue, de 96±22,3 pg/mL nos indivíduos não portadores do vírus da dengue e de 73,8±14,8 pg/mL no grupo controle (Figura 12).



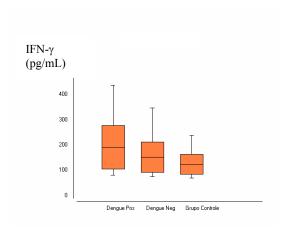
**Figura 12** - Níveis séricos de TNF- $\beta$  nos grupos dengue positivo, dengue negativo e grupo controle.

Foi observada associação estatisticamente significante comparando-se os níveis séricos dos grupos dengue positivo, dengue negativo e grupo controle (p<0,01) (Figura 13).



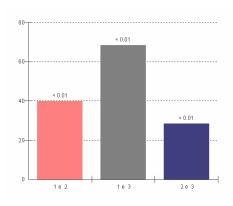
**Figura 13** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-β dos pacientes dengue positivo (1), dengue negativo (2) e grupo controle (3).

A média das dosagens séricas de IFN-γ no grupo dengue positivo foi de 192,1±86,2 pg/mL, no grupo dengue negativo foi de 152,1±59,5 pg/mL e no grupo controle foi de 123,6±39,3 pg/mL (Figura 14).



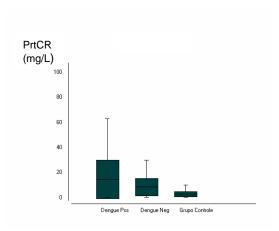
**Figura 14** - Níveis séricos de IFN-γ nos grupos dengue positivo, dengue negativo e grupo controle.

Observou-se associação estatisticamente significante quando comparados os grupos dengue positivo, dengue negativo e grupo controle (p<0,01) (Figura 15).



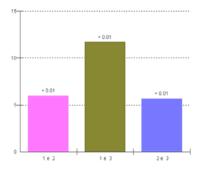
**Figura 15** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de IFN-γ dos pacientes dengue positivo (1), dengue negativo (2) e grupo controle (3).

A média das dosagens séricas de PrtCR no grupo dengue positivo foi de 14,5±5,4 mg/L, no grupo dengue negativo foi de 8,6±6,9 mg/L e no grupo controle foi de 2,8±2,2 mg/L (Figura 16).



**Figura 16** - Níveis séricos de PrtCR nos grupos dengue positivo, dengue negativo e grupo controle.

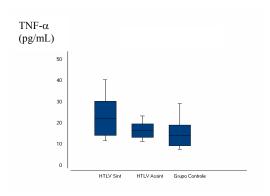
Observou-se associação estatisticamente significante quando comparados os níveis séricos de PrtCR entre os grupos dengue positivo, dengue negativo e grupo controle (p<0,01) (Figura 17).



**Figura 17** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de PrtCR dos pacientes dengue positivo (1), dengue negativo (2) e grupo controle (3).

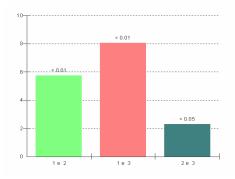
# 3.2.2 Grupo HTLV

A média das concentrações de TNF-α foi de 22,3±8 pg/mL nos pacientes com infecção sintomática pelo HTLV, de 16,6±3,2 pg/mL nos portadores assintomáticos do HTLV e de 14,3±4,9 pg/mL no grupo controle (Figura 18).



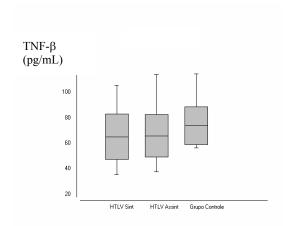
**Figura 18** - Níveis séricos de TNF-α nos grupos pacientes sintomáticos, portadores assintomáticos da infecção pelo HTLV e grupo controle.

Foi observada associação estatisticamente significante quando comparados os níveis séricos de TNF- $\alpha$  dos três grupos: pacientes sintomáticos e portadores assintomáticos da infecção pelo HTLV (p<0,01), pacientes sintomáticos e grupo controle (p<0,01) e portadores assintomáticos e grupo controle (p<0,05) (Figura 19).



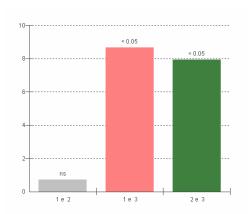
**Figura 19** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF- $\alpha$  dos pacientes sintomáticos (1), portadores assintomáticos (2) e grupo controle (3).

Os níveis séricos médios de TNF-β foram de 65,2±17,7 pg/mL nos portadores sintomáticos do HTLV, de 65,9±16,7 pg/mL nos portadores assintomáticos do HTLV e de 73,8±14,8 pg/mL no grupo controle (Figura 20).



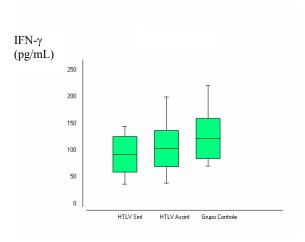
**Figura 20** - Níveis séricos de TNF-β nos grupos de portadores sintomáticos do HTLV, portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle.

Foi encontrada associação estatisticamente significativa comparando-se os grupos de portadores sintomáticos do HTLV e grupo controle (p<0,05), bem como, portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle (p<0,05) (Figura 21).



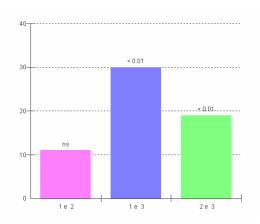
**Figura 21** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-β dos portadores sintomáticos do HTLV (1), portadores assintomáticos do HTLV (2) e grupo controle (3).

A média dos níveis séricos de IFN-γ nos portadores sintomáticos do HTLV foi de 92,3±32,9 pg/mL, nos portadores assintomáticos do HTLV foi de 103,3±33,8 pg/mL e no grupo controle foi de 123,6±39,3 pg/mL (Figura 22).



**Figura 22** - Níveis séricos de IFN-γ nos grupos de portadores sintomáticos do HTLV, portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle.

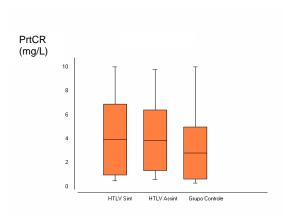
Foi observada associação estatisticamente significante quando comparados os grupos: portadores sintomáticos do HTLV e grupo controle (p<0,01); portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle (p<0,01) (Figura 23).



**Figura 23** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de IFN-γ dos portadores sintomáticos do HTLV (1), portadores assintomáticos do HTLV (2) e grupo controle (3).

Os níveis séricos médios de PrtCR nos portadores sintomáticos do HTLV foi de 3,9±3 mg/L e nos portadores assintomáticos do HTLV foi de 3,9±2,5 mg/L e no grupo controle foi de 2,8±2,2 mg/L (Figura 24).

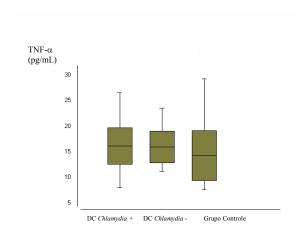
A comparação dos níveis séricos de PrtCR não demonstrou associação estatisticamente significante (p=0,255).



**Figura 24** - Níveis séricos de PrtCR nos grupos de portadores sintomáticos do HTLV, portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle.

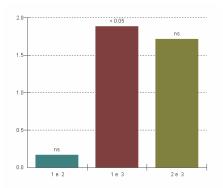
## 3.2.3 Grupo Doença Coronariana

A concentração sérica média de TNF-α foi de 16,2±3,6 pg/mL nos pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* de 16±3,1 pg/mL nos pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* e de 14,3±4,9 pg/mL no grupo controle (Figura 25).



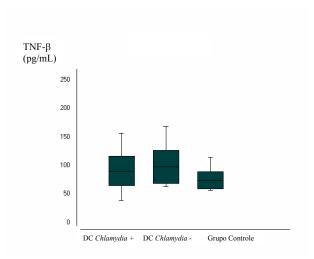
**Figura 25** - Níveis séricos de TNF- $\alpha$  nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia*, pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* e grupo controle.

Observou-se associação estatisticamente significante entre os pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* e o grupo controle (p<0,05) (Figura 26).



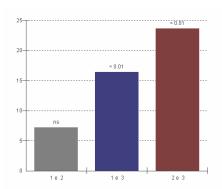
**Figura 26** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-α dos pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* (1), pacientes doença com coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* (2) e grupo controle (3).

A concentração sérica média de TNF-β foi de 90,3±26 pg/mL nos pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia*, de 97,4±29,2 pg/mL nos pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* e de 73,8±14,8 pg/mL no grupo controle (Figura 27).



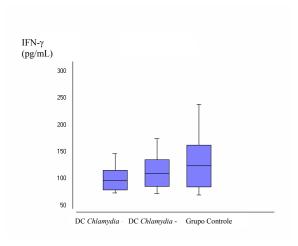
**Figura 27** - Níveis séricos de TNF-β nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia*, pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* e grupo controle.

Observou-se associação estatisticamente significante quando comparados pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* com o grupo controle (p<0,01), e pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* com grupo controle (p<0,01) (Figura 28).



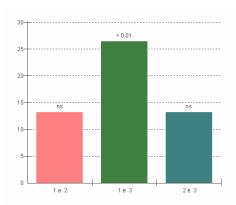
**Figura 28** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-β dos pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* (1), pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* (2) e grupo controle (3).

A concentração sérica média de IFN-γ foi de 97,2±18,1 pg/mL nos pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia*, de 110,5±25,2 pg/mL nos pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* e no grupo controle foi de 123,6±39,3 pg/mL (Figura 29).



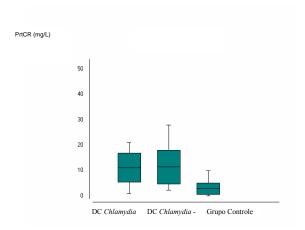
**Figura 29** - Níveis séricos de IFN-γ nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Clamydia*, pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Clamydia* e grupo controle.

Foi encontrada associação estatisticamente significante apenas quando comparados os grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* e grupo controle (p<0,01) (Figura 30).



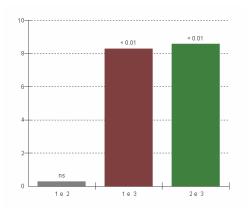
**Figura 30** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de IFN-γ dos pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* (1), pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* (2) e grupo controle (3).

A concentração sérica média de PrtCR foi de 11,1±5,7 mg/L nos pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* e de 11,4±6,7 mg/L nos pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* e no grupo controle foi de 2,8±2,2 mg/L (Figura 31).



**Figura 31** - Níveis séricos de PrtCR nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia*, pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* e grupo controle.

Observou-se associação estatisticamente significante quando comparados os níveis séricos de PrtCR do grupo de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* com o grupo controle (p<0,01), assim como pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* e grupo controle (p<0,01) (Figura 32).



**Figura 32** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de PrtCR dos pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* (1), pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* (2) e grupo controle (3).

3.3 DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES  $TNF-\alpha$ ,  $TNF-\beta$  E  $IFN-\gamma$ , DE ACORDO COM OS GRUPOS ESTUDADOS

#### 3.3.1 Grupo Dengue

A distribuição das frequências genotípicas para o polimorfismo do gene TNF- $\alpha$  na posição -308 demonstrou a presença elevada do genótipo heterozigoto AG no grupo controle (17,2%) em relação aos grupos dengue positivo e dengue negativo, sendo observada associação estatisticamente significante quando comparados os três grupos (p=0,0494), no entanto, Não houve associação quando comparadas as frequências alélicas (p=0,1762) (Tabela 7).

**Tabela 7** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $TNF-\alpha$  (-308) nos grupos dengue positivo, dengue negativo e controle.

TNF-α (-308)	DENGUE POS	DENGUE NEG	Grupo controle	$X^2$	p
GENÓTIPOS	N=80 (%)	N=100 (%)	N=99 (%)		
GG	63 (78,7)	88 (88,0)	75 (75,7)		
AG	9 (11,3)	4 (4,0)	17 (17,2)	9,515	0,0494
AA	8 (10,0)	8 (8,0)	7 (7,1)		
ALELOS	N=160 (%)	N=200 (%)	N=198 (%)		
A	25 (15,6)	20 (10,0)	31 (15,7)	3,472	0,1762
G	135 (84,4)	180 (90,0)	167 (84,3)		

As frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo do gene  $TNF-\beta$  (+252) observadas nos grupos dengue positivo, dengue negativo e controle, não demonstraram associação estatisticamente significante quando comparadas (p=0,4854 e p= 0,5967, respectivamente) (Tabela 8).

**Tabela 8** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene TNF- $\beta$  (+252) nos grupos dengue positivo, dengue negativo e controle.

TNF-β (+252)	DENGUE POS	DENGUE NEG	Grupo controle	$X^2$	р
GENÓTIPOS	N=80 (%)	N=97 (%)	N=79 (%)		
GG	11 (13,7)	15 (15,5)	18 (22,8)		
AG	34 (42,5)	44 (45,4)	28 (35,4)	3,451	0,4854
AA	35 (43,7)	38 (39,1)	33 (41,8)		
ALELOS	N=160 (%)	N=194 (%)	N=158 (%)		
G	56 (35,0)	74 (38,1)	64 (40,5)	1,033	0,5967
A	104 (65,0)	120 (61,9)	94 (59,5)		

A investigação do polimorfismo do gene  $IFN-\gamma$  (+874) demonstrou que 74,7% dos indivíduos do grupo controle possuíam o genótipo AT, sendo observada também uma frequência baixa do genótipo TT (5,1%) neste grupo em comparação aos grupos dengue positivo e dengue negativo. Foi encontrada associação estatisticamente significante entre os genótipos dos três grupos (p=0,0008), no entanto, o mesmo não aconteceu ao serem comparadas as frequências alélicas (p=0,5163) (Tabela 9).

**Tabela 9** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $IFN-\gamma$  (+874) nos grupos dengue positivo, dengue negativo e controle.

IFN-γ (+874)	DENGUE POS	DENGUE NEG	Grupo controle	$X^2$	р
GENÓTIPOS	N=80 (%)	N=99 (%)	N=99 (%)		
AA	30 (37,5)	21 (21,2)	20 (20,2)		
AT	36 (45,0)	65 (65,7)	74 (74,7)	19,018	0,0008
TT	14 (17,5)	13 (13,1)	05 (5,1)		
ALELOS	N=160 (%)	N=198 (%)	N=198 (%)		
A	96 (60,0)	107 (54,0)	114 (57,6)	1,322	0,5163
T	64 (40,0)	91 (46,0)	84 (42,4)		

# 3.3.2 Grupo HTLV

Embora tenha sido observada uma frequência maior do genótipo AG (17,2%) no grupo controle, quando comparado com os grupos HTLV sintomáticos e HTLV assintomáticos, não foi encontrada associação estatisticamente significante tanto para os genótipos (p=0,9084), quanto para os alelos (p=0,5120) (Tabela 10).

**Tabela 10** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $TNF-\alpha$  (-308) nos grupos de portadores do HTLV (sintomáticos e assintomáticos) e grupo controle.

TNF-α (-308)	HTLV SINT	HTLV ASSINT	Grupo controle	$X^2$	p
GENÓTIPOS	N=27 (%)	N=44 (%)	N=99 (%)		
GG	22 (81,5)	36 (81,8)	75 (75,7)		
AG	4 (14,8)	6 (13,6)	17 (17,2)	1,0726*	0,9084
AA	1 (3,7)	2 (4,6)	7 (7,1)		
ALELOS	N=54 (%)	N=88(%)	N=198 (%)		
A	6 (11,1)	10 (11,4)	31 (15,6)	1,339	0,5120
G	48 (88,9)	78 (88,6)	167 (84,4)		

<sup>\*</sup>Teste G

Foram observadas frequências mais elevadas para o genótipo AG (55,3%) no grupo de portadores assintomáticos do HTLV e do alelo A (73,3%) nos portadores sintomáticos do HTLV quando comparados os três grupos. Todavia, não foram encontradas associações estatisticamente significantes (p=0,0642 e p=0,1070, respectivamente) (Tabela 11).

**Tabela 11** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $TNF-\beta$  (+252) nos grupos de portadores do HTLV (sintomáticos e assintomáticos) e grupo controle.

TNF-β (+252)	HTLV SINT	HTLV ASSINT	Grupo controle	$X^2$	p
GENÓTIPOS	N=30 (%)	N=47 (%)	N=79 (%)		
GG	02 (6,7)	7 (14,9)	18 (22,8)		
AG	12 (40,0)	26 (55,3)	28 (35,4)	8,879	0,0642
AA	16 (53,3)	14 (29,8)	33 (41,8)		
ALELOS	N=60 (%)	N=94 (%)	N=158 (%)		
G	16 (26,7)	40 (42,6)	64 (40,5)	4,471	0,1070
A	44 (73,3)	54 (57,4)	94 (59,5)		

Não foram observadas associações estatisticamente significantes para o polimorfismo do gene  $IFN-\gamma$  quando comparadas as frequências genotípicas (p=0,3008) e alélicas (p=0,5830) dos grupos de portadores sintomáticos, portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle (Tabela 12).

**Tabela 12** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $IFN-\gamma$  (+874) nos grupos de portadores do HTLV (sintomáticos e assintomáticos) e grupo controle.

IFN-γ (+874)	HTLV SINT	HTLV ASSINT	Grupo controle	$X^2$	p
GENÓTIPOS	N=30 (%)	N=47 (%)	N=99 (%)		
AA	06 (20,0)	15 (31,9)	20 (20,2)		
AT	20 (66,7)	28 (59,6)	74 (74,7)	4,8707	0,3008
TT	04 (13,3)	04 (8,5)	05 (5,1)		
ALELOS	N=60 (%)	N=94 (%)	N=198 (%)		
A	32 (53,3)	58 (61,7)	114 (57,6)	1,079	0,5830
T	28 (46,7)	36 (35,1)	84 (42,4)		

#### 3.3.3 Grupo Doença Coronariana

A comparação das distribuições genotípicas e alélicas entre os grupos de pacientes com doença coronariana e positivos para *Chlamydia*, com doença coronariana e negativos para *Chlamydia* e grupo controle não mostrou associação estatisticamente significante para o polimorfismo do gene TNF- $\alpha$  (p=0,9084 e p=0,6277, respectivamente) (Tabela 13).

