



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF
Pós Graduação em Clínica Médica – Pneumologia
Tese de Mestrado

**Análise molecular parcial da região promotora dos genes
que codificam para IFN- γ , TNF- α e SLC11A1 (NRAMP1)
na tuberculose**

Márcia Quinhones Pires Lopes

Orientadores:

Dr. Adalberto Rezende Santos
Pesquisador Titular –Lab. de Biol Mol. Aplicada a Micobactérias
Departamento de Micobacterioses
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Prof. Dr. José Roberto Lapa e Silva
Professor Titular-Instituto de Doenças do Tórax-IDT
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
Fevereiro 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Análise molecular parcial da região promotora dos genes que codificam para IFN- γ ,
TNF- α e SLC11A1 (NRAMP1) na tuberculose**

Márcia Quinhones Pires Lopes

Orientadores:

Dr. Adalberto Rezende Santos

Prof. Dr. José Roberto Lapa e Silva

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica –
Pneumologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro como
parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de mestre em Ciências.

Banca Examinadora

Dra. Andréa Carla de Souza Góes

Dr. Antônio Basílio de Miranda

Dr. Neio Lúcio Fernandes Boechat

Lopes, Márcia Quinhones Pires

Análise molecular parcial da região promotora dos genes que codificam para IFN- γ , TNF- α e SLC11A1 (NRAMP1) na tuberculose / Márcia Quinhones Pires Lopes. - Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina, 2008.

xxi, 148 f.

Orientadores: Adalberto Rezende Santos e José Roberto Lapa e Silva
Dissertação (mestrado) – UFRJ / Faculdade de Medicina, Pós Graduação em Clínica Médica, 2004.

Referências bibliográficas: f. 122-142

1. Tuberculose. 2. Polimorfismo. 3. TNF- α . 4. IFN- γ . 5. SLC11A1 (MRAMP1). 6. Proteção. 7. Doença. 8. Pneumologia – Tese. I. Santos, Adalberto Rezende. II. Lapa e Silva, José Roberto. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Medicina. IV. Título.

“Para os meus filhos queridos: Tiago e Diogo”

“Para minha família, com carinho.”

**“ Quero, um dia, dizer às pessoas que nada foi em vão...
Que o amor existe, que vale a pena se doar as amizades e
as pessoas, que a vida é bela sim e que eu sempre dei o
melhor de mim ... e que valeu a pena”**

Mário Quintana

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me mostrado o caminho, ter me dado força e saúde e colocado às pessoas certas na minha vida.

A meus pais por sempre terem me mostrado que com honestidade, força e determinação podemos realizar nossos maiores sonhos.

Ao chefe do laboratório Dr. Philip Noel Suffys por ter aberto as portas e confiado em mim em todos os momentos, principalmente pelo apoio financeiro para execução deste trabalho sem o qual não teria sido possível, serei eternamente grata.

Ao meu orientador Dr. Adalberto Rezende Santos que além de ser um grande amigo, é um exemplo de simplicidade, humildade e determinação e me mostrou que com gestos simples, objetivos e sabedoria podemos obter grandes realizações, além de ter depositado em mim toda confiança e me dar todo apoio para que pudesse realizar este trabalho.

Ao meu orientador prof. Dr. José Roberto Lapa e Silva que mesmo sem me conhecer acreditou em mim e me deu a oportunidade da realização deste trabalho com todo apoio e confiança.

A minha amiga e filha Raquel por todo o carinho e apoio que sempre me depositou a qual eu responsabilizo pela grande decisão na minha vida de lutar pelas coisas que eu achava importante e sem a qual eu não teria realizado este trabalho. Muito, muito, abrigado. Uma das pessoas que todos os dias eu agradeço a Deus por ter colocado na minha vida.

Aos meus filhos que por tantas vezes foram deixados em segundo plano e se privaram do convívio familiar e lazer, mas com paciência sempre compreenderam e me apoiaram. Amo vocês.

Ao meu marido que por tantas vezes soube compreender e aceitar quando várias vezes assoberbada de trabalho me faltavam paciência.

A minha amiga Lizânia, também minha filha, pelo apoio e ajuda em todos os momentos, principalmente na finalização deste trabalho em que me sentia perdida com toda formatação e problemas de última hora. Ainda, nos dias em que estava sentindo solitária durante a dissertação da tese e ela ligava para me apoiar e atualizar dos problemas do Lab e eu ficava feliz em ter outra coisa para pensar que não a tese.

Ao amigo Rafael pela grande ajuda na parte experimental desta tese em todos os momentos e sem a qual teria sido extremamente difícil. Muito obrigada!

Ao meu amigo Harrison pelo incentivo sempre e todo apoio nos principais momentos. Muito obrigado de tê-lo como amigo.

A minha amiga Mara que compartilhou vários momentos da minha vida e cujo convívio foi muito gratificante e agora podemos dividir o martírio das teses. Obrigada por tudo!

Aos amigos do Lab pelo convívio e poder compartilhar todos os momentos bons e ruins e graças a Deus foram a maioria bons, principalmente nossas comemorações com café da manhã.

A todos os amigos da Hanseníase que direta ou indiretamente puderam compartilhar de todos os momentos desta tese (Não citarei nomes porque são muitos).

Ao amigo Luís Nei que na fase final me socorreu tantas vezes na informática e análise estatística.

Aos amigos da UPT que sempre foram solícitos e me deram todo apoio quando precisei, principalmente a Adriana e Joseane o qual sem elas, as amostras seriam impossíveis. Além disso, a Joseane é uma grande amiga de todas as horas com quem pude contar sempre até os momentos finais na formatação da tese. Muito obrigada!

Aos amigos do DBBM que sempre estavam prontos a ajudar no que fosse possível, principalmente ao Érico, Leonardo, Aline, Marcelo e Gustavo.

A minha amiga inesquecível de todas as horas e que sempre está pronta para ajudar no que for preciso, a eterna Dona Neiva.

A plataforma PDTIS/seqüenciamento/Fiocruz.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1: Dados da OMS 2006. Controle Global da Tuberculose.	16
Figura 2: Determinação das condições para a reação de seqüenciamento da região de interesse do gene de <i>IFN-γ</i> . Amostras de DNA de 4 pacientes diferentes: paciente 1 (linhas A e B), paciente 2 (linhas C e D) paciente 7 (linhas E e F) e paciente 9 (linhas G e H). Nas linhas A, C, E e G foram adicionadas reações contendo “primer sense” (S) enquanto nas linhas B, D, F e H foram adicionadas reações contendo “primer anti-sense” (AS). As diluições dos produtos de PCR foram: 1:2 (colunas 3, 6, 9 e 12), 1:5 (colunas 2, 5, 8 e 11) e 1:10 (colunas 1, 4, 7 e 10). Ainda foram testados diferentes concentrações de Big Dye (0,5 μ L e 1 μ L) e tampão 5x (1,5 μ L e 2 μ L). Foi realizado seqüenciamento do vetor de clonagem pGEM (“primer” M13F), como controle da reação (poço H12).	57
Figura 3: página inicial do Software SeqScape mostrando os projetos programados.	59
Figura 4: página inicial do Software SeqScape mostrando os projetos programados.	59
Figura 5: 5 A e B: Ilustração da utilização do Software v.2.5. Nesta janela podem ser observadas as seqüências obtidas a partir de cada iniciador bem como a região de aproveitamento de cada uma delas (verde). Nesse indivíduo foi detectado 1 SNP, ou seja, 1 base se apresentou distinta da seqüência referência (5B).	59
Figura 6: Ilustração da utilização do Software SeqScape v.2.5. Nessa janela pode ser observado o alinhamento das amostras bem como as seqüências referência e consenso do gene de <i>IFN-γ</i> .	60
Figura 7: Identificação de SNP através da visualização do cromatograma dentro do programa SeqScape. A figura mostra três possíveis genótipos para o SNP TNF G-376A. (A) Amostra mutante homozigota, (B) amostra mutante heterozigota e (C) amostra homozigota tipo-selvagem.	60
Figura 8: Extração de DNA genômico humano a partir de sangue total utilizando o kit “F Flexigene Quiagen”. Linhas: 1-17 DNA proveniente de 17 amostras de pacientes.	64

Figura 9: PCR de gradiente para padronização da amplificação da região promotora do gene de *IFN γ* . Linhas: (1) Marcador de peso molecular 100 bp ladder (Invitrogen); (2 a 11) PCR/*IFN γ* com gradiente de temperatura: (2) 53,1°C, (3) 53,4°C, (4) 54°C, (5) 55,2°C, (6) 56,5°C, (7) 58,1°C, (8) 59,6°C, (9) 61,3°C, (10) 63,1°C, (11) 64,2°C. 65

Figura 10: Linhas: (1) Marcador de peso molecular 100 pb ladder (Invitrogen); (2 a 4) PCR/*IFN γ* com gradiente de temperatura (continuação): (2) 65°C, (3) 65,3°C, (4) 65,8°C. 65

Figura 11: Linhas: 1-12, amplificação das amostras dos pacientes 49P-60P; Marcador de peso molecular, 100pb ladder Invitrogen; 13-24, amostras dos pacientes 61P-72P; 25, DNA controle usado para padronização; 26-37, amostras dos pacientes 73P-84P; 39-50, amostras dos pacientes 85P-96P; 51, DNA controle. 66

Figura 12: Purificação dos produtos amplificados das amostras 1P a 23P com Sulfato de Amônia 2,5M final. 66

Figura 13: Purificação com Kit ChargeSwitch da Invitrogen, amostras 24P a 34P. 66

Figura 14: Estratégia de amplificação e seqüenciamento do gene de *IFN- γ* (Seqüência parcial da região promotora do gene que codifica para *IFN- γ* retirada da seqüência referência AF3757790). O esquema mostra a região de anelamento dos iniciadores utilizados para amplificação e/ou seqüenciamento bem como a região de interesse (negrito) mostrando em azul, o +1 RNA, início da transcrição e vermelho o ATG, códon do início da tradução. Em verde, os iniciadores Externos Sense e Antisense usados para amplificação e seqüenciamento. Em cinza, iniciadores internos Sense e Antisense usados somente para seqüenciamento. 68

Figura 15: Identificação de SNPs no gene de *IFN- γ* através da visualização do cromatograma apresentado pelo programa SeqScape. (A): C-787T; (B): C-785T e (C): C-599G. 69

Figura 15.1: Identificação de SNPs no gene de *IFN- γ* através da visualização do cromatograma apresentado pelo programa SeqScape (D): C-517T; (E): A-255G; (F): G-200T e (G): A-172G. 70

Figura 16: Mapeamento dos SNPs encontrados em parte da região promotora do gene de *IFN- γ* na população de estudo. O esquema mostra a região de anelamento dos iniciadores externos utilizados para amplificação e seqüenciamento grifados em verde bem como dos iniciadores internos usados somente para o seqüenciamento em cinza. 71

Figura 17: Esquemática da região amplificada do gene *IFN- γ* contendo os sítios de ligação dos fatores de transcrição na região promotora. 72

Figura 18 (A) PCR de gradiente para padronização da amplificação da região promotora do gene de *TNF- α* : (M) Marcador de peso molecular 100 bp ladder DNA (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA); Linhas de 1 a 12 PCR/ *TNF- α* com gradiente de temperatura: (1) 50,1°C, (2) 50,5°C, (3) 51,3°C, (4) 52,7°C, (5) 54,4°C, (6) 56,4°C, (7) 58,3°C, (8) 60,3°C, (9) 62,6°C, (10) 64,0°C, (11) 64,7°C, (12) 65,2°C. **Figura 18 (B)**: PCR/ *TNF- α* com gradiente de temperatura (continuação): (M) Marcador de peso molecular 100 pb ladder DNA, (1) 65,4°C, (2) 65,9°C, (3) 66,4°C. 86

Figura 19: Amplificação da região de interesse do gene de *TNF- α* com temperatura de anelamento de 65,9°C utilizando 0,5U de *Taq* Gold DNA Polimerase. Linhas de 1 a 12, amostras de DNA dos pacientes 1P-12P; (M) Marcador 100pb ladder DNA (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA); Linhas de 13 a 24, amostras de DNA dos pacientes 13P-24P; Linhas de 25 a 36, amostras de DNA dos pacientes 25P-36P; Linhas de 37 a 48 amostras dos pacientes 37P-48P. 87

Figura 20: Purificação dos produtos amplificados utilizando o Kit ChargeSwitch da Invitrogen. (M) Marcador 100pb ladder DNA (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA); linhas de 1 a 40 produtos amplificados das amostras dos pacientes 1P-40P após purificação. 88

Figura 21: Estratégia de amplificação e seqüenciamento de *TNF- α* (Seqüência parcial da região promotora do gene que codifica para *TNF- α* retirada da seqüência referência (AB088112). O esquema mostra a região de anelamento dos iniciadores utilizados para amplificação e/ou seqüenciamento bem como a região de interesse (negrito). Em verde está representado o nucleotídeo referente a posição do mRNA (+1mRNA), referente ao início da transcrição. Em amarelo, estão os iniciadores Externos Sense e Antisense usados para amplificação e seqüenciamento e em azul, os iniciadores internos Sense e Antisense usados somente para seqüenciamento. 89

Figura 22: Identificação de SNPs e dos genótipos correspondentes no gene de *TNF- α* através da visualização do cromatograma apresentado no programa SeqScape. (A) G-646A; (B) A-572C e (C) C-422T (heterozigotos). 90

Figura 22.1: SNPs, (D) G-376A (heterozigoto); (E) G-308A (heterozigoto) e G-308A (homozigoto) para a variante mutante. 90

Figura 22.2: (A)G-646A; (B)A-572C; (C)C-422T; (D)G-376A; (E) G-308A (heterozigotos) ; (F) G-308A homozigoto para a variante mutante; (G) A-238G heterozigoto; (H) A-238G homozigoto para a variante. 91

Figura 23: Mapeamento dos SNPs encontrados em parte da região promotora do gene *TNF- α* na população de estudo. O esquema mostra a região de anelamento dos iniciadores externos utilizados para amplificação e seqüenciamento grifados em amarelo bem como dos iniciadores internos usados somente para o seqüenciamento em azul. 92

- Figura 24:** Esquema da região amplificada do gene de *TNF- α* contendo os sítios de ligação dos fatores de transcrição na região promotora. 93
- Figura 25:** PCR de gradiente de temperatura para padronização do sistema para amplificação da região promotora de *NRAMP1*: linha 1: marcador de peso molecular 100 bp ladder DNA; linhas 2 a 13) gradiente de temperatura: (2) 51,1°C, (3) 51,5°C, (4) 52,3°C, (5) 54,7°C, (6) 56,4°C, (7) 58,4°C, (8) 61,5°C, (9) 62,3°C, (10) 64,0°C (11) 64,7°C, (12) 65,2°C e (13) 65,9°C. 104
- Figura 26:** Amplificação da região de interesse do gene que codifica para *TNF- α* com temperatura de anelamento de 65,9°C. Linha 1: marcador de peso molecular 100pb ladder DNA; linhas: 2 a 8 amostras provenientes dos pacientes 1P-7P, linha 9 amostra referente ao paciente 8P não amplificada e linhas 10 e 11 amostra 9P e 10P. 105
- Figura 27:** linhas 1 a 12, 13 a 24 purificação dos produtos amplificados por precipitação com Sulfato de amônia 2,5M (concentração final), (M) 100pb marcador de peso molecular Ladder DNA. 106
- Figura 28:** Estratégia de amplificação e seqüenciamento de *NRAMP1* (Seqüência parcial da região promotora do gene que codifica para *NRAMP1* retirada da seqüência referência (AF229163). Em negrito e sublinhado podemos observar as seqüências repetitivas ao longo da região de interesse no promotor. 107
- Figura 29:** Estratégia para o seqüenciamento da região de interesse no promotor do gene que codifica para *NRAMP1*. 108

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Variação das concentrações de Mg ²⁺ e desoxiribonucleotídeos	52
Tabela 2: Iniciadores utilizados na reação de seqüenciamento.	56
Tabela 3: Condições ideais para a amplificação do gene de <i>IFN-γ</i>	65
Tabela 4: Descrição das frequências absolutas e alélicas dos sete SNPs encontrados na população estudada (n=500).	73
Tabela 5: Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos de <i>IFN-γ</i> encontrados no total de indivíduos analisados.	75
Tabela 6: Descrição dos haplótipos identificados no gene <i>IFN-γ</i> (n=500) e suas respectivas frequências.	76
Tabela 7: Avaliação de associação entre os diferentes genótipos presentes no gene de <i>IFN-γ</i> com suscetibilidade <i>per se</i> a ocorrência de TB ativa.	77
Tabela 8: Avaliação da associação entre os diferentes genótipos presentes no gene de <i>IFN-γ</i> com suscetibilidade a ocorrência de TB pulmonar.	78
Tabela 9: Avaliação da associação entre os diferentes genótipos presentes no gene de <i>IFN-γ</i> com gravidade da TB.	79
Tabela 10: Avaliação da associação entre os diferentes genótipos separadamente com capacidade de infecção TST+/TST negativo.	80
Tabela 11: Distribuição das frequências alélicas da variante mutante -200T nos grupos de acordo com os diferentes desfechos estudados.	81
Tabela 12A e B: Análise de associação dos polimorfismos C-599G e G-200T no promotor do gene <i>IFN-γ</i> com risco de tuberculose em diferentes variáveis demográficas.	82-83
Tabela 13: Descrição da frequência haplotípica nos diferentes grupos estudados	84
Tabela 14: Análise de associação dos haplótipos identificados com os diferentes desfechos.	85
Tabela 15: Condições de amplificação do gene de <i>TNF-α</i>	87
Tabela 16: Descrição das frequências absolutas dos sete SNPs encontrados na população estudada.	95

Tabela 17: Distribuição dos genótipos e das frequências alélicas referentes a variante mutante de cada SNP individual encontrado na região de interesse do gene de <i>TNF-α</i> no total de indivíduos analisados.	96
Tabela 18: Descrição dos haplótipos identificados na região de interesse do gene <i>TNF-α</i> no total de indivíduos analisados (n=500).	97
Tabela 19: Avaliação da associação entre os diferentes genótipos separadamente com suscetibilidade <i>per se</i> a ocorrência de TB ativa.	99
Tabela 20: Avaliação da associação entre os diferentes genótipos separadamente com gravidade da TB pulmonar x extrapulmonar.	100
Tabela 21A: Distribuição da frequência alélica referente a variante mutante <i>TNF-α</i> -376A e análise de associação com os diferentes desfechos estudados.	101
Tabela 21B: Distribuição da frequência alélica referente a variante mutante <i>TNF-α</i> -308A e análise de associação com os diferentes desfechos estudados.	101
Tabela 21C: Distribuição da frequência alélica referente a variante mutante <i>TNF-α</i> -244A e análise de associação com os diferentes desfechos estudados.	102
Tabela 21D: Distribuição da frequência alélica referente a variante mutante <i>TNF-α</i> -238A e análise de associação com os diferentes desfechos estudados.	102
Tabela 22: Frequência haplotípica referente aos SNPs encontrados na região estudada do gene de <i>TNF-α</i> nos diferentes grupos estudados.	103
Tabela 23: Condições ideais para a amplificação do gene <i>NRAMP1</i>	105

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	Adenina
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
C	Citosina
CCL18	<i>CC chemokine ligand-18</i>
CCL4	<i>CC chemokine ligand-4</i>
DHEA	<i>Dehydropiandrosterone</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoribonucléico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato (N= A, C, G ou T)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
G	Guanina
HBV	Vírus hepatite B
HLA	Human leucocyte antigens
IC	Intervalo de confiança
IFN- γ	Interferon-gama
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-12RB1	Receptor B1 de Interleucina12
IL-6	Interleucina-6
LAM	Lipoarabinomana
LPS	Lipopolissacarídeos
LSPs	Large Sequences Polymorphims
LTA	Lymphotoxin- α
LTB	<i>Heat-labile enterotoxin</i>

<i>M.tb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MBL	Mannose Binding Lectin
Mg ⁺⁺	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MR	Receptor de manose
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NK	Natural killer
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
NOS2A	Nitric oxide synthase gene
OCT-1	<i>Octamer-binding protein</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds ration
PAS	Ácido paramino salicílico
pb	Par (es) de base (s)
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear cells
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação de polimerização em cadeia)
PPD	<i>Purified Protein Derivative</i>
PT	Prova tuberculínica
RA	Artrite reumatóide
RFLP	<i>Restriction fragment lengt polymorphisms</i>
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SLC11A1	<i>Solute carrier family 11 member 1</i>
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SP	Proteína surfactante
STAT5B	<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>
T	Timina
TAE	Tris-Acético-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Tuberculose
TE	Tris-EDTA
TLR	Toll-like
TNF- α	Tumour necrosis factor
Tris-	Trishidroximetilamino metano
TST	Teste Cutâneo da Tuberculina
UV	Ultravioleta
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
VDR	Receptor de vitamina D

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	10
2.1- Histórico.....	10
2.2 -Tuberculose: Epidemiologia e Genética Humana.....	16
2.2.1- A bactéria.....	18
2.2.2 - O ambiente.....	22
2.2.3 - O hospedeiro.....	24
2.2.3.1- Identificação de genes de suscetibilidade a tuberculose.....	25
2.2.3.2 - Estado da arte dos genes avaliados neste estudo.....	28
<i>NRAMP1</i> ou <i>SLC11A1</i>	28
Interferon- γ (<i>IFN-γ</i>).....	32
Tumor necrosis factor α (<i>TNF-α</i>).....	38
3. Objetivos	45
3.1- Objetivos Gerais.....	45
3.2- Objetivos Específicos.....	45
4. Pacientes e Métodos	46
4.1- Delineamento do Estudo.....	46
4.2- Período de Estudo.....	46
4.3- Local de Estudo.....	46
4.3.1- Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz - IOC/ Laboratório de Biologia Molecular aplicada à Micobactérias.....	46
4.3.1.1- Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz / IOC / Dep. de Biologia Molecular / Lab. de Genômica Funcional e Bioinformática.....	47
4.3.2- Centro Hospitalar Instituto de Doenças do Tórax (IDT) e Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF-UFRJ).....	47
4.3.3- Hospital Estadual Santa Maria.....	47
4.4- Critérios de inclusão.....	48
4.4.1- Pacientes com tuberculose ativa.....	48
4.4.2- Contatos.....	48
4.5- Critérios de exclusão.....	48
4.6- Grupos de estudo.....	49
4.7- Coleta e processamento das amostras clínicas.....	49
4.8- Suporte Financeiro.....	49
4.9- Metodologia.....	50
4.9.1- Extração de DNA genômico.....	50
4.9.1.1- Método “in House”: purificação de DNA genômico a partir de sangue total por fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1)	50
4.9.1.2- Purificação de DNA genômico a partir do Kit Flexigene (Quiagen)	51
4.9.2- Amplificação de parte da região regulatória dos genes que codificam para <i>TNFα</i> , <i>IFNγ</i> e <i>NRAMP1</i>	51
4.9.3- Eletroforese em gel de agarose.....	53

4.9.4- Purificação dos produtos de PCR para seqüenciamento com Acetato de amônio 7,5 M.....	53
4.9.5- Purificação dos produtos de PCR para seqüenciamento com Kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up (Invitrogen).....	54
4.9.6- Seqüenciamento automatizado.....	54
4.9.6.1- Padronização inicial da reação de seqüenciamento.....	56
4.9.7- Análise das seqüências e identificação das SNPs presentes na região promotora dos genes que codificam para TNF- α , IFN- γ e SLC11a1.....	58
4.10- Análise estatística.....	61
4.11- Aspectos Éticos.....	61
5. Resultados.....	62
5.1- Padronização dos procedimentos técnicos utilizados.....	63
5.1.1- Extração de DNA genômico a partir de sangue total utilizando o Kit “FlexiGene DNA” (Quiagen).....	63
5.1.2- Padronização das condições para amplificação da região de interesse do gene que codifica para IFN- γ	64
5.2- Amplificação das amostras após padronização e purificação dos produtos amplificados.....	66
5.3- Seqüenciamento e análise dos SNPs encontrados em parte da região promotora do gene que codifica para <i>IFN-γ</i> através do programa SeqScape v2.5 (AppliedBiosystems).....	67
5.4- Mapeamento dos possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição com importância molecular nesta região.....	72
5.5- Análise descritiva dos polimorfismos identificados na região de interesse do gene <i>IFN-γ</i> na população estudada (n=500).....	73
5.6- Estudo de associação.....	76
5.7- Padronização das condições para amplificação por PCR da região de interesse do gene que codifica para o TNF- α	86
5.8- Amplificação das amostras após padronização e purificação dos produtos Amplificados.....	87
5.9- Seqüenciamento e análise de SNPs em parte da região promotora do gene que codifica para TNF- α através do programa SeqScape v.2.5.....	88
5.10- Mapeamentos dos possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição com importância molecular nesta região.....	93
5.11- Análise descritiva dos polimorfismos identificados na região de interesse do gene de <i>TNF-α</i> na população estudada (n=500).....	94
5.11.1- Frequências absolutas e alélicas dos SNPs encontrados na população estudada(n=500)	95
5.11.2- Distribuição genotípica e alélica encontrada na população geral	96
5.11.3- Determinação dos diferentes haplótipos encontrados e suas frequências na população geral.....	97
5.12- Estudo de associação.....	98
5.12.1- Avaliação da possível associação entre os genótipos identificados para os diferentes SNPs individuais presentes na região de interesse dentro do promotor do gene de <i>TNF-α</i> com a ocorrência de TB ativa.....	98
5.13- Padronização das condições para amplificação por PCR da região de interesse do gene que codifica para SLC11A1(NRAMP1).....	104
5.14 - Amplificação das amostras após padronização e purificação dos produtos amplificados.....	105

5.15-Sequenciamento e análise de SNPs em parte da região promotora do gene que codifica para NRAMP1.....	106
6. Discussão.....	109
7. Conclusões.....	121
8. Bibliografia	122
9. Anexos.....	143

Resumo

A despeito de sua origem milenar, a tuberculose (TB) continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Apenas 10% das pessoas infectadas com o *Mycobacterium tuberculosis* desenvolvem doença clínica e fatores genéticos do hospedeiro podem influenciar na suscetibilidade e gravidade ou resistência à ocorrência da mesma. O Interferon-gama (IFN- γ) é uma citocina importante na regulação da resposta imune celular a patógenos intracelulares e o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) é fundamental na patogênese da tuberculose, principalmente devido à atuação na formação e manutenção do granuloma. O gene que codifica a proteína de macrófago associada à resistência natural 1 (NRAMP1) ou SLC11A1, aparentemente também está associado a suscetibilidade a tuberculose, embora sua função ainda não esteja totalmente elucidada. Neste estudo, procedemos ao mapeamento de parte da região promotora dos genes que codificam para TNF- α , IFN- γ e SLC11a1 através de seqüenciamento de amostras de DNA provenientes de 500 indivíduos sendo 265 pacientes de tuberculose e 235 controles sadios não relacionados e sem histórico de TB prévia, todos residentes no Rio de Janeiro, e investigamos a possível associação dos polimorfismos encontrados com diferentes desfechos na tuberculose em 140 indivíduos com TB, sendo 121 com TB pulmonar (TBP) e 19 com TB extrapulmonar (TBE) e 154 controles, sendo 96 positivos no teste intradérmico de tuberculina (TST+) e 58 negativos (TST-). Após a genotipagem 7 polimorfismos de base única (SNPs) foram identificados nas regiões de interesse dos genes de IFN- γ e TNF- α . Para o gene de IFN- γ , 4 destes SNPs ainda não foram descritos na literatura. Não foi possível finalizar o seqüenciamento do gene que codifica para SLC11A1 devido à quantidade de seqüências repetitivas dentro desta região. No estudo de associação, baseado na comparação das frequências alélicas, genotípicas e de haplótipos, encontramos, no gene de IFN- γ , uma associação da variante IFN- γ -200T com proteção a ocorrência de TB ativa, de TBP e com um risco aumentado de infecção latente ($P= 0,033, 0,043$ e $0,035$) respectivamente. Todos os outros SNPs identificados neste gene não apresentaram associação com nenhum dos desfechos analisados. Para o gene de TNF- α , foi encontrada uma associação de risco entre a variante TNF- α -376A e a ocorrência de TB ativa e TBE ($P= 0,035$ e $0,038$) respectivamente. O SNP TNF-572G>A apresentou forte associação tanto genotípica quanto alélica com risco de ocorrência de TBE (RR 8,12, IC 5,20<12,67, $P = 0,0175$ e RR 7,72, IC 5,69<10,47, $P = 0,0179$) respectivamente. Não houve associação haplotípica em nenhum dos genes analisados.

