



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

DANIELA MAIRA CARDOZO

Influência de polimorfismos de genes HLA na susceptibilidade ao dengue no sul
do Brasil

Maringá
2009

DANIELA MAIRA CARDOZO

Influência de polimorfismos de genes HLA na susceptibilidade ao dengue no sul
do Brasil

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

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof^ª Dr^ª Jeane Eliete Laguila Visentainer

Co-Orientador: Prof Dr Ricardo Alberto Moliterno

Maringá
2009

Essa ficha deve ser impressa no verso da folha de rosto

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

C268i Cardozo, Daniela Maira
 Influência de polimorfismos de genes HLA na
 susceptibilidade ao dengue no Sul do Brasil / Daniela
 Maira Cardozo. -- Maringá : [s.n.], 2008.
 74 f. : il. color., figs.

 Orientador : Prof^a. Dr^a. Jeane Eliete Laguila
 Visentainer.
 Co-orientador : Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
 Maringá, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas,
 2008.

 1. HLA. 2. Dengue. 3. Polimorfismo genético. 4. Biologia
 molecular. 5. PCR-SSO. 6. Imunogenética. 7. Doenças virais.
 8. Doenças tropicais. I. Universidade Estadual de Maringá.
 Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas. II. Título.

CDD 21.ed. 616.0796

FOLHA DE APROVAÇÃO

DANIELA MAIRA CARDOZO

Influência de polimorfismos de genes HLA na susceptibilidade ao dengue no sul do Brasil

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

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a Dr^a Jeane Eliete Laguila Visentainer
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a Dr^a Ana Maria Sell
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Milton Ozório Moraes
Fundação Oswaldo Cruz

Aprovada em: 01 de março de 2009.

Local de defesa: Sala 09, Bloco J-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTO(S)

A Deus, que está presente em todos os momentos da minha vida trilhando meus caminhos com tanta perfeição.

À minha mãe, Sônia, ao meu pai, Jurandir, minha irmã Luiana, agradeço por tanto apoio, carinho e confiança.

Aos tios, Everson, Solange, Valter, Valda, Vera, Antônio Augusto, e aos meus avós Wilma e Armando, pelo apoio técnico e pelo carinho de sempre.

À toda equipe do Laboratório de Imunologia Básica da Universidade Estadual de Maringá, os professores Sueli, Rafael, Ana, Luíza e Márcia.

Aos funcionários Fabiano, Marco, Helen e Edna, que ao longo desses anos se tornaram pessoas da minha família.

Aos meus queridos amigos Diego, Viviane, Amanda e a todos que estiveram presentes no meu cotidiano durante esses dois anos.

A minha querida amiga Gláucia, cuja colaboração para a realização deste trabalho foi muito importante.

Ao professor Dennis Armando Bertolini e à professora Ana Maria Sell pela gentileza de participar da banca examinadora.

Ao meu Co-orientador Ricardo que contribuiu de maneira ímpar para a realização deste trabalho.

Por último à minha orientadora Jeane cuja competência e orientação foi excepcional, agradeço muito!!!

Influência de polimorfismos de genes HLA na susceptibilidade ao dengue no sul do Brasil

RESUMO

Dengue é a doença viral de maior preocupação transmitida por vetores artrópodes. Anualmente, existe uma estimativa de 50 - 100 milhões de casos de dengue no mundo. Além de fatores ambientais, os fatores genéticos parecem ter importância na manifestação da doença, pois mesmo em áreas endêmicas somente uma pequena proporção de pessoas desenvolve a forma mais grave. Polimorfismos de genes de resposta imune poderiam estar associados com o desenvolvimento de casos de dengue. A proposta deste estudo foi determinar as frequências dos alelos: HLA-A, B, Cw, DRB1, DQA1 e DQB1, de uma população com dengue confirmada por sorologia e de uma população com sintomas, mas com sorologia negativa, da região Sul do Brasil. A comparação das frequências de alelos HLA entre estas populações, através da genotipagem PCR-SSO baseada na tecnologia Luminex, permitiu determinar associação de genes HLA com a proteção e susceptibilidade ao dengue em nossa região. Houve associação negativa dos alelos HLA-A*31 e A*69, dos haplótipos A*31-B*40, B*40-Cw*03, B*58-Cw*07 e DQA1*02-DQB1*03 e do genótipo homocigoto DQB1*0402. O alelo HLA-A*66 foi mais frequente em pacientes que em controles, atuando como gene de susceptibilidade à doença. Para os alelos HLA-A*31 e A*66, os valores de *P* tornaram-se não significativos após a correção de Bonferroni. Portanto, alguns fatores genéticos HLA foram associados com o dengue clássico, sorotipo 3, na população sul brasileira.

Palavras-chave: *Dengue, HLA, Polimorfismo genético*

Influence of HLA gene polymorphisms on susceptibility to dengue in the South of Brazil

ABSTRACT

Dengue fever is a viral disease of most concern vectors transmitted by arthropods. Each year there is an estimated 50 to 100 million cases of dengue fever in the world. Besides environmental factors, genetic factors seem important in the manifestation of the disease, even in endemic areas because only a small proportion of people develop a more severe form. Immune response gene polymorphisms could be associated with the development of dengue cases. The purpose of this study was to determine the allele frequencies: HLA-A, B, Cw, DRB1, DQA1 and DQB1, in a population with dengue serology and confirmed by a population with symptoms but with negative serology, from Southern Brazil. A comparison of the frequencies of HLA alleles between these populations, by PCR-SSO genotyping based on Luminex technology, allowed determining association of HLA genes with protection and susceptibility to dengue in our region. There was negative association between HLA-A*31, A*69, A*31-B*40, B*40-Cw*03, B*58-Cw*07, DQA1*02-DQB1*03 and DQB1*0402/*0402, and dengue. HLA-A*66 was more frequent in patients than in controls, acting as a susceptibility gene for the disease. For HLA-A*31 and A*66, the values of *P* became not significant after Bonferroni's correction. Thus, some HLA genetic factors were associated with classic dengue, serotype 3, in Southern Brazilian population.

Keywords: Dengue fever, HLA, genetic polymorphisms

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas: *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (artigo 1) Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=0037-8682&lng=en&nrm=iso>*

Annals of Human Genetics (artigo 2)

Disponível em:

<http://www.ovid.com/site/catalog/Journal/2615.jsp?top=2&mid=3&bottom=7&subsection=12>

>*

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	
1.1	Histórico.....	9
1.2	Etiologia.....	9
1.3	Epidemiologia e transmissão.....	10
1.4	Patogenia e Resposta Imune.....	13
1.5	Manifestações Clínicas.....	20
1.6	Dengue Hemorrágico.....	21
1.7	Tratamento.....	23
1.8	Profilaxia.....	23
1.9	Justificativa.....	25
1.10	Objetivos.....	25
1.11	Referências Bibliográficas.....	26
2	CAPÍTULO II.....	34
2.1	Padronização de extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem <i>HLA</i> e de genes <i>KIR</i>	34
2.2	Influência de polimorfismos de genes HLA na susceptibilidade ao dengue no sul do Brasil.....	52
3	CAPÍTULO III.....	73
3.1	Conclusões.....	73
3.2	Perspectivas Futuras.....	74

CAPÍTULO I

HISTÓRICO

Dengue é a doença viral transmitida por vetores artrópodes e, atualmente, é considerada um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Anualmente, existe uma estimativa de 50-100 milhões de casos de dengue e 250.000 a 500.000 de dengue hemorrágico em mais de 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa (*Organização Mundial da Saúde*, 1997). Infecções pelo vírus do dengue representam uma significativa causa de morbidade e mortalidade em muitas áreas do mundo, incluindo a Ásia do sul e Américas central e do sul. Cerca de 550.000 doentes necessitam de hospitalização e 20.000 morrem em consequência do dengue (Maringá, 2007).

ETIOLOGIA

O vírus do dengue é membro da família *Flaviviridae*, subgênero *Stegomyia*, gênero *Flavivirus* e seu material genético é composto por uma fita simples de 11kb de RNA de polaridade positiva (arbovírus do grupo B) (Veronesi; Focaccia, 1996; Ubol *et al.*, 2008). Atualmente, se conhecem quatro sorotipos do vírus, DEN 1, 2, 3 e 4, os quais são fortemente relacionados antigenicamente. A comparação entre as sequências genômicas dos diferentes sorotipos revelam em torno de 67 a 75% de homologia na sequência de aminoácidos (Zeng *et al.*, 1996).

O isolamento do vírus do dengue só ocorreu na década de quarenta, em 1943, por Kimura, e, em 1944, por Hotta, sendo a cepa denominada Moshizuki. Em 1945, Sabin e Schlesinger isolaram a cepa Havai, sendo que Sabin no mesmo ano havia isolado outro vírus em Nova Guiné, observando que as cepas tinham características diferentes, por isso passou-se a considerar que havia sorotipos do mesmo vírus (Teixeira *et al.*, 1999).

As primeiras cepas foram denominadas de sorotipo 1 e as isoladas de Nova Guiné foram consideradas de sorotipo 2. Em 1956, foram isolados os sorotipos 3 e 4 na epidemia de dengue hemorrágico ocorrida no Sudeste Asiático. A partir destas descobertas foi considerado que o complexo vírus do dengue é formado por quatro sorotipos antigenicamente distintos

(Teixeira *et al.*, 1999).

No Brasil, circulam os sorotipos 1, 2 e 3. Em 1981, os sorotipos 1 e 4 foram os primeiros a serem isolados em uma epidemia ocorrida no município de Boa Vista, Roraima. Posteriormente, entre 1986 e 1987, o sorotipo 1 invadiu o Sudeste (Rio de Janeiro e Minas Gerais) e Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco e Bahia) (Câmara *et al.*, 2007). Entre 1990 e 1991 foi isolado o sorotipo 2, e o tipo 3 está presente desde dezembro de 2000, isolado em janeiro de 2001, no Rio de Janeiro (São Paulo, 2007). A infecção por um tipo de vírus provê imunidade ao longo da vida para aquele vírus, mas não para os outros.

Atualmente, os sorotipos 1, 2 e 3 circulam em 24 estados brasileiros, contribuindo assim para a incidência das formas mais graves da doença (dengue hemorrágico e síndrome do choque do dengue), nos municípios onde são registradas epidemias sequenciais por pelo menos dois sorotipos diferentes, embora a virulência da cepa epidêmica possa ser muitas vezes o determinante principal do dengue hemorrágico (Câmara *et al.*, 2007).

EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

Em 1906, as primeiras evidências do ciclo de transmissão do dengue foram descritas por Bancroft que levantou a hipótese de que o *Aedes aegypti* podia ser considerado transmissor da doença. Agramonte e outros pesquisadores confirmaram esta teoria (Teixeira *et al.*, 1999).

Esta espécie de mosquito é originária da África subsahariana, onde se adaptou e se domesticou em ambiente criado pelo homem, tornando-se antropofílico e suas larvas encontradas em depósitos artificiais. Estas características fizeram com que estes mosquitos se tornassem abundantes nos centros urbanos e levados facilmente para outras áreas através dos meios de transporte, o que aumentou a habilidade de se tornar infectado, replicar o vírus e transmiti-lo (Dye, 1992).

Por um longo período de tempo, o dengue foi considerado uma doença de pequena importância. Porém, após a Segunda Guerra Mundial, que de certa forma contribuiu para a circulação de vários sorotipos em uma mesma área geográfica, foram relatados surtos de febre hemorrágica severa, que posteriormente seria identificada como uma forma de manifestação do dengue (Martinez-Torres, 1990).

A maioria dos países da Ásia sofreu as consequências da epidemia e o dengue hemorrágico se tornou o principal problema de saúde pública nestes países (Rigau-Pérez *et al.*, 1998). Estudos retrospectivos confirmaram que a forma hemorrágica já ocorria há muito tempo, pois em 1928 foi identificado na Grécia um surto de dengue hemorrágico severo e que

levou muitas pessoas ao óbito. A investigação de soros de sobreviventes constatou a existência dos sorotipos 1 e 2 (Halstead; Papavaugelou, 1980).

Nas regiões das Américas, por meio de um programa coordenado pela *Organização Panamericana de Saúde*, entre 1950 e 1960, o *Aedes aegypti* foi considerado erradicado. Contudo, após os anos 70, novas infestações ocorreram e o número de países com epidemias de dengue foi aumentando desde 1980 e 1990, com novos sorotipos sendo introduzidos (Pinheiro, 1996).

Depois disso, ocorreram epidemias na Colômbia, Porto Rico e Saint Thomas com o isolamento dos vírus 2 e 3. Em 1977, o sorotipo 1 foi identificado na Jamaica, Ilhas do Caribe e América Tropical. Na década de 80, foi isolado o vírus do tipo 4 e os países que mais apresentaram casos registrados foram: Brasil, Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Paraguai, Porto Rico e Venezuela (Pinheiro, 1996).

A epidemia mais relevante que ocorreu no continente americano foi registrada em 1981 em Cuba, onde foram observados casos de dengue hemorrágico e síndrome de choque do dengue. Ao todo, foram notificados 344.203 casos, com 116.143 internações. Entre os 10.312 casos considerados graves, 158 resultaram em óbito dos quais 101 destes eram crianças (Kouri *et al.*, 1986).

No Brasil, as primeiras referências na literatura médica de casos de dengue são de 1916 em São Paulo e 1923 em Niterói. Neste último ano, um navio francês com casos suspeitos aportou em Salvador, Bahia, mas não houve registros nessa região (Soares, 1928).

A primeira epidemia com confirmação laboratorial ocorreu em 1982 na cidade de Boa Vista, Roraima, com 11 mil casos registrados e o isolamento dos sorotipos 1 e 4 (Osanaí, 1984). Outros registros só ocorreram depois de cinco anos, no Rio de Janeiro. A partir daí, a virose se disseminou para diversas cidades do Rio de Janeiro, Alagoas, Ceará, Pernambuco, São Paulo, Bahia e Minas Gerais (Teixeira *et al.*, 1999).

Em 1990, houve aumento da circulação do sorotipo 1 e a introdução do tipo 2 no Rio de Janeiro. Nesse período, foram registrados os primeiros casos de dengue hemorrágico no país com 462 confirmações e 8 óbitos (Teixeira *et al.*, 1999). A partir daí, o vírus se disseminou por todo o território brasileiro, com casos em todos os estados.

Em 2007, um dos estados com maior número de casos confirmados foi o Paraná. Foram, aproximadamente, 50.028 casos notificados e 25.998 casos confirmados. Um dos municípios mais afetados foi o de Maringá, com cerca de 5.700 casos confirmados, sendo considerado o 8º em maior taxa de incidência de dengue no país (Paraná, 2008).

Este ano, o estado mais afetado foi o Rio de Janeiro, que registrou a maior epidemia de

dengue nos últimos 22 anos. Segundo a Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro, até abril de 2008, foram registrados 110.783 casos confirmados e 92 óbitos (Figura 1) (Brasil, 2007; Folha on line, 2008).

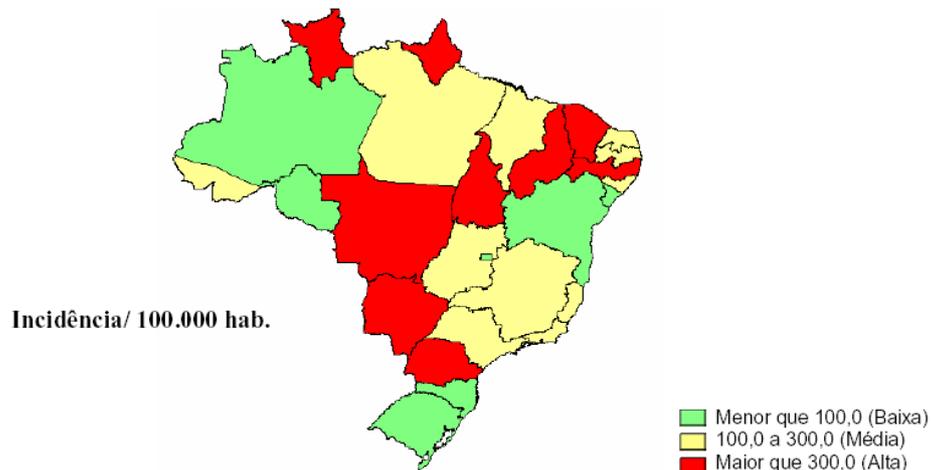


Figura 1: Distribuição dos estados por áreas de incidência do vírus do dengue, Brasil, 2007.