**Tabela 13** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $TNF-\alpha$  (-308) nos grupos com doença coronariana e positivos para *Chlamydia*, doença coronariana e negativos para *Chlamydia* e controle.

TNF-α (-308)	DC Chlamydia pos	DC Chlamydia neg	Grupo controle	$\mathbf{X}^2$	р
GENÓTIPOS	N=58 (%)	N=31 (%)	N=99 (%)		
GG	47 (81,0)	26 (83,9)	75 (75,7)		
AG	7 (12,1)	3 (9,7)	17 (17,2)	1,4666*	0,9084
AA	4 (6,9)	2 (6,4)	7 (7,1)		
ALELOS	N=116 (%)	N=62 (%)	N=198 (%)		
A	15 (12,9)	7 (11,3)	31(15,7)	0,9310	0,6277
G	101 (87,1)	55 (88,7)	167 (84,3)		

<sup>\*</sup>Teste G

O grupo de pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* apresentou maiores frequências para o genótipo AA (51,6%) e alelo A (69,4%) na investigação do polimorfismo do gene TNF- $\beta$  (+252), quando comparado ao grupo de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* e grupo controle, mas não foi observada associação estatisticamente significante (p=0,4148 e p=0,3315, respectivamente) (Tabela 14).

**Tabela 14** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $TNF-\beta$  (+252) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia*, pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* e grupo controle.

TNF-β (+252)	DC Chlamydia pos	DC Chlamydia neg	Grupo controle	$X^2$	p
GENÓTIPOS	N=57 (%)	N=31 (%)	N=79 (%)		
GG	10 (17,5)	4 (12,9)	18 (22,8)		
AG	27 (47,4)	11 (35,5)	28 (35,4)	3,936	0,4148
AA	20 (35,1)	16 (51,6)	33 (41,8)		
ALELOS	N=114 (%)	N=62 (%)	N=158 (%)		
G	47 (41,2)	19 (30,6)	64 (40,5)	2,208	0,3315
A	67 (58,8)	43 (69,4)	94 (59,5)		

A comparação das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $IFN-\gamma$  entre os grupos de pacientes com doença coronariana (com sorologia positiva e com sorologia negativa para *Chlamydia*) e grupo controle não mostrou associação estatisticamente significante (p=0,6898 e p=0,7045, respectivamente) (Tabela 15).

**Tabela 15** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene *IFN*- $\gamma$  (+874) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia*, pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* e grupo controle.

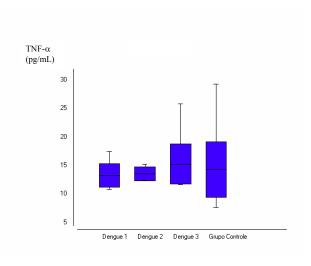
IFN-γ (+874)	DC Chlamydia pos	DC Chlamydia neg	Grupo controle	$X^2$	p
GENÓTIPOS	N=58 (%)	N=31 (%)	N=99 (%)		
AA	10 (17,2)	03 (9,7)	20 (20,2)		
AT	46 (79,3)	26 (83,9)	74 (74,7)	2,2503*	0,6898
TT	02 (3,5)	02 (6,4)	05 (5,1)		
ALELOS	N=116 (%)	N=62 (%)	N=198 (%)		
A	66 (56,9)	32 (51,6)	114 (57,6)	0,701	0.7045
T	50 (43,1)	30 (48,4)	84 (42,4)	0,701	0,7015

<sup>\*</sup>Teste G

3.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DAS CITOCINAS E AS CARACTERÍSTICAS DE ESPÉCIE/SOROTIPO/GENÓTIPO VIRAL OU BACTERIANO

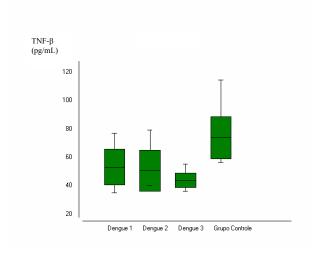
#### 3.4.1 Grupo Dengue

Considerando a espécie de vírus da dengue, observou-se os níveis séricos médios de TNF- $\alpha$  de 13,2±2,1 pg/mL para DEN 1, 13,6±1,2 pg/mL para DEN 2, de 15,2±3,5 pg/mL para DEN 3 e de 14,3±4,9 pg/mL no grupo controle, não sendo encontrada diferença estatisticamente significante entre os níveis séricos médios quando comparados todos os grupos entre si (p=0,3187) (Figura 33).



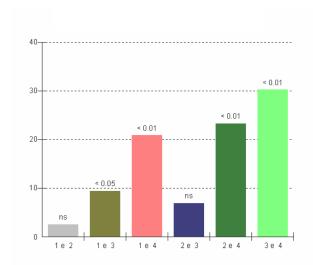
**Figura 33** - Níveis séricos de TNF- $\alpha$  no grupo dengue positivo de acordo com a espécie e grupo controle.

Quanto à dosagem sérica de TNF-β, observou-se níveis séricos médios de 53±12,5 pg/mL para DEN 1, 50,6±14,5 pg/mL para DEN 2, de 43,7±5,1 pg/mL para DEN 3 e de 73,8±14,8 pg/mL para o grupo controle (Figura 34).



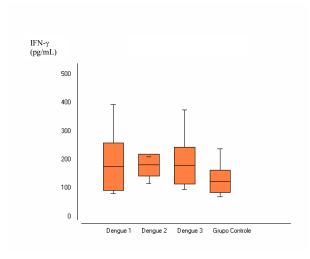
**Figura 34** - Níveis séricos de TNF-β no grupo dengue positivo de acordo com a espécie e no grupo controle.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os níveis séricos médios de TNF- $\beta$  para as espécies DEN 1 e DEN 3 (p<0,05), assim como entre DEN 1, DEN 2, DEN 3 comparados ao grupo controle (p<0,01) (Figura 35).



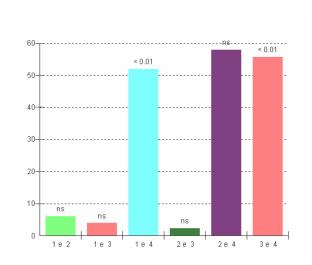
**Figura 35 -** Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-β dos pacientes DEN 1 (1), DEN 2 (2), DEN 3 (3) e grupo controle (4).

Para IFN-γ foram encontrados níveis séricos médios de 175,5±84,2 pg/mL para DEN 1, 181,6±38,6 pg/mL para DEN 2, de 179,3±64,1 pg/mL para DEN 3 e de 123,6±39,3 pg/mL para o grupo controle. (Figura 36).



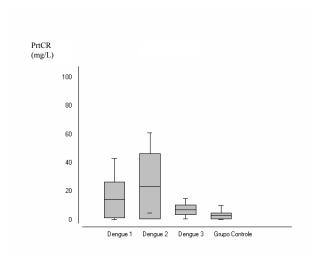
**Figura 36** - Níveis séricos de IFN-γ no grupo dengue positivo de acordo com a espécie e no grupo controle.

Foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os níveis séricos médios de IFN- $\gamma$  para DEN 1 e grupo controle e DEN 3 e grupo controle (p<0,01) (Figura 37).



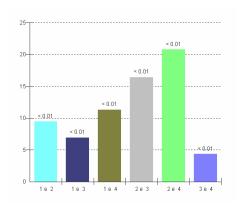
**Figura 37** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de IFN-γ dos pacientes DEN 1 (1), DEN 2 (2), DEN 3 (3) e grupo controle (4).

Para PrtCR foram obtidos níveis séricos médios de 14,1±5,6 mg/L para DEN 1, 23,8±5,3 mg/L para DEN 2, de 7,1±3,3 mg/L para DEN 3 e de 2,8±2,2 mg/L para o grupo controle (Figura 38).



**Figura 38** - Níveis séricos de PrtCR no grupo dengue positivo de acordo com a espécie e no grupo controle.

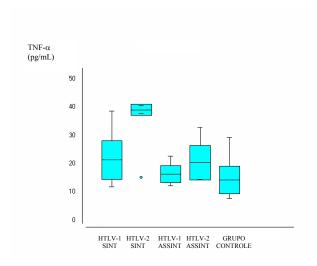
Houve diferença estatisticamente significante entre os níveis séricos médios de PrtCR para todas as espécies comparadas entre si e com o grupo controle (p<0,01) (Figura 39).



**Figura 39** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de PrtCR dos pacientes DEN 1 (1), DEN 2 (2), DEN 3 (3) e grupo controle (4).

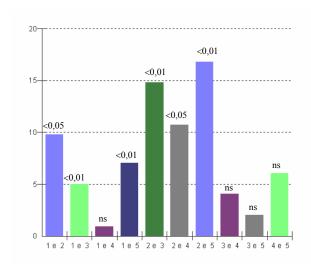
## 3.4.2 Grupo HTLV

Considerando-se o tipo de HTLV entre os pacientes com sintomas observou-se que o nível sérico médio de TNF-α entre os portadores do HTLV-1 foi de 21,3±6,8 pg/mL e do HTLV-2 foi de 31,1±13,8 pg/mL. Entre os portadores assintomáticos deste vírus foi encontrado o nível sérico médio de 16,3±3,1 pg/mL para portadores do HTLV-1 e de 20,4±6 pg/mL para portadores do HTLV-2. No grupo controle foi de 14,3±4,9 pg/mL (Figura 40).



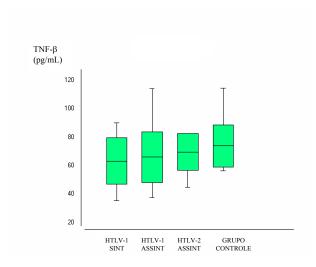
**Figura 40** - Níveis séricos de TNF-α de acordo com o tipo de HTLV entre os portadores sintomáticos e assintomáticos do vírus e no grupo controle.

A comparação das médias dos níveis séricos de TNF-α de cada grupo entre si demonstrou associação estatisticamente significante, exceto quando comparados os grupos de portadores sintomáticos do HTLV-1 e portadores assintomáticos do HTLV-2, portadores assintomáticos do HTLV-1 e portadores assintomáticos do HTLV-2, portadores assintomáticos do HTLV-1 e grupo controle, bem como portadores assintomáticos do HTLV-2 e grupo controle (Figura 41).



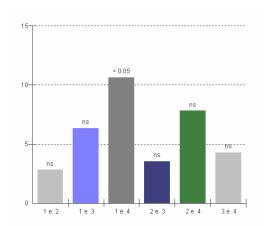
**Figura 41** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-α nos grupos HTLV-1 sintomático (1), HTLV-2 sintomático (2), HTLV-1 assintomático (3), HTLV-2 assintomático (4) e grupo controle (5).

A média dos níveis séricos de TNF-β entre os portadores sintomáticos do HTLV-1 foi de 63,2±16,3 pg/mL. Entre os portadores assintomáticos deste vírus foi encontrado o nível sérico médio de 66±17,9 pg/mL para portadores do HTLV-1 e de 69,6±12,9 pg/mL para portadores do HTLV-2. No grupo controle a média foi de 73,8±14,8 pg/mL. Não foi possível realizar a dosagem sérica de TNF-β dos portadores sintomáticos do HTLV-2 (Figura 42).



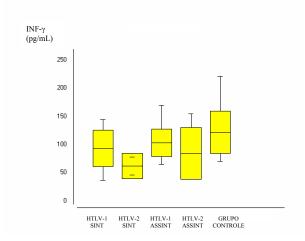
**Figura 42** - Níveis séricos de TNF- $\beta$  de acordo com o tipo de HTLV entre os portadores sintomáticos e assintomáticos do vírus e no grupo controle.

Foi observada associação estatisticamente significante apenas quando comparados os níveis séricos de TNF- $\beta$  dos portadores sintomáticos do HTLV-1 e o grupo controle (p<0,05) (Figura 43).



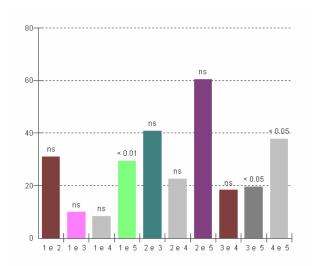
**Figura 43** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF- $\beta$  nos grupos HTLV-1 sintomático (1), HTLV-1 assintomático (2), HTLV-2 assintomático (3) e grupo controle (4).

A média dos níveis séricos de IFN-γ entre os portadores sintomáticos do HTLV-1 foi de 92,2±32,2 pg/mL e de 86,7±35,7 pg/mL para os portadores do HTLV-2. Entre os portadores assintomáticos deste vírus foi encontrado o nível sérico médio de 102,8±24,3 pg/mL para portadores do HTLV-1 e de 84,5±45,9 pg/mL para portadores do HTLV 2. No grupo controle a média foi de 123,6±39,3 pg/mL (Figura 44).



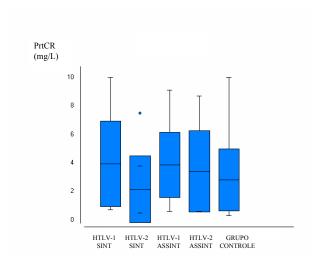
**Figura 44** - Níveis séricos de IFN-γ de acordo com o tipo de HTLV entre os portadores sintomáticos e assintomáticos do vírus e no grupo controle.

Observou-se associação estatisticamente significante quando comparados os níveis séricos de IFN- $\gamma$  dos grupos de portadores sintomáticos do HTLV-1 e grupo controle (p<0,01); portadores assintomáticos do HTLV-1 e grupo controle (p<0,05) e portadores assintomáticos do HTLV-2 e grupo controle (p<0,05) (Figura 45).



**Figura 45** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de IFN-γ nos grupos HTLV-1 sintomático (1), HTLV-2 sintomático (2), HTLV-1 assintomático (3), HTLV-2 assintomático (4) e grupo controle (5).

Entre os pacientes com sintomas observou-se que o nível sérico médio de PrtCR entre os portadores do HTLV-1 foi de 3,9±3 mg/L e do HTLV-2 foi de 3,9±3,5 mg/L. Entre os portadores assintomáticos deste vírus foi encontrado o nível sérico médio de 3,9±2,3 mg/L para portadores do HTLV-1 e de 3,4±2,8 mg/L para portadores do HTLV-2. No grupo controle observou-se nível médio de 2,8±2,2 mg/L, não sendo observada associação estatisticamente significante quando comparados entre si (*p*=0,1458) (Figura 46).

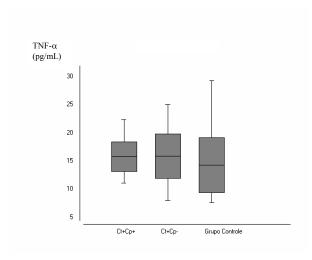


**Figura 46** - Níveis séricos de PrtCR de acordo com o tipo de HTLV entre os portadores sintomáticos e assintomáticos do vírus e no grupo controle.

## 3.4.3 Grupo Doença Coronariana

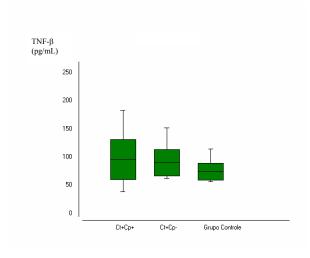
A dosagem sérica média de TNF-α para o grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* foi de 15,8±2,6 pg/mL, no grupo que apresentou reatividade apenas para *C. trachomatis* foi de 15,9±3,9 pg/mL e no grupo controle foi de 14,3±4,9 pg/mL (Figura 47).

A análise estatística não demonstrou associação significante quando comparados os níveis séricos dos grupos entre si (p=0,1199).



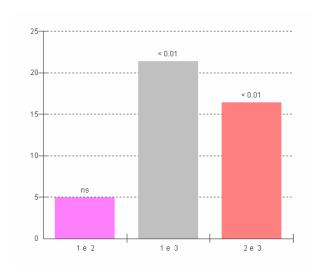
**Figura 47** - Níveis séricos de TNF- $\alpha$  no grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae*, no grupo positivo apenas para *C. trachomatis* e no grupo controle.

O nível sérico médio de TNF-β para o grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* foi de 95,2±35,6 pg/mL, no grupo que apresentou reatividade apenas para *C. trachomatis* foi de 90,2±25,5 pg/mL e no grupo controle foi de 73,8±14,8 pg/mL (Figura 48).



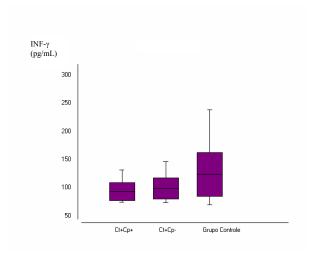
**Figura 48** - Níveis séricos de TNF- $\beta$  no grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae*, no grupo positivo apenas para *C. trachomatis* e no grupo controle.

Foi observada associação estatisticamente significante quando comparados os níveis séricos de TNF- $\beta$  dos dois grupos de pacientes com o grupo controle (p<0,01) (Figura 49).



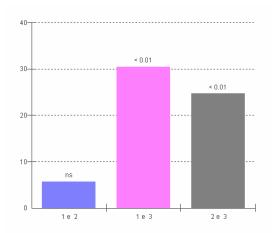
**Figura 49** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de TNF-β no grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* (1), no grupo positivo apenas para *C. trachomatis* (2) e no grupo controle (3).

A média dos níveis séricos de IFN-γ para o grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* foi de 93,2±16,3 pg/mL, no grupo que apresentou reatividade apenas para *C. trachomatis* foi de 99±18,9 pg/mL e no grupo controle foi de 123,6±39,3 pg/mL (Figura 50).