Abstract

The spite of its millenarian origin, the tuberculosis (TB) continues being one of the biggest public health problems world-wide. Only 10% of the people infected with the *Mycobacterium tuberculosis* develop clinical illness and genetic factors of the host can influence in the susceptibility and severity or resistance to its occurrence. The Interferon-gamma (IFN- γ) is an important cytokine involved in the regulation of the cellular immune response against intracellular pathogens and the Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is fundamental in pathogenesis of the tuberculosis, mainly due its importance in the formation and maintenance of granuloma. The gene that codifies for the natural resistance associated macrophage protein 1 (NRAMP1) or SLC11A1, apparently also is associated to the susceptibility to tuberculosis, although its function is still not elucidated totally. In this study, we proceed the mapping from part of the promoter region of the genes coding for TNF- α , IFN- γ and SLC11a1 through sequencing of DNA samples from 500 individuals, being 265 tuberculosis patients and 235 not related healthy controls without previous description of TB, all residents in Rio de Janeiro, and investigate the possible association of the polymorphisms found with different outcomes in the tuberculosis in 140 individuals with TB, being 121 with pulmonary TB (TBP) and 19 with extrapulmonary TB (TBE) and 154 controls, being 96 positives in the Tuberculin Skin Test (TST+) and 58 negatives (TST -). After genotyping 7 Single Base Pair Polymorphisms (SNPs) had been identified in the regions of interest of the IFN- γ and TNF- α genes. For the IFN- γ gene, 4 of these SNPs had still not been described in literature. It was not possible to finish the sequencing of the SLC11A1 gene due the amount of repetitive sequences of this region. In the association study, based on the comparison of the allele, genotype and haplotype frequencies, we find, in the IFN- γ gene, an association of the variant IFN- γ -200T with protection to the occurrence of active TB, TBP and with an increased risk of latent infection ($P= 0,033$, $0,043$ and $0,035$) respectively. All the other SNPs identified in this gene were not associated with none of the analyzed outcomes. For the TNF- α gene, an association of risk between TNF variant -376A and the occurrence of active TB and TBE was found ($P = 0,035$ and $0,038$) respectively. The SNP TNF-572G>A presented a strong genotype (-572GA) and allele (-572A) association with risk of the TBE occurrence (RR 8,12, IC 5,20<12,67, $P = 0,0175$ and RR 7,72, IC 5,69<10,47, $P = 0,0179$) respectively. No haplotype association was found in any of the analyzed genes.



1- Introdução

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, um bacilo álcool-ácido resistente, aeróbico de crescimento lento, o qual é transmitido através de aerossóis (produzidos durante a expectoração) que são inalados proporcionando o início da infecção. A TB é considerada um problema de saúde pública mundial, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS). Aproximadamente, um terço da população mundial está infectada pelo *M. tuberculosis*. A taxa de infecção anual é de 54 milhões, dos quais 9 milhões desenvolvem a doença e aproximadamente 3 milhões vão a óbito (OMS, 2006). O *M. tuberculosis* mata mais indivíduos que qualquer outro agente infeccioso (Frieden e cols., 2003). Os óbitos representam 25% de toda a mortalidade evitável nos países em desenvolvimento onde se registram 95% dos casos e 98% dos falecimentos causados pela doença. A maioria dos casos de TB (75%) ocorre no grupo etário economicamente produtivo (15-50 anos) e é a principal causa de morte por infecção em mulheres, principalmente mulheres jovens (Caracta, 2003). Estima-se que 2,4 bilhões de pessoas estejam infectadas com o *M. tuberculosis* e estudos de modelagem estatística sugerem que 70 milhões de pessoas morrerão de tuberculose de 1998 a 2018, apesar da disponibilidade de antibióticos que podem curar esta doença (Murray e cols., 1998).

O Brasil ocupa o 15º lugar no grupo dos 22 países responsáveis por 80% dos casos de TB do mundo (Raviglione, 2003) e estima-se uma incidência de 128 mil casos por ano, dos quais são notificados apenas cerca de 70%, em sua maioria, em grandes centros urbanos. O percentual de abandono do tratamento está em torno de 12% no país, chegando a algumas capitais a valores entre 30 e 40%, o que proporciona elevadas taxas de resistência aos medicamentos (REDE TB, 2005, p.11).



Durante a transmissão as partículas são inaladas e levadas via aérea por macrófagos até os alvéolos onde se alojam, iniciando assim uma cascata de eventos que resultam na contenção da infecção ou progressão para doença ativa (tuberculose primária). Após a infecção, na ausência de imunossupressão, pouco menos de 10% dos indivíduos desenvolvem TB ativa.

Dentre os principais fatores que influenciam na suscetibilidade à TB estão os fatores ambientais, tais como: densidade demográfica, globalização, movimentos migratórios, desigualdade social e suas implicações, condições precárias de alimentação, abuso de álcool, stress, transporte, educação, moradia (aglomerados populacionais), envelhecimento da população e a piora na qualidade dos programas de controle (Van Helden, 2003). Fatores genéticos também poderiam explicar em parte porque algumas pessoas resistem mais a infecção que outras. A influência desses fatores na suscetibilidade à TB foi primeiramente observada por Kallmann, et al., 1943 e Comstock, 1978, os quais mostraram um excesso significativo e consistente de adoecimento em gêmeos monozigóticos onde ambos os irmãos tinham desenvolvido tuberculose (doença concordante) quando comparados com gêmeos dizigóticos ou outros pares de irmãos. Como gêmeos monozigóticos são geneticamente idênticos estes estudos provêm fortes dados em defesa de fatores genéticos estarem envolvidos na suscetibilidade à tuberculose. Além disso, inúmeros estudos de genes candidatos identificaram marcadores de suscetibilidade genética nos genes VDR (receptor de vitamina D), IL-12 (Interleucina-12), IL-12RB1 (receptor B1 de Interleucina12), IFN- γ (Interferon-gama), MBL (*Mannose Binding Lectin*), TNF- α e SLC11A1 (*Solute carrier family 11 member 1*) (Casanova, 2004; Malik, 2002 e Cooke, 2001). Vários estudos de associação de HLA (*human leucocyte antigens*) com tuberculose pulmonar têm sido conduzidos em Chineses. Outro fator relevante relacionado à suscetibilidade à TB é a pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).



Após a infecção, a dinâmica da progressão para a doença ativa pode se dar de duas formas: indivíduos que progridem para a doença logo após a infecção (transmissão recente) e aqueles que desenvolvem a doença muitos anos ou até mesmo décadas mais tarde (reativação; Lillebaek e cols., 2002). Esta informação epidemiológica bem estabelecida incitou uma intensa busca por fatores que ativam o avanço da infecção para doença nesta pequena proporção de indivíduos suscetíveis, ou seja, se estes indivíduos são inerentemente suscetíveis à doença ou se o desenvolvimento da doença é promovido por fatores específicos. Sabe-se hoje, que fatores genéticos tanto do patógeno (*M. tuberculosis*) como do hospedeiro têm impacto na resposta imune contra o *M. tuberculosis*. Um melhor entendimento da complexa interação entre o microorganismo invasor e o sistema imune do hospedeiro é muito importante para identificação dos mecanismos envolvidos na proteção, tais conhecimentos seriam muito importantes, por exemplo, no desenho de novas estratégias de vacina. (Van Helden, 2003).

A interação do *Mycobacterium tuberculosis* com o macrófago pode ser efetuada por vários mecanismos como: receptores do complemento, receptores de manose, receptores surfactantes, receptores *toll-like* e outros capazes de mediar esta interação inicial. Dentre estes o receptor mais bem caracterizado, capaz de se ligar a micobactéria não opsonizada, é o receptor de manose (MR) e sua interação com o *M. tuberculosis* é feita por uma glicoproteína de superfície da micobactéria chamada lipoarabinomana (LAM).

O desenvolvimento da imunidade mediada por células contra o *M. tuberculosis* está associada à positividade do teste de reatividade cutânea à tuberculina. Em nível celular ocorre uma resposta imune efetiva, de maneira que os macrófagos infectados com *M. tuberculosis* interagem com linfócitos T através da produção de várias citocinas (Flynn, 2000).

O Interferon- γ , (IFN- γ) é uma citocina que possui um papel crucial no controle da infecção pelo *M. tuberculosis* (Flynn, 1993), estimulando a produção do fator de necrose



tumoral (TNF- α) pelos macrófagos, induzindo assim, a formação do granuloma e controle da extensão da infecção (Flynn, 1995; Bean, 1999). Polimorfismos no gene que codifica para IFN- γ ou seus receptores em humanos podem influenciar tanto na expressão como na atividade biológica destas moléculas (Jouanguy, 1996). Embora a produção de IFN- γ varie interindividualmente, alguns estudos sugerem que os níveis de IFN- γ em indivíduos portadores de tuberculose ativa são consideravelmente reduzidos em comparação com indivíduos saudáveis (Lyn, 1996; Zhang, 1995). Assim como IFN- γ , o TNF- α é secretado por macrófagos, células dendríticas e células T e desempenha múltiplas funções na resposta imune e patológica da doença. Essa citocina também influencia na expressão de moléculas de adesão bem como de várias quimiocinas. Além disso, os receptores de TNF- α estão diretamente ligados a formação do granuloma funcional nos tecidos infectados (Raja, 2004).

Embora várias citocinas e quimiocinas estejam envolvidas na interação dos macrófagos com outras células efectoras, a participação tanto do IFN- γ como do TNF- α e seus receptores são fundamentais, e a diminuição da produção das mesmas está comprovadamente relacionada a uma falha na resposta específica contra a infecção pelo *M. tuberculosis*. Flynn e col. (1993), demonstraram que ratos com ruptura do gene que codifica para IFN- γ são altamente suscetíveis à infecção pelo *M. tuberculosis*, falham na produção de NOS (*nitric oxide synthase*) e desenvolvem uma forma disseminada da doença, caracterizada por granuloma irregular e grande área de necrose do tecido. Em 1995, o mesmo grupo demonstrou que ratos com ruptura no receptor de TNF- α ou deprimidos de TNF- α pela utilização de anticorpo monoclonal anti-TNF- α são extremamente suscetíveis ao *M. tuberculosis*, apresentando um aumento na carga bacteriana, uma desregulação na formação do granuloma e sobrevivência encurtada (Flynn e col., 1995). Adicionalmente, humanos recebendo terapia anti-TNF- α apresentam maior vulnerabilidade à infecção micobacteriana (Winthrop, 2006; Hamilton, 2003).



A infecção pelo *M. tuberculosis* é complexa e processa estágios de múltiplas etapas desde o encontro inicial com o patógeno. A fagocitose e a subsequente secreção de IL-12 são processos iniciados na ausência de exposição prévia ao antígeno e conseqüentemente formam um componente de imunidade inata. Outros componentes importantes da imunidade inata são “*natural resistance associated macrophage protein 1*” (NRAMP1), neutrófilos, células *natural killer* (NK), receptores *toll-like* (TLR). O gene *NRAMP1*, (ou *SLC11A1-Solute carrier family 11 member 1*) é o maior determinante de resistência natural à infecção intracelular e foi originalmente identificado em ratos. A NRAMP1 é uma proteína de membrana expressa somente no lisossomo de macrófagos e monócitos. Após a fagocitose a NRAMP1 dirige-se para a membrana do fagossomo que contém a bactéria. Neste momento, essa proteína atua como uma bomba de cátion divalente que remove o ferro ou outros cátions divalentes do fagossomo, não havendo assim replicação do microorganismo (Blackwell, 2000, Eide, 2005). A NRAMP1 também é crucial no transporte de nitrito do citosol para ambientes mais ácidos como o fagolisossomo, onde ocorre então a conversão em óxido nítrico. A diminuição de NRAMP1 aumenta a suscetibilidade à infecção por micobactérias. Vários estudos de associação entre polimorfismos presentes no gene que codifica para a NRAMP1 e TB têm demonstrado associação com a suscetibilidade à ocorrência da TB em populações do Japão, Canadá, Coréia, Vietnam, Gâmbia e África do Sul (Hoal, 2004). Contudo, mais recentemente, Malik e colaboradores sugeriram que NRAMP1 deve influenciar somente a velocidade da progressão da infecção para doença (Malik, 2005).

Atualmente, o desenvolvimento da genética/genômica tem contribuído sobremaneira para o entendimento do processo patogênico que está sob as principais doenças infecciosas permitindo um estudo mais sistemático da influência genética.



Seguindo os relevantes avanços das últimas décadas no entendimento dos processos imunológicos em nível molecular e em tecnologias para estudar esses processos biológicos, a tuberculose está sendo extensivamente investigada com novas perspectivas.

Com o término do projeto genoma humano, e a disponibilização de seqüências referências de alta qualidade, os estudos para a avaliação da variabilidade genética interindividual e determinação de fatores de risco para diferentes desfechos imunológicos, ou mesmo resposta à fármacos, têm sido desenvolvidos com frequência. Segundo as informações obtidas com o projeto genoma, os polimorfismos de base única (SNPs) representam a mais abundante fonte de variação genética no genoma humano. A associação de SNPs com fenótipos de doenças humanas tem grande potencial para aplicação clínica direta por prover novos e mais precisos marcadores genéticos para diagnóstico, prognóstico e possivelmente, novos alvos terapêuticos. Assim, identificação de genes que contribuem para doenças complexas como a tuberculose tem sido um grande desafio na era pós-genômica (Suh, 2005). Contudo, a suscetibilidade à ocorrência de TB tem uma etiologia multifatorial, nenhuma estratégia simples poderia identificar todos os genes potencialmente envolvidos em tal desfecho devido às limitações nos desenhos de estudo. Estudos de ligação no genoma humano podem ser usados para identificar regiões do genoma as quais podem conter um locus com maior efeito de suscetibilidade à doença na população em geral. Famílias com pares de irmãos, que contenham dois irmãos afetados pela doença de interesse, são usualmente selecionados porque eles são mais prováveis ter a doença típica da população em geral. Eles e seus pais são incluídos na varredura do genoma indiferentemente se os pais são afetados pela doença, mas é necessário grande número de famílias a serem tipadas para prover força razoável (Bellamy, 2006). Este método é compreensivo e pode localizar algum gene que exerça um maior efeito na suscetibilidade à doença, mas sua força é relativamente baixa, uma vez que existe a



possibilidade de não detectar genes que possuam efeito moderado na determinação do risco da doença (Bellamy, 2006; Suh, 2005).

Identificação de genes que afetam a suscetibilidade a patógenos individuais em espécies animais provêm genes candidatos úteis para estudos humanos, como no caso do homólogo humano de NRAMP1, também designado com este nome nos humanos, foi recentemente renomeado SLC11a1 (*solute carrier family 11 number 1*) e está localizado no cromossomo 2q35 (Cellier, 1994). Vários polimorfismos têm sido identificados neste gene, os quais têm sido amplamente avaliados em estudos de associação com suscetibilidade à TB humana (Bellamy, 2006). Adicionalmente, a associação de vários genes do complexo HLA (*Human Leukocyte Antigen*) e não HLA com suscetibilidade à tuberculose em várias populações étnicas têm sido freqüentemente estabelecidas. Estudos de associação com genes candidatos das regiões HLA DR2, DQ1 e DP, bem como de genes que codificam para outras moléculas não pertencentes ao complexo HLA como MBL (*Mannose Binding Lectin*), VDR (receptor de vitamina D), SP (Proteína surfactante), IFN- γ (interferon gama) e etc, têm sido reportadas em várias populações de diferentes etnias (Selvaraj, 2004).

As citocinas desempenham um papel fundamental na regulação de várias respostas biológicas, como resposta imune, inflamatória, hematopoiese, oncogênese e até mesmo no início do desenvolvimento embrionário.

A transdução de sinais de citocinas de fora para dentro das células se dá via receptores específicos. Contudo, a expressão dos genes que codificam para as diferentes citocinas pode variar em decorrência de vários fatores, dentre os quais, fatores ambientais e genéticos.

A variabilidade genética, normalmente representada pela presença de polimorfismos de base única (SNPs) na região promotora de vários genes de citocinas têm sido uma das principais características investigadas em relação a diferentes desfechos em doenças de



origem infecciosa ou não, sendo os SNPs presentes nos genes de TNF- α e IFN- γ , os mais estudados.

O gene IFN- γ humano está localizado próximo aos marcadores microssatélites D12S335 e D12S313 no cromossomo 12q.15, possui aproximadamente 5,4 Kb e apresenta 4 exons que codifica uma proteína de 166 aminoácidos (Gray & Goeddel, 1982; Bureau, 1995).

Nos últimos anos, alguns polimorfismos têm sido reportados no gene IFN- γ (Oppenheim & Feldmann, 2001). Contudo, poucas variações na região promotora deste gene capazes de afetar a expressão de IFN- γ estão disponíveis na literatura. Vários estudos têm demonstrado que o polimorfismo presente no Intron I do gene de IFN- γ (+874 A/T) está relacionado à regulação da expressão do gene, sendo o alelo T associado com alta produção de IFN- γ e o alelo A com baixa produção da proteína (Amin e cols., 2007; Rossouw e cols., 2003). Estudos de associação deste polimorfismo com a suscetibilidade à TB mostram uma associação direta do alelo A com suscetibilidade ao desenvolvimento da doença nas populações Européia, Africana e Brasileira (Amin e cols., 2007; Lopez-maderuelo, 2003; Rossouw, 2003, Lio, 2002).

Em relação ao TNF- α em humanos, o gene que codifica para esta citocina está localizado no braço curto do cromossomo 6, dentro de uma região de 7 kilobases (Kb). Os Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) estão localizados na região 6p21.1-p21.3 e incluem várias famílias de genes. Por uma análise da disposição dos vários loci, a região de classe II, DR, e a região de classe III são separadas por cerca de 400 kb. A região classe III do gene C2 é separada da região classe I, HLA B, por 600 Kb. Na interseção deste intervalo estão incluídos os genes que codificam para TNF- α e LT α (Hajeer, 2001). O gene TNF contém muitos polimorfismos incluindo microssatélites e SNPs. Somente na região promotora, segundo Mira et al. (1999), já foram descritos SNPs nas seguintes posições relativas ao sítio de iniciação da transcrição: -1031(T/C), -863(C/A), -857(C/A), -851(C/T), -419(G/C), -376(G/A), -308(G/A), -238(G/A), -163(G/A) e -49(G/A), embora aquelas da posição -419, -163 e -49 sejam raras em



caucasianos (Mira et al, 1999). Muitos destes polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação com alelos HLA classe I e II (Hajeer, 2000). Alguns dos polimorfismos no gene TNF- α influenciam na produção de TNF- α através de uma regulação positiva SNP -308 (Bouma,1996, Louis,1998) ou negativa SNP -238 do gene, vários estudos sugerem a associação destes SNPs com suscetibilidade ou proteção a várias doenças (Santos et al 2002, Correa e cols., 2005; Corbett e cols., 2002).

Embora SNPs sinônimas não afetem a seqüência de aminoácidos, podem influenciar a expressão da proteína através de vários mecanismos diferentes, como por exemplo, alterar *splicing* do mRNA, a estabilidade do mRNA e os níveis de transcrição do gene. Polimorfismos dentro da seqüência regulatória 5' e 3' ou introns normalmente afetam a transcrição, pois podem alterar a estrutura do sítio de ligação a fatores de transcrição ou a estrutura de “*enhancers e silencers*” em introns (Bidwell, 1998).

As conseqüências da grande expressão de IFN- γ e TNF- α têm sido estudadas, no entanto, já é sabido que a expressão exagerada de IFN- γ resulta em células B, T e hematopoéticas deficientes (Young e cols., 1997). Contudo, foi mostrado que polimorfismos (SNPs) no promotor destas citocinas são capazes de modificar a expressão desses genes (Wilson e cols., 1997; Knight e cols., 1999; Bream e cols., 2002).

Neste estudo, mapeamos (através de seqüenciamento) parte da região regulatória (promotor) dos genes que codificam para TNF- α e IFN- γ em um grupo de pacientes com tuberculose pulmonar e/ ou extrapulmonar, um grupo de contatos domiciliares sem TB ativa sob risco de se infectarem pelo bacilo da TB, devidamente agrupados nos principais grupos predominantes. Adicionalmente, realizamos a análise da associação dos polimorfismos encontrados com diversas características clínicas e demográficas tais como suscetibilidade ao desenvolvimento de TB ativa, gravidade da doença e resistência do hospedeiro à infecção pelo *M.tuberculosis*, após infecção.



2. Revisão da Literatura

2.1 Histórico

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa de origem milenar cujo principal agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), dentre qualquer outro patógeno microbiano foi o que levou o maior número de pessoas a óbito (Daniel, 2006).

Acredita-se que o gênero *Mycobacterium* tenha se originado há mais de 150 milhões de anos (Hayman, 1984) e modernas técnicas de genética molecular como o seqüenciamento do genoma de várias cepas de *M. tuberculosis* permitiram uma estimativa mais rigorosa do tempo de origem da micobactéria. Esta estimativa é facilitada pela baixa taxa de mutação do *M. tuberculosis*. Em 2005, Gutierrez e cols. concluíram que um ancestral do *M. tuberculosis* estava presente na África Oriental há 3 milhões de anos já infectando hominídeos (Gutierrez e cols., 2005). Vários autores sugerem que todos os membros modernos do complexo *M. tuberculosis* tenham tido um ancestral comum há cerca de 35000-15000 anos (Gutierrez e cols., 2005, Brosch e cols., 2002, Kapur e cols., 1994). Assim, a África Oriental teria sido então, o local de origem do bacilo tubérculo tendo o homem como hospedeiro, porém, faltam evidências arqueológicas da presença de tuberculose (Hirsh e cols., 2004). As primeiras evidências documentadas da presença de tuberculose datam de cerca de 5000 anos atrás no Egito, quando descobertas em múmias egípcias, típicas de tuberculose foram identificadas (Zimmerman, 1979).

A tuberculose é claramente descrita na bíblia em ambos; Leviticus 2:16 e Deteronomy 28: 22, porém, usando a palavra no hebreu antigo “*schachepeth*”, que permanece em uso no hebreu moderno como “*schachefet*”, que significa tuberculose (Daniel,1999). Há relatos da presença de tuberculose na Índia há 3300 anos atrás e na China há 2300 anos (Daniel, 1998).



Como no Egito, evidências arqueológicas de tuberculose antiga também são encontradas na América. Assim como no Egito, a tuberculose óssea, incluindo doença de Pott é bem demonstrada em múmias peruanas, onde o DNA de *M. tuberculosis* foi identificado em tecidos mumificados. Já as evidências mais antigas de tuberculose pré-colombiana na América vêm da região dos Andes, antes da chegada dos primeiros exploradores europeus (Roberts e cols., 2003, Daniel, 2000, Salo e cols., 1994, Allison e cols., 1973).

Na Grécia clássica, a tuberculose era chamada de “*phthisis*”, sendo reconhecida por Hipócrates, que percebeu claramente sua predileção por adultos jovens (Daniel, 1997; Coar e cols., 1982). Com a entrada da Europa na idade média, o registro escrito da tuberculose ficou escasso, o que não significa que a doença não esteve presente (Roberts e cols., 2003). Há evidências arqueológicas da presença de tuberculose em várias regiões da Europa durante o milênio que seguiu a queda de Roma no 5º século (Daniel, 2006).

Com o renascimento, novos conhecimentos sobre a doença surgiram. Foi René Théophile Hyacinthe Laennec um grande anatomista, lembrado até hoje por sua invenção “o estetoscópio”, quem elucidou a patogênese da tuberculose e unificou o conceito da doença, pulmonar ou extrapulmonar (Daniel, 2000, Daniel, 2004). Em seu trabalho, Laennec não somente expôs claramente a patologia da tuberculose, mas também descreveu a maioria dos sintomas da forma pulmonar e introduziu termos para descrever esses resultados que ainda estão em uso hoje, dando início ao entendimento moderno da tuberculose.

O trabalho de Laennec foi possível em grande parte por causa de sua enorme experiência com autópsias de pacientes de tuberculose no hospital Necker em Paris. Na época, o índice de mortalidade em Londres, Estocolmo e Hamburgo se aproximaram de 800-1000/100000/ano.

No norte da Europa, a tuberculose era geralmente considerada uma doença hereditária, enquanto no Sul acreditava-se ser de natureza infecciosa, o que foi sugerido oficialmente pela primeira vez em 1790, por Benjamim Marten, que atribuiu à doença “algumas certas espécies



de *animalcula*” (Doetsch, 1978). Em 1865, o cirurgião militar francês Jean-Antoine Villemin, convincentemente demonstrou a infecção natural da tuberculose através da inoculação de “uma pequena quantidade de líquido purulento de cavidade tuberculosa”, removido em autopsia de um indivíduo que morreu de tuberculose em um coelho. Embora o animal tenha permanecido aparentemente saudável, quando sacrificado e autopsiado três meses mais tarde várias evidências de tuberculose foram identificadas (Major, 1945). Na mesma época, William Budd escreveu uma carta para *Lancet* sugerindo que tuberculose “era disseminada pela sociedade por germes específicos”.

A história da tuberculose foi mudada dramaticamente em março de 1882, quando Robert Koch fez sua famosa apresentação, “A Etiologia da Tuberculose” para a Sociedade Fisiológica de Berlin. Em sua apresentação, Koch não somente demonstrou o bacilo tubérculo que ele havia identificado, como apresentou seu famoso postulado (Daniel, 2005, Kaufmann, 2003).

Em 1890, Koch após ter injetado nele mesmo tuberculina concentrada, observou o desenvolvimento de uma reação violenta e não comum, com elevação da temperatura a 39,6°C, concluindo que sua tuberculina poderia ser usada para o diagnóstico da tuberculose. Em 1905 ele ganhou o Prêmio Nobel em medicina pela elucidação da etiologia da tuberculose (Kaufmann, 2003).