O vírus do dengue é mantido em um ciclo de transmissão urbana em áreas tropicais e subtropicais pelo mosquito *Aedes aegypti*, uma espécie fortemente relacionada com a habitação humana, mas, podem ser transmitidos pelo *Aedes albopictus* e *Aedes scutellaris* (Veronesi *et al.*, 1996). A progressão do dengue depende de condições ecológicas e sócio-ambientais que proporcionem a dispersão do vetor. O controle do dengue requer o esforço conjunto de toda a sociedade, uma vez que a capacidade de adaptação do *Aedes aegypti* ao ambiente é extraordinária (Câmara, 2007).

A sazonalidade das infecções pelo vírus do dengue é bem evidente no Brasil na maioria dos estados. A incidência se eleva nos primeiros meses do ano, alcançando magnitude de março a maio, seguida de brusca redução a partir de junho. Esse padrão de clima que nem sempre é observado em outros países tem sido a explicação para o crescimento no número de *Aedes aegypti*, em razão do aumento da temperatura e umidade, registradas em grandes extensões do país nos períodos de verão e outono (Teixeira *et al.*, 1999).

O problema diz respeito ao meio ambiente urbano, população e autoridades, não apenas da área de saúde. É necessário envolver o setor de urbanismo das prefeituras de forma a evitar edificações com arquitetura que permitam possíveis criadouros, alertar a população e fiscalizar construções que são grandes geradores de criadouros, com entulhos e recipientes; e, exigir boa drenagem de superfícies impermeabilizadas (Penna, 2003).

PATOGENIA E RESPOSTA IMUNE

O vírus do dengue é composto por 3 proteínas estruturais: C, M e E, e sete proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5. As proteínas NS estão envolvidas primariamente com a replicação do vírus de RNA devido ao fato de fazerem parte do complexo de replicação (Kapoor *et al.*, 1995).

A proteína NS1 possui atividade de maturação viral e é encontrada na superfície, ligada à membrana da célula infectada, sendo também secretada livremente. Anticorpos contra NS1 atuam como mediadores de fenômenos de citotoxicidade por linfócitos, através de seus receptores para a porção Fc das imunoglobulinas (Figueiredo, 1999).

A proteína NS3 que se apresenta em contato com a superfície celular ou é secretada livremente, possui capacidade imunogênica e se caracteriza por ser uma enzima bifuncional nucleotídea trifosfatase/helicase viral (Barbosa, 1996). A presença de NS3 estimula a destruição de células infectadas por linfócitos T citotóxicos. A NS5 está relacionada à atividade RNA polimerase, a proteína E representa o principal antígeno capaz da neutralização de anticorpos e o restante das proteínas NS ainda não tem suas atividades totalmente elucidadas (Navarro-Sanchez *et al.*, 2005).

Após a entrada do vírus do dengue no organismo, pela picada do mosquito, este faz a sua primeira replicação em linfonodos regionais, em células musculares estriadas, lisas e em fibroblastos (Figura 2). Posteriormente, ele produz viremia e se dissemina por todo o organismo, ficando livre no plasma ou no interior de monócitos/macrófagos e linfócitos B (Navarro-Sanchez *et al.*, 2005)

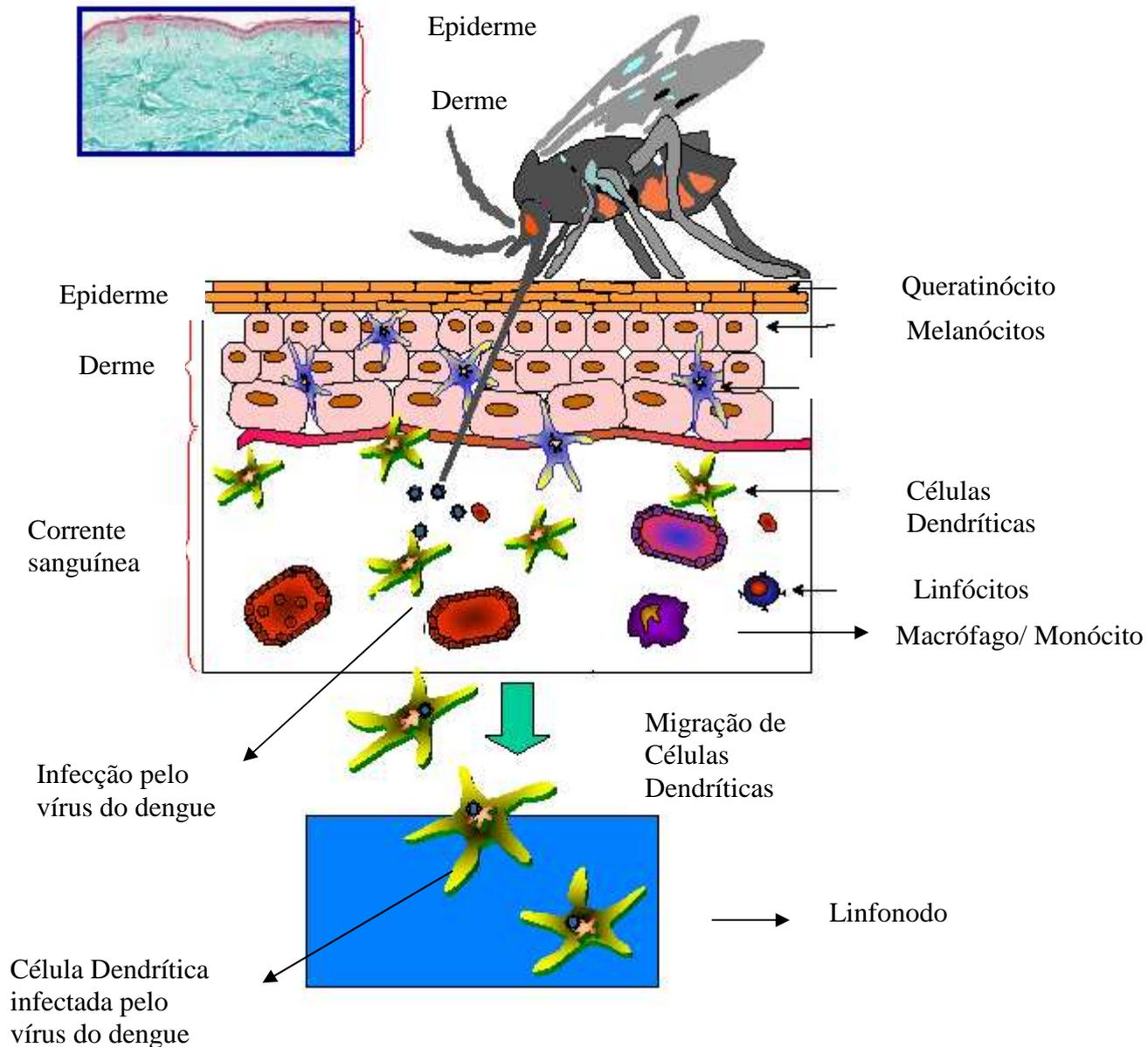


Figura 2. Transmissão do vírus do dengue, pela picada do mosquito

Acredita-se que existam duas formas opostas de resposta imune ao dengue. A primeira previne a infecção e propicia a recuperação do indivíduo. A segunda relaciona-se à imunopatologia do dengue hemorrágico (Navarro-Sanchez *et al.*, 2005)

A infecção pelo vírus do dengue está inicialmente ligada a fatores do sistema complemento e receptores celulares. Acredita-se que a entrada do vírus nas células ocorra por um receptor mediador de endocitose e, com a mudança conformacional da glicoproteína E, leva à fusão entre vírus e membrana do endossomo (Navarro-Sanchez *et al.*, 2005)

A replicação viral está relacionada com estruturas de membrana presentes na porção citoplasmática das células infectadas. O primeiro passo, para o Flavavírus é o local de associação das membranas do retículo endoplasmático (Navarro-Sanchez *et al.*, 2005)

O vírus é inicialmente montado como sendo uma partícula imatura que contém proteína M não covalente ligada com o complexo heterodimérico E. Estes vírus são transportados através da membrana em vesículas e são liberados por exocitose (Navarro-Sanchez *et al.*, 2005)

Depois da morfogênese viral, a glicoproteína M é proteoliticamente processada por proteases no momento da exocitose na região trans-Golgi, resultando em uma proteína de membrana M (prM). A proteólise de prM leva à formação de homodímeros E antes da sua liberação da célula (Navarro-Sanchez *et al.*, 2005).

A estrutura tridimensional da proteína E consiste de um complexo dimérico com duas subunidades iguais e é subdividida em três regiões distintas: I, região central da molécula que é formada por um radical amino terminal; II, que contém a maior parte das regiões de contato com o dímero; e III, que contém a região C terminal e tem relação com a virulência de determinadas cepas virais (Chambers *et al.*, 1990, Chambers *et al.*, 1997).

A resposta imunológica que ocorre com a introdução do vírus no organismo humano é considerada muito vigorosa. Anticorpos, principalmente os que se ligam aos epítomos da proteína E, promovem lise do envelope ou bloqueio de seus receptores com conseqüente neutralização viral (Figueiredo, 1999).

A resposta imune celular citotóxica por linfócitos T é descrita sob estímulo das proteínas NS1, NS3 e E dos vírus do dengue (Chambers *et al.*, 1990; Henchal *et al.*, 1998). Linfócitos T CD4 produzem IFN-gama, IL-2 e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos que atuam na resposta imune eliminando células infectadas com o vírus do dengue que possuem receptores HLA de classe II, Linfócitos T CD8 lisam células infectadas pelo vírus expressando receptores HLA de classe I. Portanto, as células T participam ativamente na resposta imune reduzindo o número de células infectadas com o vírus (Figueiredo, 1999).

No caso de uma re-infecção, anticorpos preexistentes podem não neutralizar sorotipos diferentes do vírus. Paradoxalmente, podem até amplificar a infecção, facilitando a entrada do vírus em monócitos/macrófagos por meio de receptores Fc, levando indivíduos ao desenvolvimento do dengue hemorrágico e/ou síndrome do choque do dengue (DHF/DSS) (Halstead; O'Rourke, 1977; Cardosa, 1987).

Uma importante diferença entre dengue clássico e dengue hemorrágico é a alta carga

viral e altos níveis de antígenos virais circulantes em pacientes com dengue hemorrágico (Libraty *et al.*, 2002).

Infecções sequenciais de dengue foram muito bem definidas como importantes fatores de risco para DHF/DSS (Sangkawibha *et al.*, 1984). Em epidemias que ocorreram no Sudeste Asiático e Ilhas do oceano Pacífico, observou-se que pacientes com sintomas de DHF/DSS sofreram com maior frequência, infecção inicial por dengue tipo 1, 3 ou 4, seguida, após intervalo de 1 a 5 anos, de infecção do vírus tipo 2. No ano de 1981, na epidemia de dengue hemorrágico ocorrida em Cuba, foi isolado o sorotipo 2 de pacientes, quatro anos depois de uma epidemia pelo tipo 1 (Kouri *et al.*, 1986).

Monócitos/macrófagos parecem ser os alvos principais do vírus do dengue, contudo alguns estudos mostraram que a replicação do vírus pode ocorrer em linfócitos B (King *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2002). Ambos são potenciais alvos para o complexo vírus-Ac já que possuem receptores para Fc. Os monócitos/macrófagos ativados ou lisados liberam proteases ativadoras do sistema complemento, causadoras de lise celular e choque (Monath, 1986).

A resposta humoral, produzida por plasmócitos que vêm da ativação de linfócitos B é bastante forte. Os anticorpos IgM específicos são detectáveis a partir do quarto dia, após o início dos sintomas, atingindo níveis mais elevados em torno do sétimo ou oitavo dia e declinando lentamente, passando a não serem mais detectados após o período de três meses (Figueiredo, 1999).

As IgGs específicas são observadas, em níveis baixos, a partir do quarto dia após o início dos sintomas, têm um aumento gradual, atingindo valores elevados após duas semanas e podem ser detectadas por vários anos, conferindo imunidade contra o tipo infectante, provavelmente por toda a vida (Figueiredo, 1989).

Além disso, fatores genéticos indicam ter importância na manifestação da doença, pois mesmo em áreas endêmicas somente uma pequena proporção de pessoas desenvolve a forma mais grave do dengue. A maioria dos estudos envolve os genes reguladores de citocinas e aqueles do sistema HLA (Figueiredo, 1989)

Polimorfismos em genes reguladores de citocinas podem ser responsáveis por variações na produção desta citocinas pelo indivíduo (Meenagh *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 1997; Pravica *et al.*, 1999; Fishman *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 1997; Awad *et al.*, 1998). Portanto, podem estar associados a diferenças no padrão de resposta dos linfócitos TH1 e TH2 apresentado durante uma doença infecciosa. Estes padrões podem determinar se o indivíduo vai desenvolver os sintomas clínicos da doença ou vai desenvolver a doença de uma forma mais grave ou não. (Turner *et al.*, 1997).

A presença de certos alelos em regiões reguladoras de genes de citocinas foi associada ao curso de infecções virais (Ribeiro *et al.*, 2007) e micobacterianas (Franceschi *et al.*, 2009), cujos agentes etiológicos são parasito-intracelulares obrigatórios. Fernandez-Mestre *et al.* (2004) sugeriram a presença do alelo -308 A para o gene *TNF* como possível fator de risco para manifestações hemorrágicas em pacientes com dengue. Nosso grupo, recentemente, mostrou que o genótipo *IL6*⁻¹⁷⁴GC se apresentou como um marcador de resistência ao dengue clássico numa população do Norte do Paraná (Moreira *et al.*, 2008).

A importância do sistema HLA na susceptibilidade a doenças também é bastante conhecida. Eles participam efetivamente da resposta imune promovendo a interação entre os epítomos de um dado patógeno e o repertório de células T do hospedeiro. Desta forma, dependendo do HLA do indivíduo, este pode responder de forma diferente ao mesmo antígeno.

A resposta imune mediada por linfócitos T CD4 e CD8 está diretamente ligada ao reconhecimento e apresentação de antígenos próprios, presentes na superfície das células por moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) de classe I e II. Estas moléculas nada mais são do que receptores expressos na maioria das células, capazes de se ligar a peptídeos próprios ou não próprios do organismo e apresentá-los a linfócitos T através de receptores (TCR, do inglês, *T cell receptor*), podendo assim dar início a uma resposta imunológica, caso esse peptídeo seja reconhecido como estranho (Maffei *et al.*, 1997).

O CPH humano só foi descoberto na década de 50, por meio de estudos sorológicos em pacientes politransfundidos que detectaram anticorpos leucoaglutinantes (Lamm *et al.*, 1985). Este complexo recebeu a denominação HLA (do inglês, *Human Leucocyte Antigen*) em humanos, referindo-se ao conjunto gênico mapeado no braço curto do cromossomo 6, na banda 6p21.31 (Figura 3) (Izar, 2005). Existem também outros genes presentes nesta região que não pertencem ao sistema HLA (Christiansen *et al.*, 1994).

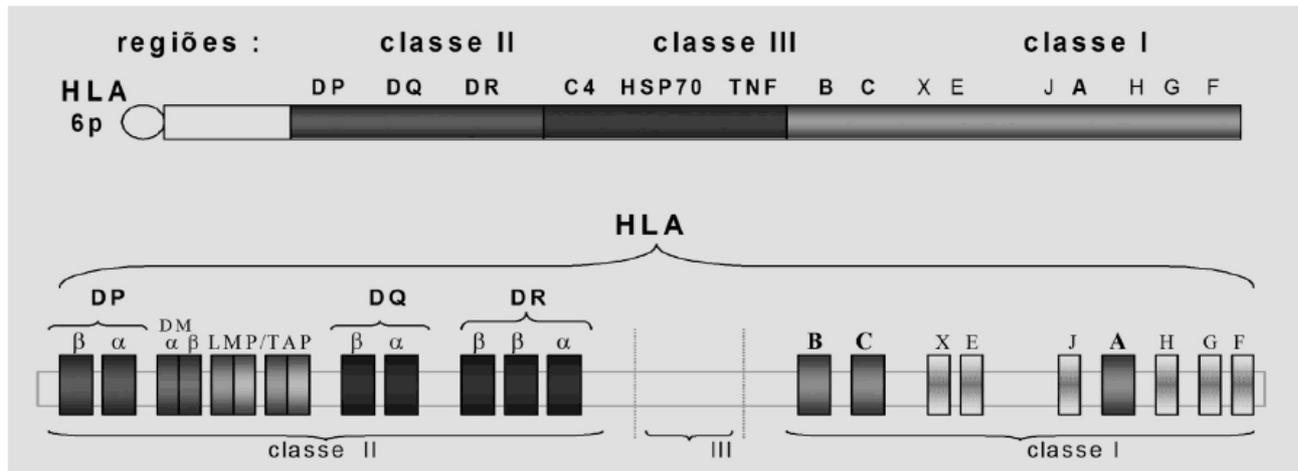


Figura 3. Mapa genético do Complexo Principal de Histocompatibilidade.