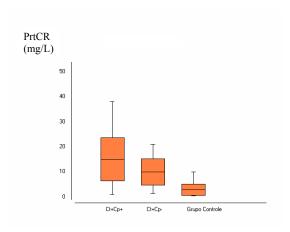
**Figura 50** - Níveis séricos de IFN-γ no grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae*, no grupo positivo apenas para *C. trachomatis* e no grupo controle.

Houve associação estatisticamente significante quando comparados níveis séricos de IFN- $\gamma$  dos dois grupos de pacientes com o grupo controle (p<0,01) (Figura 51).



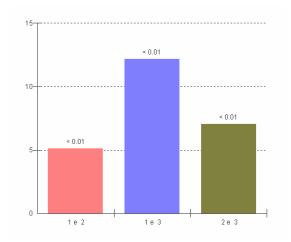
**Figura 51** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de IFN-γ no grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* (1), no grupo positivo apenas para *C. trachomatis* (2) e no grupo controle (3).

No grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* o nível sérico médio de PrtCR foi de 15±8,7 mg/L, no grupo que apresentou reatividade apenas para *C. trachomatis* foi de 9,9±5,2 pg/mL e no grupo controle foi de 2,8±2,2 pg/mL (figura 52).



**Figura 52** - Níveis séricos de PrtCR no grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae*, no grupo positivo apenas para *C. trachomatis* e no grupo controle.

Quando comparados os níveis séricos de PrtCR dos três grupos observou-se associação estatisticamente significante (p<0,01) (Figura 53).



**Figura 53** - Comparação estatística entre os níveis séricos médios de PrtCR no grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* (1), no grupo positivo apenas para *C. trachomatis* (2) e no grupo controle (3).

3.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DAS CITOCINAS E AS CARACTERÍSTICAS DE ESPÉCIE/SOROTIPO/GENÓTIPO VIRAL OU BACTERIANO

#### 3.5.1 Grupo Dengue

O genótipo mutante AA para o polimorfismo do gene  $TNF-\alpha$  (-308) foi encontrado em maior frequência nos portadores do DEN 1 (21%). No entanto, não foi observada associação estatisticamente significante quando comparadas nem as frequências genotípicas, nem as frequências alélicas (p=0,3061 e p=0,5161, respectivamente) (Tabela 16).

**Tabela 16** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $TNF-\alpha$  (-308) nos grupos DEN 1, DEN 2, DEN 3 e grupo controle.

TNF-α (-308)	DEN 1	DEN 2	DEN 3	Grupo controle	G	p
GENÓTIPOS	N=19 (%)	N=08 (%)	N=53 (%)	N=99 (%)		
GG	14 (73,7)	6 (75,0)	43 (81,1)	75 (75,7)		
AG	1 (5,3)	2 (25,0)	6 (11,3)	17 (17,2)	7,1627	0,3061
AA	4 (21,0)	0	4 (7,6)	7 (7,1)		
ALELOS	N=38 (%)	N=16 (%)	N=106 (%)	N=198 (%)		
A	9 (23,7)	2 (12,5)	14 (13,2)	31 (15,7)	2,2813	0,5161
G	29 (76,3)	14 (87,5)	92 (86,8)	167 (84,3)		

Não foi encontrada associação estatisticamente significante quando comparadas as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene TNF- $\beta$  (+252) nos grupos DEN 1, DEN 2, DEN 3 e grupo controle (Tabela 17).

**Tabela 17** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene TNF- $\beta$  (+252) nos grupos DEN 1, DEN 2, DEN 3 e grupo controle.

TNF-β (+252)	DEN 1	DEN 2	DEN 3	Grupo controle	$X^2$	р
GENÓTIPOS	N=19 (%)	N=08 (%)	N=53 (%)	N=79 (%)		
GG	2 (10,5)	2 (25,0)	7 (13,2)	18 (22,8)		
AG	9 (47,4)	4 (50,0)	21 (39,6)	28 (35,4)	4,3193	0,6336
AA	8 (42,1)	2 (25,0)	25 (47,2)	33 (41,8)		
ALELOS	N=38 (%)	N=16 (%)	N=106 (%)	N=158 (%)		
G	13 (34,2)	8 (50,0)	35 (33,0)	64 (40,5)	2,7304	0,4351
A	25 (65,8)	8 (50,0)	71 (67,0)	94 (59,5)		

Observou-se uma maior frequência do genótipo TT ( $IFN-\gamma +874$ ) nos portadores do DEN 2 (37,5%). Houve associação estatisticamente significante quando comparadas as frequências genotípicas (p=0,0007), o mesmo não sendo observado para as frequências alélicas (Tabela 18).

**Tabela 18** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene *IFN-\gamma* (+874) nos grupos DEN 1, DEN 2, DEN 3 e grupo controle.

IFN-γ (+874)	DEN 1	DEN 2	DEN 3	Grupo controle	G	p
GENÓTIPOS	N=19 (%)	N=08 (%)	N=53 (%)	N=99 (%)		
AA	8 (42,1)	4 (50,0)	18 (34,0)	20 (20,2)		
AT	9 (47,4)	1(12,5)	26 (49,1)	74 (74,7)	23,2685	0,0007
TT	2 (10,5)	3 (37,5)	9 (16,9)	5 (5,1)		
ALELOS	N=38 (%)	N=16 (%)	N=106 (%)	N=198 (%)		
A	25 (65,8)	9 (56,2)	62 (58,5)	114 (57,6)	0,9485	0,8137
T	13 (34,2)	7 (43,8)	44 (41,5)	84 (42,4)		

## 3.5.2 Grupo HTLV

As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $TNF-\alpha$  (-308) observadas nos grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos do HTLV não evidenciou associação estatisticamente significante quando comparadas entre si e com o grupo controle (Tabela 19).

**Tabela 19** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $TNF-\alpha$  (-308) nos grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos de acordo com o tipo de HTLV e no grupo controle.

TNF-α (-308)	HTLV-1 Sint	HTLV-2 Sint	HTLV-1 Assint	HTLV-2 Assint	Grupo controle	$\mathbf{X}^2$	p
GENÓTIPOS	N=25 (%)	N=02 (%)	N=31 (%)	N=07 (%)	N=99 (%)		
GG	20 (80,0)	2 (100,0)	26 (83,9)	5 (71,4)	75 (75,7)		
AG	4 (14,8)	0	4 (12,9)	1(14,3)	17 (17,2)	2,9569*	0,9370
AA	1 (3,7)	0	1 (3,2)	1(14,3)	7 (7,1)		
ALELOS	N=50 (%)	N=04 (%)	N=62 (%)	N=14 (%)	N=198 (%)		
A	6 (12,0)	0	6 (9,7)	3 (21,4)	31 (15,7)	3,4448	0,4863
G	44 (88,0)	4 (100,0)	56 (90,3)	11(78,6)	167 (84,3)		

<sup>\*</sup>Teste G

Não foi observada associação estatisticamente significante entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene TNF- $\beta$  (+252) nos grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos do HTLV e grupo controle. (Tabela 20).

**Tabela 20** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene TNF- $\beta$  (+252) nos grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos de acordo com o tipo de HTLV e no grupo controle.

TNF-β (+252)	HTLV-1 Sint	HTLV-2 Sint	HTLV-1 Assint	HTLV-2 Assint	Grupo controle	$\mathbf{X}^2$	p
GENÓTIPOS	N=27 (%)	N=03 (%)	N=33 (%)	N=08 (%)	N=79 (%)		
GG	2 (7,5)	0	4 (12,1)	3 (37,5)	18 (22,8)		
AG	11 (40,7)	1(33,3)	20 (60,6)	2 (25,0)	28 (35,4)	12,9884	0,1123
AA	14 (51,8)	2 (66,7)	9 (27,3)	3 (37,5)	33 (41,8)		
ALELOS	N=54 (%)	N=06 (%)	N=66 (%)	N=16 (%)	N=158 (%)		
G	15 (27,8)	1 (16,7)	28 (42,4)	8 (50,0)	64 (40,5)	5,6638	0,2257
A	39 (72,2)	5 (83,3)	38 (57,6)	8 (50,0)	94 (59,5)		

A diferença da distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene *IFN-γ* (+874) nos grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos do HTLV não demonstrou associação estatisticamente significante em relação ao grupo controle (Tabela 21).

**Tabela 21** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $IFN-\gamma$  (+874) nos grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos de acordo com o tipo de HTLV e no grupo controle.

IFN-γ (+874)	HTLV-1 Sint	HTLV-2 Sint	HTLV-1 Assint	HTLV-2 Assint	Grupo controle	$\mathbf{X}^2$	р
GENÓTIPOS	N=27(%)	N=03(%)	N=33 (%)	N=08 (%)	N=99 (%)		
AA	6 (22,2)	0	10 (30,3)	3 (37,5)	20 (20,2)		
AT	18 (66,7)	2 (66,7)	20 (60,6)	5 (62,5)	74 (74,7)	7,9061*	0,4427
TT	3 (11,1)	1 (33,3)	3 (9,1)	0	5 (5,1)		
ALELOS	N=54(%)	N=06(%)	N=66 (%)	N=16 (%)	N=198 (%)		
A	30 (55,6)	2 (33,3)	40 (60,6)	11 (68,8)	114 (57,6)	2,5961	0,6275
T	24 (44,4)	4 (66,7)	26 (39,4)	5 (31,2)	84 (42,4)		

<sup>\*</sup>Teste G

### 3.5.3 Grupo Doença Coronariana

As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene *TNF-α* (-308) encontradas nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* e no grupo positivo apenas para *C. trachomatis* quando comparadas entre si e ao grupo controle não evidenciaram associação estatisticamente significante (Tabela 22).

**Tabela 22** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $TNF-\alpha$  (-308) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para C. trachomatis e C. pneumoniae, no grupo positivo apenas para C. trachomatis e no grupo controle.

TNF-α (-308)	Ct+ Cp+	Ct+ Cp-	Grupo controle	$X^2$	p
GENÓTIPOS	N=23 (%)	N=34 (%)	N=99 (%)		
GG	15 (65,2)	31 (91,2)	75 (75,7)		
AG	06 (26,1)	01 (3,0)	17 (17,2)	8,2047	0,0844
AA	02 (8,7)	02 (5,8)	7 (7,1)		
ALELOS	N=46 (%)	N=68 (%)	N=198 (%)		
A	10 (21,7)	05 (13,2)	31 (15,7)	5,2487	0,0725
G	36 (78,3)	63 (86,8)	167 (84,3)		

Não se observou associação estatisticamente significante quando comparadas as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene TNF- $\beta$  (+252) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para C. trachomatis e C. pneumoniae, no grupo positivo apenas para C. trachomatis e no grupo controle (Tabela 23).

**Tabela 23** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $TNF-\beta$  (+252) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para C. trachomatis e C. pneumoniae, no grupo positivo apenas para C. trachomatis e no grupo controle.

TNF-β (+252)	Ct+ Cp+	Ct+ Cp-	Grupo controle	$X^2$	р
GENÓTIPOS	N=23 (%)	N=33 (%)	N=79 (%)		
GG	04 (17,4)	06 (18,2)	18 (22,8)		
AG	14 (60,9)	12 (36,4)	28 (35,4)	5,6696*	0,2252
AA	05 (21,7)	15 (45,4)	33 (41,8)		
ALELOS	N=46 (%)	N=66 (%)	N=158 (%)		
G	22 (47,8)	24 (36,4)	64 (40,5)	1,4768	0,4779
A	24 (52,2)	42 (63,6)	94 (59,5)		

<sup>\*</sup>Teste G

As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $IFN-\gamma$  (+874) observadas nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para C. trachomatis e C. pneumoniae e no grupo positivo apenas para C. trachomatis demonstraram associação estatisticamente significante quando comparadas às do grupo controle (Tabela 24).

**Tabela 24** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene *IFN-\gamma* (+874) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae*, no grupo positivo apenas para *C. trachomatis* e no grupo controle.

IFN-γ (+874)	Ct+ Cp+	Ct+ Cp-	Grupo controle	$X^2$	p
GENÓTIPOS	N=23 (%)	N=34 (%)	N=99 (%)		
AA	04 (44,4)	06 (34,0)	20 (20,2)		
AT	19 (37,0)	26 (49,1)	74 (74,7)	16,6164*	0,0023
TT	0	02 (16,9)	5 (5,1)		
ALELOS	N=46 (%)	N=68 (%)	N=198 (%)		
A	27 (58,7)	38 (55,9)	114 (57,6)	6,2764	0,0434
T	19 (41,3)	30 (44,1)	84 (42,4)		

<sup>\*</sup>Teste G

### 4 DISCUSSÃO

As citocinas estão envolvidas em muitas doenças e, consequentemente, muitos estudos têm sido conduzidos para investigar se uma base genética para estas doenças pode ser encontrada nos polimorfismos em genes de citocinas (Allen *et al.*, 2000; Pelletier *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Cataldo *et al.*, 2005; Kamali-Sarvestani *et al.*, 2005; Vallinoto *et al.*, 2010).

A hipótese de participação dos polimorfismos de genes de citocinas em doenças baseia-se no fato de que eles podem influenciar *in vivo* os níveis de citocinas. Isto é evidenciado na observação de que os indivíduos diferem no que diz respeito ao nível de produção após o cultivo *in vitro* de suas células e que essas diferenças podem ser atribuídas, em parte, aos polimorfismos de nucleotídeo único ou de microssatélites em seus genes de citocinas. Comumente, os indivíduos com genótipos de citocinas estão sendo chamados de "alto" ou "baixo" produtores, após a suposta relação entre o genótipo e o correspondente perfil de produção de citocinas *in vitro* (Pelletier *et al.*, 2000; Reviron *et al.*, 2001; Tambur *et al.*, 2001).

Entre as várias hipóteses postuladas para explicar a patogênese da doença grave causada pelo vírus da dengue o modelo de imunopatogênese é o mais aceito tendo a cascata de citocinas como principal representante (Chaturvedi *et al.*, 1999a; Chaturvedi *et al.*, 2000).

Alguns estudos demonstraram níveis séricos e plasmáticos aumentados de citocinas como TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , em pacientes infectados pelo vírus da dengue (Bethell *et al.*, 1998; Hober *et al.*, 1998; Green *et al.*, 1999; Gagnon *et al.*, 2002). Níveis

maiores de TNF-α e TNF-β foram detectados em pacientes com febre hemorrágica comparado a pacientes com dengue clássica. Os níveis mais elevados ocorreram no período de crise quando a perda plasmática, hemorragia e choque circulatório comumente ocorrem em pacientes com febre hemorrágica (Green *et al.*, 1999; Gagnon *et al.*, 2002).

Não está claro porque alguns indivíduos infectados pelo HTLV-1 desenvolvem doença e outros não. Provavelmente a doença resultante depende de uma interação entre fatores virais, imunes e genéticos do hospedeiro (Bangham, 2003).

Marcadores virais (como a carga pró-viral) e marcadores imunológicos (como expressão de citocinas) têm sido associados com a presença de soropositividade para o HTLV-1 e/ou a presença de doença neurológica (PET/MAH). No entanto, na literatura não há conclusões a respeito de quais destes marcadores está associado primariamente com a patogênese da PET/MAH e se ela é direcionada inicialmente pela alta carga pró-viral ou pela reação inflamatória contra o vírus (Best *et al.*, 2006).

Estudos mostraram que a infecção pelo HTLV-1 é caracterizada pela proliferação espontânea e produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IFN-γ e TNF-α quando células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos infectados são cultivadas *in vitro* na ausência de qualquer estímulo (Carvalho *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004).

O papel da suscetibilidade genética à doença arterial coronariana tem sido estudado por vários autores (Georges et *al.*, 2003; Martins et *al.*, 2006; Ghazouani *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Alguns estudos foram direcionados para polimorfismos que possam influenciar algumas funções biológicas como a coagulação, a fibrinólise, o número de

plaquetas, a função vascular, o metabolismo lipídico e o processo inflamatório (Incalcaterra *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2006). As citocinas pró-inflamatórias, TNF-α e TNF-β são associadas com a patogênese da aterosclerose (Schulz *et al.*, 2006).

Outros trabalhos têm investigado uma possível relação entre a presença de agentes infecciosos, marcadores de resposta inflamatória e a ocorrência de doenças coronarianas (Kirbis *et al.*, 2005; Carratelli *et al.*, 2006; Clancy *et al.*, 2006; Vahdat *et al.*, 2007).

#### 4.1 GRUPO DENGUE

No presente trabalho não foi observada associação estatisticamente significante entre os grupos dengue positivo e dengue negativo em relação ao sexo, a idade e a procedência.

Estes resultados corroboram os encontrados por outros autores em Taiwan, na Colômbia e no Brasil, os quais também não encontraram associação estatisticamente significante tanto para sexo quanto para idade comparando o grupo de pacientes infectados pelo vírus da dengue com o grupo controle (Wang *et al.*, 2007; Passos *et al.*, 2008; Restrepo *et al.*, 2008).

Araújo *et al.*, em 2002, no Pará, encontraram diferença significativa de infecção entre os sexos quando compararam indivíduos positivos e negativos para o vírus da dengue, mostrando que o risco de transmissão do VD foi maior em mulheres e que o grupo mais vulnerável foi o de 16-30 anos, seguido pelo grupo de 31-45 anos.

No presente estudo a média dos níveis séricos de TNF-α foi maior nos portadores do vírus da dengue do que nos indivíduos doentes não portadores deste vírus, no entanto, foi similar ao observado no grupo controle, não sendo observada associação estatisticamente significante comparando-se os níveis séricos entre os grupos.

Resultados similares foram observados por Chen *et al.*, 2006, os quais analisaram os níveis séricos de TNF-α em amostras de pacientes com dengue e de indivíduos saudáveis e não observaram aumento significativo nos níveis desta citocina quando comparados o grupo de pacientes com dengue e o grupo controle.