Em 1909, Clemens Freiherr Von Pirquet, um dos primeiros pediatras de Viena, usando uma lanceta para introduzir uma pequena quantidade de tuberculina diluída intracutaneamente, notou que a reação de tuberculina positiva refletia tuberculose latente (um termo que ele introduziu) em crianças que não manifestavam tuberculose (Von Pirquet, 1909). Em 1930, Florence Seibert desenvolveu o PPD (Derivado de Proteína Purificada) essencialmente na forma a qual é usada atualmente em uma série de investigações na Universidade da Pensilvânia.



Em 1955, a Organização Mundial de saúde (OMS) publicou os resultados obtidos com a utilização do teste PPD em crianças na idade escolar em várias populações (WHO, 1955). Através desta publicação, ficou claro que em países com alta prevalência de tuberculose como Etiópia e Filipinas, um número substancial de crianças saudáveis reagiram ao teste apresentando uma enduração similar àquelas apresentadas por pacientes com tuberculose, corroborando os resultados de Von Pirquet (Von Pirquet, 1909).

Enquanto o entendimento da tuberculose avançou com os trabalhos de Villemin, Koch e outros, a incidência da doença na Europa e América do Norte diminuiu. O índice de mortalidade começou a declinar no início e meado do século XIX (Davies e cols., 1999, Wilson, 1990), provavelmente devido à melhoria das condições de vida e da imunidade das pessoas, resultante de uma população geneticamente mais resistente devido à seleção natural. Contudo, nenhuma destas hipóteses foi comprovada (Davies e cols., 1999). Até os dias atuais, a incidência da tuberculose na Europa e América do Norte é historicamente baixa. Em outros lugares, especialmente na África Subsaariana, onde a incidência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é alta, a epidemia da tuberculose continua crescente.

Em 1889, Herman Biggs, após ter defendido uma tese sobre profilaxia e vigilância sanitária, tornou-se o principal médico oficial na cidade de Nova York e posteriormente, comissário de saúde no estado de Nova York, introduzindo a obrigatoriedade de registro pelos agentes de saúde dos casos de tuberculose da cidade. Embora tenha ocorrido uma grande resistência da população e classe médica, Biggs foi elogiado por Koch através de correspondência em 1906, onde o mesmo expressou que em sua opinião pareciam ser procedimentos extraordinariamente práticos e adaptados de maneira adequada para o controle da tuberculose (Winslow, 1929).

Uma contribuição mais direta para o desafio de saúde pública que a tuberculose representava foi dado por Albert Calmette e seu associado Camille Guérin (Daniel, 2005), os



quais tinham a intenção de desenvolver uma vacina contra tuberculose e empreenderam um grande esforço para atenuar o *Mycobacterium bovis* para uso como vacina, no Instituto Pasteur de Lille. Após sobreviver aos problemas gerados pela primeira guerra mundial, Calmette estava pronto para testar a vacina BCG (Bacille Calmette-Guérin) em 1921, agora no Instituto Pasteur em Paris. A vacina foi testada em um recém-nato de uma paciente de tuberculose que havia ido a óbito. E deixado a criança aos cuidados de uma avó tuberculosa. A criança sobreviveu e não desenvolveu tuberculose. Durante sete anos subsequentes, mais que 100.000 crianças foram imunizadas. A vacina foi prontamente aceita na maioria da Europa, mas não foi amplamente usada na Inglaterra (Daniel, 2005).

A incidência da tuberculose foi declinando no início do século XX, mas as devastações da primeira guerra mundial conduziram sua ressurgência. Na França, entre 1916-17 foi detectado que a tuberculose acometia entre 400.000 e 500.000 casos. Com apoio da Fundação Rockefeller e agências voluntárias francesas, o comitê nacional de defesa contra tuberculose montou uma campanha de saúde pública em todo país que trouxe medidas de saúde pública para toda França.

Em 1945, T.W. e Mostyn Davies descreveram uma pesquisa empreendida ao longo de Gales que alcançou 21627 pessoas. Deste grande número, 133 casos de tuberculose foram encontrados (0,6%) (Davies e cols., 1945).

Em 1948, uma notável campanha patrocinada pela UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância) e Cruz Vermelha dinamarquesa, baseada no teste de tuberculina seguido pela vacinação dos não-reatores, começou na Polônia, se espalhando rapidamente a outros países da Europa e no final para o Equador. Durante três anos, aproximadamente 30 milhões de pessoas foram testadas com tuberculina e 14 milhões vacinadas com BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). O programa foi, de fato, o primeiro programa de controle da doença empreendido por uma agência da Organização Mundial de Saúde (Comstock, 1994). Hoje, a



OMS continua com vários programas para o controle da tuberculose, mas já não recomenda vacinação com BCG, exceto para recém-natos. Nos Estados Unidos, onde BCG não foi extensamente usado, os programas de controle da tuberculose preconizam o tratamento de indivíduos com infecção latente (OMS).

No histórico do tratamento da tuberculose pode-se destacar o Dr. Edward Livingston Trudeau, um notável homem, vítima da tuberculose e produto de um ensino médico inconstante, ele montou um laboratório de pesquisa junto com seu sanatório e desenvolveu muitos estudos para examinar a eficácia do tratamento da tuberculose. Depois de sua morte, o “British Journal of Tuberculosis” publicou sobre seu comentário a respeito da crença na possibilidade de quimioterapia para tuberculose baseado simplesmente no que Erlich tinha demonstrado para sífilis, isto é, que um composto químico era capaz de matar o germe sem causar injúrias para as células (Trudeau, 1916). Trinta anos mais tarde, a perspectiva para pacientes com tuberculose e a história da doença mudaram dramaticamente com a introdução da quimioterapia Trudeau. A descoberta do ácido paramino salicílico (PAS) por Jorgen Lehmann em 1943 e do thiosemicarbazone por Gerhard Domagk durante o tempo de guerra na Alemanha culminaram em 1945 com o rendimento dos primeiros agentes terapêuticos eficazes no tratamento da tuberculose, ambos somente bacteriostáticos.

Em 1944, foi publicado o isolamento da estreptomicina, o primeiro antibiótico e primeiro agente bactericida efetivo contra tuberculose (Ryan, 1992, Schatz e cols., 1944). Dentro de poucos meses foi usada com resultados impactantes para o tratamento de uma paciente com tuberculose (Hinshaw e cols., 1945). Contudo, nenhuma publicação sobre o uso da estreptomicina para o tratamento da tuberculose havia sido reportada até 1950, no jornal de tuberculose britânico e doenças do tórax (Weitzman e cols., 1950).

A isoniazida foi a primeira droga micobactericida oral, descoberta em 1952 seguida da rifampicina em 1957, iniciando uma nova era para o tratamento da tuberculose. O tratamento

foi aumentado para incluir aqueles com infecção latente. A história do controle da tuberculose entra em um novo capítulo. O tratamento para curar tornou-se o objetivo buscado por toda pessoa aflita no mundo.

2.2 Tuberculose: Epidemiologia e Genética Humana

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa de evolução lenta, principalmente causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e continua, a despeito de sua origem milenar, a ser um enorme problema de saúde pública, mesmo com o difundido uso da vacina BCG, terapia multidroga e a existência de programas nacionais e internacionais de controle. Segundo a Organização Mundial de Saúde (figura1), em 2004 foram notificados 8,9 milhões de novos casos de tuberculose no mundo (140/100.000), dos quais, 3,9 milhões (62/100.000) apresentaram cultura positiva e 741.000 adultos estavam infectados pelo HIV. Mais que 80% de todos novos pacientes foram provenientes da África, Sul e Leste da Ásia e regiões do pacífico Ocidental. Uma estimativa de 1,7 milhões de pessoas (27/100.000) morreram de TB em 2004, incluindo aqueles coinfectados com HIV (248.000) (OMS, 2006). Hoje, estima-se que aproximadamente um terço da população mundial esteja infectada pelo *M. tuberculosis*.

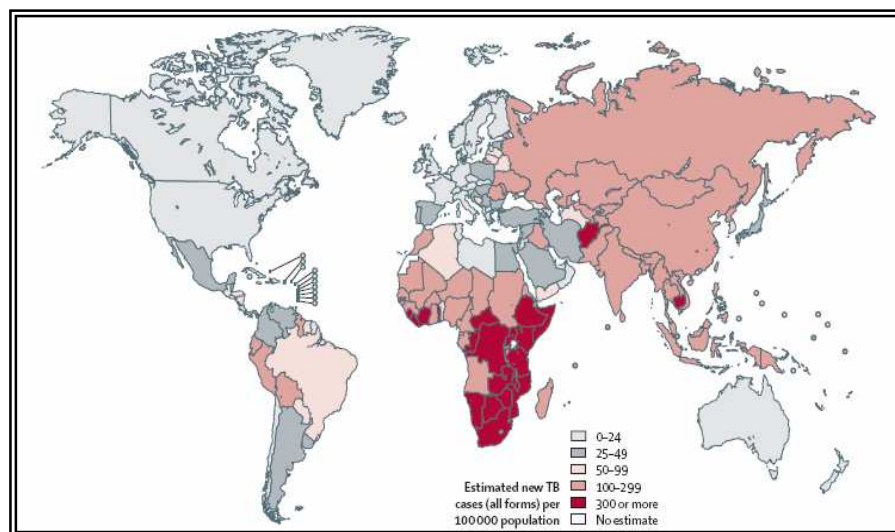


Figura1: Dados da OMS 2006. Controle Global da Tuberculose (WHO/HTM/TB/2006.362)



O Brasil ocupa o 15º lugar entre os 22 países onde se estima que ocorram 80% dos casos de TB do mundo com uma incidência de 128 mil casos/ano (REDE TB, 2005, p.11). No entanto, pouco menos que 10% destes infectados tornam-se doentes (na ausência de imunossupressão) (Sutherland e cols., 1952). Certamente um melhor entendimento dos fatores ambientais e genéticos do hospedeiro que determinam a progressão da infecção latente para doença ativa é primordial para um melhor controle desta endemia. Estudos com famílias, gêmeos e contatos não consangüíneos têm sugerido claramente a presença de fatores genéticos envolvidos na suscetibilidade ou resistência a tuberculose (Comstock, 1978, Fine 1981). Por outro lado, pesquisas recentes têm mostrado a diversidade de cepas de *M. tuberculosis* e que podem influenciar o curso da doença (McSHANE, 2003, Kremer e cols., 1999, Manca e cols., 1999). Claramente temos que lidar por um lado com um patógeno próspero, mas por outro lado um hospedeiro que tem aprendido viver com este patógeno. Hipótese recente sugere que o *M. tuberculosis* possui três milhões de anos, o que significa um longo período de co-evolução e adaptação para ambos (Gutierrez e cols., 2005).

Em geral, quando *M. tuberculosis* é introduzido numa população sem contato prévio ele deve espalhar rapidamente. Assim, no Reino Unido, com a maciça migração ocorrida durante a revolução industrial e as condições de pobreza em que vivia a população naquele momento, a oportunidade para uma epidemia era criada. Em Londres, foi estimado que 20% de todas as mortes em 1667 foram devido à tuberculose. Possivelmente o pico de tuberculose no Reino Unido por volta de 1780 (início da revolução industrial) era cerca de 1.120/100.000 por ano, com uma estimativa de morte por tuberculose de 1,25% da população/ano. Posteriormente, a incidência de tuberculose na Inglaterra, começou declinar anos antes de outras doenças infecciosas e muito antes da introdução dos programas de controle ou antibióticos (Van Helden, 2003).



A infecção pelo *M. tuberculosis* é um processo complexo que envolve múltiplos estágios desde o encontro inicial entre patógeno e hospedeiro. Em cada estágio deste processo, fatores inatos desempenham uma importante função. Enquanto crescentes evidências sugerem a presença de imunidade adquirida através de uma prévia exposição devido à vacinação com BCG, há também muitas evidências que sugerem que a infecção prévia não necessariamente confere proteção contra uma futura infecção ou progressão da doença (Rook e cols., 2005, Cosma e cols., 2004).

Excluindo os determinantes sociológicos, os prováveis fatores biológicos que estão envolvidos na resistência inata ao *M. tuberculosis* são: a bactéria, o ambiente (nutrição e outras infecções) e o hospedeiro.

2.2.1 A bactéria

Estudos de doenças infecciosas são complicados pelo fato que dois genomas, um procariótico e outro eucariótico estão interagindo por anos e não se sabe quais as possíveis influências que esta interação poderia ter na imunopatogenia ou mesmo possibilidades de cura da doença. Estudos de Epidemiologia Molecular têm demonstrado através de técnicas de genotipagem uma grande variedade de cepas diferentes de *M. tuberculosis* em circulação e, através da genômica comparativa, sabe-se hoje que o genoma de *M. tuberculosis* tem evoluído através de polimorfismos de base única (SNPs), inserção e/ ou deleções, o que tem estimulado sobremaneira a investigação da relação entre variação genética e fenótipo. Uma série de ferramentas de genotipagem para *M. tuberculosis* têm sido desenvolvidas (Kremer e cols., 1999) e a maioria destas fazem uso de elementos genéticos móveis ou sequências repetitivas de DNA. Embora essas ferramentas tenham sido fundamentais para a detecção da transmissão de tuberculose, os marcadores nos quais elas são baseadas mudam com certa rapidez, dificultando a utilização das mesmas para estudos filogenéticos (Monot e cols.,



2005). Ao contrário, polimorfismos de grandes seqüências (LSPs) representam um evento único e podem ser usados para estudos robustos de filogenia para *M. tuberculosis* (Hirsh e cols., 2004). Uma vantagem adicional é que, uma vez uma LSPs tenha sido identificada (por hibridação comparativa do genoma total), um PCR simples pode ser usado para rastrear um grande número de cepas em um modelo de auto-processamento. Em 2002, Gagneux, e cols. usou a genômica comparativa e ferramentas de epidemiologia molecular para definir a estrutura da população global de *M. tuberculosis* e investigar sua influência na dinâmica da transmissão de *M. tuberculosis* em São Francisco durante um período de 11 anos. Demonstrou que a estrutura da população de *M. tuberculosis* é definida por seis linhagens filogeográficas, cada uma associada com população humana específica (“sympatric”, isto é, maior compatibilidade de um dado patógeno infectar um determinado hospedeiro). A observação de patógenos agrupados em populações geograficamente estruturadas implica que cepas particulares e suas populações alvo correspondente (pacientes), podem ser classificadas como “Sympatric” ou “Allopatric” (Woolhouse e cols., 2002). Análise multivariada destes dados revelou que pacientes nascidos nos Estados Unidos, porém de origem étnica bem definida (chinesa e filipina) tendem a abrigar a mesma cepa de pacientes nascidos na China e Filipinas, respectivamente. Uma vez que a etnicidade bem definida é um bom marcador de ancestralidade genética em humanos, estas observações demonstram claramente uma associação entre patógeno-hospedeiro. A adaptação de determinados grupos do patógeno a populações específicas do hospedeiro é uma característica que deve, portanto ser considerada, quando da criação e avaliação de novos candidatos a vacina contra a tuberculose. Diferenças na seqüência do DNA entre isolados clínicos podem estar associadas com diferenças na efetividade ou virulência. Em 1998, Valway e cols., investigando a cepa de *M. tuberculosis* (atualmente conhecida como CDC1551) revelaram que a mesma tinha uma alta transmissibilidade em humanos e foi significativamente mais virulenta em modelo animal que



outros isolados clínicos. Estudos imunológicos detalhados desta cepa mostraram que ela induziu níveis mais altos de TNF- α , IL-10, IL-6 e IFN- γ que outras cepas nos pulmões de ratos infectados e quando crescidas em monócitos humanos (Manca e cols., 1999).

Estudos posteriores de outros isolados clínicos têm mostrado evidências claras da importância desta modificação na resposta imune induzida pelo patógeno. Em estudo conduzido por Manca e cols., 2001, a hipervirulência do isolado HN878 foi claramente demonstrada em modelo animal. Ratos infectados com esta cepa falharam na indução da resposta do tipo Th1 e apresentaram baixos níveis de IFN- γ e TNF- α nos pulmões.

A associação entre a diversidade da sequência de DNA do patógeno e a variação na resposta imune do hospedeiro demonstra claramente a importância da investigação das diferenças genéticas entre cepas de *M. tuberculosis*. O desenvolvimento de uma resposta imune tipo Th1 é essencial para imunidade protetora contra este patógeno, que é intracelular e reside principalmente em macrófagos. Como tal, a ativação de macrófagos, principalmente por IFN- γ , é fundamental para a resposta imune protetora em ratos e humanos (Flynn e cols., 2001). Se a diversidade da sequência de diferentes cepas de *M. tuberculosis* resulta na diferença da habilidade para induzir uma resposta imune do hospedeiro tipo Th1, então isto deve explicar diferentes padrões da doença.

Lopez e cols. em (2003), usou um modelo animal de tuberculose pulmonar para investigar o papel da diversidade genética do patógeno na determinação da patogenicidade e imunogenicidade usando doze cepas distintas de *M. tuberculosis* definidas com base no padrão de RFLP IS6110 e representando quatro famílias dos principais genótipos encontrados no mundo hoje. Eles investigaram a resposta imune, sobrevivência depois do desafio e mudanças histopatológicas no rato infectado com estas diferentes cepas e compararam os mesmos parâmetros em ratos infectados com a cepa de referência H37RV. No mesmo estudo investigaram também a eficácia protetora de BCG contra estas diferentes cepas e encontraram



marcantes diferenças nos padrões de indução de citocinas e imunopatologia entre elas. Ratos infectados com o genótipo Beijing tiveram uma carga bacilar significativamente mais alta e razão de mortalidade em quatro semanas após infecção, enquanto ratos infectados com o genótipo Canetti tiveram uma carga bacilar mais baixa e áreas significativamente menores de pneumonia comparado com o tipo Beijing. As diferenças com outros genótipos foram menos marcantes e mostraram índices intermediários de sobrevivência. A eficácia protetora de BCG para os diferentes genótipos variou, sendo menos protetora contra o genótipo Beijing. A diferença da razão de mortalidade entre os genótipos neste estudo, não pode ser explicada pelo padrão de secreção de IFN- γ encontrado, pois os genótipos Beijing e Canetti induziram níveis similares de IFN- γ no final da infecção apesar deles terem induzido índices de mortalidade muito diferentes. A infecção com o genótipo Canetti induziu um nível constante de TNF- α em contraste à cepa Beijing que induziu TNF- α somente no estágio inicial.

Estas descobertas são importantes e pertinentes porque o genótipo Beijing é a cepa predominante de *M. tuberculosis* em várias áreas geográficas distintas, presumivelmente por causa de uma vantagem seletiva desta cepa sobre as outras (Caminero e cols., 2001).

Recentes estudos realizados por Tsenova e cols., 2005, concluíram que a cepa Beijing é mais patogênica, causa uma resposta febril na infecção e tem mais alta propensão a desenvolver resistência a droga. Além disso, esta cepa induz uma resposta imune tipo Th2 no hospedeiro após a infecção permitindo assim a progressão para a doença ativa. Isto difere dos princípios genéticos do grupo 2, cepa CDC1551, a qual induz uma forte resposta Th1 e menor progressão para doença. Vários estudos mostram que cepas de *M. tuberculosis* têm diferentes razões de crescimento e induzem diferentes tipos de resposta imune do hospedeiro (Tsenova e cols., 2005, Janulionis e cols., 2005).

Um maior entendimento dos diferentes padrões de produção de citocinas induzidas por diferentes cepas e como isto se traduz em virulência ajudará a identificação do evasivo



correlato de proteção que é necessário para a avaliação clínica do candidato a vacina mais promissor.

2.2.2 O ambiente

A tuberculose humana tem sido considerada como uma doença complexa com um forte componente genético. Além da contribuição de fatores genéticos para suscetibilidade a doença, sabe-se que fatores ambientais também constituem um importante aspecto envolvido na suscetibilidade. Intensa exposição, saúde debilitada, má nutrição, outros organismos infecciosos, hormônios (hormônios esteróides), estress social e abuso de substâncias (como tabaco e álcool) são considerados como importantes fatores de risco para o desenvolvimento da tuberculose.

Em um estudo de associação entre fumo e infecção por tuberculose realizado por den Boon e cols. 2005, em Cape Town, África do Sul, comunidade com alta incidência de tuberculose, os autores concluem que as razões para o aumento do risco de infecção nos fumantes não está clara, mas pode ser explicada pelos efeitos do fumo na defesa pulmonar do hospedeiro.

A associação da tuberculose com a pobreza e conseqüentemente com má nutrição e desequilíbrio de nutrientes é muito importante no caso de doenças infecciosas. Vários estudos têm mostrado que o lipídeo Omega-6, ácido araquidônico, bem como seis outros lipídeos pró-inflamatórios poderiam estimular a montagem de actina do fagossomo, fusão com lisossomo e um significativo aumento na morte do patógeno. Em contraste, a adição do lipídeo Omega-3, especialmente ácido eicosapentanóico, suprime a montagem de actina do fagossomo e induz um significativo aumento no crescimento da micobactéria patogênica (*Mtb* e *M. avium*) em macrófagos (Anes e cols., 2003). A habilidade desses lipídeos de aumentar o crescimento do patógeno foi também mostrada em ratos e cobaias, para *M. tuberculosis* e Salmonela (Paul,



1997, Chang, 1992). Possivelmente a manipulação dietética de Omega-6 e outros lipídeos pró-inflamatórios podem ajudar a restringir o crescimento do patógeno dentro do macrófago fagossomo. Kris-Etherton e cols., 2002, mostraram em modelo animal, que intervenção dietética até mesmo em curto prazo pode ter efeitos dramáticos no processo acima mencionado.

A influência do gênero na suscetibilidade a tuberculose nunca foi muito bem explicada. No mundo inteiro, nota-se claramente uma mesma tendência na incidência de acordo com o gênero. Na infância, nenhuma diferença significativa é notada, porém, durante a adolescência, o gênero feminino apresenta uma taxa inicialmente mais alta de tuberculose, enquanto na maioridade, ocorre uma inversão, com maior número de casos sendo encontrado no gênero masculino. Acredita-se que esta diferença na maioridade pode ser atribuída a diferenças comportamentais e culturais, mas outros fatores podem também ter importância neste contexto. Roberts e cols., 2005, mostraram que a preferência no consumo de alimento em pacientes hospitalizados é diferente entre homens e mulheres. Adicionalmente, sabe-se também que hormônios esteróides, tal como DHEA (dehydropiandrosterone), aparentemente influenciam o curso da doença, especificamente em concentrações mais altas exacerbando a patologia (Rook e cols., 1997).

Segundo Eide e cols., 2005, os micronutrientes, tais como o ferro em concentrações aumentadas e baixos níveis de algumas vitaminas antioxidantes também representam fatores de risco para o desenvolvimento de tuberculose ativa. O efeito global destes micronutrientes é crítico (Eide e cols., 2005).

Aparentemente existe uma grande correlação entre fatores ambientais e fatores genéticos de risco para a tuberculose. É possível que fatores de suscetibilidade genética detectados num estudo, mas não em outro sejam falsos positivos, contudo, é também possível que a dificuldade na reprodução dos resultados provenientes da análise de fatores genéticos de risco



seja simplesmente devido à deficiência no entendimento da patogênese da doença e a função desempenhada pela interação gene-ambiente. Por outro lado, parece igualmente provável que certas vias de respostas fundamentais do hospedeiro estão diretamente sob o fenótipo da doença. Defeitos genéticos em tais vias provavelmente não são afetados por fatores ambientais outros que não seja a exposição ao *M. tuberculosis*.

Assim como resultado desta interação gene-ambiente, o que podemos verificar é que há fortes fatores genéticos de risco que agem independentemente da modulação de fatores ambientais, outros são evidenciados somente no contexto da interação gene-ambiente e possivelmente haverá exemplos em que o ambiente anula qualquer limite genético existente.

2.2.3 O hospedeiro

Embora a importância dos fatores ambientais na suscetibilidade à tuberculose seja confirmada, vários estudos têm demonstrado que os fatores genéticos de risco são ainda mais importantes na determinação do desfecho após a infecção (Soborg e cols., 2007).

Crescentes evidências têm demonstrado a importância dos fatores genéticos na resposta humana a patógenos infecciosos. Várias são as abordagens utilizadas para a identificação de genes candidatos ligados à suscetibilidade humana a doenças infecciosas, dentre os quais: i) análise comparativa de regiões do genoma humano com diferentes regiões conservadas do genoma murino, sabidamente envolvidas com suscetibilidade a doenças; ii) investigação do genoma total usando multicópios de famílias para testar ligação genética entre suscetibilidade e marcadores microssatélites informativos, distribuídos uniformemente pelo genoma e iii) exploração do conhecimento prévio das principais moléculas envolvidas no desenvolvimento da resposta inata e adquiridas (Naik, 2006).

2.2.3.1 Identificação de genes de suscetibilidade a tuberculose



A suscetibilidade genética a tuberculose é uma característica multifatorial. Nenhuma estratégia simples é capaz de identificar todos os genes potencialmente envolvidos devido a limitações nos desenhos de estudo. Contudo, estudos de ligação no genoma total humano podem ser usados para identificar regiões genômicas que contenham loci associados à suscetibilidade. Famílias com pares de irmãos (e outras famílias com números relativamente pequenos de pessoas afetadas) são usualmente selecionadas para estudos de transmissibilidade. Uma família com par de irmãos é aquela em que dois irmãos são afetados pela doença de interesse. Neste tipo de estudo, todos são incluídos na varredura do genoma independente dos parentes estarem afetados pela doença. Esta investigação sistemática e compreensiva deveria teoricamente detectar algum locus genômico o qual exerça um maior efeito de risco de doença em grandes populações (Bellamy, 2006). Contudo, esta abordagem não tem a força para detectar loci gênicos capazes de conferir somente um efeito moderado no risco da doença em grandes populações, pois um número muito grande de famílias seria necessário para identificar este efeito por ligação (Risch e cols., 1996).

Normalmente, a varredura de genoma é a primeira etapa na procura de um gene candidato a suscetibilidade a doenças multifatoriais. Depois da detecção da ligação é necessário tentar localizar o gene de interesse mais precisamente olhando para o desequilíbrio de ligação. Um mapa físico da região contendo o suposto gene pode então ser elaborado e a procura por um gene candidato em potencial iniciada. Esta estratégia foi usada com sucesso para identificar o gene murino *nramp1* e o gene humano *NRAMP1* (Malo e cols., 1993, Schurr e cols., 1990, Schurr e cols., 1989, Gros, 1981). A primeira varredura de genoma e procura de genes candidatos à suscetibilidade em tuberculose foram conduzidos em duas amostras de pares de irmãos afetados provenientes da Gâmbia e da África do Sul, no qual, marcadores nos cromossomos 15q11-q13 e Xq26 mostraram evidências sugestivas de ligação à tuberculose (Bellamy e cols., 2000). Em recente varredura do genoma com o mesmo objetivo conduzido



no Brasil, um grupamento de genes de suscetibilidade a tuberculose foi identificado no cromossomo 17q11. 2 (Jamieson e cols., 2004) indicando a presença de quatro genes candidatos, NOS2A (nitric oxide synthase gene), CCL18 (CC chemokine ligand-18), CCL4 (CC chemokine ligand-4) e STAT5B (Signal transducer and activator of transcription 5), os quais aparentemente devem contribuir para esta região de ligação. Espera-se, no entanto, que outros loci identificados por outras varreduras de genoma murino e humano também conduzam a identificação de outros genes envolvidos na suscetibilidade a tuberculose.