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

Muitos estudos têm colocado em pauta se genes de resistência ou susceptibilidade podem pertencer ao complexo gênico HLA que codifica moléculas HLA de classe I e II, as quais participam da indução da resposta imune por estarem envolvidas na apresentação de antígenos para linfócitos T CD4 e CD8. Moléculas HLA de classe I e II têm sido associadas a mais de 100 doenças. Normalmente, a região HLA está associada com doenças auto-imunes ou infecciosas, sendo que um ou mais alelos podem estar aumentados ou diminuídos em pacientes quando comparados com controles (Shiina *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2005; Fonseca *et al.*, 2005).

A susceptibilidade a doenças infecciosas pode acontecer devido a imperfeições em alguns estágios do sistema imune. O indivíduo que apresenta um determinado haplótipo HLA pode provocar uma ligação inadequada ao peptídeo ou o complexo HLA-peptídeo pode gerar uma resposta ineficaz de linfócitos levando a uma baixa resistência do indivíduo à invasão do agente infeccioso (Klein, 2000).

Pacientes cujas moléculas HLA conferem proteção contra uma determinada doença possuem genes que provavelmente selecionam e estimulam a multiplicação de linfócitos T e

eliminam o agente invasor através da produção de citocinas inflamatórias, ou destruindo as próprias células infectadas (Mack *et al.*, 1999).

Exemplos de associações de genes HLA com doenças causadas por vírus e micobactérias também já foram reportados. O alelo HLA-B*35, particularmente o B*3501, que normalmente está ligado ao HLA-Cw*04 foi associado à progressão da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Gao, 2001; Turner, 2004; Paranjape, 2005). Enquanto, os alelos HLA-B*27, B*57, B*14 e Cw*04 foram associados como fatores de proteção à infecção pelo HIV (Gao, 2001; Paranjape, 2005). Alguns estudos mostraram que os vários estágios da evolução da Hepatite C podem estar associados com os alelos HLA (Kryczka, 2001; McKiernan *et al.*, 2004; Thio, 2004).

No caso do dengue, a associação dos genes HLA começou a ser pesquisada e uma série de resultados foi encontrada. LaFleur *et al.*, (2002), numa população Mexicana, correlacionaram o alelo HLA-DRB1*04 com a proteção ao dengue hemorrágico, supondo que estas moléculas podem apresentar antígenos virais a linfócitos T CD4, levando a uma efetiva resposta imune e protegendo contra a forma mais grave da doença, enquanto Nishimura *et al.* (1991) sugeriram um papel imunossupressor de HLA-DQ1 na resposta imune ao vírus do dengue.

No Brasil, em um estudo realizado na região Norte/Noroeste do Paraná, Polizel *et al.* (2004) encontraram forte associação de genes HLA-DQ1 em pacientes que tiveram dengue clássico em uma epidemia ocorrida em 1995 caracterizada pela presença do sorotipo 1.

Pesquisas realizadas na etnia Thais, população isolada do norte da Tailândia (Sukhuthai, Tailândia), demonstraram diversas associações entre HLA-A e B e infecções secundárias tanto na forma clássica quanto na forma hemorrágica do dengue: HLA-A*0203 aumentado em pacientes com dengue clássico com infecção secundária pelos sorotipos 1 e 3, além de HLA-A*0207 aumentado em pacientes com dengue hemorrágica com infecção secundária pelos sorotipos 1 e 2, sugerindo alta probabilidade de indivíduos HLA-A*0207 desenvolverem dengue hemorrágico depois de uma infecção secundária provocada pelo sorotipo 2. Este estudo também mostrou que a frequência do alelo HLA-B*05 foi maior em indivíduos com dengue clássico e hemorrágico, HLA-B*44 e B*77 reduzidos em pacientes com dengue hemorrágico, B*62 e B*77 reduzidos em indivíduos com dengue clássico e infecção secundária, B*76 reduzido em todos os pacientes com infecção secundária, B*46 aumentado em pacientes com dengue hemorrágico, B*51 aumentado na ocorrência de dengue hemorrágico por sorotipos 1 e 3 e, B*52 aumentado no dengue clássico por sorotipo 2 (Stephens *et al.*, 2002).

De acordo com Loke *et al.*, (2001), crianças apresentando HLA-A*33 são menos susceptíveis ao dengue hemorrágico e as que apresentam HLA-A*24 têm risco maior de desenvolver um quadro hemorrágico.

No Vietnã, pesquisas demonstram que as moléculas HLA-B*07 estão restritas ao reconhecimento da proteína NS3 do vírus e as moléculas HLA-A*24 restritas às proteínas do envoltório viral (E) (Simmons *et al.*, 2004), o que foi, em parte, confirmado por ensaios realizados em Bangkok e Tailândia, afirmando a restrição do HLA-B*07 às proteínas NS3 (Zivna *et al.*, 2002). Já no Hawaii, pesquisadores afirmam a restrição de HLA-B*5502 à proteína NS5 (Imrie *et al.*, 2007).

Estudos com a etnia Thais mostram restrição de HLA-B*57 às proteínas NS1 virais (Mathew *et al.*, 1998) e em Massachusetts houve a demonstração de restrição de HLA-DRB1*15 também à proteína NS3 (Zeng *et al.*, 1996).

Pesquisas realizadas com 120 indivíduos com dengue clássico ou hemorrágico em Cuba (Santiago de Cuba) apresentaram associação de HLA-A*31, B*15 e DRB1*07 com as formas clássica e hemorrágica do dengue quando comparados com controles (Sierra *et al.*, 2007).

Portanto, fatores genéticos relativos ao sistema HLA podem ter importante papel na susceptibilidade ou na proteção ao dengue, tanto clássico quanto hemorrágico/choque do dengue, por isso mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar questões a respeito da influência destes genes de resposta imune em doenças virais como o dengue, nas diversas populações das grandes áreas de ocorrência do vírus e dos vetores.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O período de incubação do vírus do dengue é de 3 a 15 dias, com média de 5 dias, sendo o período de transmissibilidade de 6 dias. Todos os indivíduos são susceptíveis ao vírus e a imunidade normalmente se apresenta permanente para um mesmo sorotipo, mas transitória para sorotipos diferentes (Maringá, 2007).

A mesma doença pode ter apresentações muito variadas, desde a forma assintomática ou oligoassintomática, até quadros dramáticos com óbito. No dengue clássico, o quadro clínico é de febre de início abrupto, cefaléia, mialgia, artralgia, prostração, astenia, anorexia, náuseas, vômitos, exantema e prurido cutâneo. Podem ocorrer também hepatomegalia dolorosa, dores abdominais, pequenas manifestações hemorrágicas como petéquias, epistaxe, gengivorragia, sangramento gastrointestinal, hematúria e metrorragia (Maringá, 2007; Rigau-Pérez *et al.*,

1998).

Estudos baseados em populações mostram que a gravidade da doença aumenta com a idade do paciente e com repetidas infecções e que leucopenia e trombocitopenia são manifestações freqüentes nestes pacientes (Rigau-Pérez *et al.*, 1998).

Além das manifestações clínicas mais comuns, outros sinais de alerta devem ser observados em casos suspeitos, uma vez que cada organismo reage à infecção de uma maneira particular: derrames cavitários, sangramentos importantes, hipotensão arterial, diminuição da pressão diferencial, hipotensão postural, diminuição da diurese, agitação, letargia, pulso rápido e fraco, extremidades frias, cianose, diminuição brusca da temperatura corpórea associada à sudorese profusa, taquicardia, lipotimia e aumento repentino do hematócrito (Maringá, 2007).

A infecção viral causada pelos quatro sorotipos do vírus do dengue define-se, segundo a Organização Mundial de Saúde (1975; 1986), de duas formas: a clássica ou febre dengue (DF), como doença febril aguda acompanhada por cefaléia e dores musculares e articulares; e a febre dengue hemorrágica (DHF), como doença febril aguda, caracterizada clinicamente por uma diátese hemorrágica e uma tendência à evolução para a síndrome de choque (síndrome do choque do dengue-DDS) que pode ser fatal (Marzochi, 1991).

Ainda, com relação às duas formas de dengue, são admitidas variações de gravidade: a chamada forma clássica ou febre do dengue, variando desde a febre não diferenciada (síndrome viral), até a síndrome de febre por dengue, que se apresenta sem hemorragia ou com hemorragia incomum; e a chamada febre hemorrágica do dengue, que se instala com o mesmo quadro clínico da febre e pode evoluir sem choque ou com choque, podendo ocorrer vários tipos de sangramento (Marzochi, 1991).

DENGUE HEMORRÁGICO

Muitos autores procuram buscar explicações para a ocorrência da forma hemorrágica do dengue. Alguns associam a ocorrência desta forma a duas infecções seqüenciais, por dois sorotipos diferentes, após ter passado um tempo entre elas, quando a resposta imune do indivíduo sensibilizado seria amplificada pela segunda infecção em função da presença de anticorpos da primeira infecção (Halstead, 1981).

Outros autores, como Rosen (1986), acreditam que as formas mais graves da doença ocorrem devido a uma maior virulência de algumas cepas do vírus. Na verdade, o que é mais

provável e aceito, atualmente, é que as formas mais graves do dengue não se dêem através de fatores isolados, mais sim através de múltiplos fatores que se combinam. Entre esses fatores de risco podem estar: idade, sexo, etnia, estado nutricional, pré-existência de enfermidades crônicas, presença de anticorpos e intensidade da resposta imunológica a infecções anteriores. Também podem ser observados fatores ligados ao vírus como: virulência da cepa circulante, sorotipo viral envolvido em cada evento imunológico e fatores epidemiológicos como imunidade de grupo, competência vetorial, densidade vetorial, intensidade da circulação viral e tempo entre uma infecção e outra por diferentes sorotipos (Kouri *et al.*, 1987).

Nas Américas tropicais, o dengue hemorrágico é visto em indivíduos de todas as idades, enquanto que na Ásia, ele atinge principalmente crianças. O dengue hemorrágico é definido como uma doença febril aguda, a qual pode levar aos quadros de trombocitopenia, efusão pleural, hipoalbuminemia e/ou hipoproteinemia. A gravidade da doença é dada pela liquidez do plasma que extravasa através do endotélio, sem necrose ou inflamação do endotélio capilar (Rigau-Pérez *et al.*, 1998).

Nos casos de infecção seqüencial por dengue apresentando as formas hemorrágicas e/ou síndrome do choque do dengue (DHF/DSS), anticorpos preexistentes, devido a uma infecção prévia por outro tipo viral, não neutralizam o segundo vírus de sorotipo diferente e amplificam a infecção, facilitando a penetração em macrófagos do novo tipo infectante. Os vírus utilizam a porção Fc dos anticorpos ligados ao envelope para a ligação com os receptores de membrana Fc γ , presentes nas membranas celulares dos macrófagos, fenômeno este chamado de facilitação da penetração viral em macrófagos por anticorpos (*antibody dependent enhancement*– ADE) (Halstead *et al.*, 1977)

Em casos de ocorrência de DHF/DSS, ocorre agravamento do ADE, estímulo de IFN-gama, liberado por Linfócito T CD4 ativado, causando elevada exposição de receptores Fc γ na membrana dos macrófagos, tornando-os mais permissíveis ao vírus. A presença aumentada de moléculas HLA classes I e II, nos macrófagos apresentando antígenos, facilita o reconhecimento de múltiplos epítomos virais pelos linfócitos T CD4 e citotóxicos (Rothman; Ennis, 1999).

Os antígenos do vírus do dengue, expressos na membrana macrofágica induzem fenômenos de eliminação imune por Linfócitos T CD4 e citotóxicos. Os macrófagos, ativados pelos linfócitos e agredidos ou lisados pelas células T citotóxicas, liberam tromboplastina, iniciando fenômenos da coagulação e proteases ativadoras do complemento, causadoras de lise celular e de choque (Monath; Tsai, 1997).

O DHF/DSS tem como base fisiopatológica uma resposta imune anômala, desencadeada

pela resposta imune do indivíduo infectado e provocada pela cepa viral infectante, envolvendo leucócitos, citocinas e imunocomplexos, causando aumento da permeabilidade por má função vascular endotelial, sem destruição do endotélio, com extravasamento de líquidos para o interstício, causando queda da pressão arterial e manifestações hemorrágicas associadas à trombocitopenia (Rico-Hesse *et al.*, 1998).

Estas manifestações fazem com que ocorra hemoconcentração com redução da volemia, má perfusão tissular, hipóxia e acidose láctica. Em muitos casos, podem-se observar hemorragias cutâneas, em trato gastrointestinal, no septo intraventricular cardíaco, no pericárdio, em espaços subaracnóides e superfícies viscerais, hepatomegalia e derrames cavitários (Figueiredo; Fonseca, 1996).

Em linfonodos e baço, há proliferação linfoplasmocitária com grande atividade celular e necrose nos centros germinativos. A polpa branca esplênica é reduzida e apresenta linfocitólise abundante com fagocitose das células regionais (Figueiredo; Fonseca, 1996).

Na medula óssea, ocorre bloqueio da maturação megacariocítica e de outras linhagens celulares. No fígado, observam-se hiperplasia, necrose hialina de células de Kupffer e a presença, em sinusóides, de células mononucleares com citoplasma acidófilo e vacuolizado, semelhantes a corpúsculos de Councilman, aspecto semelhante ao encontrado na febre amarela (Figueiredo; Fonseca, 1996)

Os hepatócitos apresentam graus variáveis de esteatose e necrose mediozonal. Os rins têm glomerulonefrite relacionada à deposição de imunocomplexos em membrana basal glomerular (Figueiredo; Fonseca, 1996).

TRATAMENTO

Pacientes com dengue requerem fluídos orais, para compensar a perda de líquidos devido à diarreia e ao vômito, e analgésicos e antipiréticos para controlar a dor e a febre alta, respectivamente. Um monitoramento da pressão sanguínea, hematócrito, contagem de plaquetas e manifestações hemorrágicas também é importante. No caso do dengue hemorrágico, a reposição pode ser realizada com soro e sangue.

PROFILAXIA

Não há vacinas em uso até o momento, mas vários estudos estão em andamento. A prevenção deve ser feita pelo combate ao mosquito e por meio da conscientização da

população em relação à limpeza dos quintais para evitar a reprodução do mosquito (Veronesi *et al.*, 1996).

JUSTIFICATIVAS

A caracterização genética do polimorfismo de genes HLA, de uma população que desenvolveu o dengue e de um grupo controle (indivíduos que apresentaram os sintomas do dengue, mas com sorologia negativa para a doença), permitiu investigar a influência destes genes na resistência ou susceptibilidade ao dengue. Além disso, esta análise poderá servir de referência para futuras investigações da resposta imune em casos de dengue hemorrágico e síndrome do choque, pois o perfil genético de resposta imune de indivíduos com dengue poderá informar quais os pacientes com maior risco de evoluírem para as formas mais graves da doença.