Em estudos realizados em Taiwan e no Brasil também não foi encontrada associação entre os níveis séricos de TNF-α comparando-se os grupos de pacientes com dengue clássica e com dengue hemorrágica (Wang *et al.*, 2007; Bozza *et al.*, 2008).

Ao contrário, a análise do perfil de citocinas, realizada na Índia, no Brasil e na Venezuela, em amostras de sangue de pacientes com dengue e indivíduos saudáveis demonstrou que os níveis de TNF-α foram significantemente mais elevados em pacientes com dengue do que no grupo controle, sendo os níveis mais elevados presentes em pacientes que apresentaram manifestações hemorrágicas (Azeredo *et al.*, 2001; Braga *et al.*, 2001; Chakravarti & Kumaria, 2006; Levy *et al.*, em 2010).

Green *et al*, em 1999, analisaram os níveis de TNF-α em amostras de crianças tailandesas com infecção confirmada por vírus da dengue e com doença febril não causada por este vírus e não encontraram diferença estatística nos níveis médios plasmáticos entre os grupos. Todavia, a proporção de amostras com TNF-α detectável foi maior em crianças com febre hemorrágica do que naquelas com dengue clássica ou doença febril não causada por dengue.

No entanto, em trabalhos desenvolvidos na Tailândia, na Colômbia e no Vietnã, foram encontrados níveis mais elevados de TNF-α em crianças infectadas pelo vírus da dengue do que em indivíduos saudáveis (Kittigul *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2004; Restrepo *et al.*, 2008).

Priyadarshini *et al*, em 2010, na Índia, analisaram o nível sérico de citocinas em casos confirmados de dengue e controles saudáveis e encontraram níveis séricos médios de TNF-α menores nos grupos de casos de dengue do que no grupo controle.

No presente trabalho, a média dos níveis séricos de TNF-β foi menor nos portadores do vírus da dengue do que nos indivíduos não portadores deste vírus e no grupo controle. Foi observada associação estatisticamente significante comparando-se os níveis séricos dos grupos dengue positivo e dengue negativo com o grupo controle.

Gagnon *et al.*, em 2002, quantificaram a produção de citocinas em células mononucleares do sangue periférico obtidas de crianças com dengue, e observaram que a expressão de TNF-β foi detectada em todas as amostras analisadas, não sendo observada associação significante na expressão desta citocina quando comparados grupos de pacientes com febre hemorrágica, dengue clássica e com outras doenças febris que não dengue.

No presente estudo, a média das dosagens séricas de IFN-γ no grupo dengue positivo foi maior do que no grupo dengue negativo e no grupo controle. Observou-se associação estatisticamente significante quando comparados os grupos dengue positivo, dengue negativo e grupo controle.

Resultados similares foram observados por outros autores, os quais encontraram níveis significantemente maiores de IFN-γ em casos de dengue comparados ao

grupo controle. Em pacientes com dengue clássica os níveis foram mais elevados do que nos casos de febre hemorrágica (Azeredo *et al.*, 2001; Chakravarti & Kumaria, 2006, Priyadarshini *et al.*, 2010).

No estudo realizado por Bozza *et al.*, em 2008, foi encontrada associação entre os níveis séricos de IFN-γ e casos graves de dengue comparados a casos leves.

Chen *et al.*, em 2006, em Taiwan, encontraram níveis de IFN-γ menores em pacientes que morreram com febre hemorrágica de dengue comparado aos que sobreviveram. E os níveis desta citocina nos pacientes que tiveram febre hemorrágica e sobreviveram foram mais elevados do que os níveis encontrados em pacientes com dengue clássica e no grupo controle, sugerindo um efeito protetor relacionado a uma maior produção de IFN-γ nos pacientes que sobreviveram.

Nguyen *et al.*, em 2004 e Restrepo *et al.*, em 2008, observaram elevados níveis de IFN-γ em crianças com febre hemorrágica ou síndrome do choque por dengue comparado ao grupo controle, sendo esta diferença estatisticamente significante.

Na análise das concentrações plasmáticas de IFN-γ em crianças tailandesas, realizada por Green *et al*, em 1999, observou-se que os níveis médios de tal citocina também foram significantemente maiores em crianças com dengue do que naquelas com doença febril não causada por dengue, contudo não foi encontrada significância estatística quando comparados pacientes com febre hemorrágica e com dengue clássica.

A quantificação de PrtCR, aqui realizada, demonstrou que a média das dosagens séricas no grupo dengue positivo foi significantemente maior comparada aos grupos dengue negativo e controle.

Em estudo realizado por Levy *et al.*, em 2010, avaliando os níveis séricos de PrtCR em pacientes com dengue clássica, pacientes com febre hemorrágica e indivíduos saudáveis, observou-se que os níveis desta citocina estavam significantemente aumentados em pacientes com febre hemorrágica comparados aos outros grupos, sendo associado ainda com a ocorrência de infecção secundária.

Neste estudo, a distribuição das frequências genotípicas para o polimorfismo do gene *TNF-α* na posição -308 demonstrou a presença elevada do genótipo heterozigoto AG no grupo controle em relação aos grupos dengue positivo e dengue negativo, sendo observada associação estatisticamente significante quando comparados os três grupos, contudo, não houve associação quando comparadas as frequências alélicas.

Ao contrário, Fernández-Mestre *et al.*, em 2004, investigando o polimorfismo do gene TNF- $\alpha$  na posição -308 encontraram um aumento significante do alelo TNF-308A observado em pacientes com febre por dengue que apresentaram manifestações hemorrágicas comparado a pacientes com febre clássica, sugerindo que a presença deste alelo está associada à produção de altos níveis de TNF- $\alpha$ , porém, não foram observadas diferenças quando comparados o grupo de pacientes e o grupo controle.

Em geral, para o polimorfismo TNF-α-308 os genótipos AA ou AG estão associados com alta produção desta citocina e o GG com baixa produção (Reviron *et al.*, 2001; Tambur *et al.*, 2001).

As frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo do gene *TNF-β* (+252), observadas neste trabalho, nos grupos dengue positivo, dengue negativo e controle, não demonstraram associação estatisticamente significante quando comparados.

Não há descrição na literatura de trabalhos de investigação do polimorfismo do gene *TNF-β* na posição +252 em grupos de pacientes infectados pelo vírus da dengue.

A investigação do polimorfismo do gene  $IFN-\gamma$  (+874) demonstrou maior frequência do genótipo AT no grupo controle, sendo observada também uma frequência baixa do genótipo TT neste grupo em comparação aos grupos dengue positivo e dengue negativo. Foi encontrada associação estatisticamente significante entre os genótipos dos três grupos, no entanto, o mesmo não aconteceu ao serem comparadas as frequências alélicas.

Tais resultados foram contrários aos observados por Fernández-Mestre *et al.*, em 2004, já que estes encontraram frequências similares entre os genótipos do polimorfismo do gene *IFN*- $\gamma$ (+874) quando compararam o grupo de pacientes e o grupo controle, não sendo observada diferença estatística.

O alelo IFN-γ -874T é associado com alta produção *in vitro* de IFN-γ e o alelo IFN-γ -874A com baixa produção (Pelletier *et al.*, 2000; Tambur *et al.*, 2001). Este alelo foi correlacionado com a presença de 12 repetições CA, também conhecido como alelo número dois, na codificação do gene *IFN-γ* (Pravica *et al.*, 2000).

Quando comparados os grupos DEN 1, DEN 2 e DEN 3, neste estudo, não foi observada associação estatisticamente significante com relação ao sexo, idade ou a procedência.

Resultados similares foram encontrados na Tailândia e na Nicaragua, onde não foram observadas diferenças estatisticamente significantes com relação ao sexo ou a idade quando comparados pacientes com infecção secundária pelo *Virus da dengue 3* 

(Libraty *et al.*, 2002) ou pacientes infectados por DEN 1 ou DEN 2 (Balmaseda *et al.*, 2006).

Considerando a espécie de vírus da dengue, observou-se neste trabalho que os níveis séricos médios de TNF-α foram mais elevados para DEN 3, comparados com DEN 1 e DEN 2, porém, não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os níveis séricos médios das espécies comparados entre si e ao grupo controle.

Estes achados são consistentes ao estudo realizado por Levy *et al.*, em 2010, os quais também não encontraram associação estatística entre os níveis séricos de TNF-α e as espécies DEN 2, DEN 3 e DEN 4.

Na Polinésia Francesa, Laur *et al.*, em 1998, encontraram níveis séricos similares de TNF-α em crianças com dengue durante uma epidemia pelo DEN 2.

Quanto à dosagem sérica de TNF-β, no presente estudo observou-se níveis séricos médios maiores para DEN 1, sendo encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os níveis séricos médios das espécies DEN 1 e DEN 3, assim como entre DEN 1, DEN 2, DEN 3 comparados ao grupo controle.

Esta é a primeira descrição na literatura da quantificação dos níveis séricos de TNF-β em pacientes infectados com o vírus da dengue, de acordo com a espécie.

Neste trabalho os níveis séricos médios mais elevados de IFN-γ foram observados em portadores de DEN 2, sendo encontrada diferença estatisticamente significante entre os níveis séricos médios da espécie DEN 1 e grupo controle e DEN 3 e grupo controle.

Libraty *et al.*, em 2002, na Tailândia, avaliaram os níveis séricos de IFN-γ em crianças com infecção secundária pelo *Virus da dengue 3* e não observaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de pacientes com dengue clássica e febre hemorrágica.

No presente estudo, os níveis séricos médios maiores de PrtCR foram obtidos no grupo DEN 2. Houve diferença estatisticamente significante entre os níveis séricos médios de todas as espécies comparadas entre si e com o grupo controle.

Similarmente, em estudo realizado por Levy *et al.*, em 2010, avaliando os níveis séricos de PrtCR em pacientes com dengue clássica e pacientes com febre hemorrágica, também observou-se que os níveis aumentados desta citocina foram associados com a presença de infecção pelo *Vírus da dengue 2*.

O genótipo mutante AA para o polimorfismo do gene  $TNF-\alpha$  (-308) foi encontrado em maior frequência nos portadores do DEN 1 (21%). No entanto, não foi observada associação estatisticamente significante quando comparadas nem as frequências genotípicas, nem as frequências alélicas.

Não foi encontrada associação estatisticamente significante quando comparadas as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene TNF- $\beta$  (+252) nos grupos DEN 1, DEN 2, DEN 3 e grupo controle.

Observou-se uma maior frequência do genótipo TT ( $IFN-\gamma +874$ ) nos portadores do DEN 2. Houve associação estatisticamente significante quando comparadas as frequências genotípicas, o mesmo não sendo observado para as frequências alélicas.

Os achados do presente trabalho são os primeiros a demonstrar a investigação de polimorfismos dos genes  $TNF-\alpha$ ,  $TNF-\beta$  e  $IFN-\gamma$  envolvendo pacientes com dengue, considerando a discriminação por espécie.

#### 4.2 GRUPO HTLV

Comparando-se neste trabalho, os grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos do HTLV, não foi encontrada associação estatisticamente significante com relação ao sexo nem com a idade, embora tenha sido observada uma frequência maior do sexo feminino em ambos os grupos.

Contrariamente, Best *et al.*, em 2004 e Talledo *et al.*, em 2010, observaram uma média de idade significantemente maior, assim como uma frequência mais elevada de pacientes do sexo feminino, em pacientes com PET/MAH, do que em portadores assintomáticos do HTLV.

Muniz *et al.*, (2010), no Brasil, também demonstraram uma maior frequência de mulheres com PET/MAH do que homens, comparando pacientes com PET/MAH e portadores assintomáticos do HTLV, porém, observaram uma média de idade similar entre os grupos.

No presente estudo, a média das concentrações de TNF- $\alpha$  foi mais elevada nos pacientes com infecção sintomática pelo HTLV, comparando-se com portadores assintomáticos do HTLV e com o grupo controle, sendo observada associação estatisticamente significante quando comparados os níveis séricos de TNF- $\alpha$  dos três grupos.

Similarmente, Goon *et al.*, em 2003, na Inglaterra, encontraram níveis significantemente maiores de TNF-α em pacientes com PET/MAH do que em portadores assintomáticos do HTLV-1, ambos com carga pró-viral similar.

Santos *et al.*, (2004), determinaram os níveis séricos de TNF-α em pacientes com PET/MAH, em portadores assintomáticos do HTLV e indivíduos saudáveis, sendo encontrados níveis mais elevados de TNF-α em pacientes com PET/MAH comparado com portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle. No entanto, não houve associação significante quando comparados os três grupos.

Os resultados do presente estudo, são contrários aos descritos por Muniz *et al.*, (2006), na cidade de Salvador, e por Montanheiro *et al.*, (2009), em São Paulo, os quais determinaram os níveis séricos de TNF-α de pacientes com PET/MAH e portadores assintomáticos do HTLV, porém não encontraram diferença significante quando comparados os níveis entre os grupos.

No presente trabalho, os níveis séricos médios de TNF-β encontrados nos portadores sintomáticos do HTLV e nos portadores assintomáticos do HTLV foram menores que no grupo controle. E houve associação estatisticamente significativa comparando-se os grupos de portadores sintomáticos do HTLV e grupo controle, bem como, portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle.

Goon *et al.*, em 2003, também não observaram frequências elevadas de TNF-β no sangue periférico tanto de pacientes com PET/MAH quanto de portadores assintomáticos do HTLV-1.

A média dos níveis séricos de IFN-γ no grupo controle foi maior do que a observada para os portadores sintomáticos e para os portadores assintomáticos do HTLV, sendo observada associação estatisticamente significante quando comparados os grupos de portadores sintomáticos do HTLV e grupo controle e portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle.

Estes resultados não corroboram os trabalhos de Santos *et al.*, (2004), Best et *al.*, (2006), Muniz *et al.*, (2006) e Montanheiro *et al.*, em 2009, onde foram observados níveis séricos médios de IFN-γ significantemente mais elevados em pacientes com PET/MAH do que em portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle.

Guerreiro *et al.*, no Brasil, em 2006, analisaram os níveis de IFN-γ em portadores do HTLV-1 sem sintomas neurológicos, pacientes com PET/MAH e indivíduos soronegativos para HTLV e encontraram níveis mais elevados desta citocinas em portadores assintomáticos do HTLV comparado aos outros grupos envolvidos.

Embora Goon *et al.*, em 2003, não tenham encontrado associação significante em relação aos níveis de IFN-γ, foi observada uma tendência para correlação positiva entre a carga pró-viral do HTLV e elevados níveis de IFN-γ em portadores assintomáticos.

No presente estudo, os níveis séricos médios de PrtCR nos portadores sintomáticos do HTLV foi similar ao observado nos portadores assintomáticos do HTLV e superior ao encontrado no grupo controle. A comparação dos níveis séricos de PrtCR não demonstrou associação estatisticamente significante.

Não foram encontrados trabalhos na literatura relativos à quantificação dos níveis séricos de PrtCR em portadores do HTLV.

Embora tenha sido observada uma frequência maior do genótipo mutante TNF- $\alpha$  (-308) AA no grupo controle do presente trabalho, quando comparado com os grupos HTLV sintomáticos e HTLV assintomáticos, não foi encontrada associação estatisticamente significante tanto para os genótipos quanto para os alelos.

Similarmente, em estudos realizados no Japão foram investigados polimorfismos no gene TNF- $\alpha$  em portadores do HTLV e não foi observada associação estatística significante entre as frequências genotípicas ou alélicas deste polimorfismo comparando-se os grupos estudados (Seki *et al.*, 1999; Tsukasaki *et al.*, em 2001).

No presente trabalho, para o polimorfismo do gene TNF- $\beta$  foram observadas frequências mais elevadas para o genótipo AG no grupo de portadores assintomáticos do HTLV e do alelo A nos portadores sintomáticos do HTLV quando comparados os três grupos, todavia não foram encontradas associações estatisticamente significantes.

Nishimura *et al.*, em 2000, analisaram o polimorfismo do gene *TNF-β* (+252) em pacientes japoneses com PET/MAH, pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto, portadores assintomáticos do HTLV e indivíduos soronegativos para este vírus e detectaram uma diferença significante entre pacientes com PET/MAH e portadores assintomáticos do HTLV. A diferença foi também observada entre pacientes com PET/MAH e grupo controle. Por outro lado, não houve associação entre pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto e PET/MAH ou portadores assintomáticos do HTLV.

Não foram observadas, no presente trabalho, associações estatisticamente significantes quando comparadas as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $\mathit{IFN-\gamma}$  (+874) dos grupos de portadores sintomáticos, portadores assintomáticos do HTLV e grupo controle.

Não foram encontrados estudos relacionados ao polimorfismo do gene  $IFN-\gamma$  (+874) em portadores do HTLV.

Considerando-se o tipo de HTLV entre portadores sintomáticos e assintomáticos não houve associação estatisticamente significante quando comparados o sexo ou a idade.

No presente estudo, considerando-se o tipo de HTLV observou-se que o nível sérico médio de TNF-α mais elevado foi encontrado entre os portadores sintomáticos do HTLV-2. A comparação das médias dos níveis séricos de cada grupo entre si demonstrou associação estatisticamente significante, exceto quando comparados os grupos de portadores sintomáticos do HTLV-1 e portadores assintomáticos do HTLV-2, portadores assintomáticos do HTLV-1 e portadores assintomáticos do HTLV-2, bem como portadores assintomáticos do HTLV-1 e grupo controle.

A média dos níveis séricos de TNF-β no grupo controle foi maior do que entre os portadores do HTLV independente do tipo viral. Foi observada associação estatisticamente significante apenas quando comparados os portadores sintomáticos do HTLV-1 e o grupo controle.

A média dos níveis séricos de IFN-γ também foi mais elevada no grupo controle em relação aos portadores sintomáticos ou assintomáticos HTLV, sendo observada

associação estatisticamente significante quando comparados os grupos de portadores sintomáticos do HTLV-1 e grupo controle; portadores assintomáticos do HTLV-1 e grupo controle e portadores assintomáticos do HTLV-2 e grupo controle.