A identificação de genes que contribuam para doenças complexas é o maior desafio da era pós-genômica. A complexidade genética das várias doenças poligênicas requer o estudo de centenas e milhares de marcadores genéticos e o limitado progresso neste campo tem gerado um substancial debate científico em relação às estratégias ótimas para localização e identificação de genes envolvidos nestas desordens humanas complexas. (Pritchard e cols., 2002, Wright e cols., 2001, Reich e cols., 2001, Terwilliger e cols., 1998). Como resultado, observa-se que possivelmente dentre os múltiplos genes envolvidos nestes fenótipos complexos, a maioria tem um efeito relativamente fraco, enquanto interagindo fortemente com outros genes e fatores ambientais (Zonderva e cols., 2004). Portanto, estes fatores essencialmente impedem o uso de análise de ligação, cujo sucesso depende de um efeito mais forte e poucos fatores confundidores para elucidação de componentes genéticos de fenótipos de doenças comuns.

Os estudos de associação, nos quais a frequência alélica no locus polimórfico é comparada entre uma população afetada e uma sadia (controle) são considerados como a ferramenta mais eficaz para estudar características complexas devido ao maior poder estatístico para detectar genes com pouco efeito (Martin e cols., 2000, Long e cols., 1999). A simples comparação da frequência de SNPs em casos e controles não relacionados, já permite a detecção de genes que estão em desequilíbrio de ligação (LD) com um determinado SNP. Dependendo de sua



posição no gene de estudo, pode desempenhar ou não um papel funcional na regulação da expressão gênica e na mudança da estrutura ou função da proteína, contribuindo diretamente para a variação do fenótipo.

Com a progressiva melhoria dos métodos para a identificação de SNPs, tal como o seqüenciamento (padrão ouro), podemos agora avaliar todas as variações genéticas possíveis nas regiões codificante e regulatória de cada gene de interesse individualmente para estudos de associação direta. Até então, estudos de associação direta são limitados à análise do SNP candidato, onde a associação entre a suposta variante funcional e riscos de doença são testados (Suh e cols., 2005).

Os SNPs funcionais podem ser caracterizados como SNPs codificantes (cSNPs), que mudam aminoácidos ou SNPs regulatórios, que modulam a expressão ou “splicing” do gene. A identificação de mais de mil e setecentos genes envolvidos com doenças humanas e com múltiplas mutações ligadas a suscetibilidade, durante as duas últimas décadas provêm evidências de que a maioria das doenças é influenciada por fatores genéticos (Stenson e cols., 2003). Assim, um importante fator a ser levado em consideração para os estudos de associação de genes candidatos com suscetibilidade a doenças é a definição das moléculas que estão funcionalmente implicadas (possuem conhecida função biológica) com a doença a ser estudada.

A tuberculose é uma doença infecciosa com um amplo espectro de formas clínicas e vários estudos relativos à associação de fatores genéticos com a ocorrência da doença têm sido reportados com genes candidatos tais como *SLC11A1* (*NRAMP1*), HLA, VDR e vários genes de citocinas.

Muitos dos genes que controlam a suscetibilidade e resistência a doenças infecciosas estão localizados na região dos antígenos leucocitários humanos (HLA). Estudos de associação entre HLA e TB pulmonar já foram realizados em diferentes populações com resultados que



demonstraram também a importância da etnia na definição do marcador envolvido. Em indianos, por exemplo, os alelos HLA-DRB1*1501 e DQB1*0502 foram significativamente mais frequentes em pacientes com TB pulmonar que em controles saudáveis em (Meyer e cols., 1998, Ravikumar e cols., 1999). Já na população vietnamita, o alelo HLA-DQB1*0503 foi associado com suscetibilidade à tuberculose (Goldfeld e cols., 1998). A grande variabilidade genética humana evidenciada entre populações de diferentes etnias deixa claro a importância deste fator na reprodutibilidade dos resultados provenientes deste tipo de estudo, por isto, para a determinação dos fatores envolvidos com a doença, é importante que os estudos sejam conduzidos separadamente dentro de cada população pois é perfeitamente possível que um determinado SNP, por exemplo, esteja envolvido com suscetibilidade a um determinado desfecho relativo a uma doença em uma população e não em outra. De qualquer forma, muitos destes estudos têm indicado genes e vias que são importantes na patogênese de várias doenças (van Helden, 2006).

2.2.3.2 Estado da arte dos genes avaliados neste estudo

NRAMP1 ou SLC11A1

A proteína de macrófago associada à resistência natural NRAMP1 é uma proteína integral de membrana, expressa somente no lisossomo de macrófagos e monócitos. Depois da fagocitose da bactéria, NRAMP1 é dirigida para a membrana do fagossomo contendo a bactéria, onde deve modificar o ambiente para afetar a replicação da bactéria, agindo como uma bomba de cátion divalente a qual poderia remover ferro ou outros cátions divalentes do fagossomo (Blackwell e cols., 2000).

O gene homólogo humano de *Nramp1* foi originalmente designado *NRAMP1*, sendo posteriormente renomeado como *SLC11A1* (Solute carrier family 11 member 1) e está localizado no cromossomo 2q35. Contém 15 exons distribuídos em um fragmento de DNA de



12 Kb e codifica uma proteína de 550 aminoácidos (Celier e cols., 1994). Vários polimorfismos têm sido identificados no gene humano *NRAMP1* e avaliados em estudos de ligação e associação com suscetibilidade a tuberculose em populações humanas. O primeiro estudo para demonstrar uma associação entre suscetibilidade a tuberculose e *NRAMP1* foi um estudo do tipo caso controle na população de Gâmbia, Oeste da África, no qual quatro diferentes polimorfismos, 5'(CA)_n, INT4, D543N e 3'UTR foram significativamente associados com a suscetibilidade a ocorrência de tuberculose ativa. Indivíduos que foram heterozigotos para ambos os alelos INT4 e 3'UTR estavam particularmente bem representados naqueles com tuberculose o que conduziu a um aumento de 4 vezes o risco de tuberculose comparado com os controles etnicamente agrupados. Os autores concluem que estes polimorfismos de *NRAMP1* são fatores de risco para a TB no Oeste da África (Bellamy e cols., 1998). Em um segundo trabalho, avaliando o polimorfismo INT4, o mesmo grupo mostrou num estudo baseado em família com uma população de Guiné-Conakry uma associação significativa com suscetibilidade para TB (Cervino e cols., 2000). O polimorfismo em 3'UTR do gene *NRAMP1* foi ainda associado à ocorrência de TB na população coreana (OR 1.85; CI 95%) (Ryu e cols., 2000) e o polimorfismo 5'(CA)_n no Japão (OR, 2.07) (Gao e cols., 2000). Em contraste, em um grande estudo baseado em famílias brasileiras nenhum dos polimorfismos descritos no locus *NRAMP1* foi associado com suscetibilidade a TB (Shaw e cols., 1997).

A variante alélica de 3'UTR, associada à suscetibilidade na tuberculose em algumas populações é muito incomum em caucasianos, mas muito freqüente na Coréia e Oeste da África. Estas observações devem explicar em parte porque africanos americanos e coreanos tem maior suscetibilidade a tuberculose que os caucasianos (Ryu e cols., 2000).

O polimorfismo 5'CA é uma repetição complexa (Blackwell e cols., 1995), a qual teve o seu papel funcional definido na regulação da expressão gênica de *NRAMP1* (*SLC11A1*) em



um sistema repórter de luciferase (Searle e cols., 1999). Há quatro variantes neste sítio: os alelos 1 e 4, que são raros (frequências de <0.001) e os alelos 2 e 3, que ocorrem em frequências de aproximadamente 25% e 75% respectivamente. O alelo 3 regula positivamente a expressão gênica em níveis altos quando comparados com os outros alelos e a estimulação com lipopolissacarídeos (LPS), aumenta ainda mais a expressão de *NRAMP1*. Este alelo foi associado com resistência à tuberculose em Africanos e o alelo 2, com atividade promotora mais baixa, foi associado com suscetibilidade (Bellamy e cols., 1998). Em 2002, um estudo caso controle conduzido por Awomoyi e colaboradores na população da Gâmbia, reproduziu associação do alelo 2 no promotor de *NRAMP1* e suscetibilidade a tuberculose.

Em outro estudo de associação de polimorfismos no gene *NRAMP1* na população japonesa realizado por Abe e cols., 2003, nenhuma associação foi encontrada com suscetibilidade, porém, o alelo A do polimorfismo D543N, por análise de regressão logística com ajuste para sexo, idade e presença de diabetes, foi significativamente associado ao desenvolvimento de lesão cavitária.

Em 2005, Zhang e colaboradores, examinando a possível associação das variantes de INT4 e D543N, com formas graves de tuberculose pulmonar, verificaram que os polimorfismos existentes nestes dois loci estavam significativamente associados com as formas graves de tuberculose pulmonar e tuberculose cavitária, porém, as variantes não estavam associadas com infecção pulmonar por *M. tuberculosis per se*, o que sugere que estas variantes de *NRAMP1* poderiam ter um efeito no crescimento do bacilo e no desfecho de tuberculose pulmonar, mas não na suscetibilidade a infecção (Zhang e cols., 2005).

Em 2006, Li e colaboradores em uma meta análise sobre os estudos de associação entre as variantes alélicas de *NRAMP1* e suscetibilidade a TB, mostraram que as variantes alélicas dos quatro principais polimorfismos (3'UTR, D543N, INT4 e 5'[GT]n) foram as mais estudadas, com resultados que variaram substancialmente entre diferentes populações. As variantes dos



polimorfismos 3'UTR ou D543N, por exemplo, foram associadas com suscetibilidade a TB em pacientes da Gâmbia, China, Japão e Coreia, mas não naqueles da Índia, Camboja, Maluá, Guiné e Taiwan. Segundo os autores, várias poderiam ser as explicações para tal, dentre as quais: i) tamanho amostral; ii) viés de seleção ou ainda; iii) diversidade da população. Nesta meta-análise, 17 estudos entre 1998 a 2004 foram avaliados. Três foram excluídos por estarem em desequilíbrio para Hardy-Weinberg e 14 estudos caso-controle foram escolhidos, envolvendo um total de 2460 casos e 3227 controles distribuídos em diferentes grupos geográficos, com 49% de casos de descendentes Africanos, 41,7% de Asiáticos e 9,3% de Europeus de modo a ajustar o "background" étnico como fatores confundidores. Após a avaliação final, ficou demonstrado que as variantes dos polimorfismos em 3'UTR, D543N e 5'(GT)_n tem uma associação com a ocorrência de tuberculose pulmonar na população como um todo. Com (ORs 1.33, 1.67 e 1.32), correspondendo a um risco relativo de 1.27, 1.61 e 1.25, respectivamente, ou seja, pessoas com alelos menos comum nos três loci tiveram um risco mais alto (27%, 61% e 25%) de desenvolver tuberculose pulmonar que aqueles que possuíam os alelos selvagens. Na população Asiática, principalmente nos descendentes do Leste Asiático, as variantes nos três loci acima descritos foram associadas com um risco aumentado de suscetibilidade a TB de 39%, 59% e 65%, respectivamente. Nenhum dos três polimorfismos descritos acima em *NRAMP1* apresentou associação significativa com suscetibilidade a TB na população de origem Européia. No entanto, exceto para a variante 3'UTR, os mesmos estão associados com este desfecho na população Africana. Uma análise combinada de estudos com o variante INT4 não demonstra associação global significativa com TB em sujeitos de origem Asiática e Européia. Resumindo, alelos menos comum nos quatro loci mostraram geralmente conferir um aumento de risco de tuberculose pulmonar nos portadores da população Africana e Asiática, o que pode explicar em parte por que Africanos e Asiáticos têm maior suscetibilidade a TB que aqueles de descendência Européia.



O resultado de alguns estudos baseados em família para a avaliação de possível associação entre variantes de *NRAMP1* com suscetibilidade a TB também são conflitantes. Porém, os estudos de associação baseado em gene candidato, parecem mais apropriados para avaliação de suscetibilidade a doenças humanas complexas como tuberculose (Spielman e cols., 1996).

Li e cols., 2006, também exploraram o potencial de heterogeneidade entre os estudos. Etnicidade, tamanho amostral e média de idade dos casos foram empregados como características para avaliação de heterogeneidade. Dos estudos com os três loci (3'UTR, INT4 e 5'(GT)n) que tiveram ou mostraram uma tendência na heterogeneidade entre os diversos estudos, etnicidade e tamanho amostral, mostraram uma associação estatisticamente significativa, assim como a média de idade dos casos nos estudos com INT4 e 5'(GT)n.

Uma complexa interação entre fatores genéticos do hospedeiro e outros fatores, bem como fatores ambientais, refletem a dificuldade para comparação entre diferentes estudos. Apesar desta dificuldade, a associação das variantes polimórficas 5'(CA)n com TB nas populações de Gâmbia, Dinamarca e Estados Unidos (Bellamy e cols. 1998, Soborg e cols., 2002, Ma 2002) foi determinada.

Interferon- γ (IFN- γ)

A complexidade dos mecanismos imunes necessários para proteção do hospedeiro humano a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* ainda não são completamente entendidos. Contudo, vários estudos envolvendo modelos animais de infecção têm implicado células T como um essencial componente da resposta imune ao *Mycobacterium tuberculosis*. A citocina Interferon – gama (IFN- γ), produzida principalmente por células T e células NK tem se mostrado um importante mediador da ativação de macrófagos no controle de patógenos intracelulares. Em estudo conduzido por Flynn e colaboradores em 1993, a importância do IFN- γ na resistência a infecção por *M. tuberculosis* foi testada utilizando ratos



“knockout” para IFN- γ . Ratos homocigotos knockout para o gene IFN- γ interrompido (*gko*) não produziram IFN- γ , mas eram saudáveis na ausência do patógeno e não apresentavam alterações na população de células do baço ou timo. Contudo, a ativação de macrófagos *in vitro* destes ratos (*gko*) foi grandemente reduzida quando da estimulação com *M. bovis* BCG levando os mesmos a morte. O IFN- γ é uma citocina multifuncional, essencial no desenvolvimento de células Th1 e na resposta celular para uma variedade de patógenos incluindo HIV-1. Tem sido demonstrado que defeitos em genes que afetam o IFN- γ mediado pela resposta imune Th1 conferem suscetibilidade a tuberculose (Picard e cols., 2002).

O gene *IFN- γ* humano está localizado próximo aos microssatélites D12S335 e D12S313 no cromossomo 12q15 (Gray&Goeddel,1982, Bureau e cols.,1995), possui aproximadamente 5.4kb e contém quatro exons que codifica uma proteína de 166 aminoácidos. Como já observado para outras citocinas, a região codificante do *IFN- γ* é muito conservada e até hoje nenhum polimorfismo foi registrado.

A região regulatória principal dentro do promotor do gene *IFN- γ* foi identificada através de estudos de análise de deleção envolvendo uma região altamente conservada entre a posição -100 a -30 e contém duas sub-regiões que podem complexar com proteínas. Em 1986, Penix e colaboradores demonstraram que no promotor deste gene, especificamente entre os nucleotídeos -108 e -40 existem dois elementos regulatórios essenciais e conservados, que conferem ativação específica da expressão desta molécula em células T e que o mais proximal seria um importante determinante da limitação de sua expressão. O elemento proximal é um sítio composto que liga os membros do CREB/ATF (activating transcription factor) e AP-1 (activator protein) entre outros fatores de transcrição. Adicionalmente, demonstraram também que a metilação do dinucleotídeo central CpG deste elemento diminui a ligação de fatores de transcrição, diminuindo a expressão de *IFN- γ* pelas células T, sugerindo assim que o elemento



proximal no promotor do gene de *IFN- γ* , desempenha uma importante função na expressão seletiva desta citocina pelas células T.

Funcionalmente, loci polimórficos nos promotores (Kroeger e cols., 1997, Song e cols. 1996) e introns (em algumas citocinas) (Bailly e cols., 1996) têm sido associados à regulação da expressão gênica. No gene de *IFN- γ* humano, por exemplo, foi mostrado que o intron 1 contém um proeminente sítio de DNase I, hipersensível na ativação da transcrição do mesmo (Hardy e cols., 1985, 1987), além de um elemento potencializador que liga proteínas NF κ B (Sica e cols., 1992) e sítios de ligação de transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) (Xu e cols., 1996).

Poucas são as variações na região promotora do gene de *IFN- γ* descritas na literatura com potencial para afetar sua expressão. Contudo, polimorfismos de base única nesta região têm mostrado papel funcional, afetando a ligação de fatores envolvidos na transcrição (Bailly e cols., 1993, Penix e cols., 1993, 1996). Outros polimorfismos como o microssatélite (CA) $_n$, presente no intron 1 do gene foi descrito por Ruiz-Linares e cols. em 1993. Estudos subsequentes, realizados por Awata e cols., 1994; Pociot e cols., 1997, mostraram a característica polimórfica desta variação genética, sugerindo a presença de seis diferentes alelos, os quais se diferenciavam somente pelo número de repetições CA, sendo o alelo 1 correspondente a 11 repetições, o alelo 2 correspondente a 12 repetições e os alelos 3-6 correspondentes de 13 a 16 repetições (Awata e cols., 1994; Pociot e cols., 1997). No intron 3, região 3' não traduzida, três outros polimorfismos foram documentados por Bream e cols. em 2000.

Na tentativa de identificar novos polimorfismos no gene de *IFN- γ* , os autores analisaram amostras de DNA genômico de uma coorte composta predominantemente de caucasianos, paralelamente, testaram ainda a associação do microssatélite (CA) em relação à infecção com HIV-1 e progressão para AIDS. De acordo com a literatura, o microssatélite (CA) $_n$ já foi



associado à diabetes Mellitus tipo 1 insulina dependente (Awata, 1994), embora esteja fracamente correlacionado com a produção de IFN-gama *in vitro* (Pravica e cols., 1999). O resultado deste estudo demonstrou que a região proximal do promotor do gene de *IFN-γ* humano apresentou-se muito conservada na população analisada, pois nenhuma variante alélica foi identificada em mais de 100 amostras testadas HIV+ e HIV-. Contudo, quatro SNPs em introns [(intron 1 = +1480 poly-T; intron 3= +2118(A/G); +2326(T/C) e +3812(G/A)] e uma na região 3'UTR [+4766 (C/T)] foram encontradas.

O dinucleotídeo (CA)_n foi ainda associado com suscetibilidade e gravidade à artrite reumatóide na população Canadense (Khani-Hanjani e cols., 2000) e em indivíduos Britânicos saudáveis, o alelo 2 foi associado com produção de concentrações mais altas de IFN-gama *in vitro* (Pravica, 1999). Em 2000, Pravica e cols. relataram a presença de uma mutação de base única (SNP) correspondente a uma substituição T→A na extremidade 5' do microssatélite CA (+874 T/A) e adicionalmente mostraram uma relação absoluta entre a presença do alelo T e o alelo 2 (alto produtor de IFN γ). Este SNP (T/A) localiza-se em um sítio de ligação do fator de transcrição NF κ B (Heinmeyer e cols., 1998), sugerindo assim, uma atividade funcional na transcrição do gene de IFN γ e portanto, com uma associação direta com a produção dos níveis de IFN γ associado com o microssatélite CA.

Em 2002, Bream e colaboradores identificaram um SNP raro na região promotora de *IFN-γ*, na posição -333 consistindo da uma substituição C/T, porém, seu papel funcional não foi investigado. Na ocasião o grupo descreveu ainda mais um SNP na região promotora, posição -179 G/T, com possível influência no domínio de ligação AP-1 e outro na posição +445 no primeiro intron consistindo de uma transição de C para T. (Bream e cols., 2002). No mesmo ano mais dois novos polimorfismos foram identificados na região promotora, respectivamente nas posições -183 (transição de G para T) e na posição -155 (transição de A para G). Com relação ao papel funcional, aparentemente o polimorfismo -183(G/T), resulta na mesma



função biológica do polimorfismo -179 (G/T) descrito por Bream e cols., 2002, alterando o domínio de ligação AP-1 e a regulação da transcrição. Já o polimorfismo -155(A/G), devido a sua localização próximo ao sítio nuclear do fator de ativação de células T (sítio NFAT) (-168 TAAAGGAAA-160), parece afetar a estabilidade desta região (Chevillard e cols., 2002).

Pouco tem sido publicado de estudos de associação entre polimorfismos no gene *IFN- γ* e suscetibilidade a tuberculose. López-Maderuelo, 2003, testou a hipótese de que uma produção mais baixa de IFN-gama, IL-10 ou ambas determinada geneticamente poderia influenciar suscetibilidade ou gravidade na tuberculose pulmonar. O estudo foi conduzido em pacientes brancos com doença ativa, contatos saudáveis tuberculina positiva e tuberculina negativa e sujeitos controles não expostos, para determinar a influência desses polimorfismos na suscetibilidade e expressão da doença e acessar alguma significância funcional pela correlação *ex vivo* da produção de IFN-gama e IL-10 com os genótipos *IFN- γ* e *IL-10*. Este estudo revelou que o polimorfismo *IFN- γ* (+874) é significativamente associado com tuberculose pulmonar; provê evidências que este polimorfismo influencia a produção de IFN-gama com indução de PPD (*Purified Protein Derivative*) em pacientes, contatos saudáveis e sujeitos normais não expostos. Uma associação entre o polimorfismo *IFN- γ* (+874) T/A e tuberculose foi publicado em amostras de 45 pacientes Sicilianos afetados por tuberculose (Lio, 2002), contudo, a significância funcional da associação não foi explorada.

Um outro estudo de associação dos genes *IFN- γ* e *IL-10* com tuberculose foi investigada por Tso et al., 2005, em 385 pacientes com TB ativa (HIV-) e 451 controles na população Chinesa em Hong Kong. Os resultados mostraram que indivíduos portadores do genótipo +874(A/A) tinham um aumento de 3.79 vezes de risco de desenvolverem tuberculose e o alelo 2 estava absolutamente ligado ao +874A nesta população como previamente publicado na população Britânica (Pravica, 2000). O resultado da associação de polimorfismos no gene de



IL-10 com TB foi inconsistente e deve refletir variações étnicas específicas, ou sugerem a possibilidade que elementos mais distais no promotor estejam envolvidos (Gibson, 2001).

Associação positiva do *IFN- γ* (+874) com TB foi registrada primeiro nos Sicilianos (Lio, 2002), depois nos Espanhóis (Lopez-Maderuelo, 2003) e nos Sul Africanos (Rossouw, 2003). A frequência de risco A/A na população Chinesa (45,7%) foi menor que a da África do Sul (47%), mas mais alta que na Sicília (26%) e Espanha (28%). Também, a frequência do alelo de proteção 12 CA na população Chinesa (33,3%) foi menor que da Caucasiana (35%), mas mais alta que a de Americanos Africanos (26%) (Lee, 2001).

Vidyarani et al. (2006) avaliou a associação de polimorfismos na região intrônica do gene *IFN- γ* (+874A) e região promotora do gene *IL-4* (-590T) para estudar a influência desses polimorfismos na suscetibilidade a tuberculose na população Sul Indiana. Os genótipos foram em seguida associados com os níveis de *IFN- γ* e *IL-4* produzido espontaneamente e em estimulação com antígeno *in vitro* para acessar a influência desses polimorfismos na produção de citocinas. O estudo sugeriu uma falta de associação funcional do polimorfismo *IFN- γ* (+874A) com tuberculose na população Sul Indiana.

Finalmente, em 2007, Amim e cols, no primeiro estudo de associação deste polimorfismo com tuberculose no Brasil, demonstraram que o alelo +874A foi significativamente associado com tuberculose e que carreadores heterozigotos tinham 25% mais chance de risco enquanto o genótipo homozigoto AA tinham mais de duas vezes aumento de risco de tuberculose ativa (95% CI; 1,16-5,91 e $p= 0,03$). Este estudo concorda com o observado em outras populações e demonstram que o polimorfismo +874T/A no gene *IFN- γ* está associado com tuberculose em diferentes populações, apesar da mistura étnica observada na população brasileira.

De acordo com o registro do controle global de tuberculose 2004 da OMS, a razão de notificação anual por 100 000 na África do Sul é 558, enquanto na China é 113 e abaixo de 20 na Espanha. Esta tendência da variação na razão de incidência da tuberculose e frequência do



genótipo A/A entre populações sugere que as diferenças da razão de incidência nas diferentes populações dependem da duração da seleção do ancestral para resistência ao *M. tuberculosis*.

Tumor necrosis factor α (TNF- α)

TNF- α é uma potente citocina inflamatória pleiotrópica produzida principalmente por macrófagos e células T (Vassalli, 1992). É sintetizado como uma proteína de membrana, que é clivada para produzir sua forma solúvel de 17Kd. O TNF solúvel exerce várias atividades inflamatórias e imunomodulatórias que são induzidas através da ativação de macrófagos por transdução de sinais em dois receptores distintos (Tartaglia e cols., 1993) e são importantes na defesa do hospedeiro. É essencial no controle e contenção de patógenos intracelulares, estimula o recrutamento de células inflamatórias para a área da infecção e a formação e manutenção do granuloma que fisicamente contém a infecção. Ele media a inflamação e produz imunidade protetora contra infecções bacterianas, parasitárias e virais. A super expressão de TNF tem sido implicada na patogênese de várias condições incluindo artrite reumatóide (RA), psoríase, doença de Chron, sepse e câncer (Old, 1988, Vassali, 1992).

Recentemente, drogas bloqueadoras de TNF- α (infiximab, atanercept e adalimumab) têm sido amplamente utilizadas no tratamento das doenças autoimunes acima relacionadas. Contudo, complicações com infecções têm sido reportadas com todas as três drogas mencionadas, incluindo reativação da infecção latente da tuberculose, que frequentemente apresenta-se atipicamente na forma disseminada ou extrapulmonar (Crum e cols., 2005, Winthrop, 2006; 2005, Wallis e cols., 2004, Hamilton, 2003). Das várias citocinas associadas com a patogênese da tuberculose, incluindo IFN- γ e IL-12, acredita-se também que TNF- α seja responsável pela proteção contra o desenvolvimento da doença (Rook, 1990).

Os níveis circulantes de TNF são regulados em diferentes estágios: transcrição do gene, controle pós-transcricional da estabilidade do mRNA, clivagem da forma de membrana para



liberar a forma solúvel e expressão de receptores. A função do TNF é mediada pela sua ligação aos receptores de TNF (TNFRs). Há vários membros da família de TNFR, porém, o TNFR1 e o TNFR2 têm sido os mais investigados. O TNFR2 tem uma afinidade mais alta para TNF e o liga melhor em concentrações mais baixas. Os sinais através de TNFRs influenciam a proliferação de células T e a resposta pró-inflamatória (Tartaglia e cols., 1991).

Ambos os receptores TNFR1 e TNFR2 localizam-se na superfície da célula na forma solúvel (Heller e cols, 1990), assim adicionando outro nível para regulação da função de TNF. Os TNFRs solúveis neutralizam atividade de TNF por competição com ligação a receptores na célula., mas ao mesmo tempo, eles estabilizam a molécula de TNF- α e previne sua degradação (Aderka e cols., 1992).