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi investigar a influência de genes HLA na susceptibilidade e/ou resistência ao dengue, numa população da região Sul do Brasil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar os alelos e haplótipos dos genes: HLA-A, B, Cw, DRB1, DQA1 e DQB1 em indivíduos que desenvolveram o dengue (com sorologia positiva) e indivíduos que manifestaram os sintomas (com sorologia negativa), da região Sul do Brasil;
- 2) Estimar as frequências alélicas e genotípicas para estes genes polimórficos nestas populações;
- 3) Verificar a conformidade das proporções genotípicas, com respeito às expectativas em equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- 4) Avaliar uma associação entre estes genes e o desenvolvimento do dengue nesta população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves C, Souza T, Veiga S, Alves C, Toralles MB, Lemaire D. Importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. *Pediatria (São Paulo)* 27(4):274-286, 2005.
- Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnot PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor- β 1 gene. *Transplantation* 66(8): 1014-1020, 1998.
- Barbosa ML. Dengue: Revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 56:27-45, 1996.
- Boletim Informativo. Projeto: Hospital Sentinela. (Hospital Universitário Regional de Maringá) Publicação Trimestral, ano III, N10, Maringá, 2007.
- Câmara PF, Theophilo RLG, Santos GT, Pereira SRFG, Câmara DCP, Matos RRC. Estudo retrospectivo (histórico) de dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(2): 192-196, 2007.
- Cardosa MJ. Dengue virus isolation by antibody-dependent enhancement of infectivity in macrophages. *The Lancet* 24: 193-194, 1987.
- Chambers TJ, Hahn CH, Galler R, Rice CM. Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. *Annual Review Microbiology* 44: 649-688, 1990.
- Chambers TJ, Tsai TF, Pervikov Y, Monath TP. Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis. In: report of a World Health Organization meeting 15:1494-1502, 1997.
- Christansen OB, Rasmussen KL, Jersil C, Grunnet N. Hla class II alleles confer susceptibility to recurrent fetal losses in Danish women. *Tissue Antigens* 44: 225-233, 1994.
- São Paulo. Companhia de tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB, 2007. www.cetesb.sp.gov/Institucional/dengue/dengue.asp acessado em 28 de setembro de 2007.
- Crouau-roy B, Amadou C, Bouissou C, Clayton J, Verenet C, Ribouchon MT, Pontarotti P. Localization of the OTF3 gene within the human MHC class I region by physical and meiotic mapping. *Genomics* 21: 241-243, 1994.
- Dye C. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. *Annual Review Entomology* 37:1-19, 1992
- Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vitencourt P, Layrisse Z. TNF-alpha-308 allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens* 64:469-472, 2004.

- Figueiredo LTM, Simões MC, Cavalcante SMB. Study On An Enzyme Immunoassay For Dengue IgG And IgM Antibodies Detection Using Infected Mosquito Cells As Antigen. Transactions of the Royal Academy of Tropical Medicine and Hygiene 83: 702-707, 1989.
- Figueiredo LTM, Fonseca BAL. Dengue. In: Veronesi R, Foccacia R. Tratado de Infectologia 201-214, 1996.
- Figueiredo LTM. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. Medicina, Ribeirão Preto 32: 15-20, 1999.
- Fishman D, Faulds G, Jeffry R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. Journal of Clinic Investigation 102: 1369-1376, 1998.
- Folha do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u394660.shtml> acessado em 07 de agosto de 2008.
- Fonseca CT, Cunha-Neto E, Goldberg AC, Kalil J, de Jesus AR, Carvalho EM, Correa-Oliveira R, Oliveira SC. Human T cell epitope mapping of the Schistosoma mansoni 14-kDa fatty acid-binding protein using cells from patients living in areas endemic for schistosomiasis. Microbes Infections 7:204-212, 2005.
- Franceschi DAS, Mazini PS, Rudnick CCC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas ML, Peixoto PRF, Visentainer JEL. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the South of Brazil. International Journal of Infectious Diseases 13: 493-498, 2008.
- Franceschi DAS, Mazini PS, Rudnick CCC, Sell AM, Tsuneto LT, Melo FC, Braga MA, Peixoto PRF, Visentainer JEL. Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. Tissue Antigens 72: 478-482, 2008.
- Gao X, Nelson GW, Karacki P, Martin MP, Phair J, Kaslow R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, O'Brien SJ, Carrington M. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. The New England Journal of Medicine 344(22):1668-1675, 2001.
- Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. The Journal of Experimental Medicine 146: 201-217, 1977.
- Halstead SB, Papavangelou G. Transmission of dengue 1 and 2 viruses in Greece in 1928.

- American Journal of Tropical and hygiene 29(4): 635-637, 1980.
- Halstead SB. The pathogenesis of dengue. Molecular epidemiology in infectious disease. American Journal of Epidemiology 114(5): 632-648, 1981.
- Henchal EA, Henchal L.S, Schlesinger JJ. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice lethal challenge with dengue-2 virus. Journal of Genetic and Virology 609: 2101-2107, 1998.
- Imrie A, Meeks J, Gurary A, Sukhbataar M, Kitsutani P, Effler P, Zhao Z. Differential Functional avidity of Dengue Virus-Specific T-Cell Clones for variant peptides representing heterologous and previously encountered serotypes. Journal of Virology 81: 10081-10091, 2007.
- Izar MCO. Tratamento hipolipemiante em situações especiais pós-transplante e/ou terapia imunossupressora. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 85(5), 2005.
- Kakhoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J *et al.* HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C vírus infection. Science 305:872-874, 2004.
- Kappor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusekawa J, Ebner KE, Padmanabhan R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. The Journal of Biological Chemistry 270:19100-19106, 1995.
- King ADA, Nisalak S, Kalayanrooj KS, Myint KS, Pattanapanyasat K, Nimmannitya S, Innis B. Lymphocytosis B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health 30: 718-728, 1999.
- Klein JSA. The HLA System: Second of two parts. The New England Journal of Medicine 343(11):782-786, 2000.
- Kouri GP, Guzman MG, Bravo J. Dengue hemorrágico en Cuba. Crônica de una epidemia. Boletim de La Oficina Sanitaria Panamericana 100(3): 322-329, 1986.
- Kouri GP, Guzman MG, Bravo J. Why dengue hemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 81(5): 821-823, 1987.
- Kryczka W, Brojer E, Kalinska A, Urbaniak A, Zarebska-Michaluk D. DRB1 alleles in relation to severity of liver disease in patients with chronic hepatitis C. Medical Science Monitor 1:217-220, 2001.
- LaFleur C, Granados J, Alarcon GV, Morales JR, Garza CV, Higuera L, Pacheco GH,

- Moguel TC, Rangel H, Figueroa R, Acosta M, Lazcano E, Ramos C. HLA-DR Antigen Frequencies in Mexican Patients with Dengue virus infection: HLA-DR4 as a Possible Genetic Resistance Factor for Dengue Hemorrhagic Fever. *Human Immunology* 63: 1039-1044, 2002.
- Lamm LU, Olaisen B. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 5 and 6. *Cytogenetics and Cell Genetics* 40:128, 1985.
- Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases* 186:1165-1168, 2002.
- Lin YW, Wang KJ, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Liu CC, Chen SH. Virus Replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *Journal of Virology* 76:12242-12249, 2002.
- Loke H, Bethell DB, Phuong CXT, Dung M, Schneider J, White NJ, Day NP, Farrar J, Hill AVS. Strong HLA Class I-Restricted T Cells Responses in Dengue Hemorrhagic Fever: A Double-Edged Sword? *The Journal of Infectious Diseases* 184:1369-1373, 2001.
- Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, Hill A. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in Vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67: 102-106, 2002.
- Mack DG, Johnson JJ, Roberts F, Roberts CW, Estes RG, David C, Grumet FC, McLeod R. HLA-class II genes modify outcome of *Toxoplasma gondii* infection. *International Journal of Parasitology* 29:1351-1358, 1999.
- McKierman SM, Hagan R, Curry M, McDonald GS, Kelly A, Nolan N, Walsh A, Hegarty J, Lawlor E, Kelleher D. Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology* 40(1): 108-114, 2004.
- Maffei A, Papadopoulos K, Harris PE. MHC class I antigen processing pathways. *Human Immunology* 54(2): 91-103, 1997.
- Martinez-Torres ME. Dengue hemorrágico em crianças: Editorial Havana: José Martí 1-180, 1990.
- Marzochi KBF. Dengue – Classificação Clínica. *Caderno de Saúde Pública* 7: 409-415, 1991.
- Mathew A, Kurane I, Green S, Stephens HA, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Chandanatingyong D, Ennis FA, Rothman AL. Predominance of HLA-restricted cytotoxic T- lymphocyte responses to serotype-cross-reactive epitopes on nonstructural

- proteins following natural secondary dengue virus infection. *Journal of Virology* 72: 3999-4004, 1998.
- Meenagh A, Williams F, Ross OA, Patterson C, Gorodezky C, Hammond M, Leheny WA, Middleton D. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from Western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. *Human Immunology* 63: 1055-1061, 2002.
- Méndez A, Granda H, Meenagh A, Contreras S, Zavaleta R, Mendoza F *et al.* Study of KIR genes in tuberculosis patients. *Tissue Antigens* 68:386-389, 2006.
- Brasil. Ministério da Saúde. Balanço Dengue Janeiro a Julho de 2007. Portal da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dengue_0210.pdf, 2007.
- Monath TP. Pathology of the Flaviviruses. *In: Schlisenger M. The Togaviridae and Flaviviridae.* New York, Plenum 375-424, 1986.
- Monath TP, Tsai TF. Flavaviruses. *In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. Clinical Virology* 1113-1185, 1997.
- Moreira ST, Cardozo DM, Visentainer JEL, Fonzar UJV, Moliterno RA. The possible protective role of the IL6⁻¹⁷⁴ GC genotype in dengue fever. *The Open Tropical Medicine Journal* 1: 87-91, 2008.
- Navarro-Sánchez E, Despre`as P, Cedillo-Barro`n L. Innate Immune Responses to Dengue Virus. *Archival of Medical Research* 36: 425-435, 2005.
- Nishimura Y, Kamikawaji N, Fujisawa K, Yoshizumi H, Yasunami M, Kimura A, Sasazuki T. Genetic control of immune response and disease susceptibility by HLA-DQ gene. *Research in Immunology* 142: 559-566, 1991.
- Osanaí CH. A epidemia de Dengue em Boa Vista, território Federal de Roraima. Tese de Mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, RJ, 1984.
- O diário, Dengue terá mais pesquisas no Paraná. O diário de Maringá acessado em 28 de junho de 2008, disponível em: www.odiarimaringa.com.br/noticia/197243.
- Paranjape RS. Immunopathogenesis of HIV infection. *The Journal of Medicine Research* 121(4):240-255, 2005.
- Penna MLF. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. *Caderno de Saúde Pública* 19: 305-309, 2003.
- Pinheiro FP. Los programas de erradicacion y control Del Aedes aegypti em las Americas. OPS/HCP/HTC, 1996.
- Polizel JR, Bueno D, Visentainer JEL, Sell AM, Borelli SD, Tsuneto LT, Dalalio MMO, Coimbra MTM, Moliterno RA. Association of Human Leukocyte Antigen DQ1 and

- Dengue Fever in a White Southern Brazilian Population. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 99(6): 559-562, 2004.
- Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *European Journal of Immunogenetic* 26: 1-3, 1999.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Nisalak A, Vaughn DW, Kalayanaroj S, Green S, Rothman AL, Ennis FA. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58(1): 96-101, 1998.
- Rhotman AL, Ennis EA. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology* 257: 1-6, 1999.
- Ribeiro CSS, Visentainer JEL, Moliterno RA. Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(4): 435-440, 2007.
- Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sandres EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet* 352: 971-977, 1998.
- Rosen L. La pathogenese de la dengue hemorrhagique: discussion critique des hypotheses Actuelles. *Bulletin Society of Pathology* 79: 342-349, 1986.
- Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB. Risk factors in Dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. *American Journal Epidemiology* 120: 653-669, 1984.
- Paraná. Secretaria de Saúde do Estado do Paraná-SESA. Boletim Informativo Dengue nº 01/2008, Paraná, 2008.
- Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations. *Tissue Antigens* 64(6): 631-649, 2004.
- Sierra B, Alegre R, Pérez AB, García G, Ramirez KS, Obasanjo O, Aguirre E, Alvarez M, Roche RR, Valdés L, Kanki P, Guzmán MG. HLA-A, B, C, and DRB1 allele frequencies in Cuba individuals with antecedents of dengue 2 disease: Advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue infection. *Human Immunology* 68: 531-540, 2007.
- Silva, SA; Mazini, PS; Franceschi, DS; Rudnick, CC; Melo, FC; Braga, MA; Sell, AM; Tsuneto, LT; Peixoto, PRF; Ribas ML; da Silva MA; Visentainer JEL. HLA alleles and the Leprosy in a Brazilian population. *Human Immunology* 68 (1):S89-S89, 2007.
- Simmons CP, Dong T, Chau NV, Dung NTP, Chau TNB, Thao LTT, Dung NT, Hien TT,

- Jones SR, Farrar J. Early T-Cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. *Journal of Virology* 79: 5665-5675, 2004.
- Soares P. Etiologia Symptomatólogica e Prophylaxia da dengue – a epidemia do aviso francês “Antarès” no porto da Bahia. *Arquivo do Hospital de Isolamento em Mont’Serrat*, 1928.
- Stephens HAF, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Green S, Kalayanaroj S, Endy TP, Libraty DH, Nisalak A, Innis BL, Rothman AL, Ennis FA, Chandanayingyong D. HLA-A and B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens* 60: 309-318, 2002.
- Teixeira GM, Barreto ML, Guerra Z. *Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. Informe epidemiológico do SUS* 8(4): 5-33, 1999.
- Thio CL, Gao X, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, O'Brien SJ, Karacki P, Astemborski J, Carrington M, Thomas DL. HLA-Cw*04 and hepatitis C vírus persistence. *Journal of Virology* 76(10):4792-4797, 2002.
- Turner D, Grant SC, Yonan N, Sheldon S, Dyer PA, Sinnott, Hutchinson IV. Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation* 64:776-779, 1997.
- Turner D. The human leucocyte antigen (HLA) system. *Vox Sanguinis* 87:87-90, 2004.
- Ubol S, Masrinoul P, Chaijaruwanich J, Kalayanaroj S, Charoenserisuthikul T, Kasisith J. Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of Dengue Fever but not Dengue Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases* 197:1459-67, 2008.
- Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia*. Ed. Atheneu, São Paulo, p. 201-214, 1996.
- Visentainer JEL, Tsuneto LT, Serra MF, Peixoto PRF, Petzl-Eler ML. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. *Brazilian Journal of Medicine Biological Research* 30:51-59, 1997.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proceedings of National Academy of Science of USA* 94: 3195-3199, 1997.
- World Health Organization: *Dengue Haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control*. Geneva: WHO, 1997.
- Zeng L, Kurane I, Okamoto Y, Ennis FA, Brinton MA. Identification of Amino Acids involved in recognition by dengue virus NS3-specific HLA-DR15-restricted Cytotoxic

CD4+ T-Cell clones. *Journal of Virology* 70: 3108-3117, 1996.

Zivna I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Stephens HAF, Chandanayingyong D, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. T Cell responses to an HLA-B*07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. *The Journal of Immunology* 168: 5959-5965, 2002.

CAPÍTULO II

Artigo: “PADRONIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE HUMANO COAGULADO PARA APLICAÇÃO NAS TÉCNICAS DE GENOTIPAGEM *HLA* E DE GENES *KIR*.”

Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina

DNA extraction from clotted human blood for application on genotyping techniques of Human Leukocyte Antigen and killer-like Immunoglobulin receptor

Daniela Maira Cardozo¹, Gláucia Andréia Guelsin¹, Samaia Laface Clementino¹, Fabiano Cavalcante de Melo¹, Marco Antonio Braga¹, Ricardo Alberto Moliterno¹, Jeane Eliete Laguila Visentainer¹

1.Laboratório de Imunogenética, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

Órgãos financiadores: PROAP, UEM

Endereço para correspondência:

Dra. Jeane Eliete Laguila Visentainer

Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Análises Clínicas - Laboratório de Imunogenética

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

Telefone: 55 44 3261-4864 / FAX: 55 44 3261-4931

e-mail: jelvisentainer@uem.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi padronizar uma metodologia de extração de DNA de alta qualidade a partir de amostras de sangue coagulado. Quarenta e oito amostras de sangue humano coagulado foram utilizadas para a extração de DNA pelo kit comercial EZ-DNA (Biological, Israel) e coluna (NeoScience, USA) e, pelo método modificado de *salting out*. Apenas o método de *salting-out* foi capaz de extrair altas concentrações de DNA (média, 180 ng/ μ L), as quais foram medidas pelo detector de fluorescência Qubit (Invitrogen, USA). Este permitiu a amplificação dos genes *HLA*, pela tecnologia PCR-SSO Luminex, a qual exige DNA de boa qualidade, e de genes *KIR*, pela técnica *in house* PCR-SSP, a qual demanda uma concentração específica (10 ng/ μ L). Pode ser concluído que a técnica de *salting-out* foi muito eficiente, simples e rápida para a extração de DNA de amostras de sangue humano coagulado, com o objetivo de realizar a genotipagem de genes *HLA* e *KIR*.