Entre os pacientes portadores sintomáticos ou assintomáticos do HTLV observou-se níveis séricos médios de PrtCR maiores do que no grupo controle, não sendo observada associação estatisticamente significante quando comparados entre si.

As frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes  $TNF-\alpha$  (-308),  $TNF-\beta$  (+252) e  $IFN-\gamma$  (+874) observadas nos grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos do HTLV não evidenciou associação estatisticamente significante quando comparadas entre si e ao grupo controle.

Não foram encontrados na literatura estudos relacionados tanto às dosagens dos níveis séricos das citocinas TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e PrtCR quanto ao polimorfismo dos mesmos (exceto PrtCR) em grupos de portadores do HTLV-1 ou HTLV-2, conforme descrito no presente estudo.

### 4.3 GRUPO DOENÇA CORONARIANA

No presente trabalho, não foi observada associação estatisticamente significante entre os grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* e pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* tanto em relação ao sexo, a idade, quanto à procedência.

Estes resultados são consistentes aos que foram observados por Georges et al., (2003) e por Goyal et al., (2007), os quais também não encontraram

associação estatística tanto para o sexo quanto para a idade quando comparados o grupo de pacientes com doença coronariana e o grupo controle, embora tenha sido observada uma significante associação entre a soropositividade para *C. pneumoniae* e a presença de doença coronariana.

Contrariamente, Rugonfalvi-Kiss *et al.*, em 2002, analisando amostras de pacientes com doença coronariana e indivíduos saudáveis demonstraram uma diferença significativa com relação ao sexo e a idade quando comparados ambos os grupos, assim como uma elevada prevalência para *C. pneumoniae* no grupo com doença coronariana.

A concentração sérica média de TNF-α, aqui encontrada foi mais elevada nos grupos de pacientes com doença coronariana que no grupo controle. Observou-se associação estatisticamente significante entre os pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* e o grupo controle.

Estes resultados corroboram os obtidos por Georges *et al.*, em 2003, os quais avaliaram os níveis de TNF-α em pacientes com doença coronariana e em indivíduos saudáveis e encontraram níveis desta citocina significantemente mais elevados em pacientes do que no grupo controle.

Martins *et al.*, em 2006, também observaram níveis séricos elevados de TNF-α em pacientes com doença coronariana comparados ao grupo de pacientes saudáveis, porém, esta diferença não apresentou significância estatística.

No presente trabalho, a concentração sérica média de TNF-β foi maior nos pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* do que nos pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* e no grupo controle.

Observou-se associação estatisticamente significante quando comparados os grupos de pacientes com doença coronariana e o grupo controle.

No presente estudo, a concentração sérica média de IFN-γ foi encontrada em níveis mais elevados no grupo controle do que nos pacientes com doença coronariana. Foi evidenciada associação estatisticamente significante apenas quando comparados os grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* e grupo controle.

Ao contrário, Martins *et al.*, em 2006, avaliaram o perfil de citocinas em pacientes com doença coronariana e pacientes saudáveis e não encontraram associação estatisticamente significante para o nível sérico de IFN-γ comparando-se os dois grupos.

A concentração sérica média de PrtCR, aqui encontrada, foi mais elevada nos grupos de pacientes com doença coronariana do que no grupo controle. Observou-se associação estatisticamente significante quando comparados os níveis séricos de PrtCR dos grupos de pacientes com doença coronariana com o grupo controle.

Similarmente, a avaliação dos níveis de PrtCR feita por Georges et *al.*, em 2003 e por Chen *et al.*, em 2005, em pacientes com doença coronariana e em indivíduos saudáveis demonstrou que os níveis de PrtCR foram mais elevados em pacientes do que no grupo controle apresentando significância estatística.

A comparação das distribuições genotípicas e alélicas para o polimorfismo de TNF-α (-308), aqui realizada, entre os grupos de pacientes com doença coronariana e positivos para *Chlamydia*, com doença coronariana e negativos para *Chlamydia* e grupo controle não mostrou associação estatisticamente significante.

Kubota *et al.*, em 1998, Georges et *al.*, em 2003 e Ghazouani *et al.*, em 2009, também não encontraram associação entre as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo de TNF-α (-308) comparando o grupo de paciente com doença coronariana e grupo controle.

No presente estudo, o grupo de pacientes com doença coronariana e sorologia negativa para *Chlamydia* apresentou maiores frequências para o genótipo AA e alelo A na investigação do polimorfismo do gene *TNF-β* (+252), quando comparado ao grupo de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *Chlamydia* e grupo controle, mas não foi observada associação estatisticamente significante.

Kubota *et al.*, em 1998 e Li *et al.*, em 2010, também não observaram associação estatisticamente significante entre as frequencias alélicas e genotípicas para o polimorfismo do gene TNF- $\beta$  (+252) em pacientes com doença coronariana comparado ao grupo controle.

No presente trabalho, a comparação das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $IFN-\gamma$  (+874) entre os grupos de pacientes com doença coronariana (com sorologia positiva e com sorologia negativa para *Chlamydia*) e grupo controle não mostrou associação estatisticamente significante.

Quando comparados os grupos que apresentaram reatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* e que reagiram apenas para *C. trachomatis* não foi observada associação estatisticamente significante com relação ao sexo, a idade ou a procedência.

A dosagem sérica média de TNF-α para os grupos de pacientes com doença coronariana (reativos para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* ou somente para *C. trachomatis*) foram similares entre si, porém mais elevadas do que no grupo controle. A análise estatística não demonstrou associação significante quando comparados os três grupos.

O nível sérico médio de TNF-β para ambos os grupos de pacientes com doença coronariana (reativos para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* ou somente para *C. trachomatis*) foi mais elevado do que no grupo controle, sendo observada associação estatisticamente significante quando comparados os dois grupos de pacientes com o grupo controle.

Não foram encontrados trabalhos comparativos na literatura relacionados à quantificação de TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  de acordo com os grupos descritos.

A média dos níveis séricos de IFN-γ para os grupos de pacientes com doença coronariana (reativos para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* ou somente para *C. trachomatis*) foi menor do que a observada no grupo controle. Houve associação estatisticamente significante quando comparados os dois grupos de pacientes com o grupo controle.

Ao contrário, em estudo realizado por Clancy *et al.*, em 2006, na Austrália, não foi encontrada associação significante entre os níveis séricos de IFN-γ em pacientes com doença coronariana quando comparados o grupo sororreativo para *C. pneumoniae* e negativo para esta bactéria, embora no grupo sororreativo a concentração desta citocina tenha sido mais elevada.

No presente estudo, observou-se que no grupo de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* o nível sérico médio de PrtCR foi mais elevado do que nos outros grupos estudados. Quando comparados os três grupos observou-se associação estatisticamente significante.

Resultados semelhantes foram descritos por Carratelli *et al.*, (2006), na Itália, e por Vahdat *et al.*, (2007), no Iran, os quais demonstraram que a soropositividade para *C. pneumoniae* e níveis elevados de PrtCR foram significantemente correlacionados com doença coronariana, em estudos desenvolvidos com portadores de doença coronariana e voluntários saudáveis.

Diferentemente, na Austrália, Clancy *et al.*, em 2006, não encontraram associação significante entre os níveis séricos de PrtCR em pacientes com doença coronariana quando comparados o grupo sororreativo para *C. pneumoniae* e negativo para esta bactéria.

Não se observou associação estatisticamente significante quando comparadas as frequências genotípicas e alélicas tanto para o polimorfismo do gene  $TNF-\alpha$  (-308) quanto para o polimorfismo do gene  $TNF-\beta$  (+252) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para C. trachomatis e C. pneumoniae, no grupo positivo apenas para C. trachomatis e no grupo controle.

As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene  $IFN-\gamma$  (+874) observadas nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para C. trachomatis e C. pneumoniae e no grupo positivo apenas para C. trachomatis

demonstraram associação estatisticamente significante quando comparadas às do grupo controle.

Estes resultados são os primeiros a descrever a investigação dos polimorfismos dos genes  $TNF-\alpha$  (-308),  $TNF-\beta$  (+252) e  $IFN-\gamma$  (+874) nos grupos de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para C. trachomatis e C. pneumoniae e no grupo positivo apenas para C. trachomatis.

## **5 CONCLUSÕES**

- 1. Não foi observada qualquer diferença sócio demográfica entre os grupos dengue positivo (infectados pelos DEN 1, DEN 2 e DEN 3) e dengue negativo;
- 2. O Virus da dengue 3 foi o mais frequente entre os indivíduos infectados;
- 3. Não houve diferença com relação ao sexo ou a idade, comparando-se os grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos do HTLV, independente do tipo viral;
- 4. O HTLV-1 foi o mais prevalente nos grupos estudados (portadores sintomáticos *vs* portadores assintomáticos);
- 5. A maioria das amostras de pacientes com doença coronariana apresentaram sororreatividade para *Chlamydia*, sendo a *C. trachomatis* a mais prevalente;
- 6. Não foi observada diferença sócio demográfica entre os grupos de pacientes com doença coronariana (com sorologia positiva ou negativa para *Chlamydia*), nem mesmo quando discriminada a espécie (*C. trachomatis* ou *C. pneumoniae*);
- 7. A discriminação da sororreatividade de anticorpos para *Chlamydia* mostrou a maior frequência para o sorotipo J de *C. trachomatis* e para a *C. pneumoniae*;
- 8. Foi observada diferença significante comparando-se os níveis séricos médios de TNF-β, de IFN-γ e de PrtCR dos grupos dengue positivo, dengue negativo e grupo controle, no entanto, não houve diferença comparando-se os níveis séricos de TNF-α destes grupos;
- Houve diferença significante quando comparados os níveis séricos de TNF-α,
   TNF-β, e IFN-γ nos grupos de portadores do HTLV e grupo controle, porém, para
   PrtCR, o mesmo não foi observado;

- 10. Observou-se diferença na comparação dos níveis séricos de TNF-α, TNF-β, IFN-γ e PrtCR entre os pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para Chlamydia e o grupo controle;
- 11. Foram encontradas diferenças significantes entre os níveis séricos médios de TNF-β, IFN-γ e PrtCR para as espécies DEN 1, DEN 2 e DEN 3 comparados ao grupo controle, mas para TNF-α, o mesmo não foi observado;
- 12. A comparação das médias dos níveis séricos de TNF-α, TNF-β e IFN-γ entre os grupos de portadores do HTLV, de acordo com a espécie e o grupo controle, demonstrou associação significante, o que não foi observado para a PrtCR;
- 13. Os níveis séricos de TNF-β, IFN-γ e PrtCR foram significativamente diferentes entre os grupos de pacientes com doença coronariana e sororreatividade para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae*, comparados ao grupo controle, no entanto, não houve diferença para as concentrações séricas de TNF-α nestes grupos;
- 14. A distribuição das frequências genotípicas demonstrou diferença para os polimorfismos dos genes  $TNF-\alpha$  e  $IFN-\gamma$  quando comparados os grupos dengue positivo, dengue negativo e controle, contudo, para o polimorfismo do gene  $TNF-\beta$  não houve diferença significante;
- 15. Não foi encontrada diferença para os genótipos e os alelos de TNF-α, TNF-β e
  IFN-γ, quando comparados os grupos de portadores do HTLV e controle;
- 16. A comparação das distribuições genotípicas e alélicas entre os grupos de pacientes com doença coronariana e positivos para *Chlamydia*, com doença coronariana e

- negativos para *Chlamydia* e grupo controle não mostrou associação para os genes  $TNF-\alpha$ ,  $TNF-\beta$  e  $IFN-\gamma$ ,
- 17. Houve diferença significante quando comparadas as frequências genotípicas para o polimorfismo do *IFN-γ* nos grupos DEN 1, DEN 2, DEN 3 e controle, mas não para as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes *TNF-α* e *TNF-β*;
- 18. As frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes *TNF-α*, *TNF-β* e *IFN-γ*, observadas nos grupos de portadores sintomáticos e assintomáticos do HTLV, independentemente do tipo viral, não evidenciaram diferença quando comparadas entre si e com o grupo controle;
- 19. Houve diferença quando comparadas as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo do gene *IFN-γ* encontradas no grupo de pacientes com doença coronariana e sorologia positiva para *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* e no grupo com reatividade isolada para *C. trachomatis*, todavia, o mesmo não foi observado para os polimorfismos dos genes *TNF-α* e *TNF-β*.

# 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. Citocinas. In: **Imunologia Celular e Molecular**.

  ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., PILLAI, S. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
  p. 267-301.
- ABRAHAM, L.J., DU, D.C., ZAHEDI, K., DAWKINS, R.L., WHITEHEAD, A.S. Haplotypic polymorphisms of the TNFB gene. **Immunogenetics**, **33:** 50–53, 1991.
- ALI, M., WAGATSUMA, Y., EMCH, M., BREIMAN, R.F. Use of a geographic information system for defining spatial risk for dengue transmission in Bangladesh: role for Aedes albopictus in an urban outbreak. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 69:** 634-640, 2003.
- ALLEN, M.H., WAKELIN, S.H., HOLLOWAY, D., LISBY, S., BAADSGAARD, O., BARKER, J.N.W.N., MCFADDEN, J.P. Association of TNFA gene polymorphism at position -308 with susceptibility to irritant contact dermatitis. **Immunogenetics**, **51**: 201–205, 2000.
- ARAÚJO, T.P., RODRIGUES, S.G., COSTA, M.I.W.A., VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. Diagnóstico sorológico de infecções por dengue e febre amarela em casos suspeitos no Estado do Pará, Brasil, 1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 35:** 579-584, 2002.
- ATIK, B., SKWOR, T.A., KANDEL, R.P., SHARMA, B., ADHIKARI, H.K., STEINER, L., ERLICH, H., DEAN, D. Identification of novel single nucleotide polymorphisms in inflammatory genes as risk factors associated with trachomatous trichiasis. **PLOS**ONE, 3: 1-11, 2008.

- AYRES, M., AYRES JR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0: aplicações** estatísticas nas áreas das Ciências biológicas e médicas. Belém, 2007. 364 p.
- AZEREDO, E.L., ZAGNE, S.M., SANTIAGO, M.A., GOUVEA, A.S., SANTANA, A.A., NEVES-SOUZA, P.C., NOGUEIRA, R.M., MIAGOSTOVICH, M.P., KUBELKA, C.F. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. **Immunobiology, 204:** 494-507, 2001.
- BALMASEDA, A., HAMMOND, S.N., PÉREZ, L., TELLEZ, Y., SABORÍO, S.I., MERCADO, J.C., CUADRA, R., ROCHA, J., PÉREZ, M.A., SILVA, S., ROCHA, C., HARRIS, E. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue.

  American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 74: 449–456, 2006.
- BALOGOU, A.A., GRUNITZKY, E.K., ANANI, T.K., KOWU, A., SADZO-HETSU, A., NUBUKPO, K.A., DUMAS, M. Prevalence of HTLV-1 virus infection in Togo (Kozah prefecture and the University Hospital Center of Lomé). Bulletin de La Société de Pathologie Exotique, 93: 3-5, 2000.
- BANGHAM, C.R. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. **Journal of General Virology, 84:** 3177–3189, 2003.
- BEST, I., ADAUI, V., VERDONCK, K., GONZÁLEZ, E., TIPISMANA, E., CLARK, D., GOTUZZO, E., VANHAM, G. Proviral load and immune markers associated with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Peru. Clinical and Experimental Immunology, 146: 226–233, 2006.

- BETHELL, D.B., FLOBBE, K., CAO, X.T., DAY, N.P., PHAM, T.P., BUURMAN, W.A., CARDOSA, M.J., WHITE, N.J., KWIATKOWSKI, D. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Diseases**, **177**: 778–782, 1998.
- BIDDISON, W.E., KUBOTA, R., KAWANISHI, T., TAUB, D.D., CRUIKSHANK, W.W., CENTER, D.M., CONNOR, E.W., UTZ, U., JACOBSON, S. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ CTL clones from patients with HTLV-I-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. **Journal of Immunology, 159:** 2018-2025, 1997.
- BITTENCOURT, A.L., DOURADO, I., FILHO, P.B., SANTOS, M., VALADÃO, E., ALCANTARA, L.C., GALVÃO-CASTRO, B. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in northeastern Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 26:** 490-494, 2001.
- BOZZA, F.A., CRUZ, O.G., ZAGNE, S.M.O., AZEREDO, E.L., NOGUEIRA, R.M.R., ASSIS, E.F., BOZZA, P.T., KUBELKA, C.F. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC Infectious Diseases, 8:** 1-11, 2008.
- BRAGA, E.L.A., MOURA, P., PINTO, L.M.O., IGNÁCIO, S.R.N., OLIVEIRA, M.J.C., CORDEIRO, M.T., KUBELKA, C.F. Detection of circulant tumor necrosis factor-α, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-γ in Brazilian patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 96:** 229-232, 2001.

- BRULL, D.J., SERRANO, N., ZITO, F., JONES, L., MONTGOMERY, H.E., RUMLEY, A., SHARMA, P., LOWE, G.D., WORLD, M.J., HUMPHRIES, S.E., HINGORANI, A.D. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 23:** 2063-2069, 2003.
- CABRERA, M., SHAW, M.A., SHARPLES, C., WILLIAMS, H., CASTES, M., CONVIT, J., BLACKWELL, J.M. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, **182**: 1259-1264, 1995.
- CALATTINI, S., CHEVALIER, S. A., DUPREZ, R., AFONSO, P., FROMENT, A., GESSAIN, A., MAHIEUX, R. Human T-cell lymphotropic Virus type 3: complete nucleotide sequence and characterization of the human Tax3 protein. **Journal of Virology, 80:** 9876–9888, 2006.
- CAMPBELL, L.A., KUO, C.C., GRAYSTON, J.T. *Chlamydia pneumoniae* and cardiovascular disease. **Emerging Infectious Disease**, **4:** 571–579, 1998.
- CAO, H., HEGELE, R.A. Human C-reactive protein (CRP) 1059G/C polymorphism.