Os genes de *TNF*, linfotoxina α (TNF β) e o gene *LTB* estão dentro da região de classe III do HLA humano, região altamente polimórfica presente no cromossomo humano 6p21. Há muitos polimorfismos dentro do grupo do gene *TNF*. Seis microssatélites polimórficos já foram descritos. Os cinco primeiros (*TNF a - e*) foram originalmente descritos por Udalova e cols.,(1993). Mais tarde, Tsukamoto e cols.,(1998) descreveu o sexto microssatélite acima do gene *LTB*, uma repetição dinucleotídica altamente polimórfica com dez alelos, presente na população Japonesa.

Associações com doenças entre os cinco microssatélites polimórficos originais, *TNF a - e*, têm sido estudadas em várias populações. *TNF a, b e d* são marcadores multialélicos altamente polimórficos, enquanto *TNFc* e *TNF e* são bialélicos e tri-alélicos, respectivamente. Resultados de diferentes estudos têm demonstrado forte desequilíbrio de ligação entre certos alelos destes microssatélites e ambos os loci HLA classe I e II em humanos (Hajeer e cols., 2000).

Vários polimorfismos de base única (SNPs) dentro do gene TNF já foram descritos. Até agora 621 SNPs estão cadastrados nos bancos de dados do (National Center for



Biotechnology Information) NCBI, sendo mais de 10 na região promotora, incluindo (relativo ao sítio de início da transcrição): -1196(C/T); -1125(G/C); -1031 (T/C); -863 (C/A); -857(C/A); -851(C/T); -575(A/G); -419(G/C); -376(G/A); -308(G/A); -244(G/A); -238 (G/A); -162 (G/A) e -49 (G/A) (Baena e cols., 2002, Negoro e cols., 1999, Higuchi e cols., 1998), embora os presentes nas posições -419; -162 e -49 sejam raros em caucasianos (Mira e cols., 1999). Conseqüentemente, a região 5' do gene *TNF- α* é altamente polimórfica. Existe ainda uma inserção de uma citosina na posição +70 no primeiro exon (D'Alfonso e cols., 1996), uma substituição de G/A na posição +488 no primeiro intron (D'Alfonso e cols., 1996) e uma deleção de uma guanidina na posição +691 no primeiro intron do gene *TNF- α* (Azmy e cols., 1999).

Variações entre indivíduos no nível de *TNF- α* têm sido atribuídas a polimorfismos no promotor do gene *TNF- α* e seus haplótipos correspondentes estendidos em HLA (Hohler, 1998, Jaber e cols., 2004, Heesen e cols., 2004).

Os efeitos dos SNPs presentes na região promotora, em relação a ligação de fatores de transcrição, não estão totalmente elucidados. O SNP -308 G/A tem sido o mais estudado, contudo, seu papel funcional é controverso. Aparentemente, os níveis de *TNF- α* circulantes podem estar sob um processo regulatório multifatorial.

Em infecções parasitárias, o alelo -308*A foi associado com um aumento de quatro vezes do risco para desenvolvimento de malária cerebral e de sete vezes para o desenvolvimento de sérias conseqüências neurológicas (McGuire e cols., 1994). Risco similar, mas independente, para o desenvolvimento de malária cerebral foi também demonstrado para o alelo -376*G em indivíduos de Gâmbia e Quênia infectados com malária (Kubota e cols., 1998).

Vários estudos têm investigado a associação entre alelos de *TNF* e infecções virais. O alelo -238*A foi associado à infecção crônica com o vírus hepatite B (HBV). Nenhum resultado similar foi encontrado para o polimorfismo -308 (Hohler, 1998). Recentes estudos



têm mostrado que várias citocinas imunoregulatórias tal como IFN- γ e TNF- α inibem a replicação do HBV pelo processo não-citolítico. Em 2006, Cheong e cols., avaliaram a possível associação dos SNPs -238 e -308 na população Coreana e embora esses SNPs não estivessem associados com persistência de HBV nas análises multivariadas, análises haplotípicas revelaram que haplótipos homozigotos de *TNF- α* -308G/-238G estavam associados com persistência do HBV. Esta descoberta sugere a importância de haplótipos do promotor de *TNF- α* na persistência do HBV. O polimorfismo *TNF- α* -308G/A é relativamente raro nos Coreanos, podendo existir assim, outro fator genético ligado ao haplótipo -308G/-238G.

Kim e cols. (2003) reportaram que a presença do alelo *TNF- α* -308A ou a ausência do -863A estava fortemente associada com a resolução da infecção com HBV na população Coreana, mas nenhuma correlação foi observada entre polimorfismos no promotor de *TNF- α* e progressão da doença.

Du e cols., (2006) usaram um desenho de estudo caso-controle para explorar se polimorfismos no promotor do gene *TNF- α* estariam associados com o desfecho da infecção com HBV na população Chinesa. No estudo foram analisados os fatores ambientais e genéticos influenciando o resultado da infecção usando um grupo de sujeitos com recuperação espontânea por HBV e um grupo de pacientes com hepatite B. Cinco SNPs na região promotora foram avaliados (-238G>A, -308 G>A, -857T>C, -863 G>A e -1031T>C) e os resultados mostraram a associação do genótipo -238GG com persistência da infecção pelo HBV, enquanto que o genótipo -857TT estava significativamente relacionado à liberação espontânea do HBV. O haplótipo GGCCT (-238/-308/-857/-863/-1031) foi associado com liberação espontânea do HBV, enquanto os haplótipos GGCAT e GGTAT mostraram uma relação clara para persistência da infecção pelo HBV.



A expressão de citocinas influenciada pelos SNPs foi determinada pela capacidade de ligação dos elementos de ligação alelos-específicos com fatores *trans*. O *TNF- α* -238 encontra-se em um suposto compartimento regulatório (Y-box) da região promotora, que se liga a proteínas regulatórias de ligação de DNA. Variação nestes sítios afeta a atividade do promotor (D'Alfonso, 1996). O polimorfismo -857 está localizado na seqüência de ligação do "octamer-binding protein" (OCT-1) ACGAAGAC. Quando T substitui C, é possível que a estabilidade de ligação do OCT1 com a seqüência de ligação seja afetada resultando na troca da atividade transcricional (van Heel e cols., 2002). O que se conclui é que polimorfismos no promotor de *TNF- α* estão independentemente associados com diferentes desfechos da infecção por HBV.

Corbett e cols., (2002) em um estudo caso-controle avaliaram a função de SNPs na região promotora do gene *TNF- α* para determinação de suscetibilidade a silicose. Este estudo demonstrou significativa associação entre os alelos -238A e -376A e silicose grave entre esses mineradores. Os alelos -238A e -376A estão em desequilíbrio de ligação, de modo que associações nestes loci não são independentes. Contudo, efeitos funcional dos alelos -238G/A e -376G/A são desconhecidos mas devem desempenhar uma função na patogênese de doenças infecciosas.

Em resumo, a presença do alelo *TNF- α* -308A tem sido associada com mais alta produção de *TNF- α* e conseqüentemente com aumento de risco para malária grave, com morte (McGuire e cols., 1994), leishmaniose mucocutânea (Cabrera e cols., 1995) e com proteção a hanseníase (Santos e cols., 2000, Roy e cols., 1997). Vários estudos têm investigado a associação a associação entre *TNF- α* e TB. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre polimorfismos no promotor de *TNF- α* e TB (Delgado e cols., 2002; Oh, JH e cols., 2007; Amirzargar e cols., 2004; Henao e cols., 2006; Vejbaesya e cols., 2007 e Ates e cols., 2007). Entretanto, vários outros estudos encontraram associações significantes entre



polimorfismos em *TNF- α* e TB (Oliveira e cols., 2004; Correa e cols., 2005 e Hill e cols., 1996).

Selvaraj e cols. (2001) estudaram polimorfismos nos genes *TNF- α* e *LTA* (Lymphotoxin- α) e suscetibilidade a tuberculose. *TNF- α* e *LTA* não foram associados com TB, mas *TNF- α* e *LTA* com combinação de haplótipos foram associados à proteção contra tuberculose pulmonar e reincidência bacteriológica. Delgado e cols., (2002) estudou quatro polimorfismos na região promotora de *TNF- α* na população Colombiana, mas não houve associação significativa entre estes marcadores e TB pulmonar. Recentemente, Fitness e cols., (2004) fracassou para encontrar alguma associação significativa entre polimorfismos em *TNF- α* e TB em Maluí do Norte.

Vejbaesya e cols., (2007) investigou a associação de polimorfismos nos genes *NRAMP1(SLC11a1)* e *TNF- α* com tuberculose na população Tailandesa. Os alelos *TNF- α* +488A; -238A e -308A foram analisados em pacientes e controles e a comparação ente a frequência genotípica das três variantes polimórficas não revelaram diferença significativa confirmando os resultados de prévios estudos de Camboja e Colômbia (Delgado e cols., 2002, Henao e cols., 2006). Em outro estudo realizado na população Colombiana, os polimorfismos *TNF- α* -238A e -308G foram associados com suscetibilidade à tuberculose (Correa e cols, 2005), enquanto que na população Iraniana, o variante *TNF- α* -238G foi também associado com suscetibilidade a tuberculose (Amirzargar e cols., 2006). A discrepância entre estudos deve surgir de diferenças nas frequências dos alelos variantes entre a população normal. A frequência do alelo *TNF- α* -308A na população controle Colombiana foi mais alta que nos Asiáticos (11% nos Colombianos versus 5,1% nos Tailandeses e 5,2% nos Cambojanos). No Brasil, esta frequência é de 16%, uma das mais altas (Santos et al, 2000). Com relação a frequência da variante -238A, esta foi também mais alta nos Colombianos (11% versus 3,4% nos tailandeses e 2% nos Cambojanos) (Delgado e cols., 2002, Correa e cols., 2005) e no



Brasil está em torno de 3-5%. Embora alguns estudos tenham encontrado associações entre polimorfismos no gene *TNF- α* e síntese de citocina, evidências recentes sugerem que os polimorfismos *TNF- α* -238 e -308 não são funcionais e que futuros estudos para a elucidação deste ponto soam necessários (Bayley e cols., 2004).



3. Objetivos

3.1- Objetivo Principal:

- Definir a diversidade genética da região promotora dos genes que codificam para TNF- α , IFN- γ e NRAMP1 em diferentes grupos de indivíduos portadores ou não de tuberculose ativa.

3.2- Objetivos Secundários:

- Definir as variações nas seqüências da região regulatória dos genes em estudo através de seqüenciamento de 800pb acima do sítio de iniciação de transcrição;
- Disponibilizar haplótipos de alta resolução da região regulatória destes 3 genes;
- Utilizar os haplótipos de alta resolução encontrados para avaliar a possível associação dos mesmos com suscetibilidade a ocorrência de TB ativa e infecção recente pelo *M. tuberculosis*.



4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1- Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo que apresenta dois desenhos epidemiológicos: a) um estudo descritivo observacional com a finalidade de avaliar a prevalência dos SNPs presentes em parte da região promotora de 3 diferentes genes (*SLC11a1*, *IFN- γ* e *TNF- α*) e b) um estudo de associação do tipo caso-controle, envolvendo pacientes com TBP e TBE (casos) e contatos diretos não relacionados consanguineamente e com informação sobre a resposta ao Teste Cutâneo da Tuberculina (TST) como controles.

4.2- Período de Estudo

O presente estudo teve uma duração de dois anos

4.3- Local de Estudo

4.3.1- Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz - IOC/ Laboratório de Biologia Molecular aplicada à Micobactérias.

Após a coleta do material clínico realizada nas unidades abaixo relacionadas, estas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular aplicada a Micobactérias na Fiocruz, situado em Manguinhos, na cidade do Rio de Janeiro. Este laboratório foi o responsável por toda a execução da parte experimental que compreendeu o processamento das amostras (extração de DNA, amplificação da região de interesse no promotor e purificação do fragmento amplificado), bem como tabulação e análise dos dados.



4.3.1.1- Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz / IOC / Departamento de Biol. Molecular / Lab. de Genômica Funcional e Bioinformática.

Neste laboratório foi realizado o seqüenciamento utilizando a Plataforma de Seqüenciamento do PDTIS - Fiocruz e todo o suporte na parte de bioinformática (análise dos resultados utilizando programas especiais de bioinformática, etc.).

4.3.2- Centro Hospitalar Instituto de Doenças do Tórax (IDT) e Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF-UFRJ).

Situado na Ilha do Fundão da cidade do Rio de Janeiro: O IDT-UFRJ e HUCFF-UFRJ formam o Centro Hospitalar Universitário.

Trata-se de um hospital geral de referência para AIDS e tuberculose, de atendimento de nível terciário, que atende a uma população referenciada de várias Unidades de saúde. A clientela desse Hospital se compõe basicamente de pacientes referenciados da área programática AP 3.1 com cerca de 200 casos/ano notificados.

4.3.3- Hospital Estadual Santa Maria

Situado na cidade do Rio de Janeiro, na área programática AP-40, caracteriza-se por um hospital de doenças pulmonares com cerca de 82 leitos para o atendimento de pacientes com TB em atividade. Nesta instituição os pacientes em decorrência de suas condições clínicas de elevada gravidade apresentam um tempo médio de internação de dois meses e posteriormente são encaminhados para as unidades de saúde de sua área programática para o término de seu tratamento antimicrobiano.



4.4- Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão e exclusão abaixo descritos foram os seguidos originalmente para a coleta das amostras (pacientes e controles) utilizadas num estudo prévio de imunogenética realizado no laboratório. O presente estudo utilizou de forma retrospectiva as mesmas amostras para uma avaliação semelhante, inclusive investigando os mesmos genes alvo. As únicas modificações foram os desfechos avaliados e a metodologia utilizada.

4.4.1- Pacientes com tuberculose ativa

Foram incluídos neste estudo, de modo sistemático, pacientes de ambos os gêneros, com idade superior a 18 anos, com apresentação clínica variada, independente de cor que:

- a) Apresentaram cultura positiva para micobactéria e subsequente confirmação bioquímica da espécie como *M. tuberculosis* em amostras clínicas respiratórias ou não;
- b) Aceitaram participar do estudo e assinarem o termo de consentimento esclarecido.

4.4.2- Contatos

Foram incluídos no estudo, indivíduos de ambos os gêneros com idade superior a 18 anos, independente de cor, que:

- a) Não apresentaram sintomas clínicos compatíveis com TB ativa;
- b) Foram submetidos à prova tuberculínica (PT) em dois tempos;
- c) Aceitaram participar do estudo e assinarem o termo de consentimento esclarecido.

4.5- Critérios de exclusão

Foram excluídos os indivíduos:

- a) Cujos materiais clínicos não haviam sido submetidos aos exames constantes do protocolo de rotina de investigação diagnóstica;



- b) Cujos materiais clínicos mostraram crescimento de micobactéria atípica associada ao Mtb;
- c) Os profissionais de saúde cujos resultados do 2º PPD não foram disponíveis.

4.6- Grupos de estudo

Este estudo compreendeu a análise de amostras de DNA extraído de sangue de indivíduos pertencentes aos seguintes grupos:

- a) Pacientes com TB (pulmonar ou extrapulmonar ativa), infectados ou não pelo HIV, com ou sem gravidade clínica para o estudo descritivo
- b) Pacientes com TB (pulmonar ou extrapulmonar ativa), não infectados pelo HIV (estudo de associação)
- c) Contatos saudáveis, assintomáticos e com informação sobre a infecção recente ou anterior pelo bacilo da TB, utilizando a prova tuberculínica (PT) segundo as normas do Programa de Controle de Tuberculose Hospitalar dos Hospitais incluídos.

4.7- Coleta e processamento das amostras clínicas

De cada paciente ou profissional de saúde arrolado no estudo, um volume de 1,5mL de sangue periférico foi coletado em tubo com vacuotainer contendo EDTA ou tampão citrato com anticoagulante. Após homogeneização por inversão o mesmo foi congelado a -20°C para posterior extração do DNA.

4.8- Suporte Financeiro

- * FAPERJ- CNPq- PRONEX/2004
- * FIOCRUZ/PDTIS/Plataforma de seqüenciamento
- * Cornell University (bolsa de mestrado)



4.9- Metodologia

4.9.1- Extração de DNA genômico

Inicialmente a extração de DNA genômico foi realizada a partir do sangue total congelado através de técnica “in house” (método convencional). Posteriormente, um kit comercial (FlexiGene DNA Kit) foi testado para verificar o melhor rendimento em termos de concentração e pureza do DNA a ser utilizado posteriormente para PCR e seqüenciamento. O método comercial foi escolhido por permitir o isolamento do DNA a partir de volumes muito pequenos de amostra (100 µL), resultar em um material (DNA) com um alto grau de pureza, um bom rendimento (DNA em alta concentração), rapidez e baixo custo. Além de não utilização de solventes orgânicos tóxicos, a utilização deste Kit permite o uso de um único tubo para todo o procedimento, reduziu o lixo e minimizou o risco de troca de amostra.

4.9.1.1- Método “in House”: purificação de DNA genômico a partir de sangue total por fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1)

Este método consiste da adição em tubo eppendorf de 500µL de tampão SEB (10mM Tris-HCl pH 7,5; 2% SDS; 1mM EDTA e 100mM NaCl) e proteinase K para concentração final 0,3mg/mL. Neste mesmo tubo é adicionado 100µL de sangue periférico. A solução é misturada em vortex por 10 segundos e incubada em banho-maria a 56°C por 16-18horas. Após este tempo, 500µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) são adicionadas seguido de uma agitação por 10 segundos em vortex. O material é então centrifugado a 14000 rpm por 2 minutos e em seguida a fase aquosa (superior) é transferida para outro tubo. Para o isolamento do DNA, 0,25M, concentração final, de NaCl é adicionado juntamente com 2 volumes de etanol absoluto seguido de agitação lenta e precipitação por 30 minutos. Após este período a mistura é centrifugada em velocidade máxima (14000 rpm) por



15 minutos e o sobrenadante é descartado. Para a evaporação do etanol o tubo é mantido aberto a temperatura ambiente por 20 minutos (nesta etapa pode-se lavar o sedimento com etanol 70% gelado). Após a secagem o DNA é ressuspensionado em 50 μ L de água Milli Q ou TE 1X (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA).

4.9.1.2- Purificação de DNA genômico a partir do Kit Flexigene (Quiagen)

Este Kit permite variação da quantidade de sangue total a ser utilizado de 100 μ L-20mL (mini e maxi purificação) rendendo um total de 50 purificações quando da utilização de 1mL de sangue. No nosso caso, a quantidade de sangue utilizada foi de 100 μ L rendendo, portanto uma quantidade de 500 purificações. Este método consiste da adição de um tampão de lise à quantidade de amostra de sangue utilizada com suave agitação, seguida de centrifugação para sedimentação dos núcleos de células e mitocôndrias. O sedimento é ressuspensionado e incubado em tampão de desnaturação, o qual contém um sal caotrópico (Guanidina hidrocloreídrico) e protease. Esta etapa remove eficientemente contaminantes como proteínas e açúcares. O DNA é então precipitado por adição de isopropanol, recuperado por centrifugação, lavado com etanol 70%, seco e ressuspensionado em tampão de hidratação (10mM Tris-HCl, pH 8,5). As quantidades são as estipuladas pelo fabricante.

4.9.2- Amplificação de parte da região regulatória dos genes que codificam para TNF α , IFN γ e NRAMP1.

O desenho dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do DNA referente à parte da região promotora dos genes que codificam para TNF- α , IFN- γ e SLC11a1 aproximadamente 800pb acima do sítio de transcrição (região de interesse), foi realizado com base nas seqüências dos respectivos genes extraídas do GenBank (Release 144)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>) utilizando o programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

A padronização das condições de amplificação para cada alvo especificamente foi realizada em um termociclador “PX2 Thermal Cycle” com utilização de um bloco com capacidade para gradiente de temperatura, permitindo uma variação de até 15° C. Além da variação da temperatura de anelamento, para cada gene foram testadas diversas condições e aditivos a fim de obtermos uma banda única para o seqüenciamento. Foram testadas: a) diferentes concentrações dos dNTPs, de magnésio e de DNA alvo. Paralelamente, foram testados como aditivos: a) glicerol (10% final); b) formamida (5% final); c) DMSO (5% final); e) BSA (1% final) e f) betaína (10% final).

- **Variação de Mg²⁺:**

Com o objetivo de determinarmos as condições de estringência da reação de amplificação, foi realizado um experimento de gradiente com os dois principais fatores envolvidos (concentração de MgCl₂ e temperatura). Utilizando DNA extraído com o método acima padronizado, procedemos a amplificação utilizando as condições descritas abaixo (tabela 1). A concentração de Mg²⁺ escolhida foi a de 2mM, que funcionou melhor desde o início dos testes de amplificação e a dos desoxiribonucleotídeos de 200µM. As condições ideais de amplificação para cada gene estão descritas nos resultados.

Tabela 1: Variação das concentrações de Mg²⁺ e desoxiribonucleotídeos.

dNTP	Mg ²⁺				
50µM	1,0 mM	1,5mM	2,0mM	2,5mM	3,0mM
100µM	1,0 mM	1,5mM	2,0mM	2,5mM	3,0mM
200µM	1,0 mM	1,5mM	2,0mM	2,5mM	3,0mM

Para cada condição foram testadas 20ng; 50ng e 100ng de DNA



4.9.3- Eletroforese em gel de agarose:

Todos os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (1/5 do produto em tampão “Loading buffer” 1X) a 80V, em TAE 1X. Após a corrida, o DNA foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz U.V. em transiluminador.

Tampão para aplicação de amostras de DNA em gel de agarose (5X)- “Loading Buffer”

Azul de Bromofenol	0,25%
Xileno Cianol	0,25%
Ficoll 400	15%

Tampão TAE 50X

Tris Base	242 g/L
Ácido Acético Glacial	57,1 mL/L
EDTA sal dissódico	37,2 g/L ou solução 0,5M pH8,0 (100mL/L)

4.9.4- Purificação dos produtos de PCR para seqüenciamento com Acetato de amônio 7,5 M:

Esta purificação é um método “*in house*”, que permite purificação dos produtos de PCR de iniciadores, dNTPs e outros que não ácidos nucléicos. Consiste da adição ao produto amplificado de Acetato de amônio 2,5M final, incubação em gelo por 15 minutos e centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante é transferido para outro tubo e o sedimento desprezado. Dois volumes e meio de etanol absoluto são adicionados ao sobrenadante e mantidos por 15 minutos a temperatura ambiente, em seguida, o material é centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante é desprezado e o sedimento lavado com etanol 70%. Em seguida, a mistura é centrifugada por 3 minutos a 14.000 rpm. O



sobrenadante é descartado e a centrifugação repetida para a remoção dos resíduos. Finalmente o sedimento é seco a temperatura ambiente e redissolvido em 20 µL de água milli-Q.

4.9.5- Purificação dos produtos de PCR para seqüenciamento com Kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up (Invitrogen)

Este sistema permite rápida e eficiente purificação dos produtos de PCR de sal, iniciadores, dNTPs e outros reagentes que não ácidos nucléicos. Depois da PCR, os produtos são purificados em menos de 10 minutos sem o uso de centrífugas ou solventes orgânicos. O kit é específico para purificação de fragmentos de DNA variando de 90pb a 40kb e permite variação do volume a ser purificado de modo que se pode aumentar o seu rendimento. O ChargeSwitch é uma tecnologia nova baseada em esfera magnética que provê uma superfície de ligação que é dependente da carga e do pH do tampão circundante para facilitar a purificação do ácido nucléico. Em baixo pH, as esferas magnéticas têm uma carga positiva e liga o ácido nucléico carregado negativamente. Proteínas e outros contaminantes não se ligam e são descartados com o tampão de lavagem usado para lavagem das esferas. Para eluir o ácido nucléico, a carga na superfície é neutralizada por elevação do pH para 8,5 usando um tampão de eluição com baixo sal. O DNA purificado elui instantaneamente neste tampão de eluição. A recuperação é muito boa e permite que um volume pequeno da reação da PCR seja utilizado.

4.9.6- Seqüenciamento automatizado:

Tendo em vista o tamanho do produto amplificado a ser seqüenciado, para cada gene foram utilizados dois iniciadores externos e dois iniciadores internos a fim de poder atingir de forma bem resolvida as extremidades.



Os métodos de seqüenciamento automático utilizam os nucleotídeos de terminação e um tipo de marcação que permite a identificação das cadeias resultantes. A marcação empregada neste processo é feita com moléculas fluorogênicas, ou seja, compostos capazes de emitir fluorescência quando excitados por uma fonte de luz. No sistema utilizado pelo nosso laboratório (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ [sistema da Applied Biosystems]), a fonte de luz empregada para excitação dos fluoróforos é um laser de argônio acoplado a um sofisticado sistema ótico, capaz de direcionar o feixe laser precisamente sobre as amostras a serem analisadas. O sinal fluorescente gerado pela excitação com laser é direcionado pelo sistema ótico a um sistema digital, capaz de decodificar o sinal eletrônico, transmitindo-o ao computador acoplado o qual, através de softwares específicos irá traduzir este sinal numa seqüência de DNA.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o “kit ABI PRISM[®] Big Dye[®] Terminator v3.1” (PE Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante e adaptadas em nosso laboratório. Neste sistema a marcação fluorescente encontra-se na extremidade 3’ do nucleotídeo de terminação, com cada cor correspondendo à uma base específica. Sendo assim, é possível seqüenciar uma amostra de DNA com uma única reação, contendo todos os terminadores juntos. Em cada reação de sequenciamento, utilizamos aproximadamente 20ng do produto amplificado e os iniciadores utilizados nas respectivas reações de PCR, como iniciadores externos e outros dois iniciadores internos desenhados apenas para o sequenciamento e com a finalidade de resolver bem o início da seqüência pegando os iniciadores externos (tabela 2). As reações foram analisadas no seqüenciador de 48 capilares “ABI PRISM[®] 3730 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems), situado no Laboratório de Biologia Molecular da FIOCRUZ/ Plataforma PDTIS.

**Tabela 2** Iniciadores utilizados na reação de seqüenciaemento.

Gene	Iniciadores 5'-3'
<i>IFN-γ</i>	Externo Sense: GGAACTCCCCCTGGGAATATTCT
	Externo Antisense: AGCTGATCAGGTCCAAAGGA
	Interno Sense: CGAAGTGGGGAGGTACAAAA
	Interno Antisense: CCCAGGAAACTGCTACTCTG
<i>TNF-α</i>	Externo Sense: CAGGACCTCCAGGTATGGAA
	Externo Antisense: TAGCTGGTCCTCTGCTGTCC
	Interno Sense: CCTGCATCCTGTCTGGAAGT
	Interno Antisense: TTTCAACCCCTGTGTGTTCG
<i>NRAMP1</i> (<i>SLC11A1</i>)	Externo Sense: CACCACTGCACTTCACACCT
	Externo Antisense: TCCACCCAGTGAGATTGAGTC
	Interno Sense: GTGTGTGTGTGTGTGGCAGA
	Interno Antisense: GGCTAAGTGTGTGTGTGTGT

4.9.6.1- Padronização inicial da reação de seqüenciamento.