Palavras-chaves: Extração de DNA. Sangue coagulado. Biologia molecular. Padronização.

ABSTRACT

The objective of this study was to standardize a method for extracting high-quality DNA from samples of clotted blood. Forty-eight samples of human clotted blood were used for DNA extraction by commercial kit EZ-DNA (Biological, Israel) and column kit (NeoScience, USA), and by a modified salting-out method. Only the Salting-out method was able to extract high concentrations of DNA (mean, 180 ng/ μ L), which were measured by a fluorescence detector Qubit (Invitrogen, USA). This enabled the amplification of *HLA* genes, by PCR-SSO Luminex technology, which demand good quality DNA, and of *KIR* genes, by in house PCR-SSP, which demand a specific concentration (10 ng/ μ L). It can be concluded

that the technique of salting-out was very efficient, simple and rapid for DNA extraction from samples of human clotted blood, with the objective of carrying out genotyping of *HLA* and *KIR* genes.

Key-words: DNA extraction. Clotted blood. Molecular biology. Standardization.

INTRODUÇÃO

Muitos testes genéticos envolvidos em estudos de doenças humanas necessitam da utilização do DNA genômico extraído de amostras de sangue. Normalmente, o DNA genômico é obtido a partir da separação da camada de células brancas ou do sangue total.

Frequentemente, ensaios genéticos envolvendo a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), para a extração de DNA, utilizam amostras de sangue coletadas com anticoagulantes³. Com isso, é possível a separação das partes sólidas e líquidas do sangue por centrifugação e, portanto, a retirada da camada de células nucleadas (*buffy-coat*).

No entanto, em muitos laboratórios, amostras de sangue coletadas para sorologia não utilizam anticoagulante e são descartadas, por serem inviáveis para os estudos genéticos, uma vez que a extração de DNA genômico destas amostras é dispendiosa e os resultados não são satisfatórios¹.

Muitos métodos para o isolamento de DNA de amostras coaguladas foram descritos e alguns deles enfocam a obtenção de um DNA satisfatório para a PCR⁴. Outras técnicas se preocupam com amostras de DNA de alta qualidade, porém são procedimentos demorados e bastante trabalhosos, envolvendo processos de homogeneização do coágulo².

Com isso, uma técnica rápida e eficiente de extração de DNA de sangue coagulado se faz necessária, uma vez que materiais biológicos que podem ser utilizados para muitos estudos genéticos são descartados rotineiramente. Além disso, esta metodologia pode representar mais uma opção para a extração de DNA de amostras cujo anticoagulante foi ineficaz.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi padronizar uma metodologia para obtenção de altas concentrações de DNA com boa qualidade, a partir de amostras de sangue coagulado para aplicação em estudos de marcadores moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá, estando de acordo com a Resolução 196/96 – CNS.

Coleta das amostras. Amostras de sangue coagulado de 48 indivíduos coletadas para realização do exame de sorologia de diagnóstico do dengue pela 15ª Regional de Saúde de Maringá, Paraná, no período de março a abril de 2007, foram utilizadas neste estudo. Estas amostras foram armazenadas em tubo do tipo Falcon de 15 mL em freezer -80°C por pelo menos 3 dias. O descongelamento em banho-maria a 37°C por 10 minutos foi seguido pelo banho de gelo por 10 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram homogeneizadas para se obter a dissolução máxima do coágulo¹.

Extração de DNA. Neste estudo, três metodologias de extração de DNA de *buffy-coat* ou sangue total foram avaliadas e modificadas para a obtenção de amostras de alta qualidade e rendimento a partir do sangue coagulado.

Método de extração por EZ-DNA. Após o descongelamento das amostras de sangue coaguladas, o DNA foi extraído, usando o kit de extração EZ-DNA (Biological Industries®, Kibbutz Beit Haemek, Israel), de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente, cerca de 500 µL de amostra foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, contendo 1 mL de solução de RCLB (do inglês, *red cell lysis blood*) e homogeneizados em vórtex por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 6.280g e o sobrenadante foi desprezado. Este procedimento foi repetido até a obtenção de um botão de células (pellet) o mais limpo possível. Após esta etapa, foi adicionado às amostras 1 mL de solução de RBC (do inglês, *red blood cell*), com homogeneização em vórtex por 20 minutos e centrifugação por 3 minutos a 6.280g. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados, em

seguida, 300 μL de solução de EZ-DNA. As amostras permaneceram 7 dias em banho-maria a 56°C para a dissolução máxima do pellet. Esse tempo foi padronizado para as amostras coaguladas. O DNA foi precipitado com 700 μL de álcool absoluto gelado e os microtubos centrifugados por 1 minuto a 7.700g. O sobrenadante foi desprezado e 500 μL de etanol 95% foram adicionados às amostras. Novamente, os microtubos foram centrifugados por 1 minuto a 7.700g, os quais após o descarte do sobrenadante foram mantidos abertos *over night* (15-18h) para a secagem do álcool. A seguir, o DNA foi hidratado com 50 μL de água ultra pura.

Extração de DNA pelo kit comercial de coluna. O DNA das amostras coaguladas foi extraído, utilizando-se o kit de extração por coluna NeoScience® (One Lambda Inc., San Diego, CA, USA) de acordo com as instruções. Cerca de 500 μL de amostra foram adicionados a microtubos de 1,5 mL contendo 20 μL de proteinase K, para a eliminação inicial de proteínas (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, foram acrescentados 200 μL de tampão 1.3, com o objetivo de lise das hemácias e lavagem da amostra, agitados por 1 minuto em vórtex e incubados por 15 minutos em banho-maria a 56°C. Após um pulso em microcentrífuga, para que toda a amostra fosse para o fundo do tubo, foram acrescentados 200 μL de etanol absoluto gelado, seguido de 1 minuto de agitação em vórtex. Mais um pulso em microcentrífuga foi realizado e as amostras foram transferidas para a coluna que estava acoplada ao microtubo de 2 mL. A seguir, foram centrifugados a 8.000g por 1 minuto. Descartou-se o microtubo contendo o filtrado, a coluna foi transferida para um microtubo limpo e foram acrescentados 500 μL do tampão 3.1 no interior da coluna. Após, foram centrifugados a 8.000g por 1 minuto. Mais uma vez, os microtubos contendo o filtrado foram desprezados, a coluna foi transferida para um novo microtubo de 2 mL e foram adicionados 700 μL de tampão 4.1 no interior da coluna. Foi realizada, a seguir, uma centrifugação de 14.000g por 3 minutos. Os microtubos contendo o filtrado foram descartados e as colunas transferidas para novos microtubos. A centrifugação com a coluna vazia foi realizada para

retirar o excesso de tampão que permaneceu na coluna, a 14.000g por 1 minuto. Esta coluna foi transferida, em seguida, para um microtubo de 1,5 mL. Uma solução de tampão 5.1 pré-aquecido a 65°C (40 µL) foi adicionada no interior da coluna e os microtubos foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 14.000g. Essa etapa foi repetida usando mais 30 µL de tampão 5.1 para retirar o restante de DNA da coluna. Finalmente, a coluna foi descartada e o DNA obtido em 50 µL de solução de hidratação.

Extração de DNA por *Salting Out*. Cerca de 500 µL de amostra foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e a eles foram acrescentados 1 mL de solução de RCLB. As amostras permaneceram sob agitação por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 14.000g, o sobrenadante foi descartado e o processo se repetiu até a obtenção de um precipitado mais claro possível. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e às amostras foram adicionados 40 µL de proteinase K, 20 U/mg (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), 20 µL de SDS (Sulfato Dodecil de Sódio, Sigma Chemical CO, Steinheim, Germany) a 20% e 240 µL de água ultra pura, com homogeneização em vórtex por 15 segundos. Os microtubos foram incubados em banho-maria a 56°C por 40 minutos, com uma leve agitação em vórtex aos 20 minutos. Após, elas foram retirados do banho a fim de atingirem a temperatura ambiente. Foram adicionados 100 µL de solução saturada de NaCl (6M), com agitação em vórtex e centrifugação por 5 minutos a 14.000g. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo contendo 100 µL de NaCl (6M), o qual foi centrifugado por 5 minutos a 14.000g. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo e foram acrescentados 800 µL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram vertidos e invertidos várias vezes, gentilmente, para a precipitação do DNA. Após, os mesmos foram centrifugados a 14.000g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol 70% gelado foram acrescentados às amostras, o que foi seguido de mais uma centrifugação de 14.000g por 2

minutos. Após estes procedimentos, o sobrenadante foi desprezado, os microtubos incubados *overnight* (15-18h) à temperatura ambiente para secagem do álcool e o DNA hidratado com 50 µL de água ultra pura.

Genotipagem HLA por PCR-SSO. A avaliação da pureza do DNA foi realizada por meio da diluição das amostras com reagente fluorescente para a possível leitura na plataforma Qubit (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). Após essa avaliação e ajuste da concentração, os genótipos HLA das amostras foram analisados pela técnica de PCR-SSO (*polimerase chain reaction - specific sequence of oligonucleotides*) (One Lambda Inc.®, Canoga Park, CA, USA) com tecnologia Luminex. Cada amostra de DNA, ajustada em 20 ng/µL, foi adicionada a uma solução tampão (dNTP e MgCl₂), juntamente com a enzima *Taq* DNA polimerase (5U/µL; Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), seguindo os volumes recomendados pelo protocolo para amplificação dos *loci*. Após homogeneização desta solução, alíquotas foram dispensadas em tubos de polipropileno contendo os iniciadores específicos para os *loci* HLA-A, B, Cw, DRB1, DQA1 e DQB1. Os tubos foram, então, transferidos para o termociclador (Pelkin-Elmer 9600) para a amplificação dos *loci*, conforme recomendações do fabricante. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese, em cuba micro SSP gel System (MGS-B, One Lambda Inc.®, Canoga Park, CA, USA), em gel de agarose a 2,0%, a 150 volts por 10 minutos. A visualização das bandas foi realizada com *Sybr Green* (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) em luz azul, e a interpretação dos resultados foi baseada na presença ou ausência do fragmento específico de DNA amplificado. As reações foram documentadas em fotografias (aparelho de fotografia Polaroid MP-4 Land). Os DNAs amplificados foram utilizados para a hibridização com pérolas ligadas a oligonucleotídeos específicos para estes alelos. A hibridização foi verificada por meio de um citômetro de fluxo LABScan™ 100 flow analyzer. A seguir, os dados foram interpretados por meio do programa de computador HLA Visualth (One Lambda, Canoga Park, CA, USA, versão 2.2.0).

Genotipagem *KIR* por PCR-SSP. Após avaliação da pureza do DNA e ajuste da concentração pelo Qubit, as tipificações dos genes *KIR* foram realizadas pela técnica PCR-SSP (*polymerase chain reaction-sequence specific primers*), usando o kit de genotipagem *KIR* padronizado *in house* (Rudnick *et al*: dados não publicados). Cada amostra de DNA, ajustada em 10 ng/μL, foi adicionada a uma solução de amplificação, previamente preparada, juntamente com a enzima *Taq* DNA polimerase (5U/μL; Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), segundo os volumes recomendados pelo protocolo. Após homogeneização desta solução, alíquotas foram dispensadas em microtubos de polipropileno, contendo os iniciadores específicos para os genes *KIR* (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). Os microtubos foram, então, transferidos para o termociclador (Pelkin-Elmer 9600), para a amplificação dos genes. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese, em cuba micro SSP gel System (MGS-B, One Lambda®, CA, USA), em gel de agarose a 2,5%, a 150 volts por 5 minutos. A visualização das bandas, quando expostas à luz azul, foi realizada pela coloração com *Sybr green* e a interpretação dos resultados foi baseada na presença ou ausência do fragmento específico de DNA amplificado. Para verificar a integridade da reação de PCR, foi utilizado um par de iniciadores como controle interno. As reações foram documentadas em fotografias (aparelho de fotografia Polaroid MP-4 Land).

RESULTADOS

As amostras extraídas pelo método EZ-DNA não se mostraram satisfatórias, pois, o DNA, após a extração, encontrou-se degradado (dados não mostrados) e não funcionou para as metodologias de amplificação propostas.

As amostras extraídas pelo kit comercial de coluna e por *salting-out* foram, primeiramente, avaliadas com relação à concentração de DNA com o leitor Qubit (Tabela 1) e por eletroforese em gel de agarose pela análise das bandas (Figura 1).

Como não foi possível quantificar o DNA pelo Qubit, nas amostras extraídas pelo kit comercial de coluna, devido às baixas concentrações obtidas (< 10 ng/mL), as concentrações foram baseadas na espessura das bandas observadas no gel de agarose para a realização da amplificação do DNA pelas técnicas de PCR-SSO e PCR-SSP.

Os resultados das amplificações dos éxons 2 e 3 para os *loci HLA* classe I e éxon 3 para os *loci HLA* classe II, na técnica de PCR-SSO, com o DNA obtido de uma amostra de sangue pelas duas técnicas de extração, podem ser vistos nas Figuras 2 e 3.

Os resultados da identificação dos genes *KIR*, usando a técnica PCR-SSP padronizada *in house* (Rudnick *et al*: dados não publicados), com o DNA obtido de uma amostra de sangue pelas duas técnicas de extração, podem ser vistos na Figura 4.

Os resultados das genotipagens *HLA* e *KIR*, com todas as amostras extraídas pelo método de *salting out*, foram validados por metodologias de uso corrente no mercado (PCR-SSO Luminex).

DISCUSSÃO

Independente da comparação, o método de extração de DNA por EZ-DNA não foi adequado quando o material biológico de origem foi o coágulo sanguíneo. As amostras de DNA obtidas não amplificaram por nenhuma das duas metodologias de PCR testadas e o procedimento foi demorado, porque para a dissolução do botão de células nucleadas na solução de EZ foi necessário um período de 5 a 7 dias, em banho-maria, a 56°C, o que pode ter contribuído para a degradação do DNA.

Quando as mesmas amostras foram extraídas pelo kit comercial de coluna, algumas apresentaram bandas mais evidentes no gel de eletroforese do que outras (Figura 1A). Este kit de coluna é utilizado, normalmente, para extração de amostras de sangue total e proporciona amostras de DNA de alta qualidade, porém a concentração não é tão alta. Algumas amostras,

obtidas por esse método, mesmo em baixa concentração, amplificaram pela PCR-SSO conforme mostrou a Figura 3, pois o DNA foi de qualidade muito boa. Mesmo assim, ocorreram muitas falhas, principalmente, nos *loci* A e C, por estes exigirem concentrações um pouco maiores de DNA.

Os melhores resultados puderam ser vistos com a extração pelo método de *salting out*, conforme visto na Figura 2. Todos os *loci* apresentaram ótimos padrões de amplificação que permitiram a posterior hibridização com sondas específicas para os alelos *HLA*.

Não foi possível a amplificação dos genes *KIR* pela técnica PCR-SSP (Rudnick *et al.*: dados não publicados), com as amostras obtidas pelo kit de coluna, pois ela exige uma concentração exata de 10 ng/mL e o equipamento Qubit não permitiu o ajuste adequado destas concentrações. Assim, o DNA extraído de amostras coaguladas por este kit de coluna não é conveniente para esta técnica de análise dos genes *KIR*. A melhor opção foi a adaptação da técnica caseira de *salting-out* para amostras coaguladas. Ela se mostrou bastante eficiente, pois as concentrações foram altas e possíveis de serem quantificadas pelo Qubit. A qualidade do DNA também foi satisfatória, pois o DNA foi amplificado por ambas as técnicas de PCR avaliadas.