  Journal of Human Genetics, 45: 100-101, 2000.
- CARVALHO, E.M., BACELLAR, O., PORTO, A.F., BRAGA, S., GALVÃO-CASTRO, B., NEVA, F. Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 27:** 1-6, 2001.

- CASSAR, O., CAPUANO, C., MEERTENS, L., CHUNGUE, E., GESSAIN, A. Human T-cell leukemia virus type 1 molecular variants, Vanuatu, Melanesia. **Emerging**Infectious Diseases, 11: 706-710, 2005.
- CATALDO, F., SCOLA, L., PICCIONE, M., GIUFFRÈ, M., CRIVELLO, A., FORTE, G.I., LIO, D., CORSELLO, G. Evaluation of cytokine polymorphisms (TNF alpha, IFN gamma and IL-10) in Down patients with coeliac disease. **Digestive and Liver Disease**, **37**: 923-927, 2005.
- CHAKRAVARTI, A., KUMARIA, R. Circulating levels of tumour necrosis factor-a and interferon-g in patients with dengue and dengue haemorrhagic fever during an outbreak.

  Indian Journal of Medical Research, 123: 25-30, 2006.
- CHAMBERS, T.J., HAHN, C.S., GALLER, R., RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology, 44:** 649-688, 1990.
- CHATURVEDI, U.C., AGARWAL, R., ELBISHBISHI, E.A., MUSTAFA, A.S. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS**Immunology and Medical Microbiology, 28: 183–188, 2000.
- CHATURVEDI, U.C., ELBISHBISHI, E.A., AGARWAL, R., RAGHUPATHY, R., NAGAR, R., TANDON, R., PACSA, A.S., YOUNIS, O.I., AZIZIEH, F. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. **Journal of Medical Virology**, **59**: 335-340, 1999a.
- CHATURVEDI, U.C., RAGHUPATHY, R., PACSA, A.S., ELBISHBISHI, E.A., AGARWAL, R., NAGAR, R., MISRA, A., KAPOOR, S., MATHUR, A., KHAN,

- M.A.Y., AZIZIEH, F. Shift from a Th1-type response to Th2-type in dengue haemorrhagic fever. **Current Science**, **76**: 63-69, 1999b.
- CHATURVEDI, U.C., NAGAR, R., SHRIVASTAVA, R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. **FEMS Immunology and Medical Microbiology, 47:** 155-166, 2006.
- CHEN, L.C., LEI, H.Y., LIU, C.C., SHIESH, S.C., CHEN, S.H., LIU, H.S., LIN, Y.S., WANG, S.T., SHYU, H.W., YEH, T.M. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,74:** 142–147, 2006.
- CHEN, J., ZHAO, J., HUANG, J., SU, S., QIANG, B., GU, D. -717A>G polymorphism of human C-reactive protein gene associated with coronary heart disease in ethnic Han Chinese: the Beijing atherosclerosis study. **Journal of Molecular Medicine**, **83:** 72-78, 2005.
- CICCARONE, V.C., CHRIVIA, J., HARDY, K.J., YOUNG, H.A. Identification of enhancer-like elements in human IFN-gamma genomic DNA. **Journal of Immunology, 144:** 725-730, 1990.
- CLANCY, R., REN, Z., PANG, G., FLETCHER, P., D'ESTE, C. Chronic *Chlamydia* pneumoniae infection may promote coronary artery disease in humans through enhancing secretion of interleukin-4. Clinical and Experimental Immunology, 146: 197–202, 2006.
- CARRATELLI, C.R., NUZZO, I., COZZOLINO, D., BENTIVOGLIO, C., PAOLILLO, R., RIZZO, A. Relationship between *Chlamvdia pneumoniae* infection, inflammatory

- markers, and coronary heart diseases. **International Immunopharmacology, 6:** 848–853, 2006.
- CONWAY, D.J., HOLLAND, M.J., BAILEY, R.L., CAMPBELL, A.E., MAHDI, O.S.M., JENNINGS, R., MBENA, E., MABEY, D.C.W. Scarring trachoma is associated with polymorphism in the tumor necrosis factor alpha (TNF-a) gene promoter and with elevated TNF-a levels in tear fluid. **Infection and Immunity, 65:** 1003–1006, 1997.
- COOK, J.A. Eliminating blinding trachoma. **New England Journal of Medicine, 358:** 1777-1779, 2008.
- D'ALFONSO, S., RICHIARDI, P.M. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. **Immunogenetics**, **39:** 150-154, 1994.
- DEBATTISTA, J., TIMMS, P., ALLAN, J., ALLAN, J. Reduced levels of gamma-interferon secretion in response to chlamydial 60 kDa heat shock protein amongst women with pelvic inflammatory disease and a history of repeated *Chlamydia trachomatis* infections. **Immunology Letters, 81:** 205-210, 2002.
- DÍAZ, F.J., BLACK, W.C. 4TH, FARFÁN-ALE, J.A., LOROÑO-PINO, M.A, OLSON K.E., BEATY, B.J. Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective. **Archives of Medical Research**, **37:** 760-773, 2006.
- EFFLER, P.V., PANG, L., KITSUTANI, P., VORNDAM, V., NAKATA, M., AYERS, T., ELM, J., TOM, T., REITER, P., RIGAU-PEREZ, J.G., HAYES, J.M., MILLS, K., NAPIER, M., CLARK, G.G., GUBLER, D.J. Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. Emerging Infectious Diseases, 11: 742-749, 2005.
- EIRAKU, N., NOVOA, P., FERREIRA, M.C., MONKEN, C., ISHAK, R., FERREIRA, O.C., ZHU, S.W., LORENCO, R., ISHAK, M.O.G., AZEVEDO, V.,

- GUERREIRO, J.F., POMBO DE OLIVEIRA, M., LOUREIRO, P., HAMMERSCHLAK, N., IJICHI, S., HALL, W.W. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. **Journal of Virology, 70:** 1481-1492, 1996.
- FERENCIK, S., LINDEMANN, M., HORSTHEMKE, B., GROSSE-WILDE, H. A new restriction fragment length polymorphism of the human TNF-B gene detected by AspHI digest. **European Journal of Immunogenetics**, **19**: 425–430, 1992.
- FERNÁNDEZ-MESTRE, M.T., GENDZEKHADZE, K., RIVAS-VETENCOURT, P., LAYRISSE, Z. TNF-*a*-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens**, **64**: 469–472, 2004.
- FERREIRA Jr., O.C., PLANELLES, V., ROSENBLATT, J.D. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology and pathogenesis. **Blood Reviews, 11:** 91-104, 1997.
- FEUER, G., GREEN, P.L. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. **Oncogene, 24:** 5996–6004, 2005.
- FURUSYO, N., HAYASHI, J., KAKUDA, K., SAWAYAMA, Y., ARIYAMA, I., EDDIE, R., KASHIWAGI, S. Markedly high seroprevalence of hepatitis B virus infection in comparison to hepatitis C virus and human T lymphotropic virus type-1 infections in selected Solomon Islands populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 61:** 85-91, 1999.

- GABAY, C., KUSHNER, I. Mechanisms of disease: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England Journal of Medicine, 340:** 448–454, 1999.
- GAGNON, S.J., MORI, M., KURANE, I., GREEN, S., VAUGHN, D.W., KALAYANAROOJ, S., SUNTAYAKORN, S., ENNIS, F.A., ROTHMAN, A.L. Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. **Journal of Medical Virology, 67:** 41–46, 2002.
- GEORGES, J.L., RUPPRECHT, H.J., BLANKENBERG, S., POIRIER, O., BICKEL, C., HAFNER, G., NICAUD, V., MEYER, J., CAMBIEN, F., TIRET, L. Impact of pathogen burden in patients with coronary artery disease in relation to systemic inflammation and variation in genes encoding cytokines. **American Journal of Cardiology, 92:** 515-521, 2003.
- GESSAIN, A., BARIN, F., VERNANT, J.C., GOUT, O., MAURS, L., CALENDER, A., DE THÉ, G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet, 2:** 407-410, 1985.
- GESSAIN, A., BOERI, E., YANAGIHARA, R., GALLO, R.C., FRANCHINI, G. Complete nucleotide sequence of a highly divergent human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type I (HTLV-I) variant from melanesia: genetic and phylogenetic relationship to HTLV-I strains from other geographical regions. **Journal of Virology**, **67:** 1015-1023, 1993.

- GESSAIN, A., FRETZ, C., KOULIBALY, M., BOUDRET, M.L., BAH, A., RAPHAEL, M., DE THE, G., FOURNEL, J.J. Evidence of HTLV-II infection in Guinea, West Africa. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 6: 324-325, 1993a.
- GHAZOUANI, L., KHALIFA, S.B., ABBOUD, N., ADDAD, F., KHALFALLAH, A.B., BRAHIM, N., MEDIOUNI, M., ALMAWI, W.Y., MAHJOUB, T. -308G>A and -1031T>C tumor necrosis factor gene polymorphisms in Tunisian patients with coronary artery disease. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 47: 1247-1251, 2009.
- GOFF, S.P. Retroviridae: The Retroviruses and their replication In: **Virology.** Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B., Straus, S.E. (eds.) Lippincott Raven, Philadelphia, 2007. p. 1999-2069.
- GOON, P.K.C., IGAKURA, T., HANON, E., MOSLEY, A.J., ASQUITH, B., GOULD, K.G., TAYLOR, G.P., WEBER, J.N., BANGHAM, C.R.M. High circulating frequencies of tumor necrosis factor alpha and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD4 T cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. **Journal of Virology**, 77: 9716–9722, 2003.
- GOTUZZO, E., ARANGO, C., DE QUEIROZ-CAMPOS, A., ISTÚRIZ, R.E. Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. **Infectious Disease Clinics of North America, 14:** 211-239, 2000.
- GOYAL, P., KALE, S.C., CHAUDHRY, R., CHAUHAN, S., SHAH, N. Association of common chronic infections with coronary artery disease in patients without any conventional risk factors. **Indian Journal of Medical Research**, **125**: 129-136, 2007.

- GRATZ, N.G. Critical review of the vector status of Aedes albopictus. **Medical and Veterinary Entomology, 18:** 215-227, 2004.
- GRAYSTON, J.T. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. **Journal of Infectious Diseases, 181:** S402–S410, 2000.
- GREEN, S., VAUGHN, D.W., KALAYANAROOJ, S., NIMMANNITYA, S., SUNTAYAKORN, S., NISALAK, A., LEW, R., INNIS, B.L., KURANE, I., ROTHMAN, A.L., ENNIS, F.A. Early immune activation in acute dengue is related to development of plasma leakage and disease severity. **Journal of Infectious Diseases**, **179:** 755–762, 1999.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clinical Microbiology Review, 11: 480-496, 1998.
- GUERREIRO, J.B., SANTOS, S.B., MORGAN, D.J., PORTO, A.F., MUNIZ, A.L., HO, J.L., TEIXEIRA-JR, A.L., TEIXEIRA, M.M., CARVALHO, E.M. Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. Clinical and Experimental Immunology, 145: 296–301, 2006.
- GUHA-SAPIR, D., SCHIMMER, B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. **Emerging Themes in Epidemiology, 2:** 1-10, 2005.
- GUZMAN, M.G., KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases, 2:** 33–42, 2002.
- HAGE, F.G., SZALAI, A.J. C-Reactive Protein Gene Polymorphisms, C-Reactive Protein Blood Levels, and Cardiovascular Disease Risk. **Journal of the American College of Cardiology, 50:** 1115–1122, 2007.

- HALL, W.W., ISHAK, R., ZHU, S.W., NOVOA, P., EIRAKU, N., TAKAHASHI, H., FERREIRA, M.D.A.C, AZEVEDO, V., ISHAK, M.O, FERREIRA, O.D.A.C, MONKEN, C., KURATA, T. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): epidemiology, molecular properties, and clinical features of infection. **Journal of Acquired Immunedeficiency Syndromes and Human Retrovirology, 13:** 204-211, 1996.
- HALL, W.W., TAKAHASHI, H., LIU, C., KAPLAN, M.H., SHEEWIND, O., IJICHI, S., NAGASHIMA, K., GALLO, R.C. Multiple isolates and characteristics of human T-cell leukemia virus type II. **Journal of Virology, 66:** 2456-2463, 1992.
- HALSTEAD, S.B. Dengue. Lancet, 370: 1644-1652, 2007.
- HERRMANN, S.M., RICARD, S., NICAUD, V., MALLET, C., ARVEILER, D., EVANS, A., RUIDAVETS, J.B., LUC, G., BARA, L., PARRA, H.J., POIRIER, O., CAMBIEN, F. Polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. **European Journal of Clinical Investigation, 28:** 59-66, 1998.
- HJELLE, B. Human T-cell leukemia/lymphoma viruses: life cycle, pathogenicity, epidemiology and diagnosis. **Archives of Pathological and Laboratorial Medicine, 115:** 440-450, 1991.
- HJELLE, B., APPENZELLER, O., MILLS, R., ALEXANDER, S., TORREZ-MARTINEZ, N., JAHNKE, R., ROSS, G. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. **Lancet**, **339**: 645-646, 1992.
- HOBER, D., NGUYEN, T.L., SHEN, L., HA, D.Q., HUONG, V.T., BENYOUCEF, S., NGUYEN, T.H., BUI, T.M., LOAN, H.K., LE, B.L., BOUZIDI, A., DE GROOTE, D.,

- DROUET, M.T., DEUBEL, V., WATTRÉ, P. Tumor necrosis factor alpha levels in plasma and whole-blood culture in dengue-infected patients: relationship between virus detection and pre-existing specific antibodies. **Journal of Medical Virology, 54:** 210–218, 1998.
- HOBER, D., POLI, L., ROBLIN, B., GESTAS, P., CHUNGUE, E., GRANIC, G., IMBERT, P., PECARERE, J.L., VERGEZ-PASCAL, R., WATTRE, P. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue infected patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **48**: 324–331, 1993.
- HÖHLER, T., SCHÄPER, T., SCHNEIDER, P.M., MEYER, Z.U.M., BÜSCHENFELDE, K.H., MÄRKER-HERMANN, E. Association of different tumor necrosis factor alpha promoter allele frequencies with ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. **Arthritis and Rheumatism**, **41:** 1489-1492, 1998.
- HOLMES, E.C., TWIDDY, S.S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, **3:** 19-28, 2003.
- HOLMGREN, B., DA SILVA, Z., LARSEN, O., VASTRUP, P., ANDERSSON, S., AABY, P. Dual infections with HIV-1, HIV-2 and HTLV-I are more common in older women than in men in Guinea-Bissau. **AIDS, 17:** 241-253, 2003.
- HUIZINGA, T.W., WESTENDORP, R.G., BOLLEN, E.L., KEIJSERS, V., BRINKMAN, B.M., LANGERMANS, J.A., BREEDVELD, F.C., VERWEIJ, C.L., VAN DE GAER, L., DAMS, L., CRUSIUS, J.B., GARCÍA-GONZALEZ, A., VAN OOSTEN, B.W., POLMAN, C.H., PEÑA, A.S. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and

- susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. **Journal of Neuroimmunology, 72:** 149-153, 1997.
- IGIETSEME, J.U., BLACK, C.M., CALDWELL, H.D. Chlamydia vaccines: strategies and status. **BioDrugs**, **16:** 19-35, 2002.
- in myocardial infarction at young age. **Minerva Cardioangiologica**, **52**: 287-312, 2004.
- INNIS, B.L., NISALAK, A., NIMMANNITYA, S., KUSALERDCHARIYA, S., CHONGSWASDI, V., SUNTAYAKORN, S., PUTTISRI, P., HOKE, C.H. An enzymelinked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **40**: 418-427, 1989.
- ISHAK, M.O., ISHAK, R. Chlamydia infection impact among native Indian groups of the Brazilian Amazon region. **Cadernos de Saúde Pública**, **17**: 385-396, 2001.
- ISHAK, R., HARRINGTON Jr., W.J., AZEVEDO, V.N., EIRAKU, N., ISHAK, M.O.G., GUERREIRO, J.F., SANTOS, S.B., KUBO, T., MONKEN, C., ALEXANDER, S., HALL, W.W. Identification of Human T-cell lymphotrpic virus type IIa infection in the Kayapo, an Indigenous Population of Brazil. **AIDS Research and Human Retrovirology, 11:** 813-821, 1995.
- ISHAK, R., VALLINOTO, A.C.R., AZEVEDO, V.N., LEWIS, M., HALL, W.W., ISHAK, M.O.G. Molecular Evidence of mother to child transmission of HTLV-IIc in

- the Kararao village in the Amazon Region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 34:** 519-525, 2001.
- IWASAKI, H., OTA, N., NAKAJIMA, T., SHINOHARA, Y., KODAIRA, M., KAJITA, M., EMI, M. Five novel single-nucleotide polymorphisms of human interferon gamma identified by sequencing the entire gene. **Journal of Human Genetic, 46:** 32–34, 2001.
- JANG, W.H., YANG, Y.I., YEA, S.S., LEE, Y.J., CHUN, J.H., KIM, H.I., KIM, M.S., PAIK, K.H. The -238 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. **Cancer Letters, 166:** 41-46, 2001.
- JESSIE, K., FONG, M.Y., DEVI, S., LAM, S.K., WONG, K.T. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **Journal of Infectious Diseases**, **189**: 1411-1418, 2004.
- KAIJZEL, E.L., VAN KRUGTEN, M.V., BRINKMAN, B.M., HUIZINGA, T.W., VAN DER STRAATEN, T., HAZES, J.M., ZIEGLER-HEITBROCK, H.W., NEDOSPASOV, S.A., BREEDVELD, F.C., VERWEIJ, C.L. Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. **Molecular Medicine, 4:** 724-733, 1998.
- KALUZA, W., REUSS, E., GROSSMANN, S., HUG, R., SCHOPF, R.E., GALLE, P.R., MAERKER-HERMANN, E., HOEHLER, T. Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. **Journal of Investigative Dermatology, 114:** 1180-1183, 2000.
- KALYANARAMAN, V.S., SARNGADHARAN, M.G., ROBERT-GUROFF, M., MIYOSHI, I., BLAYNEY, D., GOLDE, D., GALLO, R.C. A new subtype of human

- T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, **218**: 571-573, 1982.
- KAMALI-SARVESTANI, E., MERAT, A., TALEI, A.R. Polymorphism in the genes of alpha and beta tumor necrosis factors (TNF-alpha and TNF-beta) and gamma interferon (IFN-gamma) among Iranian women with breast cancer. **Cancer Letters, 223:** 113-119, 2005.
- KIRA, J., FUJIHARA, K., ITOYAMA, Y., GOTO, I., HASUO, K. Leukoencephalopathy in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: MRI analysis and a two year follow up study after corticosteroid therapy. **Journal of Neurological Science**, **106:** 41-49, 1991.
- KIRBIS, J., KESE, D., PETROVIC, D. Presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA in the Artery Wall Biomarker of Coronary Artery Disease. **Folia Biologica (Praha), 51:** 145-147, 2005.
- KITTIGUL, L., TEMPROM, W., SUJIRARAT, D., KITTIGUL, C. Determination of tumor necrosis factor-alpha levels in dengue virus infected patients by sensitive biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Virological Methods**, **90**: 51-57, 2000.
- KNIGHT, J.C., KEATING, B.J., ROCKETT, K.A., KWIATKOWSKI, D.P. In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. **Nature Genetics**, **33**: 469–475, 2003.
- KUBOTA, T., MCNAMARA, D.M., WANG, J.J., TROST, M., MCTIERNAN, C.F., MANN, D.L., FELDMAN, A.M. Effects of tumor necrosis factor gene polymorphism on patients with congestive heart failure. **Circulation, 97:** 2499-2501, 1998.