Após a purificação dos produtos amplificados do gene *IFN- γ* através do método de precipitação com acetato de amônio, iniciamos então a padronização da reação de seqüenciamento no intuito de verificar qual a menor concentração de reagentes a ser utilizada. Para tanto, variamos a concentração de Big Dye, tampão 5x e produto de PCR (amplificados a partir de 4 pacientes diferentes) de acordo com a figura 2. Após análise dos eletroferogramas constatamos que a melhor condição de reação foi aquela onde usamos 0,5 μ L de Big Dye, 1,5 μ L de tampão 5x e diluição de DNA 1:2 (coluna 12 da figura 4). Nessas condições foi possível obter seqüências de alta qualidade com mais de 650 pb (dados não mostrados).

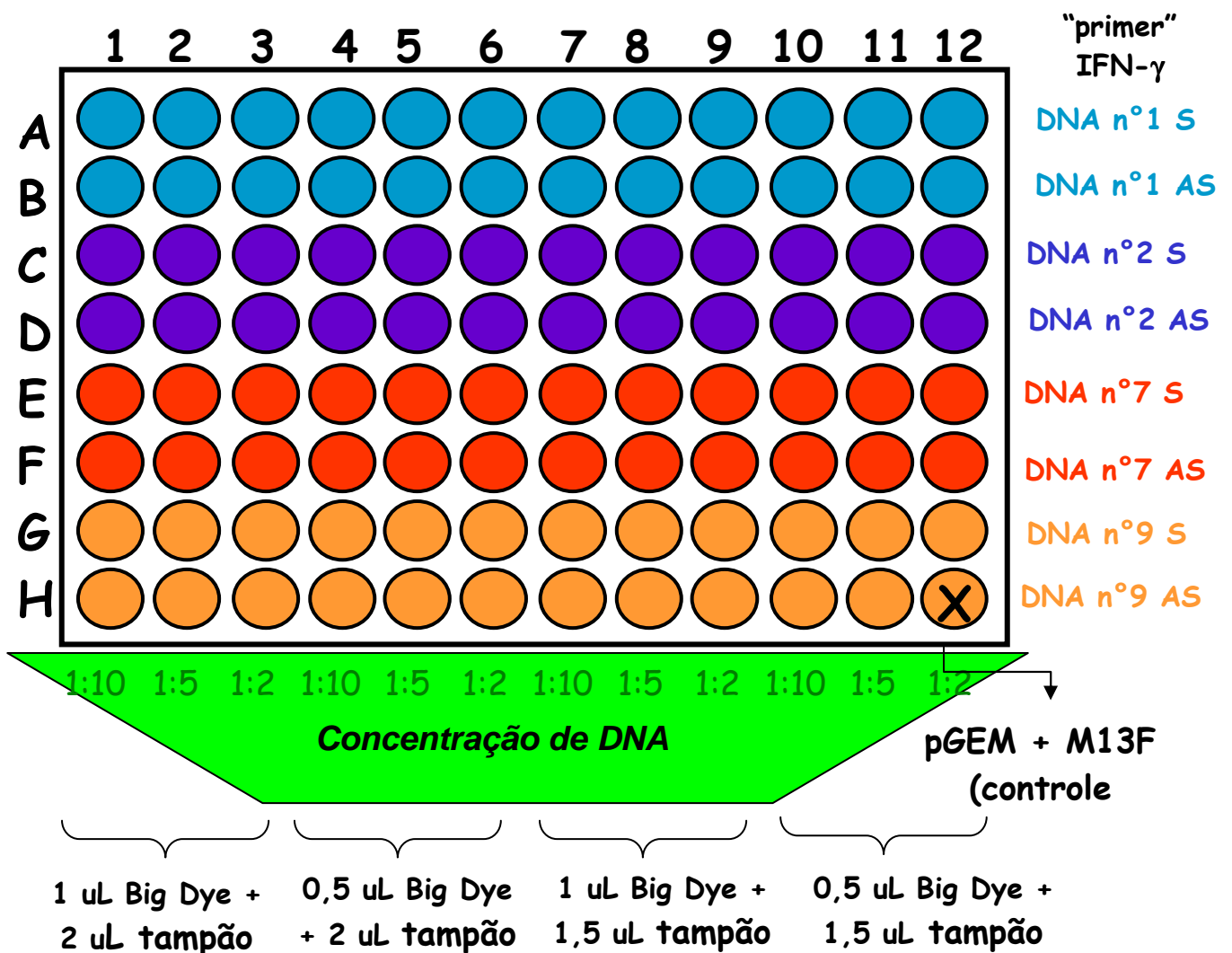


Figura 2: Determinação das condições para a reação de seqüenciamento da região de interesse do gene de *IFN- γ* : Amostras de DNA de 4 pacientes diferentes: paciente 1 (linhas A e B), paciente 2 (linhas C e D) paciente 7 (linhas E e F) e paciente 9 (linhas G e H). Nas linhas A, C, E e G foram adicionadas reações contendo “primer sense” (S) enquanto nas linhas B, D, F e H foram adicionadas reações contendo “primer anti-sense” (AS). As diluições dos produtos de PCR foram: 1:2 (colunas 3, 6, 9 e 12), 1:5 (colunas 2, 5, 8 e 11) e 1:10 (colunas 1, 4, 7 e 10). Ainda foram testados diferentes concentrações de Big Dye (0,5 μ L e 1 μ L) e tampão 5x (1,5 μ L e 2 μ L). Foi realizado seqüenciamento do vetor de clonagem pGEM (“primer” M13F), como controle da reação (poço H12).



4.9.7- Análise das seqüências e identificação das SNPs presentes na região promotora dos genes que codificam para TNF- α , IFN- γ e SLC11a1

As seqüências foram analisadas pelo programa SeqScape versão 2.5 (<http://www.appliedbiosystems.com/catalog/myab/StoreCatalog/products/CategoryDetails.jsp?hierarchyID=101&category3rd=111917&trail=no>) da Applied Biosystems (figuras 3 e 4). Este software é uma ferramenta de alinhamento e comparação de seqüências que permite uma rápida identificação de variantes na seqüência (figura 5 A e B). O software permite alinhar e comparar seqüências obtidas diretamente do seqüenciador automático contra uma seqüência referência (figura 6). Ele é capaz de alinhar e comparar múltiplas amostras mostrando o eletroferograma e o índice de qualidade de cada seqüência e o índice de qualidade do alinhamento e da comparação (figura 9), sendo assim permite dois tipos de análise:

- * Identificação de variantes nucleotídicas e aminoacídicas. O software identifica posições que diferem da seqüência referência e as classifica como variantes conhecidas ou desconhecidas.

- * Identificação de genótipos, alelos ou haplótipos de uma biblioteca. Além da identificação de variantes, o software busca em bibliotecas e bases de dados de genótipos, alelos, ou haplótipos e identifica o alelo que mais rigorosamente se iguala com a seqüência consenso.

Para facilitar a análise, o software gera um relatório das variantes encontradas na comparação.

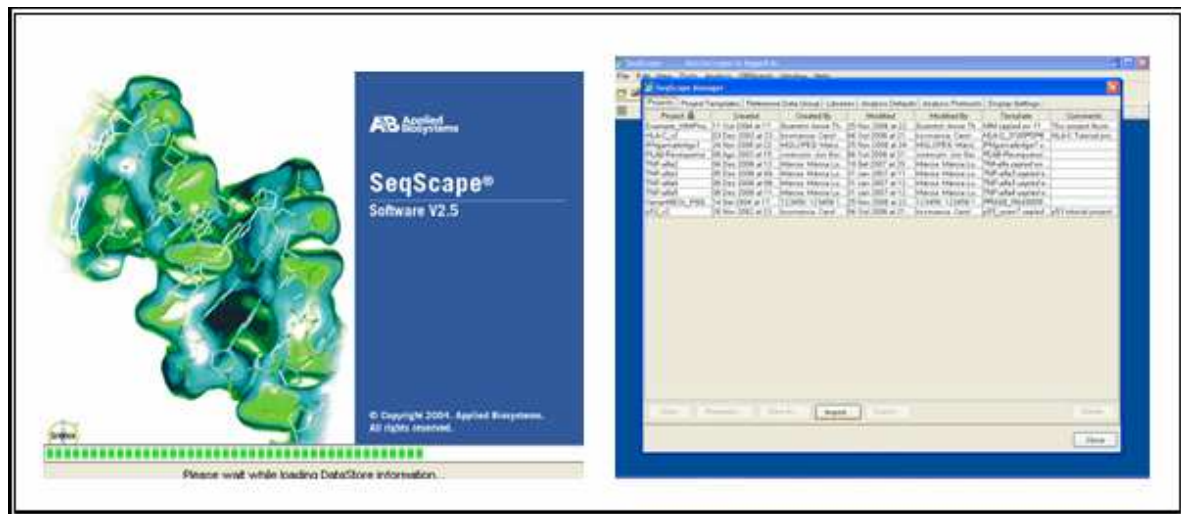
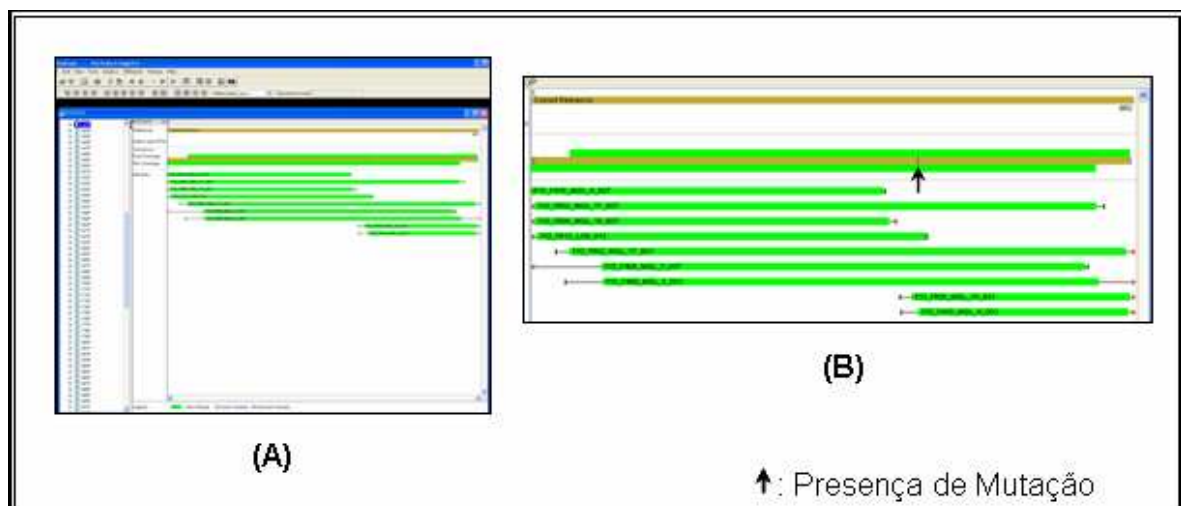


Figura 3 e 4: Página inicial do Software SeqScape mostrando os projetos programados.



Figuras 5 A e B: Ilustração da utilização do Software v.2.5. Nesta janela podem ser observadas as seqüências obtidas a partir de cada iniciador bem como a região de aproveitamento de cada uma delas (verde). Nesse indivíduo foi detectado 1 SNP, ou seja, 1 base se apresentou distinta da seqüência referência (5B).

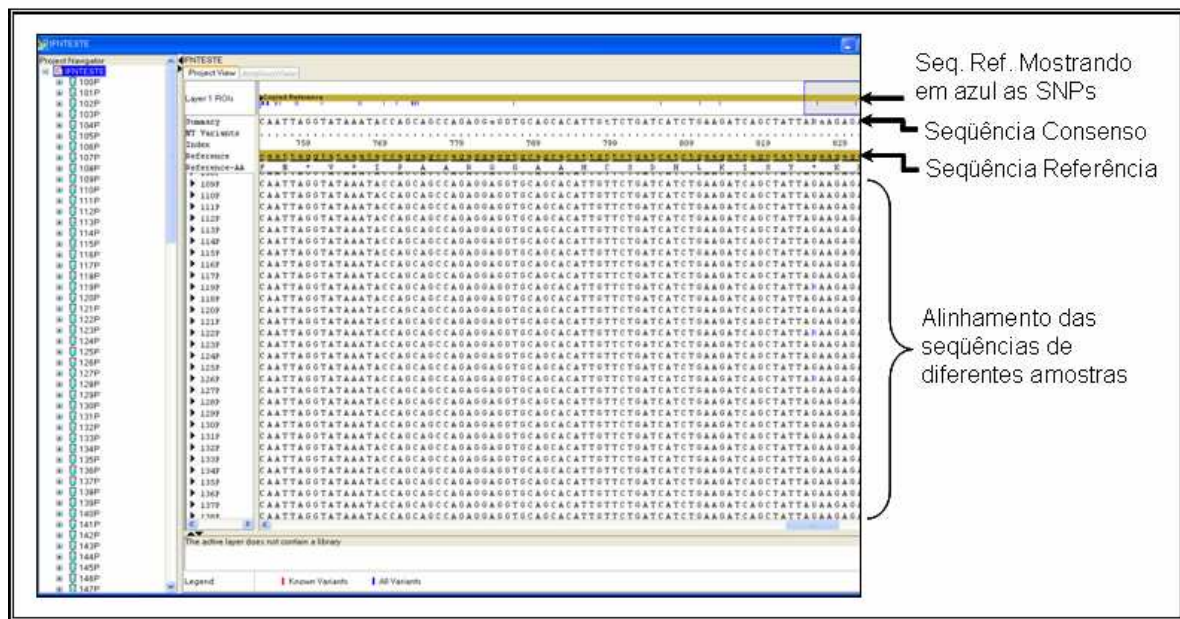


Figura 6: Ilustração da utilização do Software SeqScape v.2.5. Nessa janela pode ser observado o alinhamento das amostras bem como as seqüências referência e consenso do gene de *IFN- γ* .

Além de identificar mutações pontuais na seqüência, o programa SeqScape fornece o genótipo do referido polimorfismo, uma vez que estamos analisando os dois alelos através da estratégia escolhida: Seqüenciamento a partir de produto de PCR.

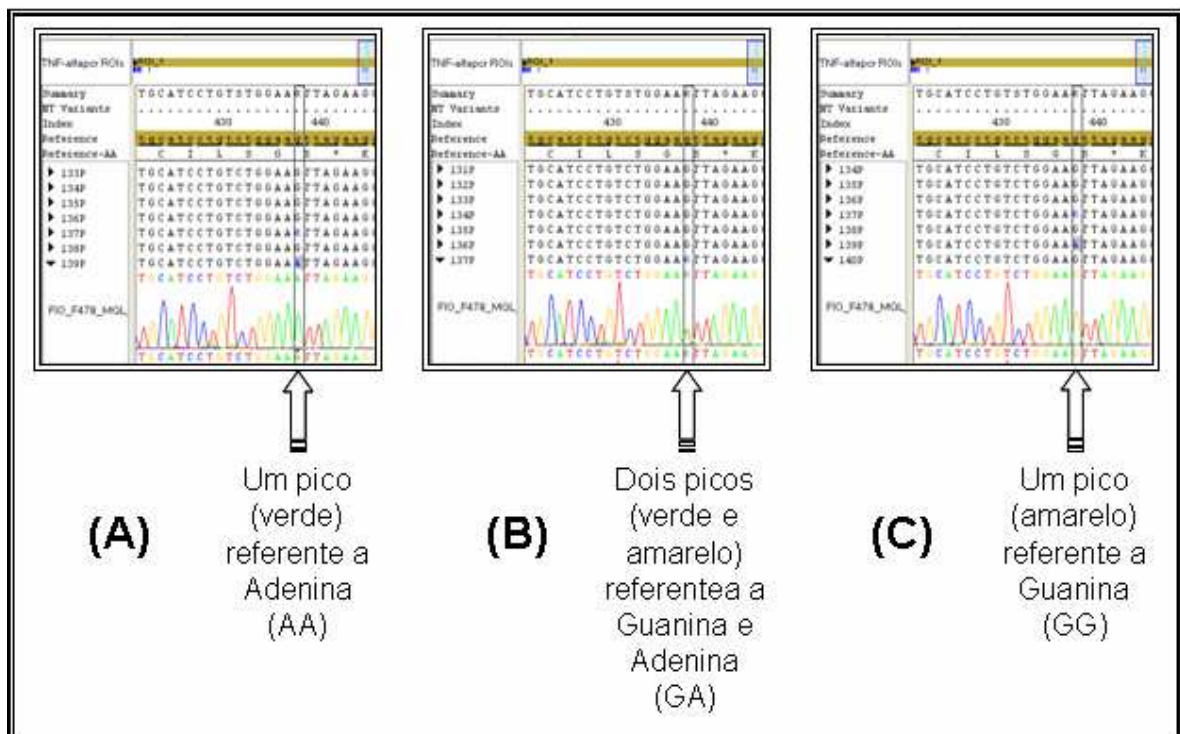


Figura 7: Identificação de SNP através da visualização do cromatograma dentro do programa SeqScape. A figura mostra três possíveis genótipos para o SNP TNF G-376A. (A) Amostra mutante homocigota, (B) amostra mutante heterocigota e (C) amostra homocigota tipo-selvagem.



4.10- Análise estatística

Todos os polimorfismos foram testados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando apropriado (Epi Info, versão 3.4.2 2007, Centers for Disease Control and Prevention – USA) considerando o valor de 5% ($p < 0,05$) como limiar de significância estatística entre os números observados e esperados separadamente em pacientes e controles. A magnitude das associações foram estimadas como razão de chances (Odds Ratio, OR) com seus respectivos intervalos de confiança. O nível de significância adotado para o estudo de associação também foi de 5%.

4.11- Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado no comitê de ética do HUCFF-UFRJ no dia 8 de agosto de 2002, com número 004/02

5. Resultados

Neste estudo, realizamos, através de sequenciamento automático, o mapeamento parcial da região promotora dos genes que codificam para TNF- α , IFN- γ e SLC11a1 (NRAMP1). Descrevemos as frequências alélicas, genóticas e haplotípicas dos polimorfismos encontrados e investigamos a possível associação dos mesmos com diferentes desfechos após a infecção pelo *M. tuberculosis*. Foram arrolados no estudo um total de 500 indivíduos sendo 265 pacientes de tuberculose e 235 controles sadios não relacionados e sem histórico de TB prévia. As amostras de DNA isoladas do sangue periférico foram amplificadas de acordo com a região de interesse para cada alvo e posteriormente genotipadas através de sequenciamento direto do produto amplificado. Tendo em vista o caráter retrospectivo das amostras utilizadas, após análise do banco de dados contendo as informações dos pacientes e controles verificamos que, retirando os pacientes positivos na sorologia para HIV (HIV+), este grupo consistiu de 140 indivíduos com tuberculose bacteriologicamente confirmada (cultura), sendo 121 portadores de TB pulmonar e 19 portadores de TB extrapulmonar. Este grupo foi estratificado em três faixas etárias (≤ 29 ; 30-39 e ≥ 40) e composto de 73 homens e 67 mulheres. O grupo controle, para a análise de associação arrolou 154 indivíduos não relacionados consanguineamente e com informação do teste intradérmico da tuberculina (TST) foi também estratificado nas mesmas faixas etárias dos pacientes, sendo composto de 55 homens e 99 mulheres. Noventa e seis indivíduos apresentaram resultados positivos no teste intradérmico de tuberculina (TST+) e 58 foram negativos (TST-). Após o término da genotipagem sete polimorfismos foram encontrados na região de interesse do gene que codifica para IFN- γ , dos quais quatro ainda não foram descritos e três estão depositados no banco de SNPs (GenBank – Entrez SNP). Na região de interesse do gene que codifica para TNF- α , também foram identificados sete polimorfismos, todos descritos no banco de SNPs e



bem caracterizados. A estratégia de genotipagem foi a mesma para todos os genes de interesse neste estudo, porém, encontramos muita dificuldade no seqüenciamento do gene de *SLC11a1* devido a quantidade de seqüências repetitivas dentro desta região que prejudica a amplificação e reação dos dideoxynucleotídeos pela *Taq* polimerase. Este imprevisto impossibilitou a continuação do seqüenciamento desse gene e mapeamento da região de interesse. A avaliação geral dos polimorfismos encontrados na nossa população e uma possível associação destes com suscetibilidade *per se*, gravidade ou proteção a TB foi analisada por comparação das freqüências alélicas e genotípicas.

5.1- Padronização dos procedimentos técnicos utilizados

5.1.1- Extração de DNA genômico a partir de sangue total utilizando o Kit “FlexiGene DNA” (Quiagen):

Através da utilização do Kit comercial “Flexigene DNA” para extração de DNA genômico humano diretamente de amostras de sangue total foi possível obter um bom rendimento (DNA altamente concentrado) em um curto espaço de tempo (Figura 8). Além disso, esse método apresentou a vantagem de não usar solventes orgânicos e ser menos dispendioso, sendo, portanto escolhido para todas as extrações de DNA realizadas neste trabalho.

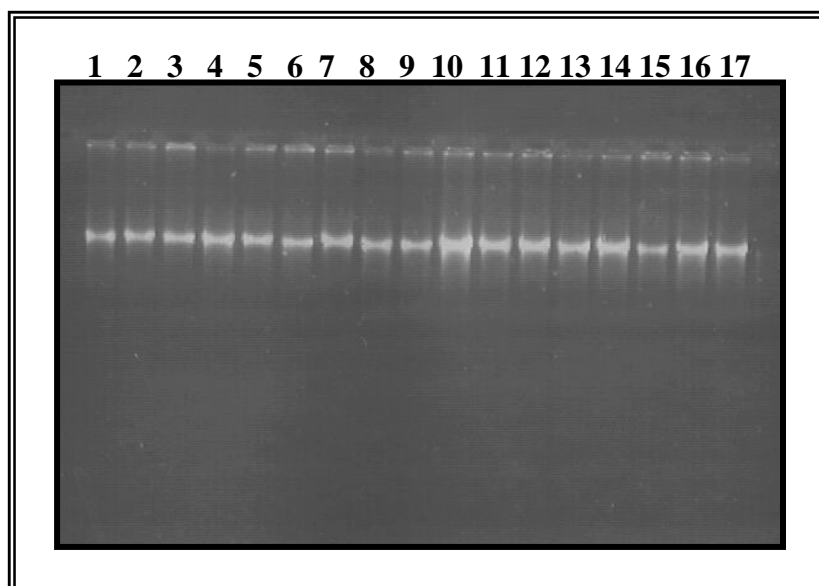


Figura 8: Extração de DNA genômico humano a partir de sangue total utilizando o kit “F Flexigene Quiagen”. Linhas: 1-17 DNA proveniente de 17 amostras de pacientes.

Após a escolha da região de interesse (a ser mapeada) nos diferentes genes alvos e desenho dos oligonucleotídeos a serem utilizados para a amplificação procedemos a padronização individual de cada reação de PCR envolvendo os seguintes parâmetros: temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos, concentração de dNTPs, de Mg^{2+} e a concentração de DNA alvo. Adicionalmente, foram testados ainda diferentes tipos de *Taq* polimerase e de aditivos (betaina, glicerol). Cada gene (alvo) apresentou dificuldades distintas nesta etapa sendo necessário, em alguns casos, (*SLC11a1* e *TNF- α*) o desenho de novos iniciadores.

5.1.2- Padronização das condições para amplificação da região de interesse do gene que codifica para IFN- γ .

Com o objetivo de determinarmos as condições de estringência da reação de amplificação para este gene realizamos um experimento de gradiente de temperatura, onde foram testadas algumas variações como Mg^{2+} , concentração de DNA alvo e 10% glicerol (tabela 1 citada na metodologia). As variações de temperatura foram programadas no termociclador PX2

Thermal Cycle (Thermo Electron Corporation), que permite um gradiente de temperatura entre 50°C e 70°C (de acordo com a temperatura de dissociação para cada gene) com uma variação a ser estabelecida pela máquina (figuras 9 e 10). Com base neste experimento a temperatura de 65,3°C utilizando 200ng de cada iniciador, 2mM Mg²⁺, 10% glicerol e 100ng de DNA molde, foi escolhida para amplificação da região de interesse (tabela 3). A amplificação é mostrada na figura 11 e a purificação desses produtos amplificados nas figuras 12 e 13.

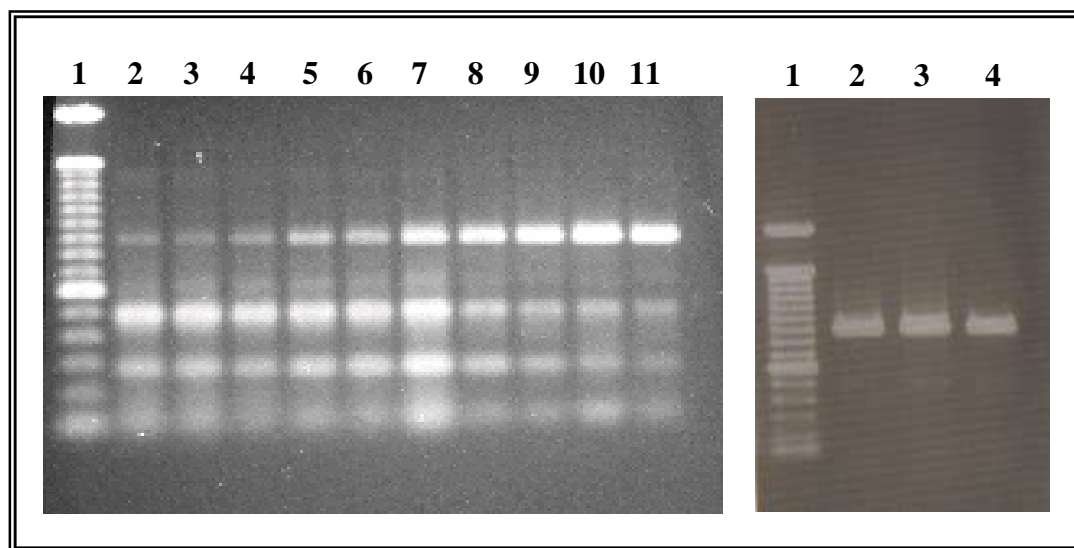


Figura 9: PCR de gradiente para padronização da amplificação da região promotora do gene de *IFN-γ*. Linhas: (1) Marcador de peso molecular 100 bp ladder (Invitrogen); (2 a 11) PCR/*IFN-γ* com gradiente de temperatura: (2) 53,1°C, (3) 53,4°C, (4) 54°C, (5) 55,2°C, (6) 56,5°C, (7) 58,1°C, (8) 59,6°C, (9) 61,3°C, (10) 63,1°C, (11) 64,2°C. **Figura 10:** Linhas: (1) Marcador de peso molecular 100 pb ladder (Invitrogen); (2 a 4) PCR/*IFN-γ* com gradiente de temperatura (continuação): (2) 65°C, (3) 65,3°C, (4) 65,8°C.

Tabela 3: Condições ideais para a amplificação do gene de *IFN-γ*

Gene	Seqüências dos Iniciadores (5'-3')	Ciclagem	Tamanho do produto
<i>IFN-γ</i>	F: GGAACTCCCCCTGGGAATATTCT R: AGCTGATCAGGTCCAAAGGA	94°C – 5' 1X 94°C – 1' } 65,3°C – 1' } 35X 72°C – 1' } 72° – 5' 1X	863pb

A PCR foi realizada em 50µL de mistura de reação contendo tampão da enzima 1X; 1U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen); 2mM de MgCl₂; 200µM dNTPs; 200ng de cada iniciador; 10% glicerol e 100ng de DNA genômico.