Por isso, pode-se concluir que a técnica de *salting-out* é muito eficiente, simples e rápida para ser utilizada na extração de DNA de amostras de sangue humano coaguladas por qualquer laboratório de Biologia Molecular. Além disso, o DNA apresentou excelente qualidade e concentração adequada para amplificar os *loci HLA* e *KIR* pelas técnicas de biologia molecular PCR-SSO-Luminex e PCR-SSP *in house*, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos funcionários do Laboratório de Imunogenética da UEM pelo apoio técnico e aqueles da Secretaria de Saúde deste município que colaboraram na obtenção das

amostras de sangue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adkins KK, Strom DA, Jacobson TE, Seemann CR, O'Brien DP, Heath EM. Utilizing Genomic DNA Purified From Clotted Blood Samples for Single Nucleotide Polymorphism Genotyping. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 126:266-270, 2002.
2. Everson RB, Mass MJ, Gallagher JE, Musser C, Dalzell J. Extraction of DNA from Cryopreserved Clotted Human Blood. *Biotechniques* 15:18-20, 1993.
3. Garg UC, Hanson NQ, Tsai MY, Eckfeldt JH. Simple and Rapid Method for Extraction of DNA from fresh and Cryopreserved Clotted Human Blood. *Clinical Chemistry* 42:647-648, 1996.
4. Zeillinger R, Schneeberger C, Speiser P, Kury F. A Simple Method for Isolation of DNA from Blood Clots Suited for use in PCR. *Biotechniques* 14:202-203, 1993.

Tabela 1. Comparação entre as concentrações de DNAs obtidos por dois métodos de extração.

AMOSTRA
DP-08
DP-10
DP-11
DP-66
DP-72
DP-73
DP-74
DP-78
DP-84
DP-88
DP-89
DP-90
DP-91
DP-92
DP-95
DP-99
DP-101
DP-105
DP-106
DP-111
DP-116
DP-123
DP-124
DP-149
DP-206
DP-180
DP-218
DP-225
DP-226
DC-34
DC-36
DC-40
DC-107
DC-164
DC-166
DC-167
DC-168
DC-169
DC-170
DC-171
DC-172
DC-174
DC-175
DC-176
DC-178
DC-179

DC-180

DC-181

x = amostras cuja concentração foi menor que 1 ng/μL; *One Lambda Inc. (San Diego, CA, USA). As conc

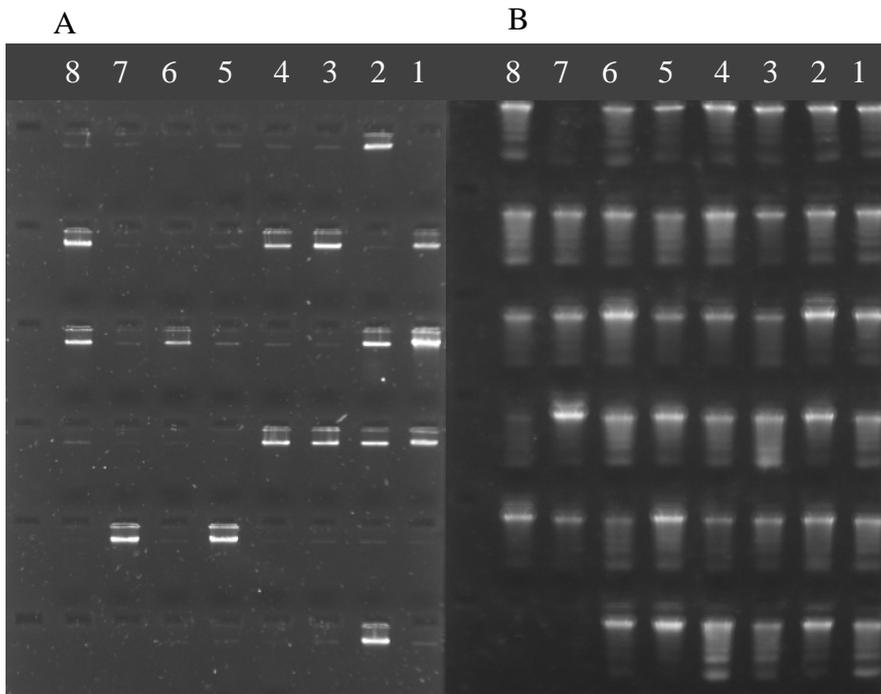


Figura 1. Análise da concentração ou integridade do DNA. A: Gel para avaliação das concentrações da depositada para a corrida eletroforética.

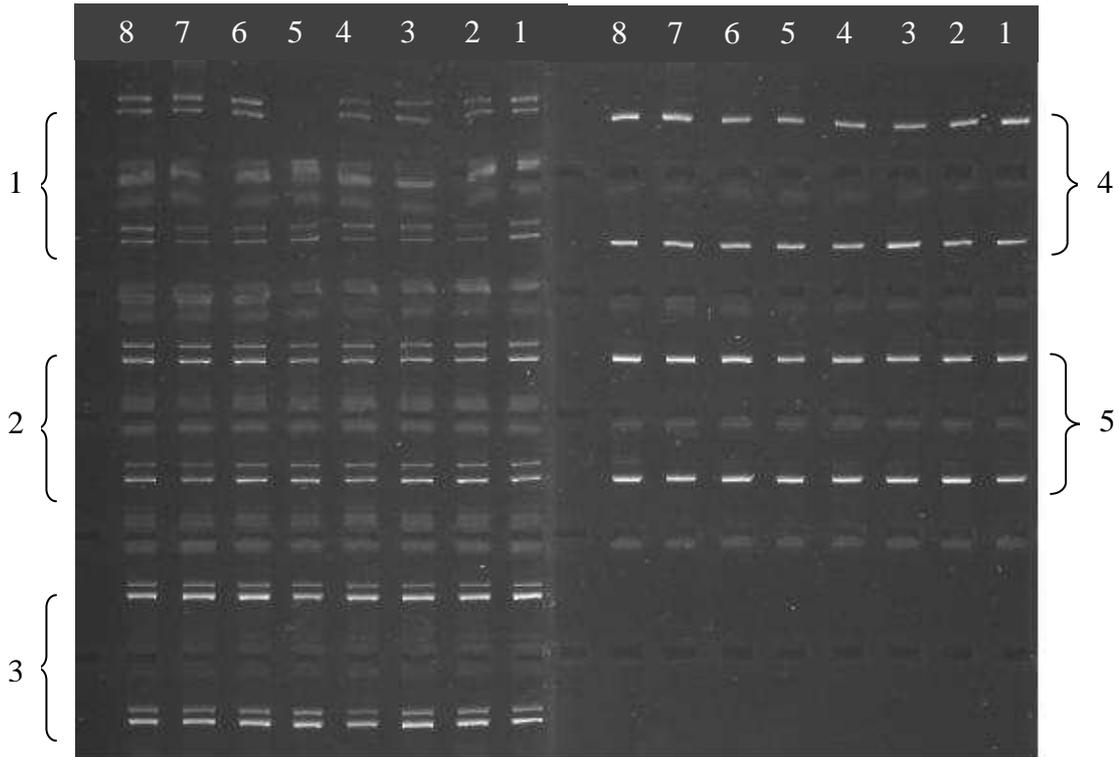


Figura 2. Amplificação dos *loci* HLA-A, B, Cw, DRB1 e DQA1/DQB1 de 16 amostras de DNAs extraído onde cada amostra de DNA foi depositada para a corrida eletroforética.

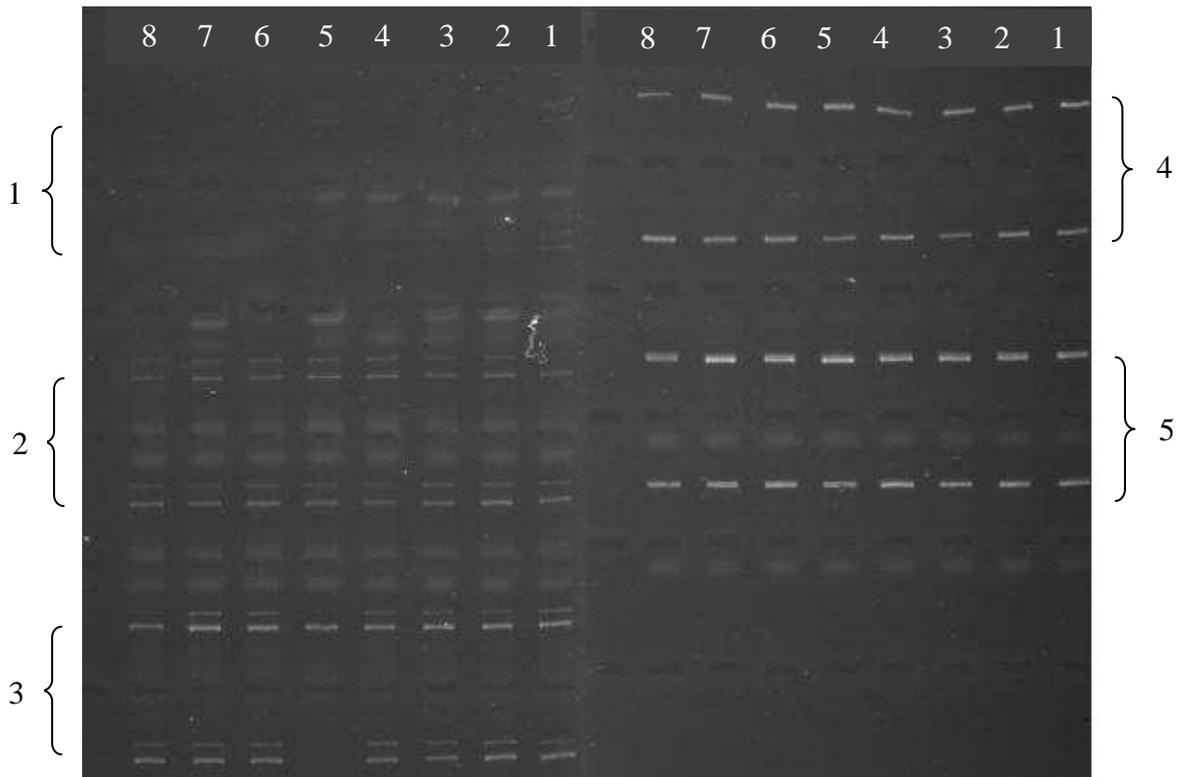


Figura 3. Amplificação dos *loci* HLA-A, B, Cw, DRB1 e DQA1/DQB1 de 16 amostras de DNA extraídos por PCR em 16

colunas onde cada amostra de DNA foi depositada para a corrida eletroforética.

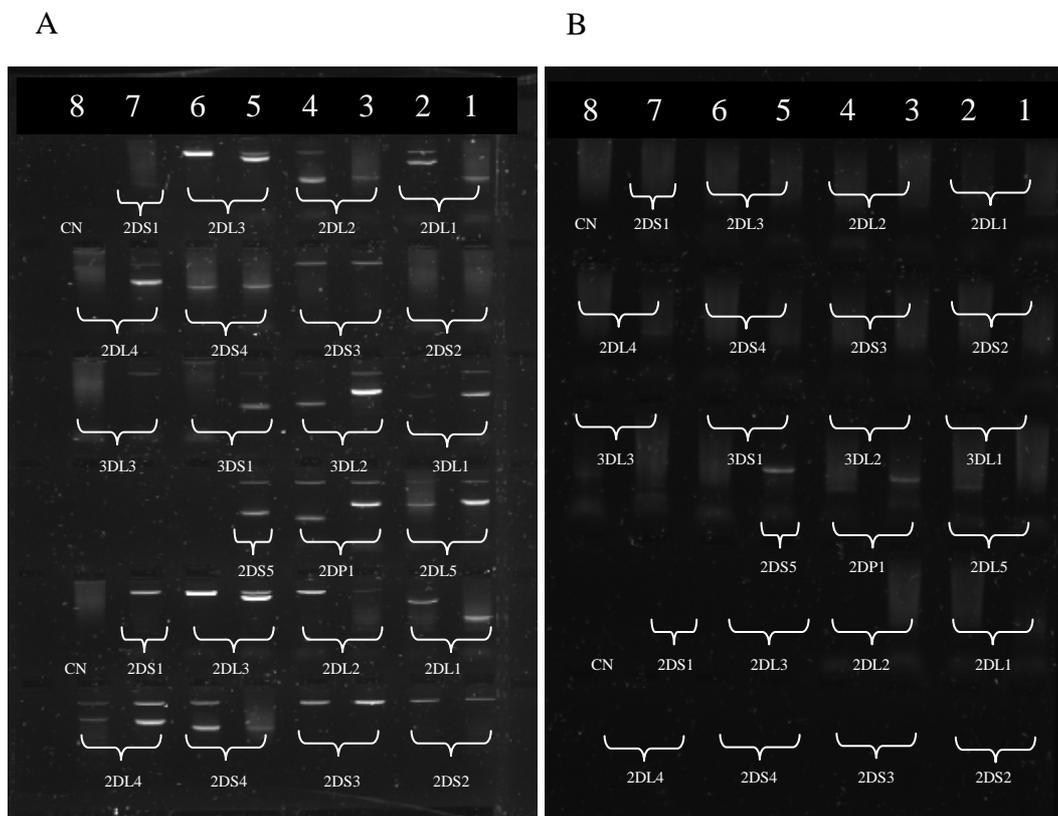


Figura 4. Genotipagem de 15 genes *KIR* por PCR-SSP de uma amostra de DNA. A: genotipagem *KIR* de obtido por kit comercial de coluna. Os números acima no gel representam as colunas onde cada amostra de l

CAPÍTULO II

**Artigo: “INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE GENES HLA NA
SUSCEPTIBILIDADE AO DENGUE NO SUL DO BRASIL.”**

INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE GENES HLA NA SUSCEPTIBILIDADE AO DENGUE NO SUL DO BRASIL

Daniela Maira Cardozo¹, Gláucia Andréia Guelsin¹, Fabiano Cavalcante de Melo¹, Marco Antonio Braga¹, Cleonice Souza², Ricardo Alberto Moliterno¹, Jeane Eliete Laguila Visentainer¹

¹Laboratório de Imunogenética, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

²15ª Regional de Saúde da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, Maringá, Paraná, Brasil

Running Title: HLA e Dengue

Endereço para correspondência

Dr. Jeane Eliete Laguila Visentainer

Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Análises Clínicas - Laboratório de Imunogenética

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

Phone number: (+55 44) 3261-4864 / FAX number: (+55 44) 3261-4931

E-mail address: jelvisentainer@uem.br; jelvisentainer@gmail.com

RESUMO

Dengue é a doença viral transmitida por vetores artrópodes de maior incidência de casos por ano no mundo todo. Anualmente, existe uma estimativa de 50 - 100 milhões de casos de dengue no mundo. Além de fatores ambientais, os fatores genéticos parecem ter importância na manifestação da doença, pois mesmo em áreas endêmicas somente uma pequena proporção de pessoas desenvolve a forma mais grave. Polimorfismos de genes de resposta imune poderiam estar associados com o desenvolvimento de casos de dengue. A proposta deste estudo foi determinar as frequências dos alelos dos locos HLA-A, B, Cw, DRB1, DQA1 e DQB1, em uma população com dengue vírus 3, confirmado por métodos sorológicos de ELISA e em uma população controle com sorologia negativa, da região Noroeste do Paraná, Sul do Brasil. A tipificação dos alelos HLA destas populações foi realizada pela genotipagem PCR-SSO (One Lambda), baseada na tecnologia Luminex. Os alelos HLA-A*31 e A*69 e o genótipo homocigoto para DQB1*0402 foram associados à proteção contra o dengue clássico sorotipo 3, enquanto o alelo HLA-A*66 foi associado à susceptibilidade. No entanto, estudos independentes devem ser realizados para replicação destes achados.