- KUNO, G., CHANG, G.J., TSUCHIYA, K.R., KARABATSOS, N., CROPP, C.B. Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal of Virology, 72:** 73-83, 1998.
- KUO, C.C., JACKSON, L.A., CAMPBELL, L.A., GRAYSTON, J.T. *Chlamydia* pneumoniae (TWAR). Clinical Microbiology Review, 8: 451–461, 1995.
- KURANE, I., ENNIS, F.E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections.

  Seminars in Immunology, 4: 121-127, 1992.
- LAUR, F., MURGUE, B., DEPARIS, X., ROCHE, C., CASSAR, O., CHUNGUE, E. Plasma levels of tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **92**: 654-656, 1998.
- LEITMEYER, K.C., VAUGHN, D.W., WATTS, D.M. Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. **Journal of Medical Virology, 67:** 41–46, 2002.
- LEVY, A., VALERO, N., ESPINA, L.M., AÑEZ, G., ARIAS, J., MOSQUERA, J. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 104:** 16–23, 2010.
- LI, W., XU, J., WANG, X., CHEN, J., ZHANG, C., SUN, K., HUI, R. Lack of association between lymphotoxin-alpha, galectin-2 polymorphisms and coronary artery disease: a meta-analysis. **Atherosclerosis**, **208**: 433-436, 2010.
- LIBRATY, D.H., ENDY, T.P., HOUNG, A.H.S.H., GREEN, S., KALAYANAROOJ, S., SUNTAYAKORN, S., CHANSIRIWONGS, W., VAUGHN, D.W., NISALAK, A.,

- ENNIS, F.A., ROTHMAN, A.L. Differing Influences of Virus Burden and Immune Activation on Disease Severity in Secondary Dengue-3 Virus Infections. **Journal of Infectious Diseases**, **185**:1213–1221, 2002.
- LOOMIS, W.P., STARNBACH, M.N. T cell responses to *Chlamydia trachomatis*.

  Current Opinion in Microbiology, 5: 87-91, 2002.
- MABEY, D., PEELING, R.W. Lymphogranuloma venereum. **Sexually Transmitted Infections, 78:** 90-92, 2002.
- MARTINS, T.B., ANDERSON, J.L., MUHLESTEIN, J.B., HORNE, B.D., CARLQUIST, J.F., ROBERTS, W.L., HARRY, R., WILL, M.D. Risk factor analysis of plasma cytokines in patients with coronary artery disease by a multiplexed fluorescent immunoassay. **American Journal of Clinical Pathology**, **125**: 906-913, 2006.
- MCGUIRE, W., HILL, A.V., ALLSOPP, C.E., GREENWOOD, B.M., KWIATKOWSKI, D. Variation in the TNF-alfa promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. **Nature**, **371**: 508-510, 1994.
- MADELEINE, M.M., WIKTOR, S.Z., GOEDERT, J.J., MANNS, A., LEVINE, P.H., BIGGAR, R.J., BLATTNER, W.A. HTLV-I and HTLV-II world-wide distribution: reanalysis of 4,832 immunoblot results. **International Journal of Cancer, 54:** 255-260, 1993.
- MAHIEUX, R., GESSAIN, A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: New members of the HTLV family. **Pathologie Biologie, 57:** 161-166, 2009.
- MAJETSCHAK, M., OBERTACKE, U., SCHADE, F.U., BARDENHEUER, M., VOGGENREITER, G., BLOEMEKE, B., HEESEN, M. Tumor necrosis fator gene

- polymorphisms, leukocyte function, and sepsis susceptibility in blunt trauma patients. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 9: 1205-1211, 2002.
- MALONEY, E.M., BIGGAR, R.J., NEEL, J.V., TAYLOR, M.E., HAHN, B.H., SHAW, G.M., BLATTNER, W.A. Endemic human T cell lymphotropic virus type II infection among isolated Brazilian Amerindians. **Journal of Infectious Diseases, 166:** 100-107, 1992.
- MANAVI, K. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. **Best Practice &**Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, 20: 941-951, 2006.
- MANNS, A., HISADA, M., LA GRENADE, L. Human T- lymphotropic virus type I infection. Lancet, 353: 1951-1958, 1999.
- MATSUMOTO, A. Electron microscopic observations of surface projections on Chlamydia psittaci reticulate bodies. **Journal of Bacteriology**, **150**: 358-364, 1982.
- MATSUOKA, M., JEANG, K.T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, **7:** 270-280, 2007.
- MATSUZAKI, T., OTOSE, H., HASHIMOTO, K., SHIBATA, Y., ARIMURA, K., OSAME, M. Diseases among men living in human T-lymphotropic virus type I endemic areas in Japan. **Internal Medicine, 32:** 623-628, 1993.
- MESSER, G., SPENGLER, U., JUNG, M.C., HONOLD, G., BLÖMER, K., PAPE, G.R., RIETHMÜLLER, G., WEISS, E.H. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. **Journal of Experimental Medicine**, **173**: 209-219, 1991.

- MESSER, W.B, GUBLER, D.J, HARRIS, E., SIVANANTHAN, K., DE SILVA, A.M. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. **Emerging**Infectious Diseases, 9: 800-809, 2003.
- MIRA, J.P., CARIOU, A., GRALL, F., DELCLAUX, C., LOSSER, M.R., HESHMATI, F., CHEVAL, C., MONCHI, M., TEBOUL, J.L., RICHÉ, F., LELEU. G., ARBIBE, L., MIGNON, A., DELPECH, M., DHAINAUT, J.F. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. Journal of the American Medical Association, 282: 561-568, 1999.
- MIURA, T., FUKUNAGA, T., IGARASHI, T., YAMASHITA, M., IDO, E., FUNAHASHI, S., ISHIDA, T., WASHIO, K., UEDA, S., HASHIMOTO, K., YOSHIDA, M., OSAME, M., SINGHAL, B., ZANINOVIC, V., CARTIER, L., SONODA, S., TAJIMA, K., INA, Y., GOJOBORI, T., HAYAMI, M. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to antropological background. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **91:** 1124-1127, 1994.
- MONTANHEIRO, P.A., PENALVA DE OLIVEIRA, A.C., SMID, J., FUKUMORI, L.M., OLAH, I., DUARTE, A.J.S., CASSEB, J. The elevated interferon gamma production is an important immunological marker in HAM/TSP pathogenesis. **Scandinavian Journal of Immunology, 70:** 403-407, 2009.
- MOROFUJI-HIRATA, M., KAJIYAMA, W., NAKASHIMA, K., NOGUCHI, A., HAYASHI, J., KASHIWAGI, S. Prevalence of antibody to human T-cell lymphotropic virus type I in Okinawa, Japan, after an interval of 9 years. **American Journal of Epidemiology, 137:** 43-48, 1993.

- MOULDER, J.W. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. **Microbiology Review**, **55:** 143–190, 1991.
- MOZZATO-CHAMAY, N., MAHDI, O.S.M., JALLOW, O., MABEY, D.C.W., BAILEY, R.L., CONWAY, D.J. Polymorphisms in candidate genes and risk of scarring trachoma in a *Chlamydia trachomatis*—endemic population. **Journal of Infectious Diseases, 182:** 1545–1548, 2000.
- MUNIZ, S.L., RODRIGUES JR, W., SANTOS, S.B., DE JESUS, A.R., PORTO, A.F., CASTRO, N., OLIVEIRA-FILHO, J., ALMEIDA, J.P., MORENO-CARVALHO, O., CARVALHO, E.M. Association of cytokines, neurological disability, and disease duration in HAM/TSP patients. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, **64**: 217-221, 2006.
- MURPHY, E.L., FRIDEY, J., SMITH, J.W., ENGSTROM, J., SACHER, R.A., MILLER, K. HTLV-associated myelopathy in a cohort of HTLV-I and HTLV-II infected blood donors. **Neurology, 48:** 315-320, 1997.
- NATIVIDAD, A., HANCHARD, N., HOLLAND, M.J., MAHDI, O.S.M., DIAKITE, M., ROCKETT, K., JALLOW, O., JOOF, H.M., KWIATKOWSKI, D.P., MABEY, D.C.W., BAILEY, R.L. Genetic variation at the TNF locus and the risk of severe sequelae of ocular *Chlamydia trachomatis* infection in Gambians. **Genes and Immunity, 8:** 288-295, 2007.
- NISHIMURA, M., MAEDA, M., MATSUOKA, M., MINE, H., SAJI, H., MATSUI, M., KURODA, Y., KAWAKAMI, H., UCHIYAMA, T. Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor receptors type 1 and 2, lymphotoxin-alpha, and HLA-DRB1 gene polymorphisms in human T-cell lymphotropic virus type I associated myelopathy. **Human Immunology, 61:** 1262-1269, 2000.

- NISHIMURA, M., MAEDA, M., YASUNAGA, J., KAWAKAMI, H., KAJI, R., ADACHI, A., UCHIYAMA, T., MATSUOKA, M. Influence of cytokine and mannose binding protein gene polymorphisms on Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus load in HTLV-I asymptomatic carriers. **Human Immunology, 64:** 453–457, 2003.
- NOGUEIRA, R.M., MIAGOSTOVICH, M.P., SCHATZMAYR, H.G., DOS SANTOS, F.B., DE ARAÚJO, E.S., DE FILIPPIS, A.M., DE SOUZA, R.V., ZAGNE, S.M., NICOLAI, C., BARAN, M., TEIXEIRA FILHO, G. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94:** 297-304, 1999.
- NGUYEN, T.H., LEI, H.Y., NGUYEN, T.L., LIN, Y.S., HUANG, K.J., LE, B.L., LIN, C.F., YEH, T.M., DO, Q.H., VU, T.Q., CHEN, L.C., HUANG, J.H., LAM, T.M., LIU, C.C., HALSTEAD, S.B. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. **Journal of Infectious Diseases**, **189**: 221-232, 2004.
- OHMAN, H., TIITINEN, A., HALTTUNEN, M., LEHTINEN, M., PAAVONEN, J., SURCEL, H.M. Cytokine polymorphisms and severity of tubal damage in women with Chlamydia-associated infertility. **Journal of Infectious Diseases, 199:** 1353-1359, 2009.
- PANG, X., ZHANG, M., DAYTON, A.I. Development of dengue virus replicons expressing HIV-1 gp120 and other heterologous genes: a potential future tool for dual vaccination against dengue virus and HIV. **BMC Microbiology, 1:** 1-9, 2001.
- PASSOS, S.R.L., BEDOYA, S.J., HÖKERBERG, Y.H.M., MAIA, S.C., GEORG, I., NOGUEIRA, R.M.R., SOUZA, R.V., MARZOCHI, K.B.F. Clinical and laboratory

- signs as dengue markers during an outbreak in Rio de Janeiro. **Infection, 36:** 570–574, 2008.
- PATHELA, P., BLANK, S., SCHILLINGER, J.A. Lymphogranuloma venereum: old pathogen, new story. **Current Infectious Disease Report, 9:** 143–150, 2007.
- PELLETIER, R., PRAVICA, V., PERREY, C., XIA, D., FERGUSON, R.M., HUTCHINSON, I.V., OROSZ, C. Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation.

  Transplantation, 70: 674-680, 2000.
- PENNICA, D., NEDWIN, G.E., HAYFLICK, J.S., SEEBURG, P.H., DERYNCK, R., PALLADINO, M.A., KOHR, W.J., AGGARWAL, B.B., GOEDDEL, D.V. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin.

  Nature, 312: 724-729, 1984.
- PINHEIRO, F.P., NELSON, M. Re-emergence of dengue and dengue haemorrhagic fever in the Americas. **Dengue Bulletin, World Health Organization (New Delhi), 21:** 16-24, 1997.
- POCIOT, F., MOLVIG, J., WOGENSEN, L., WORSAAE, H., DALBOGE, H., BAEK, L., NERUP, J. A tumour necrosis factor beta gene polymorphism in relation to monokine secretion and insulin-dependent diabetes mellitus. **Scandinavian Journal of Immunology, 33:** 37-49, 1991.
- POIESZ, B.J., RUSCETTI, F.W., GADZAR, A.F., BUNN, P.A., MINNA, J.D., GALLO, R.C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 77:** 7415-7419, 1980.

- POSCH, P.E, CRUZ, I., BRADSHAW, D., MEDHEK, A.R. Novel polymorphisms and the definition of promoter 'alleles' of the tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha loci: inclusion in HLA haplotypes. **Genes and Immunity, 4:** 547-558, 2003.
- PRAVICA, V., ASDERAKIS, A., PERREY, C., HAJEER, A., SINNOTT, P.J., HUTCHINSON, I.V. In vitro production of IFN-γ correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-γ gene. **European Journal of Immunogenetics, 26:** 1-3, 1999.
- PRAVICA, V., PERREY, C., STEVENS, A., LEE, J.H., HUTCHINSON, I.V. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. **Human Immunology, 61:** 863-866, 2000.
- PRIYADARSHINI, D., GADIA, R.R., TRIPATHY, A., GURUKUMAR, K.R., BHAGAT, A., PATWARDHAN, S., MOKASHI, N., VAIDYA, D., SHAH, P.S., CECILIA, D. Clinical Findings and Pro-Inflammatory Cytokines in Dengue Patients in Western India: A Facility-Based Study. **PLOS ONE**, 5: 1-9, 2010.
- REICH, K., WESTPHAL, G., SCHULZ, T., MÜLLER, M., ZIPPRICH, S., FUCHS, T., HALLIER, E., NEUMANN, C. Combined analysis of polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter regions and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology, 113:** 214-220, 1999.

- RESTREPO, B.N., ISAZA, D.M., SALAZAR, C.L. RAMÍREZ, R., OSPINA, M., ALVAREZ, L.G. 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:** 6-10, 2008.
- REVIRON, D., DUSSOL, B., ANDRE, M., BRUNET, P., MERCIER, P., BERLAND, Y. TNF-alpha and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients. **Transplantation Proceedings**, **33**: 350-351, 2001.
- REYNARD, M.P., TURNER, D., NAVARRETE, C.V. Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-α, interleukin-10, interferon-γ and interleukin-6 genes in a North European Caucasoid group from UK. **European Journal of Immunogenetic, 27:** 241–249, 2000.
- ROSENBLATT, J.D., GOLDE, D.W., WACHSMAN, W., GIORGI, J.V., JACOBS, A., SCHMIDIT, G.M., QUAN, S., GASON, J.C., CHEN, I.S.Y. A second isolate of HTLV-II associated with atypical hairy-cell leukemia. **New England Journal of Medicine**, 315: 372-377, 1986.
- ROTHMAN, A.L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **Journal of Clinical Investigation, 113:** 946-951, 2004.
- ROY, S., MCGUIRE, W., MASCIE-TAYLOR, C.G., SAHA, B., HAZRA, S.K., HILL, A.V., KWIATKOWSKI, D. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and

- susceptibility to lepromatous leprosy. **Journal of Infectious Diseases, 176:** 530-532, 1997.
- RUGONFALVI-KISS, S., ENDRÉSZ, V., MADSEN, H.O., BURIÁN, K., DUBA, J., PROHÁSZKA, Z., KARÁDI, I., ROMICS, L., GÖNCZÖL, E., FÜST, G., GARRED, P. Association of *Chlamydia pneumoniae* with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of Mannose-Binding Lectin. Circulation, 106: 1071-1076, 2007.
- RUULS, S.R., SEDGWICK, J.D. Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models.

  American Journal of Human Genetic, 65: 294-301, 1999.
- SANTOS, A.R., ALMEIDA, A.S., SUFFYS, P.N., MORAES, M.O., FILHO, V.F., MATTOS, H.J., NERY, J.A., CABELLO, P.H., SAMPAIO, E.P., SARNO, E.N. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases, 68:** 325-327, 2000.
- SANTOS, A.R., SUFFYS, P.N., VANDERBORGHT, P.R., MORAES, M.O., VIEIRA, L.M., CABELLO, P.H., BAKKER, A.M., MATOS, H.J., HUIZINGA, T.W., OTTENHOFF, T.H., SAMPAIO, E.P., SARNO, E.N. Role of tumor necrosis factoralpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **Journal of Infectious Diseases, 186:** 1687-1691, 2002.