5.2- Amplificação das amostras após padronização e purificação dos produtos amplificados:

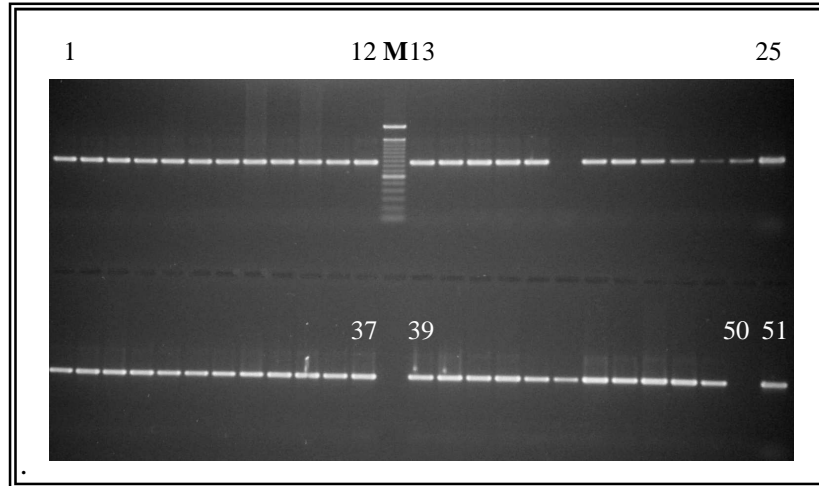


Figura 11: Linhas: 1-12, amplificação das amostras dos pacientes 49P-60P; Marcador de peso molecular, 100pb ladder Invitrogen; 13-24, amostras dos pacientes 61P-72P; 25, DNA controle usado para padronização; 26-37, amostras dos pacientes 73P-84P; 39-50, amostras dos pacientes 85P-96P; 51, DNA controle.

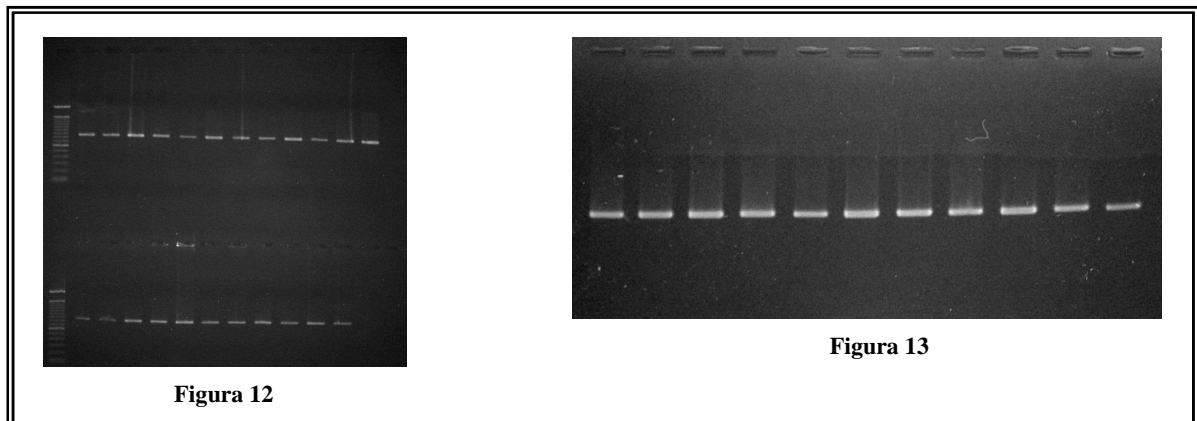


Figura 12: Purificação dos produtos amplificados das amostras 1P a 23P com Sulfato de Amônia 2,5M final.

Figura 13: Purificação com Kit ChargeSwitch da Invitrogen, amostras 24P a 34P.



5.3- Seqüenciamento e análise dos SNPs encontrados em parte da região promotora do gene que codifica para *IFN- γ* através do programa SeqScape (Applied Biosystems) v 2.5:

Uma vez purificados, os produtos de PCR foram submetidos a 4 reações de seqüenciamento de forma a obter uma seqüência completa e de boa qualidade do fragmento amplificado (863pb). A figura 14 mostra a estratégia de desenho dos iniciadores bem como a seqüência referência (AF375790) utilizada para fazer a análise e identificação de SNPs encontrados na população estudada. Após o seqüenciamento, verificamos que cerca de 80-100 pb iniciais de cada reação eram perdidos devido à má qualidade na seqüência obtida (dados não mostrados). Entretanto, conseguimos obter a seqüência relativa a toda extensão do produto amplificado de todas as amostras após a realização de 4 reações independentes (aproveitamento de 650-750 pb de cada reação com iniciadores externos e 400-500 com iniciadores internos).

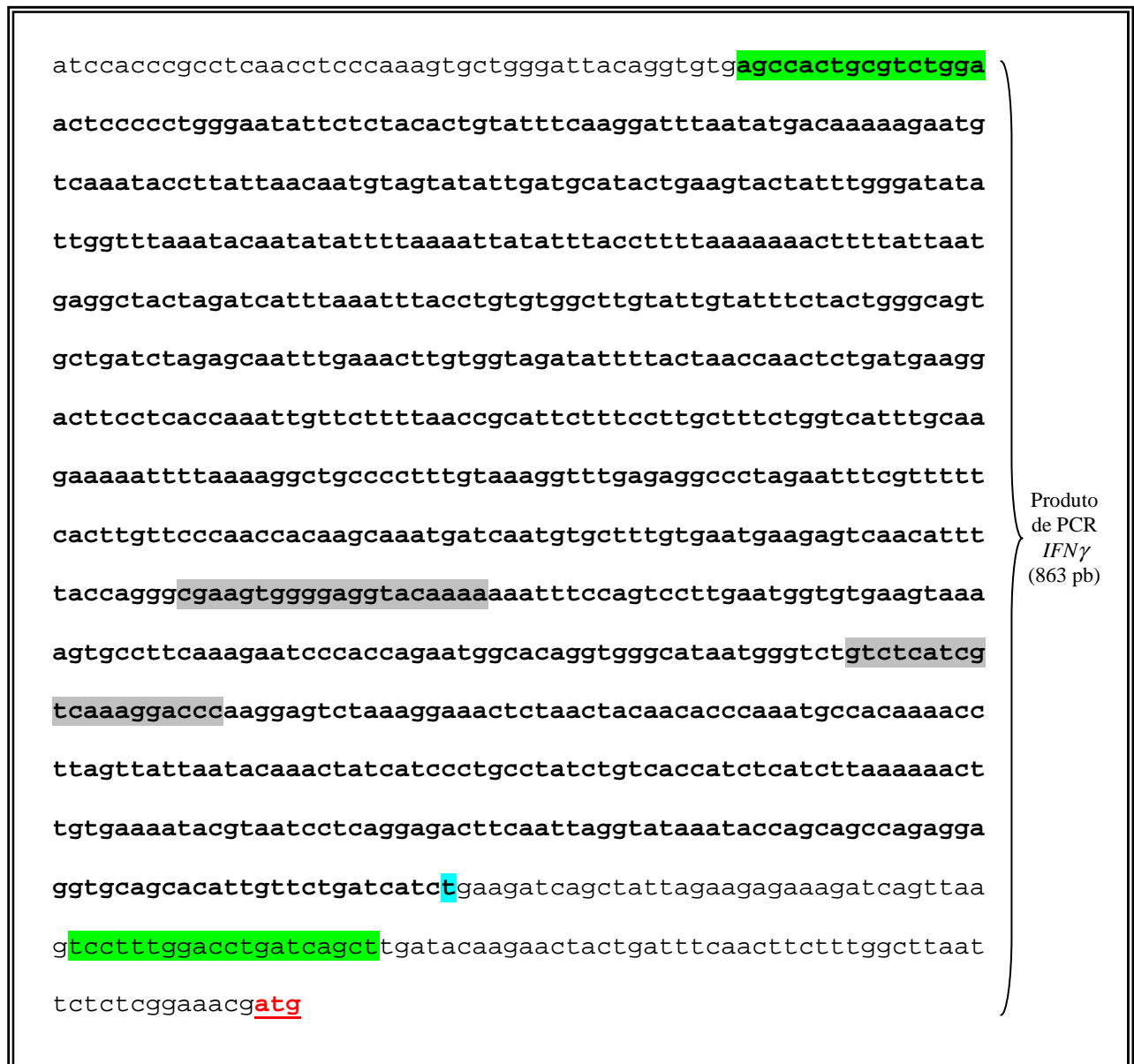


Figura 14: Estratégia de amplificação e seqüenciamento do gene de *IFN* γ (Seqüência parcial da região promotora do gene que codifica para *IFN* γ retirada da seqüência referência AF3757790). O esquema mostra a região de anelamento dos iniciadores utilizados para amplificação e/ou seqüenciamento bem como a região de interesse (negrito) mostrando em azul, o +1 RNA, início da transcrição e vermelho o ATG, códon do início da tradução. Em verde, os iniciadores Externos Sense e Antisense usados para amplificação e seqüenciamento. Em cinza, iniciadores internos Sense e Antisense usados somente para seqüenciamento.

A fim de aperfeiçoar as análises das seqüências obtidas das 500 amostras foi utilizado o programa de bioinformática SeqScape v.2.5 (Applied Biosystems). Através da utilização da seqüência AF375790 como referência e alinhamento das seqüências obtidas foi possível identificar (figura 15 A,B,C e figura 15.1 D, E, F e G) e mapear (figura 16) 7 diferentes SNPs nesta região do gene *IFN- γ* na população de estudo que representa parte da Região Sudeste (Rio de Janeiro).

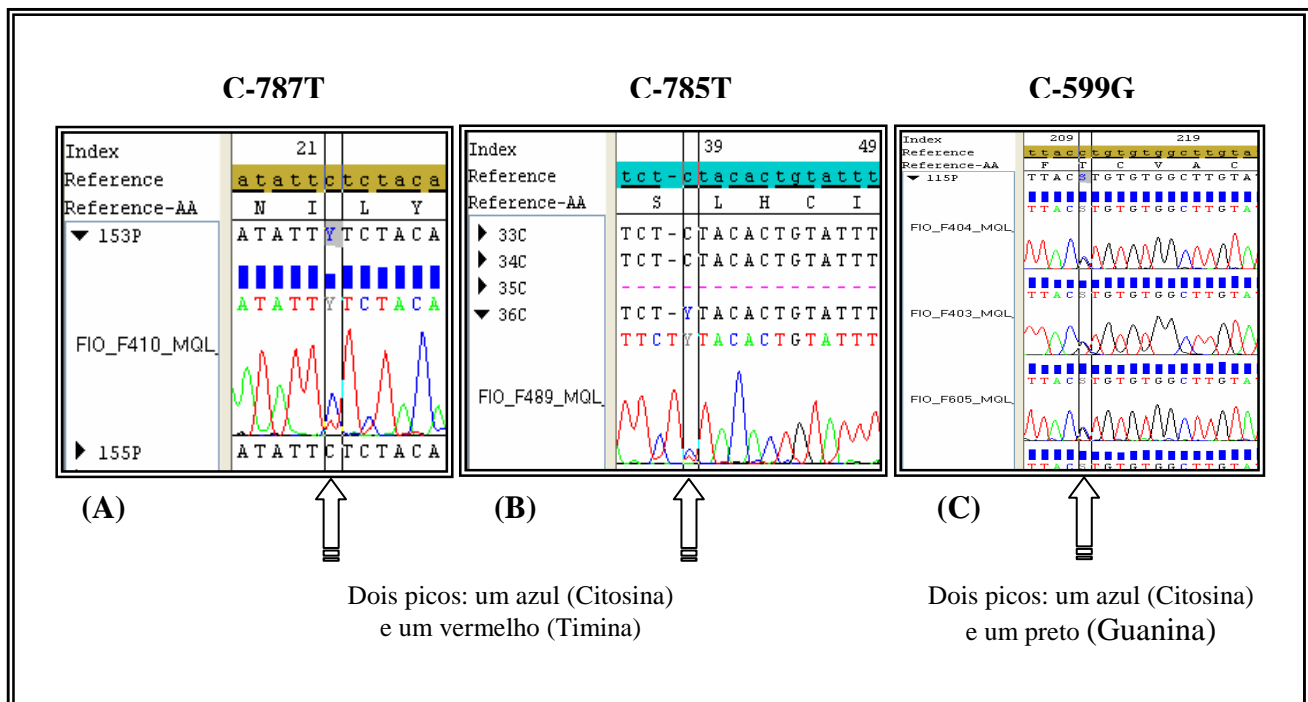


Figura 15: Identificação de SNPs no gene de *IFN- γ* através da visualização do cromatograma apresentado pelo programa SeqScape. (A): C-787T; (B): C-785T e (C): C-599G.

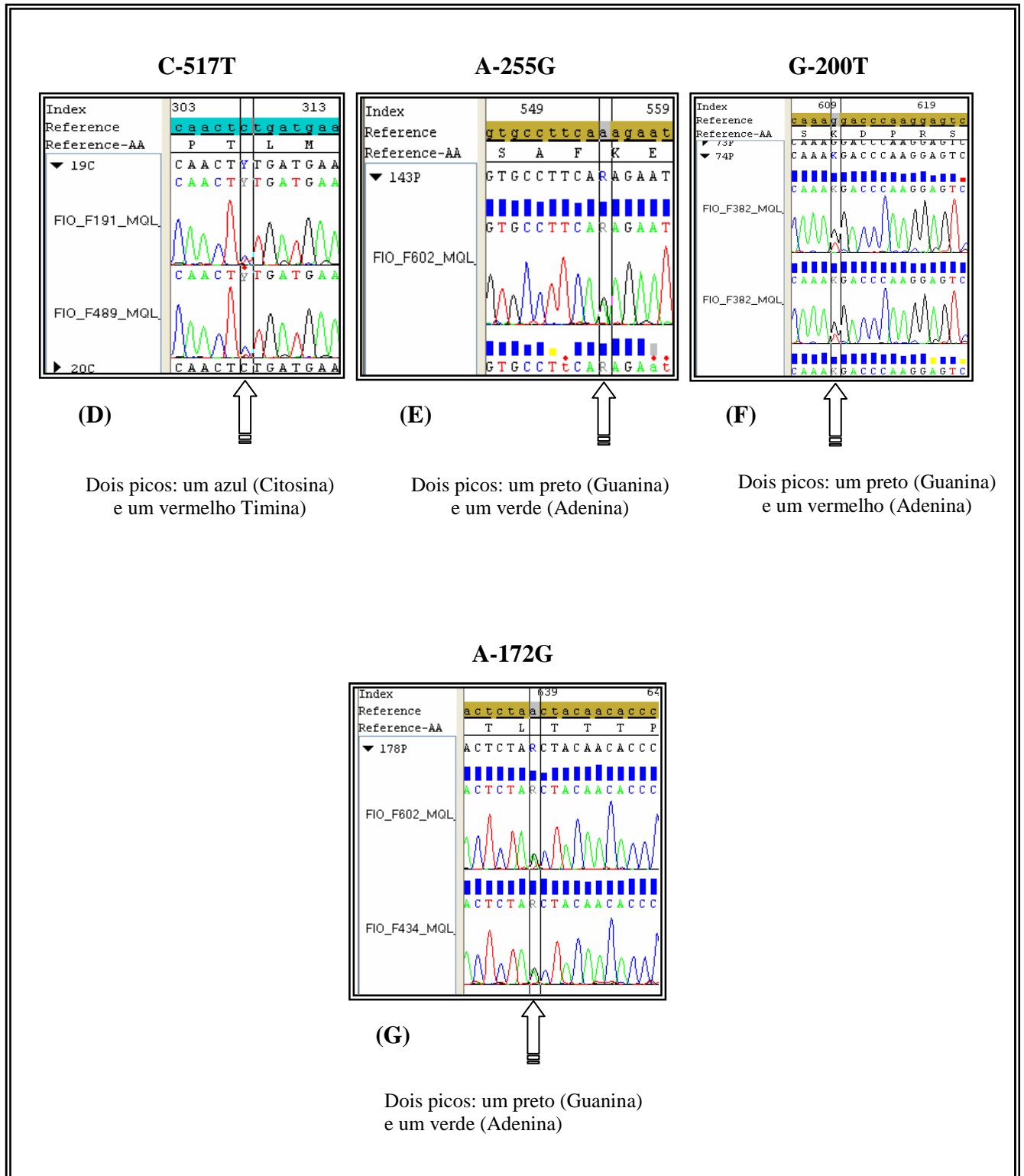


Figura 15.1: Identificação de SNPs no gene de *IFN-γ* através da visualização do cromatograma apresentado pelo programa SeqScape (D): C-517T; (E): A-255G; (F): G-200T e (G): A-172G.



-865 Primer ES
 721 atccaccgctcaacctcccaaagtgctgggattacaggtgtgagccactgctctgga
 -805 -787 -785
 781 actccccctgggaatattctctactgtatttcaaggatttaatatgacaaaaagaatg
 -745
 841 tcaaataccttattaacaatgtagtatattgatgcatactgaagtactatttgggatata
 -685 -636
 901 ttggtttaataacaatatattttaaaatttatatttaccttttaaaaaaactttttattaat
 -625 -599
 961 gaggctactagatcatttaaatttacctgtgtggccttgattgtatttctactgggcagt
 -565 -517
 1021gctgatctagagcaatttgaaacttgtggtagatattttactaaccaactctgatgaagg
 -505 -458
 1081acttctcaccxaaattggtcttttaaccgcattctttccttgctttctggtcatttgcaa
 -445
 1141gaaaaattttaaaaggctgccctttgtaaaggtttgagaggccctagaatttcgttttt
 -385 -333
 1201cacttgttcccaaccacaagcaaatgatcaatgtgctttgtgaatgaagagtcaacattt
 -325 -316 Primer IS -287
 1261taccagggcgaagtggggaggtacaaaaaatttccagtccttgaatggtgtgaagtaa
 -265 -263 -255 -246
 1321agtgccttcaagaatcccaaccagaatggcacaggtgggcataatgggtctgtctcatcg
 -205 -200 -180 -172
 1381tcaaaggacccaaggagtcctaaaggaaactctaaactacaacacccaaatgccacaaaacc
 -145 Primer IAS
 1441ttagttattaatacaaaactatcatccctgcctatctgtcaccatctcatcttaaaaaact
 -85 -30
 1501tgtagaaatacgtaatcctcaggagacttcaattaggtataaataaccagcagccagagga
 -25 +1 mRNA
 1561ggtgcagcacattggtctgatcatctgaagatcagctattagaagagaaagatcagtaa
 1621gtcctttggacctgatcagcttgatacaagaactactgatttcaacttctttggcttaat
 Primer EAS
 1681tctctcggaaacgatgaaatatacaagttatatct

- Todas as mutações já descritas que não foram encontradas.
 - Todas as mutações já descritas e que foram encontradas.
 - Todas as mutações encontradas na população de estudo e que ainda não estão descritas na literatura.
 - +1 mRNA, sítio de início da transcrição usado como referência para a contagem negativa da região promotora.
 - ATG, códon de início da tradução.
- ES: primer externo sense IS: primer interno sense
 IAS: primer interno antisense EAS: primer externo antisense.

Figura 16 - Produto de PCR *INF-γ* (863pb): Mapeamento dos SNPs encontrados em parte da região promotora do gene de *INF-γ* na população de estudo. O esquema mostra a região de anelamento dos iniciadores externos utilizados para amplificação e sequenciamento grifados em verde bem como dos iniciadores internos usados somente para o sequenciamento em cinza.

5.4- Mapeamento dos possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição com importância molecular nesta região.

Através da busca ativa nos bancos de dados existentes conseguimos mapear os possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição na região estudada (figura 19).

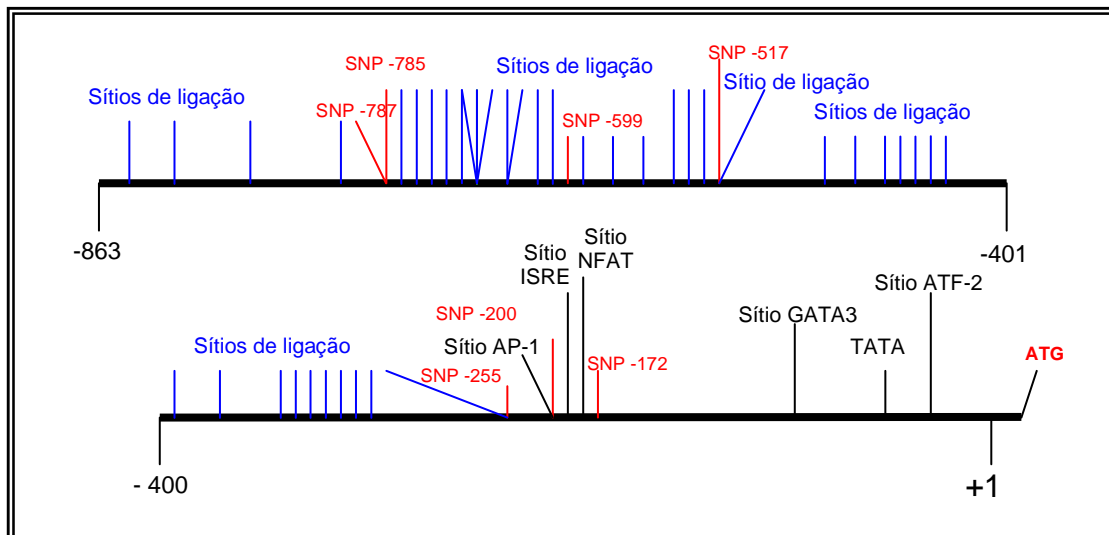


Figura 17: Esquemática da região amplificada do gene IFN- γ contendo os sítios de ligação dos fatores de transcrição na região promotora. Programa utilizado: TFscan (braunschweig.de/TRANSFAC/index.html), que é parte do pacote do Emboss (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/tfscan-simple>) e a base de dados transfac (html://emboss.sourceforge.net)

Há evidências que a região proximal do promotor do IFN- γ seja importante no controle da diferenciação das células T helper, envolve uma região altamente conservada de -100 a -30 e contém duas sub-regiões que podem formar complexo com proteínas: a) sub-região proximal (-73 a -48) que contém um elemento homólogo ao promotor de IL-2 (NF-IL-2), que é um sítio de ligação para ATF-2 (*Activating transcription factor-2*) e tem envolvimento na ativação da transcrição de INF- γ de acordo com Penix e cols, 1996 e, ao contrário, a proteína CREB (*cyclic-AMP response element binding*) que inibe esta transcrição através da ligação ao NF-IL-2. b) a região distal de -96 a -80 liga o fator GATA-3 que desempenha uma função crucial na diferenciação Th1/Th2. Na região -200 há um sítio AP-1 (*Activating transcription*

factor) e também um sítio NFAT (nuclear factors-activated T cell site) entre -168 a -160 (Chevallard e cols, 2002).

5.5- Análise descritiva dos polimorfismos identificados na região de interesse do gene de *IFN- γ* na população estudada (n=500)

Após análise das seqüências de 500 amostras através do software SeqScape, três SNPs já descritos na literatura foram identificados. Os outros quatro não foram encontrados em banco de dados (GenBank – Entrez SNP) podendo portanto serem considerados como SNPs novos. A tabela 4 mostra as freqüências absolutas e alélicas dos SNPs encontrados na população de estudo.

Tabela 4: Descrição das freqüências absolutas e alélicas dos sete SNPs encontrados na população estudada (n=500).

SNP	Nº de amostras	Amostras heterozigotas	Amostras homozigotas	Freqüência absoluta	Freqüência alélica
SNPs depositadas em banco de dados (GenBank - Entrez SNP)					
C-785T	5	5	-	1.0%	0.5%
G-200T	14	14	-	2.8%	1.4%
A-172G	2	2	-	0.4%	0.2%
SNPs não descritas					
C-787T	5	5	-	1.0%	0.5%
C-599G	13	12	1	2.6%	1.4%*
C-517T	3	3	-	0.6%	0.3%
A-255G	1	1	-	0.2%	0.1%

* freqüência alélica da variante mutante



Do total de 500 amostras genotipadas em parte da região promotora do gene de *IFN- γ* os sete SNPs identificados apresentaram-se em uma frequência muito baixa. Uma troca de base de A para G na posição -255 foi encontrada em somente um paciente, como podemos observar na tabela acima. Esta mutação, ainda não descrita na literatura foi confirmada nas duas direções e em mais de uma reação de PCR e seqüenciamento, porém, após a exclusão dos pacientes HIV⁺ para o estudo de associação, esta mutação também foi excluída. O mesmo aconteceu com a substituição de A para G na posição -172, embora já descrita, na população de estudo a mesma foi encontrada em somente dois pacientes do total de indivíduos (tabela 4), dos quais um também foi excluído. Contudo, a substituição de C para G na posição -599, de acordo com a nomenclatura oficial (http://www.genenames.org/cgi-bin/hgnc_search.pl), também não descrita, foi detectada em mais de 1% da população estudada caracterizando-se assim como um SNP real. Este SNP manteve esta frequência mesmo após a exclusão dos indivíduos sem informação ou HIV⁺. A distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos de *IFN- γ* encontrados no total de indivíduos analisados podem ser vistos na tabela 5.



Tabela 5: Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos de *IFN- γ* encontrados no total de indivíduos analisados.

Loci	Genótipo	Número de amostras (N=500)	Frequência absoluta	Frequência alélica
-787*	CC	495	99%	0,5%
	TC	5	1%	
	(f) T	5	-	
-785	CC	495	99%	0,5%
	CT	5	1%	
	(f) T	5	-	
-599*	CC	487	97,4%	1,4%
	CG	12	2,4%	
	GG	1	0,2%	
	(f) G	2	-	
-517*	CC	497	99,4%	0,3%
	CT	3	0,6%	
	(f)T	3	-	
-255*	AA	499	99,8%	0,1%
	AG	1	0,2%	
	(f) G	1	-	
-200	GG	486	97,2%	1,4%
	GT	14	2,8%	
	(f) T	14	-	
-172	AA	498	99,6%	0,2%
	AG	2	0,4%	
	(f) G	2	-	

* = SNPs não descritos

Dentre as 500 amostras de DNA seqüenciadas, com exceção de uma, todas foram heterozigotas para os SNPs encontrados. Contudo, nenhuma amostra apresentou mais de um SNP possibilitando assim, a identificação dos haplótipos e a determinação de suas freqüências para esta população como mostrado na tabela 6.

Tabela 6: Descrição dos haplótipos identificados no gene *IFN- γ* (n=500) e suas respectivas freqüências.