Palavras-chave: *Dengue, HLA, Polimorfismo genético*

Abstract

Dengue fever is a viral disease of most concern vectors transmitted by arthropods. Each year there is an estimated 50 to 100 million cases of dengue fever in the world. Besides environmental factors, genetic factors seem important in the manifestation of the disease, even in endemic areas because only a small proportion of people develop a more severe form. Immune response gene polymorphisms could be associated with the development of dengue cases. The purpose of this study was to determine the allele frequencies: HLA-A, B, Cw, DRB1, DQA1 and DQB1, in a population with dengue serology and confirmed by a population with symptoms but with negative serology, from Southern Brazil. A comparison of the frequencies of HLA alleles between these populations, by PCR-SSO genotyping based on Luminex technology, allowed determining association of HLA genes with protection and susceptibility to dengue in our region. There was negative association between HLA-A*31, A*69, A*31-B*40, B*40-Cw*03, B*58-Cw*07, DQA1*02-DQB1*03 and DQB1*0402/*0402, and dengue. HLA-A*66 was more frequent in patients than in controls, acting as a susceptibility gene for the disease. For HLA-A*31 and A*66, the values of *P* became not significant after Bonferroni's correction. Thus, some HLA genetic factors were associated with classic dengue, serotype 3, in Southern Brazilian population.

Keywords: *Dengue fever, HLA, Genetics polymorphisms*

INTRODUÇÃO

Dengue é uma doença viral transmitida por vetores artrópodes e, atualmente, é considerada um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Anualmente, existe uma estimativa de 50 milhões de casos de dengue. Apenas em 2007, nas Américas, foram notificados mais de 890.000 casos de dengue, dos quais 26.000 foram de dengue hemorrágica (WHO, 2008).

O vírus do dengue é membro da família *Flaviviridae* (arbovírus do grupo B) (Veronesi *et al.*, 1996) e, atualmente, se conhecem quatro sorotipos do vírus, DEN 1, 2, 3 e 4, os quais são fortemente relacionados antigenicamente. Os sorotipos 1, 2 e 3 circulam em 24 estados brasileiros, contribuindo assim para a incidência das formas mais graves da doença (dengue hemorrágico e síndrome do choque do dengue) nos municípios onde são registradas epidemias sequenciais por pelo menos dois sorotipos diferentes. Por outro lado, a virulência da cepa epidêmica também pode ser o determinante principal do desenvolvimento da forma hemorrágica (Câmara *et al.*, 2007).

Em 2002, com a introdução do vírus DEN-3, foi registrado o maior pico epidêmico da doença no Brasil e a taxa de letalidade foi duas vezes maior, revelando uma maior gravidade na ocorrência da doença. Em 2007, 86% dos casos de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) estavam concentrados nos estados do Ceará, Rio de Janeiro, Maranhão, Pernambuco, Amazonas, Mato Grosso do Sul, Piauí, Goiás, Alagoas, Paraíba e Rio Grande do Norte. Em relação aos óbitos por FHD, 64% aconteceram nesses estados (Brasil, 2007).

Em 2007, um dos estados com maior número de casos confirmados de dengue sorotipo 3 foi o Paraná: aproximadamente, 50.000 casos notificados, sendo 25.998 confirmados e, destes, 25.000 autóctones. Um dos municípios mais afetados foi o de Maringá, com cerca de 5.700 casos confirmados, sendo considerado o 8º em maior taxa de incidência de dengue no país (Paraná, 2008).

A resposta imunológica que ocorre com a introdução do vírus no organismo humano é considerada muito vigorosa. Anticorpos, principalmente os que se ligam aos epítomos da proteína E, promovem lise do envelope ou bloqueio de seus receptores com consequente neutralização viral (Figueiredo, 1999). A resposta imune celular citotóxica por linfócitos T é descrita sob estímulo das proteínas NS1, NS3 e E dos vírus do dengue (Chambers *et al.*, 1990; Henchal *et al.*, 1998). Linfócitos T CD4 atuam na eliminação de células infectadas com o vírus do dengue que possuem receptores HLA de classe II e, produzem IFN- γ , IL-2 e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos. Linfócitos T CD8 lisam células infectadas pelo vírus expressando receptores HLA de classe I. Portanto, as células T participam ativamente na resposta imune, reduzindo o número de células infectadas com o vírus.

Fatores genéticos parecem ter importância na manifestação da doença, pois mesmo em áreas endêmicas somente uma pequena proporção de pessoas desenvolve a forma mais grave do dengue. Durante a infecção pelo vírus do dengue uma série de genes tem seu mecanismo de regulação alterado. Dentre eles, genes ligados à alta produção de IFN- γ , além de MIP-1 β , RANTES, MBL2, IL-8 e IL-10 (Ubol *et al.* 2008, Santos *et al.*, 2008). Além disso, alguns estudos mostraram restrição HLA na apresentação de certos peptídeos do vírus do dengue para linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (Zeng *et al.*, 1996; Mathew *et al.*, 1998; Loke *et al.*, 2001; Zivna *et al.*, 2002; Simmons *et al.*, 2005).

Estudos no México mostraram o alelo HLA-DRB1*04 como um fator de proteção contra dengue hemorrágico (LaFleur *et al.*, 2002), enquanto na Tailândia, os alelos HLA-A e B foram associados a infecções secundárias, nas formas clássica e hemorrágica do dengue (Stephens *et al.*, 2002). No Vietnã, Loke *et al.* (2001) descreveram que crianças com HLA-A*33 são menos susceptíveis ao dengue hemorrágico e aquelas com HLA-A*24 têm risco maior de desenvolver um quadro hemorrágico. Em Santiago de Cuba foi demonstrada

associação de HLA-A*31, B*15 e DRB1*07 com dengue clássico e hemorrágico (Sierra *et al.*, 2007).

Numa população brasileira, Polizel *et al.* (2004) encontraram forte associação de genes HLA-DQ1 em pacientes com dengue clássico no Norte do estado do Paraná, em uma epidemia ocorrida em 1995, caracterizada pela presença do sorotipo 1.

Devido ao fato de que a moderna população brasileira é geneticamente muito diferentes em termos de polimorfismo alelo HLA (Louzada 2001), e porque os pacientes desta área apresentam aspectos clínicos e epidemiológicos da dengue sorotipo 3, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência dos alelos HLA na susceptibilidade e resistência à dengue, no Noroeste do Estado do Paraná (Brasil).

MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas preconizadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (Brasil).

Pacientes e Controles

Participaram deste estudo 420 sujeitos da região Noroeste do estado do Paraná (Sul do Brasil), no ano de 2007. As amostras foram liberadas pela Secretaria de Saúde de Maringá e obtidas durante visitas domiciliares, após assinatura de termo de consentimento.

O diagnóstico da doença foi confirmado por técnicas de sorologia (ELISA-IgM Capture Kit, Brisbane, Australia), para detecção quantitativa de anticorpos IgM ao antígeno do dengue. O sorotipo 3 do vírus foi confirmado através de cultura pelo Laboratório Central de doenças infecciosas do Paraná.

Dentre os 420 indivíduos, aqueles cuja sorologia foi positiva formaram o grupo de pacientes (N = 239) e aqueles que apresentaram sintomas semelhantes e sorologia negativa

formaram o grupo controle (N = 181).

Obtenção das amostras

As amostras coletadas, para a realização de sorologia de detecção de anticorpos IgM específicos para o vírus da dengue, foram obtidas sem anticoagulante para obtenção dos soros. Os coágulos formados durante este processo foram armazenados em freezer -80°C para posterior extração do DNA.

Durante as visitas domiciliares, amostras de 10 mL de sangue foram coletadas em tubos com EDTA (anticoagulante) e, posteriormente, centrifugadas para a obtenção do *buffy-coat*, o qual foi congelado a -20°C até o momento da extração do DNA.

Extração do DNA e genotipagem HLA

O DNA das amostras coaguladas foi extraído utilizando-se o kit de extração por coluna NeoScience® (One Lambda Inc., San Diego, CA, USA) ou a técnica de extração de DNA por *salting out* (John *et al.*, 1990, modificada por Lahiri e Nurnberger, 1991), com modificações (Cardozo *et al.*, *in press*). Após o descongelamento do *buffy-coat* das amostras obtidas com anticoagulante, o DNA foi extraído usando-se o kit de extração EZ-DNA (Biological Industries®, Kibbutz Beit Haemek, Israel).

Após avaliação da pureza do DNA por eletroforese em gel de agarose e ajuste da concentração por densidade ótica, os genótipos dos pacientes e controles foram analisados pela técnica de PCR-SSO (*polimerase chain reaction - specific sequence of oligonucleotides*) reversa (One Lambda Inc.®, Canoga Park, CA, USA) com tecnologia Luminex.

Análise estatística

As frequências alélicas foram obtidas por contagem direta e as frequências genótípicas e haplotípicas pelo programa Arlequin versão 3.1 (Bern, Switzerland) disponível no site <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>.

Pacientes e controles foram comparados em relação a estas frequências pelo teste do qui-quadrado com correção de Yates ou Teste Exato de Fisher, usando-se tabelas de contingência 2x2. O risco de desenvolver dengue em indivíduos portadores de determinados alelos HLA foi calculado por OD (*odds ratio*) e intervalo de confiança (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>).

Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos após a correção de Bonferroni para múltiplas comparações. A correção foi realizada pela multiplicação dos valores de P pelo número de locos HLA avaliados. O desequilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo programa Arlequin versão 3.1 (Bern, Switzerland) disponível no site <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>.

RESULTADOS

Dentre os 420 indivíduos que participaram do estudo, 239 (56,9%) apresentaram sintomas clínicos para o dengue clássico e confirmação da doença por exames sorológicos de ELISA. Este grupo foi constituído por 53,5% mulheres e 46,4% homens, com idade entre 6 a 75 anos ($35,5 \pm 17,0$), sendo 88,0% caucasóides, 8,3% pardos e 3,7% negros. O outro grupo, de indivíduos com sintomas clínicos para o dengue clássico e exames sorológicos de ELISA negativos para dengue, foi constituído de 181 indivíduos (43,1%); sendo 58,6% mulheres e 41,4% homens, com idade entre 7 e 80 anos ($36,9 \pm 17,0$); sendo 87,3% caucasóides, 8,8% pardos e 3,9% negros.

Todos os controles apresentaram sintomas clínicos compatíveis com dengue durante

uma epidemia de dengue ocorrida durante o primeiro semestre de 2007, caracterizada pela presença do sorotipo 3 e, nenhum deles apresentou sintomatologia para o dengue hemorrágico.

Frequências de alelos HLA classe I e II entre indivíduos com sorologia positiva e negativa ao dengue

Nas Tabelas 1 e 2, são apresentadas as frequências dos alelos HLA de classe I e II, respectivamente, as quais estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg nesta população.

Na comparação das frequências HLA entre os dois grupos analisados, foi observada uma maior frequência de HLA-A*31 e A*69 no grupo sorologicamente negativo ao dengue, enquanto o alelo HLA-A*66 foi mais freqüente em pacientes que apresentaram sorologia positiva. Após a correção de Bonferroni, somente o valor de *P* para A*66 perdeu a significância estatística. As frequências dos demais alelos não foram diferentes entre os grupos.

Distribuição de haplótipos HLA classe I e II entre pacientes e controles

A análise da distribuição dos haplótipos entre pacientes e controles mostrou que HLA-A*31-B*40, B*40-Cw*03, B*58-Cw*07 e DQA1*02-DQB1*03 (dados não mostrados) estavam aumentados no grupo controle em relação aos pacientes. Contudo, estes dados devem ser analisados com cuidado, devido à baixa frequência destes genótipos nesta população.

Distribuição das frequências genóticas de HLA-DQB1*0402

A Tabela 3 apresenta os dados das análises do genótipo de DQB1*0402, o qual apresentou diferença nas frequências entre pacientes e controles. O genótipo homozigoto

DQB1*0402/0402 foi mais frequente em indivíduos com sorologia negativa para dengue, apesar do alelo DQB1*04 não ter apresentado associação.

Não houve diferença estatisticamente significativa para os outros genótipos analisados.

DISCUSSÃO

O Brasil é um país tropical que nos dois últimos anos apresentou as maiores epidemias de dengue, além de apresentar uma população extremamente miscigenada, portanto, distinta do ponto de vista genético, em cada região. Desta forma, o presente estudo avaliou uma população do Município de Maringá (Noroeste do estado do Paraná e Sul do Brasil), a qual passou pela maior epidemia de dengue pelo vírus sorotipo 3 em 2007, com 5.700 casos confirmados, tendo sido considerado o 8º município em maior taxa de incidência de dengue no país (Boletim Informativo Dengue Paraná, 2008).

A seleção dos indivíduos foi baseada na sintomatologia característica do dengue e na confirmação do diagnóstico da infecção por exames sorológicos pelo método de ELISA para detecção de anticorpos IgM. O objetivo foi verificar uma possível associação entre genes HLA e a epidemia ocorrida naquele momento em que os pacientes apresentaram sintomas semelhantes ao dengue, não envolvendo nenhuma epidemia anterior.

Neste trabalho, foi demonstrada uma associação negativa dos alelos HLA-A*31 (2,6% vs. 6,8%) e A*69 (0% vs. 0,6%) com o dengue, sugerindo possíveis fatores de resistência à manifestação da doença. Contudo, estudos com um número maior de pacientes devem ser realizados para confirmar estes dados, devido à baixa frequência destes alelos, principalmente, de HLA- A*69.

Associações positivas de HLA-A*31 já foram relatadas em indivíduos com AIDS e citomegalovírus em uma população brasileira (Veronese *et al.*, 2003) e com dengue sorotipo 2 em Cuba (Sierra *et al.*, 2007). Diferenças desta natureza podem ocorrer devido à seleção dos

controles, uma vez que em Cuba, o grupo controle foi constituído por indivíduos saudáveis e, neste presente estudo, por indivíduos com manifestações clínicas semelhantes às daquelas do dengue e sorologia negativa para o vírus daquela epidemia. Outras diferenças podem estar ligadas às características étnicas das populações. A população de Santiago del Cuba representa um município localizado na porção oriental do país, a qual recebeu por um longo período de tempo influências genéticas aborígenes. Na população caucasiana do estado do Paraná, a frequência alélica de HLA-A*31 é 4,3%, enquanto que na população caucasiana de Cuba é 1,4% (<http://www.allelefrequencies.net/test/default1.asp>).

Além disso, o sorotipo do vírus não foi o mesmo para as duas epidemias. Em Cuba, a epidemia foi caracterizada pelo sorotipo 2 e no Brasil pelo sorotipo 3. Diferenças nas sequências do envelope e das porções não transcritas 5' e 3' do genoma de cada sorotipo podem provocar divergências na resposta imune (Pryor *et al.*, 2001; Cologna *et al.*, 2005).

O alelo HLA-A*69, também de baixa frequência nesta população, foi inicialmente sequenciado em populações negras da América do Norte (<http://www.allelefrequencies.net/test/default1.asp>), sendo relatado no 9º Workshop Internacional de Histocompatibilidade como uma variante do HLA-A*28 (Antonelli *et al.*, 1985). Ele é considerado um alelo raro em todas as populações onde foi relatado. Na população Zulu (África), sua frequência é de 0,45%, em Xiamen (China) é 0,62%. Este alelo é mais frequente na Itália e Israel: 1,98% e 2,5%, respectivamente (Terasaki *et al.*, 1997). Por isso, ainda é necessário um estudo com maior número de pacientes e controles.

Uma associação positiva foi encontrada no presente estudo para o alelo HLA-A*66, cuja frequência foi maior nos pacientes que nos controles (2,0% vs. 0,3%). A frequência deste alelo é baixa na população caucasiana do Paraná, 0,7%, sendo um pouco mais alta entre negros e cafuzos (1,3%). Já no estado de São Paulo, este alelo tem frequência zero (0,0%), assim como em outros países como China, Bulgária e Itália. Cuba é o país onde se observa a

maior frequência de A*66 (2,3% a 2,9%) tanto em brancos quanto em negros (<http://www.allelefrequencies.net/test/default1.asp>).

Não existem relatos deste alelo associado à infecção pelo vírus do dengue e, embora tenha apresentado diferença significativa entre os grupos nesta população, após a correção de *P* esta associação não se manteve.

A análise haplotípica foi realizada com o objetivo de verificar se os alelos combinados têm influência na evolução do dengue clássico e a existência de desequilíbrio de ligação. Os haplótipos HLA-A*31-B*40, HLA-B*40-Cw*03 e B*58-Cw*07 foram correlacionados à proteção contra o dengue. O alelo HLA-B*40 não demonstrou nenhuma associação com o dengue, porém sugere-se que a associação com A*31 possa contribuir à resistência ao vírus do dengue.