- SANTOS, S.B., PORTO, A.F., MUNIZ, A.L., DE JESUS, A.R., MAGALHÃES, E., MELO, A., DUTRA, W.O., GOLLOB, K.J., CARVALHO, E.M. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. **BMC Infectious Diseases, 2:** 4-7, 2004.
- SCHATZMAYR, H,G. Dengue situation in Brazil by year 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 95:** 179-181, 2000.
- SCHATZMAYR, H,G. Viroses emergentes e reemergentes. **Cadernos de Saúde Publica**, **17:** 209-213, 2001.
- SCHULZ, S., SCHAGDARSURENGIN, U., REHFELD, D., SÜSS, T., WERDAN, K., MÜLLER-WERDAN, U., GLÄSER, C. Genetic impact of TNF-beta on risk factors for coronary atherosclerosis. **European Cytokine Network, 17:** 148-154, 2006.
- SEIKI, M., HATTARI, S. HIRAYAMA, Y. YOSHIDA, M. Human Adult T cell leukemia virus complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 80: 3618-3622, 1983.
- SEKI, N., YAMAGUCHI, K., YAMADA, A., KAMIZONO, S., SUGITA, S., TAGUCHI, C., MATSUOKA, M., MATSUMOTO, H., NISHIZAKA, S., ITOH, K., MOCHIZUKI, M. Polymorphism of the 50-flanking region of the tumor necrosis factor (TNF)—a gene and susceptibility to Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) uveitis.

  Journal of Infectious Diseases, 180: 880–883, 1999.

- SETHI, G., ALLASON-JONES, E., RICHENS, J., ANNAN, N.T., HAWKINS, D., EKBOTE, A., ALEXANDER, S., WHITE, J. Lymphogranuloma venereum presenting as genital ulceration and inguinal syndrome in men who have sex with men in London, UK. Sexually Transmitted Infections, 85: 165-170, 2009.
- SHIMOTOHNO, K., TAKAHASHI, Y., SHIMIZU, N., GOJOBORI, T., GOLDE, D.W., CHEN, I.S.Y. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 82:** 3101-3105, 1985.
- SOHAIL A.M., KAUL, A.A, BALIM, A.P., RAZIUDDIN, B.M., SINGH, B.M.P., SINGH, A.O.P., DASHA, A.P., ADAK, C.T. Alleles –308A and –1031C in the TNF-α gene promoter do not increase the risk but associated with circulating levels of TNF-α and clinical features of vivax malaria in Indian patients. **Molecular Immunology, 45:** 1682-1692, 2008.
- SPAARGAREN, J., FENNEMA, H.S., MORRÉ S.A., DE VRIES, H.J., COUTINHO, R.A.

  New lymphogranuloma venereum *Chlamydia trachomatis* variant, Amsterdam. **Emerging Infectious Diseases, 11:** 1090–1092, 2005.
- STAGG, A.J., TUFFREY, M., WOODS, C., WUNDERINK, E., KNIGHT, S.C. Protection against ascending infection of the genital tract by *Chlamydia trachomatis* is associated with recruitment of major histocompatibility complex class II antigen-presenting cells into uterine tissue. **Infection and Immunity, 66:** 3535-3544, 1998.

- STEEL, D., WHITEHEAD, A. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunology Today, 15:** 81–88, 1994.
- SHUH, M., BEILKE, M. The Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): New insights into the clinical aspects and molecular pathogenesis of Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and Tropical spastic paraparesis/HTLV associated myelopathy (TSP/HAM). **Microscopy Research and Technique**, **68:** 176–196, 2005.
- SWITZER, W.M., QARI, S.H., WOLFE, N.D., BURKE, D.S., FOLKS, T.M., HENEINE, W. Ancient origin and molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 3 revealed by complete genome analysis. **Journal of Virology, 80:** 7427-7438, 2006.
- TALLEDO, M., LOPEZ, G., HUYGHE, J.R., VERDONCK, K., ADAUI, V., GONZALEZ, E., BEST, I., CLARK, D., VANHAM, G., GOTUZZO, E., CAMP, G.V., LAER, L.V. Evaluation of host genetic and viral factors as surrogate markers for HTLV-1-associated myelopathy/Tropical spastic paraparesis in Peruvian HTLV-1-infected patients. **Journal of Medical Virology, 82:** 460–466, 2010.
- TAMBUR, A.R., ORTEGEL, J.W., BEN-ARI, Z., SHABTAI, E., KLEIN, T., MICHOWIZ, R., TUR-KASPA, R., MOR, E. Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients.

  Transplantation, 71: 1475-1480, 2001.
- TANGY, F. Molecular Biology of HTLV-I. In: *HTLV*, truths and questions. Zaninovic, V. (editors). Colombia, Cali, Feriva Editores, 1996. p. 1-13.

- TAKAO, S., ISHIDA, T., BHATIA, K.K., SAHA, N., SOEMANTRI, A., KAYAME, O.W. Seroprevalence of human T-lymphotropic virus type 1 in Papua New Guinea and Irian Jaya measured using different western blot criteria. **Journal of Clinical Virology, 16:** 129-133, 2000.
- TAYLOR, G.P., BODÉUS, M., COURTOIS, F., PAULI, G., DEL MISTRO, A., MACHUCA, A., PADUA, E., ANDERSSON, S., GOUBAU, P., CHIECO-BIANCHI, L., SORIANO, V., COSTE, J., ADES, A.E., WEBER, J.N. The seroepidemiology of human T-lymphotropic viruses: types I and II in Europe: a prospective study of pregnant women. **Journal of Acquired Immunodeficiency Syndromes, 38:** 104-109, 2005.
- TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., VASCONCELOS, P.F.C., PINHEIRO, F.P., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., RODRIGUES, S.G. **Dengue**. In: Leão RNQ (ed) Doenças Infecciosas e Parasitárias Enfoque Amazônico, Cejup/UEPA/ Instituto Evandro Chagas, Belém, p. 227-241, 1997.
- TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., RODRIGUES, S.G, MONDET, B., CRUZ, A.C.R., SOUSA, M.R., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. Dengue epidemic in Belem, Para, Brazil, 1996-97. **Emerging Infectious Diseases, 6:** 298-301, 2000.
- TSUKASAKI, K., MILLER, C. W., KUBOTA, T., TAKEUCHI, S., FUJIMOTO, T., IKEDA, S., TOMONAGA, M., KOEFFLER, H. P. Tumor necrosis factor a polymorphism associated with increased susceptibility to development of Adult T-cell

- leukemia/lymphoma in human T-lymphotropic Virus type 1 carriers. **Cancer Research**, **61:** 3770–3774, 2001.
- TWIDDY, S.S., HOLMES, E.C., RAMBAUT, A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. **Molecular Biology and Evolution, 20:** 122-129, 2003.
- UGLIALORO, A.M., TURBAY, D., PESAVENTO, P.A., DELGADO, J.C., MCKENZIE, F.E., GRIBBEN, J.G., HARTL, D., YUNIS, E.J., GOLDFELD, A.E. Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter. **Tissue Antigens**, **52**: 359-367, 1998.
- URETA-VIDAL, A., GESSAIN, A., YOSHIDA, M., TEKAIA, F., GARIN, B., GUILLEMAIN, B., SCHULZ, T., FARID, R., DE THÉ, G. Phylogenetic classification of human T cell leukemia/lymphoma virus I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. **Journal of General Virology**, **75**: 3655-3666, 1994.
- VAHDAT, K., JAFARI, S.M., PAZOKI, R., NABIPOUR, I. Concurrent increased high sensitivity C-reactive protein and chronic infections are associated with coronary artery disease: a population-based study. **Indian Journal of Medical Science**, **61**: 135-143, 2007.
- VALLINOTO, A.C.R, GRAÇA, E.S., ARAÚJO, M.S., AZEVEDO, V.N.A., CAYRES-VALLINOTO, I., MACHADO, L.F.A., ISHAK, M.O.G., ISHAK, R. INFG+874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis. **Human Immunology, 71:** 692-696, 2010.

- VANDAMME, A.M., SALEMI, M., VAN BRUSSEL, M., LIU, H.F., LAETHEM, K.V., RANST, M.V., MICHELS, L., DESMYTER, J., GOUBAU, P. African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype in Congolese Bambuti Efe Pygmies. **Journal of Virology, 72:** 4327-4340, 1998.
- VAN DOOREN, S., SALEMI, M., VANDAMME, A.M. Dating the origin of the human T-cell lymphotropic virus Type-I (HTLV-I) subtypes. **Molecular Biology and Evolution, 18:** 661-671, 2001.
- VORNDAM, V., KUNO, G., ROSADO, N. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. Journal of Virology Methods, 48: 237-244, 1994.
- WALSH, M.T., DIVANE, A., WHITEHEAD, A.S. Fine mapping of the human pentraxin gene region on chromosome 1q23. **Immunogenetics, 44:** 62-69, 1996.
- WANG, E., NI, H., XU, R., BARRETT, A.D., WATOWICH, S.J., GUBLER, D.J., WEAVER, S.C. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **Journal of Virology, 74:** 3227-3234, 2000.
- WANG, L., CHEN, R.F., LIU, J.W., YU, H.R., KUO, H.C., YANG, K.D. Implications of dynamic changes among tumor necrosis factor (TNF-A), membrane TNF receptor, and soluble TNF receptor levels in regard to the severity of dengue infection.
   American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 77: 297–302, 2007.
- WANG, S.S., TONDELLA, M.L.C., BAJPAI, A., MATHEW, A.G., MEHRANPOUR, P., LI, W., KACHARAVA, A.G., FIELDS, B.S., AUSTIN, H., ZAFARI, A.M. Circulating *Chlamydia pneumoniae* DNA and advanced coronary artery disease. **International Journal of Cardiology, 118:** 215–219, 2007.

- WATANABE, T., MOCHIZUKI, M., YAMAGUCHI, K. HTLV-1 uveitis (HU). Leukemia, 11: 582-584, 1997.
- WILSON, A.G., DI GIOVINE, F.S., BLAKEMORE, A.I., DUFF, G.W. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. **Human Molecular Genetics**, **1:** 353, 1992.
- WOLFE, N.D., HENEINE, W., CARR, J.K., GARCIA, A.D., SHANMUGAM, V., TAMOUFE, U., TORIMIRO, J.N., PROSSER, A.T., LEBRETON, M., MPOUDINGOLE, E., MCCUTCHAN, F.E., BIRX, D.L., FOLKS, T.M., BURKE, D.S., SWITZER, W.M. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102:** 7994-7999, 2005.
- WRIGHT, H.R., TURNER, A., TAYLOR, H.R. Trachoma. Lancet, 371: 1945–1954, 2008.
- YEE, L.J., TANG, J., HERRERA, J., KASLOW, R.A., VAN LEEUWEN, D.J. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. **Genes Immunity**, **1:** 386-390, 2000.
- ZANOTTO, P.M., GOULD, E.A., GAO, G.F., HARVEY, P.H., HOLMES, E.C. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. **Proceedings** of the National Academy of Sciences of the USA, 93: 548-553, 1996.
- ZHANG, C., MAMMEN, M.P.J.R., CHINNAWIROTPISAN, P., KLUNGTHONG, C., RODPRADIT, P., MONKONGDEE, P., NIMMANNITYA, S., KALAYANAROOJ,

- S., HOLMES, E.C. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. **Journal of Virology, 79:** 15123-15130, 2005.
- ZHANG, D., LI, J., JIANG, Z.W., YU, B., TANG, X. Association of two polymorphisms of tumor necrosis factor gene with acute severe pancreatitis. **Journal of Surgical Research**, **112**: 138-143, 2003.
- ZIMMERMAN, M.A., SELZMAN, C.H., COTHREN, C., SORENSEN, A.C., RAEBURN, C.D., HARKEN, A.H. Diagnostic implications of C-reactive protein. **Archives Surgical, 138:** 220-224, 2003.

# **ANEXOS**

ANEXO 1



## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Parecer Consubstanciado

Belém, 18 de maio de 2006

Parecer nº 03/06

#### Análise do Projeto:

O projeto "Programa de Estudos da Patogênese de agentes infecciosos de natureza viral e bacteriana", do pesquisador Prof. Dr. Ricardo Ishack, PhD, da Universidade Federal do Pará, foi recebido neste CEP em 10/04/2006 e levado à apreciação em reunião de 10/05/2006.

Tem como objetivo geral caracterizar fatores inerentes ao hospedeiro e aos agentes virais e bacterianos que possam influenciar o curso de infecção de seres humanos, utilizando abordagens soro-epidemiológica, diagnóstica, imunológica e molecular.

A população alvo são pacientes dos ambulatórios de doenças neurológicas e de doenças respiratórias do Hospital Universitário João de Barros Barreto, pacientes do ambulatório do Hospital do Coração e do Laboratório de Arbovirus do Instituto Evandro, Chagas, além de amostras da soroteca do Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Pará, ficando então determinado que os critérios de inclusão no estudo são pacientes e amostras de soroteca dos serviços acima citados.

Em relação ao Risco/Benefício, a pesquisa não apresenta riscos para os participantes e apresenta o benefício da possibilidade de definição dos mecanismos dos agentes descritos

aff





que poderá gerar melhorias no diagnóstico, prevenção e tratamento das doenças a eles relacionadas.

O orçamento é detalhado e adequado à proposta e a bibliografia é pertinente ao tema proposto.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) contem dados em linguagem acessível ao participante, além de dados do pesquisador, incluindo endereço e telefone para qualquer contato necessário.

#### Parecer do CEP:

Trata-se de um de estudo epidemiológico, Grupo III apresentando termo de concordância escrito dos serviços participantes. O projeto está bem estruturado, com justificativas e objetivos consistentes, riscos e benefícios bem estabelecidos, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido adequado e informação precisa quanto ao financiamento. Trará benefícios para a saúde pública, uma vez que os dados obtidos terão valor científico para suporte ao diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças relacionadas com os agentes infecciosos estudados.

O projeto foi aprovado em reunião do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará, em 10 de maio de 2006.

Está de acordo com a Res. CNS 196/96.

Parecer final: FAVORÁVEL.

Luciana Maria Cunha Maradei Pereira Dra Luciana Maradei
Coordenadora do CEF

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará. - Fundação HEMOPA

Travessa Padre Eutíquio 2109,



#### ANEXO 2

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

- 1. Estou sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que está sendo desenvolvida pela Universidade Federal do Pará.
- 2. Para que eu decida em participar ou não da pesquisa me foram prestadas as seguintes informações:
- 3. O título do projeto é "Programa de Estudos da Patogênese de Agentes Infecciosos de Natureza Viral e Bacteriana".
- 4. O pesquisador responsável é o Prof. Dr. Ricardo Ishak, Biomédico, Professor Titular da Universidade Federal do Pará.
- 5. O objetivo da pesquisa é o de aumentar o conhecimento atual acerca da infecção por vírus e bactérias, assim como da resposta imunológica, particularmente, a participação da resposta inflamatória na causa da doença.
- 6. Durante a pesquisa o paciente deverá responder a um questionário, depois será submetido a coleta de sangue para exame de laboratório.
- 7. Essa pesquisa não oferece riscos; as práticas são de uso rotineiro e apenas uma pequena quantidade de sangue (5mL) será coletada para a detecção de infecções, marcadores da resposta inflamatória e genéticos do vírus e do hospedeiro.
- 8. Serão utilizados materiais esterilizados descartáveis, como agulhas, seringas, não oferecendo risco para o sujeito da pesquisa.
- 9. Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como poderá deixar a pesquisa no momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa.
- 10. Não haverá nenhum tipo de despesas para participação da pesquisa, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.
- 11.O grande benefício desta pesquisa para todos os que participam, ou não, é a possibilidade de gerar um melhor entendimento dos objetivos descritos acima.
- 12. A sua participação na pesquisa é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de sua participação. As informações utilizadas na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação individual do participante.

Prof. Dr. Ricardo Ishak – Pesquisador Responsável
Universidade Federal do Pará
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Patologia – Laboratório de Virologia

Fone-Fax: 3202-7587

rishak@ufpa.br

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLA	ARECIDO
perfeitamente esclarecido (a) ace seus riscos e benefícios. Declaro	pées acima sobre a pesquisa, que me sinto erca do conteúdo da mesma, assim como ainda que, por minha livre vontade, aceito o com a coleta de material para exame.
Belém, / /	
	Assinatura da participante
Prontuário:	Protocolo:

#### ANEXO 3

#### UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ LABORATÓRIO DE VIROLOGIA

### QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Protocolo n°:	Data da coleta de informações/amostra:			
Nome:				
Informações epidemiológicas				
Data de nascimento://	Idade:	anos		
Endereço com bairro e telefone:				
Município:				
Município de residência anterior (	<05 anos no ende	ereço atual):		
Escolaridade  a) Não alfabetizado completo	b) Alfabetizado	c) 1°	grau incompleto	d) 1° grau
e) 2° grau completo	f) 2° grau incom	pleto		
g) 3° grau incompleto h) 3° gra	au completo			
História de DST: Sim	□ Não			
Freqüência: 🔲 01	□ 01 a 05	☐ Mais	de 05	
Quais lembra (se aplicável):				
Uso de preservativo?	1. Sempre	2. Nunca	3. Às vezes	
Doenças Respiratórias				
História de doença respiratór	ia (bronquite, pne	eumonia, etc): [	Sim Não	
Fumante: Sim	□ Não			
Outras variáveis:				
Já recebeu transfusão san	güínea: a) Sim	b) Não	C) Há quanto tempo:	
Tem tatuagens: a) Sim b)	Não Há quan	ito tempo:	_	
Tem <i>piercing</i> : a) Sim b) Uso de estatinas:		o tempo:	_	