Estudos apontaram o alelo HLA-B*40 como fator de susceptibilidade à co-infecção com HIV e *Mycobacterium tuberculosis* (Selvaraj *et al.*, 2006) e o haplótipo B*58-Cw*03 como fator de resistência a infecções por HIV em populações africanas (Lazaryan *et al.*, 2006). No entanto, não existem relatos de associação destes haplótipos com o dengue clássico.

Alguns estudos de associação HLA e dengue foram realizados por Loke *et al.* (2001), usando análise molecular de alelos HLA classe I em pacientes no Vietnã. Houve evidências de associação do alelo HLA-A*24 com a susceptibilidade ao dengue hemorrágico e do HLA-A*33 com a resistência à infecção viral.

Recentemente, o segundo e maior estudo caso-controle foi realizado com indivíduos da etnia Thai (Tailândia) infectados pelo vírus do dengue, demonstrando associação negativa dos alelos HLA-A*0203, B*44, B*62, B*76 e B*77 e associação positiva de HLA-A*0207 e B*52 com o dengue clássico (Stephens *et al.*, 2002).

Um estudo realizado por Polizel *et al.* (2004), com indivíduos da mesma região do presente trabalho, demonstrou associação positiva de HLA-DQ1 para o dengue clássico

sorotipo 1 da dengue (57,7% vs. 76,6%; $P = 0,0052$; $P_c = 0,0262$). Enquanto, neste presente estudo, as frequências de HLA-DQ1 (DQB1*05 e DQB1*06) foram semelhantes entre os grupos (42,1% nos pacientes e 41,7% nos controles). A associação observada foi entre a homozigose de DQB1*0402 e a proteção ao dengue, pois todos os indivíduos homozigotos pertencem ao grupo controle (2,1% vs. 0%), o que pode sugerir que subtipos diferentes de vírus possam ser reconhecidos por alelos HLA diferentes. Este alelo já foi considerado fator de proteção contra infecções pelo papilomavírus em crianças africanas (Gregoire *et al.*, 2003).

Em conclusão, o presente estudo sugere que os alelos HLA-A*31 e HLA-A*69 e de DQB1*0402 em homozigose possam atuar como fatores de resistência para o dengue clássico numa população do Noroeste do Paraná, Sul do Brasil. No entanto, estudos futuros independentes, com um número maior de indivíduos da mesma região ou de regiões diferentes afetadas pelo mesmo sorotipo de vírus da dengue, devem ser realizados para confirmação das associações HLA observadas neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allele Frequencies in Worldwide Populations, disponível em:
<http://www.allelefrequencias.net/test/default1.asp>.
- Antonelli, P., Choo, S. Y., Nisperos, B. & Hansen J. A. (1985) A monoclonal antibody recognizing shared by HLA-A2 and HLA-Aw69 (A28* variant). *Tissue Antigens* 26 (2):114-120.
- Câmara, P. F., Theophilo, R. L. G., Santos, G. T., Pereira, S. R. F. G., Câmara, D. C. P. & Matos, R. R. C. (2007) Estudo retrospectivo (histórico) de dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. *Rev Soc Bras de Med Trop* 40(2): 192-196.
- Cardozo, D. M., Guelsin, G. A., Clementino, L. C., Melo, F. C., Braga, M. A., Moliterno, R. A., Visentainer, J. E. L. Padronização de extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para a aplicação nas técnicas de genotipagem HLA e de genes KIR. *In Press*.
- Chambers, T. J., Hahn, C. H., Galler, R. & Rice C. (1990) M. Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. *Ann Rev Microbiol* 44: 649-688.
- Cologna, R., Armstrong, P. M. & Rico-Hesse, R. (2005) Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* 79:853-859.
- Figueiredo, L. T. M. (1998) Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. *Virology* 32: 15-20.
- Gregoire, L., Reidy, P. M., Rabah, R., Lancaster, W. D. (2003) HLA-DQ Alleles in white and African American patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129(11):1221-1224.
- Henchal, E. A., Henchal, L. S. & Schlesinger, J. J. (1998) Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice lethal challenge with dengue-2 virus. *J Gen Virol* 609: 2101-2107.

- John, S. W. M & Kim, Y. S. (1990) Factors on graft survival of living donor kidney transplantation in a single centre. *Clin Transplant* 192: 408.
- LaFleur, C., Granados, J., Alarcon, G. V., Morales, J. R., Garza, C. V., Higuera, L., Pacheco, G. H., Moguel, T. C., Rangel, H., Figueroa, R., Acosta, M., Lazcano, E. & Ramos, C. (2002) HLA-DR Antigen Frequencies in Mexican Patients with Dengue virus infection: HLA-DR4 as a Possible Genetic Resistance Factor for Dengue Hemorrhagic Fever. *Hum Immunol* 63: 1039-1044.
- Lazaryan, A., Lobashevsky, E., Mulenga, J., Karita, E., Allen, S., Tang, J. & Kaslow, R. A. (2006) Human leukocyte antigen B58 supertype and Human Immunodeficiency virus type 1 infection in native Africans. *J Virol* 80:6056-6060.
- Loke, H., Bethell, D. B., Phuong, C. X. T., Dung, M., Schneider, J., White, N. J., Day, N. P., Farrar, J. & Hill, A. V. S. (2001) Strong HLA Class I-Restricted T Cells Responses in Dengue Hemorrhagic Fever: A Double-Edged Sword? *J Infect Dis* 184:1369-1373.
- Mathew, A., Kurane, I., Green, S., Stephens, H. A., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S., Suntayakorn, S., Chandanatingyong, D., Ennis, F. A. & Rothman, A. L. (1998) Predominance of HLA-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotype-cross-reactive epitopes on nonstructural proteins following natural secondary dengue virus infection. *J Virol* 72: 3999-4004.
- Nishimura, Y., Kamikawaji, N., Fujisawa, K., Yoshizumi, H., Yasunami, M., Kimura, A. & Sasazuki, T. (1991) Genetic control of immune response and disease susceptibility by HLA-DQ gene. *Res Immunol* 142: 559-566.
- Polizel, J. R., Bueno, D., Visentainer, J. E. L., Sell, A. M., Borelli, S. D., Tsuneto, L. T., Dalalio, M. M. O., Coimbra, M. T. M. & Moliterno, R. A. (2004) Association of Human Leukocyte Antigen DQ1 and Dengue Fever in a White Southern Brazilian Population. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(6): 559-562.

- Pryor, M. J., Hocking, H., Davidson, A. D. & Wright, P. J. (2001) Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg* 65:427-434.
- Santos, B. A., Segat, L., Dhalia, R., Brito, C. A. A., Neto, U. M. B., Marques, E. T. A., Crovella, S. (2008) MBL2 Gene polymorfisms protect against development of thrombocytopenia associated with sever dengue phenotype. *Human Immunology* 69:122-128.
- Secretaria de Saúde do Estado do Paraná - SESA. Boletim Informativo Dengue nº 01/2008, Paraná, 2008.
- Selvaraj, P., Swaminathan, S., Alagarasu, K., Raghavan, S., Narendran, G. & Narayanan, P. R. (2006) Association of Human Leukocyte antigen A11 with resistance and B40 and DR2 with susceptibility to HIV-1 infection in South Asian. *J Acquir Immune Defic Syndr* 43:497-498.
- Sierra, B., Alegre, R., Pérez, A. B., García, G., Ramirez, K. S., Obasanjo, O., Aguirre, E., Alvarez, M., Roche, R. R., Valdés, L., Kanki, P. & Guzmán, M. G. (2007) HLA-A, B, C, and DRB1 allele frequencies in Cuba individuals with antecedents of dengue 2 disease: Advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue infection. *Hum Immunol* 68: 531-540.
- Simmons, C. P., Dong, T., Chau, N. V., Dung, N. T. P., Chau, T. N. B., Thao, L. T. T., Dung, N. T., Hien, T. T., Jones, S. R. & Farrar, J. (2005) Early T-Cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. *J Virol* 79:5665-5675.
- Stephens, H. A. F., Klaythong, R., Sirikong, M., Vaughn, D. W., Green, S., Kalayanarooj, S., Endy, T. P., Libraty, D. H., Nisalak, A., Innis, B. L., Rothman, A. L., Ennis, F. A. &

- Chandanayingyong, D. (2002) HLA-A and B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens* 60: 309-318.
- Terasaki, P. & Gjertson, D. (1997) HLA 1997. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1-475.
- Ubol, S., Masrinoul, P., Chaijaruwanich, J., Kalayanarooj, S., Charoensrisuthikul, T. & Kasisith, J. (2008) Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of Dengue Fever but not Dengue Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* 197:145914-67.
- Veronesi, R. & Focaccia, R. (1996) Tratado de Infectologia. Ed. Atheneu, São Paulo, p. 201-214.
- Veronese, Rodrigues Mde L., de Castro Figueiredo, J. F., Deghaide, N. H., Romão, E., Vieira de Souza N. & Donadi, E. A. (2003) Frequency of HLA class 1 and 2 alleles in Brazilian patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis. *Acta Ophthalmol Scand* 81:514.
- World Health Organization. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet N°117, Revised May 2008. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/> Acesso em: 13 outubro 2008.
- Zeng, L., Kurane, I., Okamoto, Y., Ennis, F. A. & Brinton M. A. (1996) Identification of Amino Acids involved in recognition by dengue virus NS3-specific HLA-DR15-restricted Cytotoxic CD4+ T-Cell clones. *J Virol* 70:3108-3117.
- Zivna, I., Green, S., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S., Stephens, H. A. F., Chandanayingyong, D., Nisalak, A., Ennis, F. A. & Rothman, A. L. (2002) T Cell responses to an HLA-B*07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. *J Immunol* 168: 5959-5965.

Tabela 1. Comparação das frequências dos alelos HLA classe I, entre controles e pacientes com diagnóstico clínico-sorológico de dengue clássico no sul do Brasil, ocorrido em 2007 durante uma epidemia com o vírus 3.

HLA	D (%)	C (%)	HLA	D (%)	C (%)	HLA	D (%)	C (%)
A*01	9,5	6,2	B*07	6,8	8,5	Cw*01	2,6	1,7
A*02	24,1	27,8	B*08	4,3	4,0	Cw*02	8,1	5,4
A*03	11,1	9,4	B*13	2,1	2,0	Cw*03	8,8	9,7
A*11	5,7	4,3	B*14	3,4	3,7	Cw*04	18,3	15,7
A*23	5,9	4,5	B*15	9,6	9,1	Cw*05	4,3	6,8
A*24	10,4	11,1	B*18	5,5	5,7	Cw*06	10	7,7
A*25	2,2	1,1	B*27	2,1	1,1	Cw*07	19,9	24,4
A*26	3,3	4,5	B*35	13,4	10,5	Cw*08	4,0	5,7
A*29	4,6	2,8	B*37	0,8	1,1	Cw*12	8,8	6,8
A*30	5,4	4,8	B*38	3,2	4,3	Cw*14	2,0	2,8
A*31 ^a	2,6	6,8	B*39	2,8	3,7	Cw*15	5,0	5,4
A*32	3,0	3,4	B*40	2,9	6,0	Cw*16	4,2	6,2
A*33	2,6	2,5	B*41	2,1	1,7	Cw*17	3,0	1,4
A*34	0,4	0	B*42	1,5	0,8	Cw*18	1,3	0,28
A*36	1,1	0	B*44	10,4	13,1			
A*43	0	0	B*45	1,5	0,6			
A*66 ^b	2,0	0,3	B*46	0	0			
A*68	4,8	6,0	B*47	0	0,3			
A*69 ^c	0	0,6	B*48	0,6	0,5			
A*74	2,0	2,8	B*49	2,0	2,7			
A*80	0	0	B*50	2,1	2,5			
			B*51	8,3	8,2			
			B*52	2,1	0,5			
			B*53	3,0	2,8			
			B*54	0	0			
			B*55	1,0	1,4			
			B*56	0,4	0,5			
			B*57	3,2	1,4			
			B*58	2,8	2,8			
			B*59	0	0			
			B*67	0	0			
			B*73	0,2	0			
			B*78	0	0,3			
			B*81	0,8	0			
			B*82	0,4	0,3			
			B*83	0	0			

D: pacientes com dengue; C: controles. OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança. ^aP = 0,0066; Pc = 0,0396; OR = 0,37; IC 95% = 0,18-0,74. ^bP = 0,0494; Pc = 0,2964; OR = 7; IC 95% = 0,88-55,5. ^cP = 0,0001; Pc = 0,0006; OR = 0,38; IC 95% = 0,03-4,22.

Tabela 2. Comparação das frequências dos alelos HLA classe II, entre controles e pacientes com diagnóstico clínico-sorológico de dengue clássico no sul do Brasil, ocorrido em 2007 durante uma epidemia com o vírus 3.

HLA	D (%)	C (%)	HLA	D (%)	C (%)	HLA	D (%)	C (%)
DRB1*01	9,8	9,7	DQA1*01	42,3	42,2	DQB1*02	22,4	20,0
DRB1*03	11,1	8,6	DQA1*02	12,2	11,4	DQB1*03	31,1	32,0
DRB1*04	11,7	10,0	DQA1*03	14,8	11,4	DQB1*04	4,2	6,2
DRB1*07	11,5	13,7	DQA1*04	4,4	6,0	DQB1*05	20,6	20,0
DRB1*08	3,8	5,6	DQA1*05	26	28,3	DQB1*06	21,5	21,7
DRB1*09	2,5	1,7	DQA1*06	0,22	0,57			
DRB1*10	1,3	2,2						
DRB1*11	12,3	14,5						
DRB1*12	1,3	1,6						
DRB1*13	14,7	16,7						
DRB1*14	5,5	3,6						
DRB1*15	9,8	6,4						
DRB1*16	4,7	5,3						

D: pacientes com dengue; C: controles. Não houve diferença estatística entre os grupos para as frequências HLA classe II.

Tabela 3. Comparação das frequências genótípicas de HLA-DQB1 entre controles e pacientes com diagnóstico clínico-sorológico de dengue clássico no sul do Brasil, ocorrido em 2007 durante uma epidemia com o vírus 3.

	D	%	C	%	OR	IC95%	P
DQB1*0402/0402	0	0	4	2,1	0,19	0,02 - 1,68	0,0338
DQB1*0402/X	19	7,9	14	7,7	-	-	0,9187
DQB1*X/X	220	92,1	163	90,1	-	-	0,5888

D: pacientes com dengue; C: controles; X: outro alelo não HLA-DQB1*04; P: probabilidade;

OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Neste estudo, a comparação entre as frequências de genes HLA de classe I e II em indivíduos com sorologia positiva para dengue clássico e indivíduos com sintomas, porém com sorologia negativa, da nossa região, permitiram algumas conclusões:

- Associação negativa dos alelos HLA-A*31 e A*69 com o dengue;
- Associação negativa dos haplótipos HLA-A*31-B*40, B*40-Cw*03, B*58-Cw*07 e DQA1*02-DQB1*03 com o dengue;
- Associação negativa do homozigoto DQB1*0402/0402 com o dengue;
- Associação positiva do alelo HLA-A*66 com o dengue.

Quando três técnicas de extração de DNA de amostras de sangue coagulado foram executadas e comparadas quanto à qualidade e concentração de DNA, praticidade e tempo de execução:

- A técnica de *Salting-out* foi considerada a melhor. Sua eficácia foi comprovada pelas técnicas de PCR-SSO Luminex de tipificação HLA e PCR-SSP *in house* de tipificação de genes *KIR*.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo foi o primeiro que avaliou a influência de genes HLA de classe I e II em indivíduos representantes da epidemia de dengue ocorrida no ano de 2007, na população sul do Brasil, além de ser o primeiro a comparar indivíduos com sorologia positiva e negativa para dengue.

A perspectiva futura é o recrutamento de um número maior de pacientes e controles com o objetivo de definir com mais clareza o papel dos genes HLA na imunopatologia do dengue e nas suas formas clínicas.

Além disso, um maior número de controles pode elucidar o papel dos alelos HLA-A*31 e A*69, assim como do genótipo DQB1*0402/0402 como fator de resistência ao dengue clássico e o alelo HLA-A*66 como fator de susceptibilidade, na presença do sorotipo DEN-3.



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Análises Clínicas
Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

DANIELA MAIRA CARDOZO

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DE GENES HLA NA
SUSCEPTIBILIDADE AO DENGUE NO SUL DO BRASIL**

MARINGÁ
2009