Haplótipos	C-787T	C-785T	C-599G	C-517T	A-255G	G-200T	A-172G	Freq.(%)
1	C	C	C	C	A	G	A	0,916
2	C	T	C	C	A	G	A	0,010
3	C	C	G	C	A	G	A	0,024
4	C	C	C	C	A	T	A	0,028
5	T	C	C	C	A	G	A	0,010
6	C	C	C	C	G	G	A	0,002
7	C	C	C	C	A	G	G	0,004
8	C	C	C	T	A	G	A	0,006

5.6- Estudo de associação:

Para este tipo de análise utilizamos as freqüências genotípicas, alélicas e haplotípicas de todos os SNPs identificados e comparamos entre os grupos que representaram os diferentes desfechos avaliados. Conforme exposto anteriormente, para esta análise, o tamanho amostral (tanto dos pacientes como dos controles) foi reduzido devido à exclusão dos indivíduos sem informações clínico/demográficas ou positivos no teste sorológico para HIV. Os desfechos avaliados neste estudo foram: a) suscetibilidade *per se* a TB (pacientes com TB *versus* controles); b) gravidade da doença (TBP (TB pulmonar) *versus* TBE (TB extrapulmonar) e c) infecção latente (controles sadios TST+ *versus* TST-).

Na primeira avaliação, onde os genótipos identificados, referentes aos diferentes SNPs foram testados para verificar a possível associação com a ocorrência de tuberculose ativa, verificamos que dos sete SNPs testados, somente o SNP -200 G >T apresentou uma diferença significativa em nível de genótipo entre os grupos avaliados para este desfecho. A tabela 7 mostra a associação do genótipo GT com proteção à ocorrência da TB ativa quando da comparação entre os grupos de pacientes com TB (TBP + TBE) *versus* controles sadios TST+ ($P=0,033$, OR= 0,18 IC=0,03-1,00).

Tabela 7: Avaliação de associação entre os diferentes genótipos presentes no promotor do gene *IFN- γ* com suscetibilidade *per se* a ocorrência de TB ativa.

Loci	Genótipo	Pacientes (N=140)	Controles TST+* (N= 96)	χ^2	P-valor	OR	IC
-787	CC	138	96	1.383	0,515	#	#
	CT	2	0				
-785	CC	140	94	2.942	0.16	#	0,00<2,79
	CT	0	2				
-599	CC	135	93	0.035	NS	1,15	0,23<6,23
	CG	5	3				
-517	CC	140	93	2,29	0,066	#	0,00<1,52
	CG	0	3				
-255	AA	140	96	ND	ND	ND	ND
	AG	0	0				
-200	GG	138	89	3,86	0.033	0,18	0,03<1,00
	GT	2	7				
-172	AA	139	96	0.689	0.407	#	#
	AG	1	0				

* contatos (controles) positivos para o teste intradérmico de tuberculina;

indefinido; ^{NS} não significativo; ND não determinado

Ao avaliarmos a associação dos mesmos genótipos com os tipos de TB separadamente, TB pulmonar e TB extrapulmonar, verificamos que novamente, o único genótipo que apresentou diferença significativa na frequência entre os grupos foi o GT referente ao SNP -200, o qual sugere uma associação com proteção a ocorrência de TB pulmonar ($P=0,041$, $OR=0,21$, $IC=0,03-1,16$ - Tabela 8). A comparação dos genótipos selecionados entre controles TST+ e TB extrapulmonar não permitiu uma análise estatística conclusiva devido ao reduzido número de pacientes com este tipo de TB, contudo, o genótipo -200 GT foi o que mostrou a maior frequência no grupo de contatos TST+ e uma frequência de 0% (ausente) nos pacientes com TBE (dados não mostrados).

Tabela 8: Avaliação da associação entre os diferentes genótipos presentes no promotor do gene *IFN- γ* com suscetibilidade a ocorrência de TB pulmonar.

Loci	Genótipo	Pacientes TBP (n=121)	Cont. TST+ (n= 96)	χ^2	P-valor	OR	IC
-787	CC	119	96	1,594	0,504	#	#
	CT	2	0				
-785	CC	121	94	2,533	0,1945	#	0,00<3,23
	CT	0	2				
-599	CC	118	93	0,141	1,00	0,79	0,12<5,02
	CG	3	3				
-517	CC	121	93	1,88	0,085	#	0,00<1,52
	CG	0	3				
-255	AA	121	96	ND	ND	ND	ND
	AG	0	0				
-200	GG	119	89	2,98	0,041	0,21	0,03<1,16
	GT	2	7				
-172	AA	120	96	0.01	NS	#	#
	AG	1	0				

indefinido; ^{NS} não significativo; ND não determinado

Na avaliação do desfecho (gravidade da doença), a análise foi feita através da comparação das frequências encontradas nos grupos de pacientes com TB pulmonar *versus* pacientes com TB extrapulmonar (Tabela 9). Somente o SNP-599 permitiu a análise para este desfecho, contudo não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 9: Avaliação da associação entre os diferentes genótipos presentes no promotor do gene *IFN- γ* com gravidade da TB.

Loci	Genótipo	TBP n=121	TBE n=19	p-valor*	RR	IC
-787	CC	119	19	1,00	#	#
	CT	2	0			
-785	CC	121	19	-	-	-
	CT	0	0			
-599	CC	118	17	0,136	3,18	0,99<10,15
	CG	3	2			
-517	CC	121	19	-	-	-
	CG	0	0			
-255	AA	121	19	-	-	-
	AG	0	0			
-200	GG	119	19	1,00	#	#
	GT	2	0			
-172	AA	120	19	1,00	#	#
	AG	1	0			

^{TBP} Tuberculose pulmonar; ^{TBE} Tuberculose extrapulmonar; * calculado pelo Teste Exato de Fisher; ^{RR} Risco relativo; ND não determinado; # indefinido

A fim de avaliarmos a associação entre os diferentes genótipos com a capacidade de infecção, comparamos a frequência genotípica dos SNPs identificados entre os grupos de controles TST+ contra o grupo TST-. A tabela 10 mostra que as frequências dos genótipos relativas aos diferentes SNPs nos respectivos grupos são muito pequenas e conseqüentemente

nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os diversos SNPs, com exceção da SNP -200, que apresentou um *p*-valor significativo pelo Teste Exato de Fisher ($p=0,045$), embora o IC tenha sido indefinido.

Tabela 10: Avaliação da associação entre os diferentes genótipos separadamente com capacidade de infecção TST+/TST negativo.

Loci	Genótipo	TST+ (n=96)	TST- (n=58)	χ_2	<i>p</i> -valor*	OR	IC
-787	CC	96	58	ND	ND	ND	ND
	CT	0	0				
-785	CC	94	57	ND	1,00	1,21	0,08<34,60
	CT	2	1				
-599	CC	93	58	1,849	0,29	#	#
	CG	3	0				
-517	CC	93	58	1,849	0,29	#	#
	CG	3	0				
-255	AA	96	58	ND	ND	ND	ND
	AG	0	0				
-200	GG	89	58	2,91	0,045	#	#
	GT	7	0				
-172	AA	96	58	ND	ND	ND	ND
	AG	0	0				

* calculado pelo Teste Exato de Fisher; ND não determinado; # indefinido

Tendo em vista que o SNP *IFN- γ* -200 foi o único que apresentou associação com algum dos desfechos estudados em nível de genótipo, resolvemos proceder a análise utilizando a frequência alélica e como podemos observar na tabela 11, a variante mutada -200T mostrou uma associação significativa com os desfechos de suscetibilidade *per se* a ocorrência de TB geral, de TBP e ainda com infecção latente ($P=0,033$, $0,043$ e $0,035$) respectivamente. Para o desfecho gravidade onde os grupos TB pulmonar e Extrapulmonar foram analisados, não foi

possível tal associação devido à frequência alélica ser zero no grupo extrapulmonar devido ao reduzido número amostral do grupo TBE.

Tabela 11: Distribuição das frequências alélicas da variante mutante -200T nos grupos de acordo com os diferentes desfechos estudados.

Diferentes desfechos	SNP IFN- γ -200				
	Grupos		P-valor*	OR	IC
Ocorrência de TB ativa	Pacientes	TST+			
	0,0071	0,036	0,033	0,19	0,03<1,01
Ocorrência de TBP	TBP	TST+			
	0,0082	0,036	0,043	0,22	0,033<1,17
Gravidade da doença	TBP	TBE			
	0,0082	0,00	1,00	#	#
Infecção Latente	TST+	TST-			
	0,036	0,000	0,035	#	#

* Teste Exato de Fisher; # Indeterminado

Após a genotipagem de todas as amostras e avaliação de associação dos SNPs encontrados na região promotora do gene que codifica para *IFN- γ* com os diferentes desfechos propostos, os polimorfismos encontrados com maior frequência absoluta (*IFN- γ -599C>G* e *-200G>T*) foram testados contra as variáveis demográficas gênero e idade para verificar a influência das mesmas. Conforme mostram as tabelas 12 (A e B), na análise estratificada nenhuma diferença significativa foi encontrada para gênero ou idade com algum dos polimorfismos.

Tabela 12 (A) e (B): Análise de associação dos polimorfismos C-599G e G-200T no promotor do gene *IFN- γ* com risco de tuberculose em diferentes variáveis demográficas.

(A) **C-599G**

Variável	Genótipo	Pacientes N = 140	Controles N = 154	P-valor	95%IC
Todos os sujeitos	C/C	135 (96.4%)	150 (97.4%)	0,7406	0,32-6,30
	C/G+GG	5 (3.6%)	4 (2,6%)		
Gênero					
Masculino	C/C	72 (98.7%)	55 (100%)	1,00	#
	C/G+GG	1	-		
Feminino	C/C	63 (94 %)	95 (95.9%)	0,7156	0,30-7,51
	C/G+GG	4 (6%)	4 (4.4%)		
Idade					
≤29	C/C	28 (100%)	37 (97,4%)	1,00	0,00-24,20
	CG/GG	-	1 (2,6%)		
30-39	C/C	18 (94,7%)	36 (97,3%)	1,00	0,00-78,72
	C/G+GG	1 (5,3%)	1 (2.7%)		
≥40	C/C	89 (95,6%)	76 (96,2%)	1,00	0,21-6,65
	C/G+GG	4 (4,3%)	3 (3,8%)		

(B) G-200T

Variável	Genótipo	Pacientes N = 140	Controle N = 154	Caso controle	
				P-valor	95%IC
Todos os sujeitos	C/C	138 (98,6%)	147 (95,5%)	0,177	0,04-1,63
	C/G+GG	2 (1,4%)	7 (4,5%)		
Gênero					
Masculino	C/C	72 (98,7%)	51 (94,4%)	0,164	0,01-1,76
	C/G+GG	1 (1,4%)	4 (5,6%)		
Feminino	C/C	66 (98,5%)	96 (97%)	0,648	0,02-5,39
	C/G+GG	1 (1,5%)	3 (3%)		
Idade					
≤29	C/C	27 (96,4%)	37 (97,4%)	1,00	0,00-52,97
	CG/GG	1 (3,6%)	1 (2,6%)		
30-39	C/C	19 (100%)	36 (97,4%)	1,00	0,00-35,27
	C/G+GG	-	1 (2,7%)		
≥40	C/C	92 (98,9%)	76 (96,2%)	0,33	0,01-3,05
	C/G+GG	1 (1%)	3 (3,8%)		

A Tabela 13 mostra a distribuição dos diferentes haplótipos identificados nos diferentes grupos selecionados para o estudo de associação. O haplótipo 4, CCCATA SNPs (-787/-785/-599/-517/-255/-200/-172) apresentou uma frequência mais alta no grupo controle TST⁺ (6,25%) enquanto o haplótipo 8, CCCTAGA foi encontrado apenas neste grupo numa frequência de 3,1%. O haplótipo 3, CCGCAGA foi encontrado em todos os grupos estudados com exceção dos contatos TST⁻, com frequência mais alta no grupo TBE (10,5%), sendo este

o único haplótipo encontrado neste grupo. O haplótipo 6, CCCCCGGA não foi encontrado após a retirada dos HIV⁺ e indivíduos sem informação.

Tabela 13: Descrição da frequência haplotípica nos diferentes grupos estudados.

Haplótipo	TB Geral <i>n</i> =(140)	TBP <i>n</i> =(121)	TBEP <i>n</i> =(19)	Contatos TST+ <i>n</i> =(96)	Contatos TST- <i>n</i> =(58)
1	130 (92,8%)	113 (93,4%)	0	83 (86,4%)	0
2	0	0	0	2 (2,08%)	2 (3,4%)
3	5 (3,57%)	3 (2,47%)	2 (10,5%)	2 (2,08%)	0
4	2 (1,42%)	2 (1,65%)	0	6 (6,25%)	0
5	2 (1,42%)	2 (1,65%)	0	1 (1,04%)	0
7	1 (0,71%)	1 (0,82%)	0	0	0
8	0	0	0	3 (3,1%)	0

TBP: tuberculose pulmonar, TBE: tuberculose extrapulmonar, TST+: positivo no teste tuberculínico, TST-: negativo no teste tuberculínico.

Estes haplótipos foram analisados quanto à associação com os desfechos estudados. Como podemos observar na tabela 14, nenhum apresentou associação significativa com nenhum dos desfechos avaliados, embora o haplótipo 4, CCCCATA tenha apresentado uma tendência a proteção com os desfechos suscetibilidade *per se*, OR= 0,22; *p*-valor = 0,051 e IC= 0,03<1,23 e capacidade de infecção, *p*-valor = 0,055; OR e IC indeterminado.

Tabela 14: Análise de associação dos haplótipos identificados com os diferentes desfechos

		1	2	3	4	5	7	8
Ocorrência de TB ativa	OR	2,04		1,74	0,22	1,38	#	0,00
	p-valor*	0,16	Ausente	0,40	0,051	0,63	0,59	0,066
	IC	0,79<5,28		0,29<13,25	0,03<1,23	0,1<38,92	#	0,00<1,52
Ocorrência de TB pulmonar	OR	2,21		1,19	0,25	1,60	#	0,00
	p-valor*	0,137	Ausente	0,608	0,077	0,586	0,557	0,089
	IC	0,81<6,15		0,16<10,45	0,03<1,42	0,11<45,18	#	0,00<1,82
gravidade	RR	#		3,18	#	#	#	
	p-valor*	0,00	Ausente	0,136	0,746	0,746	0,86	Ausente
	IC	#		0,99<10,15	#	#	#	
Infecção latente	OR	#	0,60	#	#	#		#
	p-valor*	0,00	0,48	0,387	0,055	0,622	Ausente	0,239
	IC	#	0,06<6,12	#	#	#		#

*Teste exato de Fisher

5.7- Padronização das condições para amplificação por PCR da região de interesse do gene que codifica para o TNF- α :

Com o objetivo de determinarmos as condições ideais para a amplificação da região de interesse no promotor do gene de *TNF- α* realizamos experimentos com gradiente de temperatura onde foram testadas algumas variações como Mg²⁺, DNA e aditivos como glicerol, betaina, formamida e DMSO. Durante estes experimentos não conseguimos êxito na amplificação utilizando a mesma *Taq* polimerase (convencional) utilizada para a amplificação do gene de *IFN- γ* . Somente foi possível a amplificação do fragmento de interesse quando utilizamos a *Taq* Gold DNA polimerase (Applied Biosystem Foster City, CA-USA). Com esta enzima, além de uma boa especificidade conseguimos um rendimento maior em termos de quantidade de produto amplificado. As figuras 18 (A) e (B) mostram o gradiente de temperatura de anelamento.

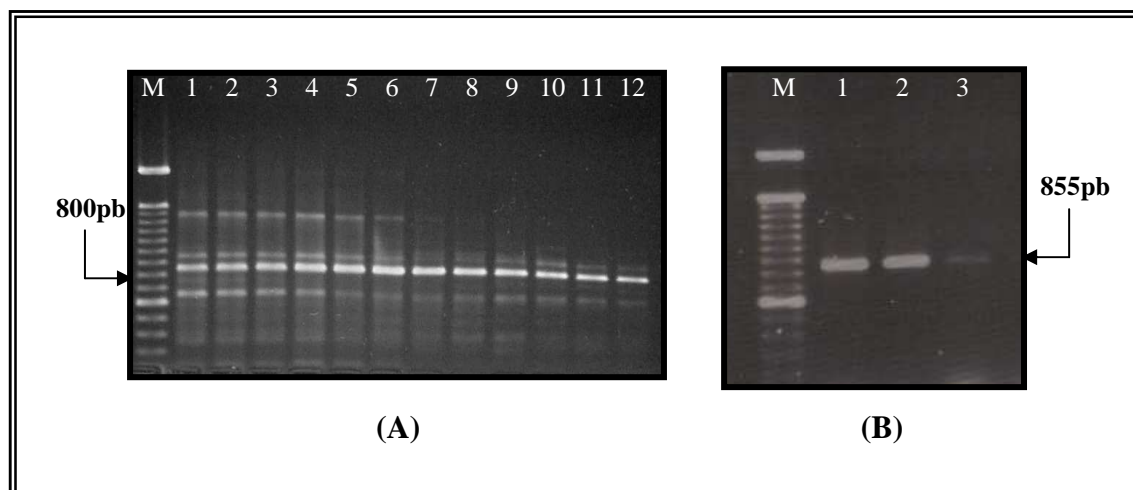


Figura 18 (A): PCR de gradiente para padronização da amplificação da região promotora do gene de *TNF- α* : (M) Marcador de peso molecular 100 bp ladder DNA (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA); Linhas de 1 a 12 PCR/ *TNF- α* com gradiente de temperatura: (1) 50,1°C, (2) 50,5°C, (3) 51,3°C, (4) 52,7°C, (5) 54,4°C, (6) 56,4°C, (7) 58,3°C, (8) 60,3°C, (9) 62,6°C, (10) 64,0°C, (11) 64,7°C, (12) 65,2°C. **Figura 18 (B):** PCR/ *TNF- α* com gradiente de temperatura (continuação): (M) Marcador de peso molecular 100 pb ladder DNA, (1) 65,4°C, (2) 65,9°C, (3) 66,4°C.

Com base neste experimento padronizamos as condições de amplificação descritas na tabela 15, nas seguintes condições: 25 μ L de mistura de reação contendo tampão 1X; 0,5U de

Taq Gold DNA Polimerase (Applied Biosystems), 2mM de $MgCl_2$; 200 μ M dNTPs; 200ng de cada iniciador e 100ng de DNA genômico.

Tabela 15: Condições de amplificação do gene de *TNF- α*

Gene	Seqüências dos Iniciadores (5'-3')	Ciclagem	Tamanho do produto
<i>TNF-α</i>	F:CAGGACCTCCAGGTATGGAA R:TAGCTGGTCCTCTGCTGTCC	94°C – 5' 1X 94°C – 1' } 65,9°C – 1' } 35X 72°C – 1' } 72° – 5' 1X	855pb

5.8- Amplificação das amostras após padronização e purificação dos produtos amplificados:

Após padronização das condições de amplificação, a reação da PCR foi realizada num volume equivalente a metade do utilizado para amplificação do gene *IFN- γ* de modo a permitir economia dos reagentes, o que foi possível devido ao bom rendimento obtido com este sistema. (figura 19). Para a purificação dos produtos da PCR foi utilizado o Kit ChargeSwitch da Invitrogen Life Technologies, como descrito em materiais e métodos por permitir melhor rendimento do produto final (figura 20).

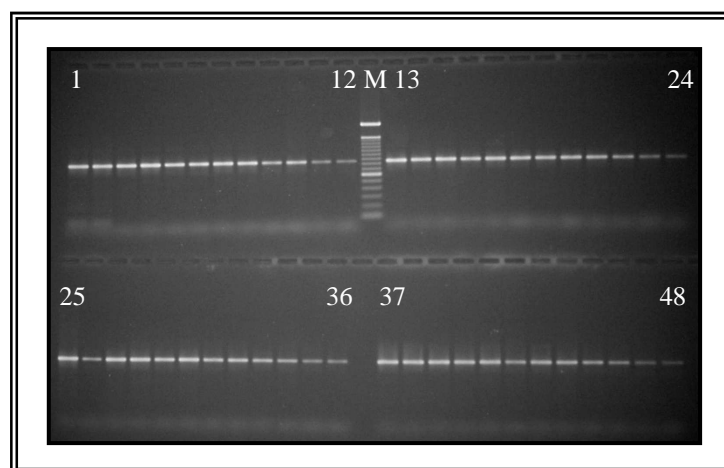


Figura 19: Amplificação da região de interesse do gene de *TNF- α* com temperatura de anelamento de 65,9°C utilizando 0,5U de *Taq* Gold DNA Polimerase. Linhas de 1 a 12, amostras de DNA dos pacientes 1P-12P; (M) Marcador 100pb ladder DNA (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA); Linhas de 13 a 24, amostras de DNA dos pacientes 13P-24P; Linhas de 25 a 36, amostras de DNA dos pacientes 25P-36P; Linhas de 37 a 48 amostras dos pacientes 37P-48P.

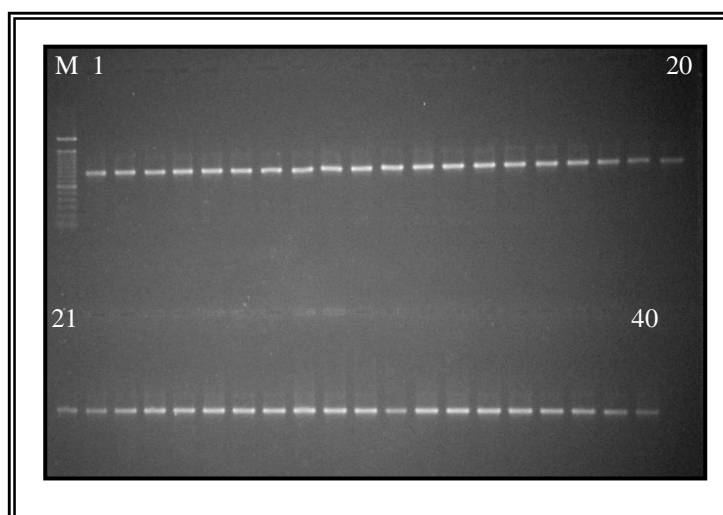


Figura 20: Purificação dos produtos amplificados utilizando o Kit ChargeSwitch da Invitrogen. (M) Marcador 100pb ladder DNA (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA); linhas de 1 a 40 produtos amplificados das amostras dos pacientes 1P-40P após purificação.

5.9- Seqüenciamento e análise de SNPs em parte da região promotora do gene que codifica para TNF- α através do programa SeqScape (Applied Biosystems) v 2.5:

Estratégia de seqüenciamento: Os produtos de PCR purificados foram submetidos a 4 reações de seqüenciamento de forma a obter a seqüência completa de todo o fragmento amplificado. A figura 21 mostra a estratégia de desenho dos iniciadores bem como a seqüência referência (AB088112) utilizada para fazer a análise e identificação de SNPs encontrados na população estudada. Toda a extensão da região de interesse no gene foi seqüenciada com êxito em todas as amostras após a realização das 4 reações independentes de seqüenciamento para cada amostra (aproveitamento de 650-750pb de cada reação com iniciadores externos e 400-500 pb com iniciadores internos).

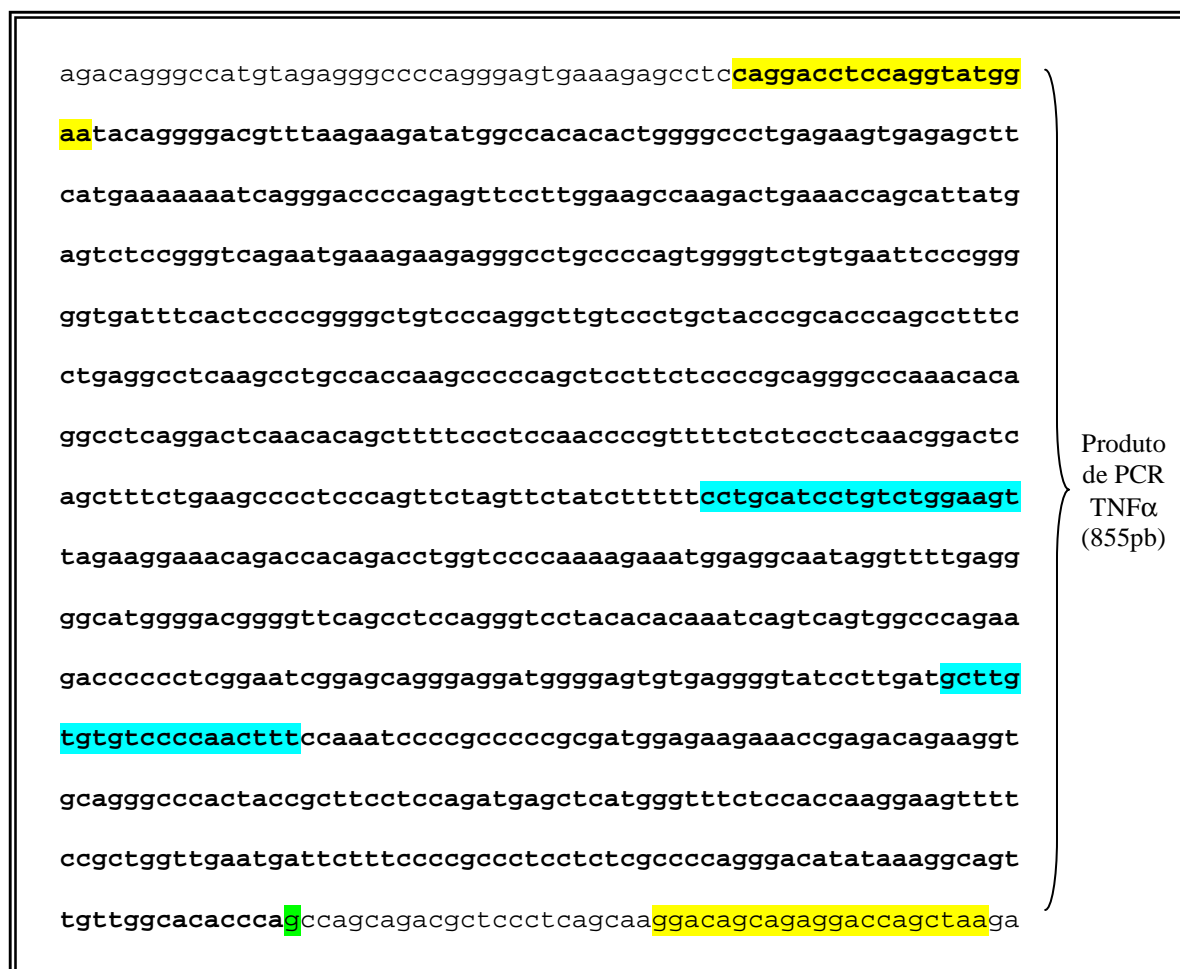


Figura 21: Estratégia de amplificação e seqüenciamento de *TNF- α* (Seqüência parcial da região promotora do gene que codifica para TNF- α retirada da seqüência referência (AB088112). O esquema mostra a região de anelamento dos iniciadores utilizados para amplificação e/ou seqüenciamento bem como a região de interesse (negrito). Em **verde** está representado o nucleotídeo referente a posição do mRNA (+1mRNA), referente ao início da transcrição. Em **amarelo**, estão os iniciadores Externos Sense e Antisense usados para amplificação e seqüenciamento e em **azul**, os iniciadores internos Sense e Antisense usados somente para seqüenciamento.

Após o alinhamento das seqüências obtidas com a seqüência referência AB088112 foi possível a identificação (figuras 22, A–C; 22.1, D-F e 22.2, G-I) e mapeamento de 7 SNPs diferentes nesta região do gene de *TNF- α* na população estudada (figura 25).

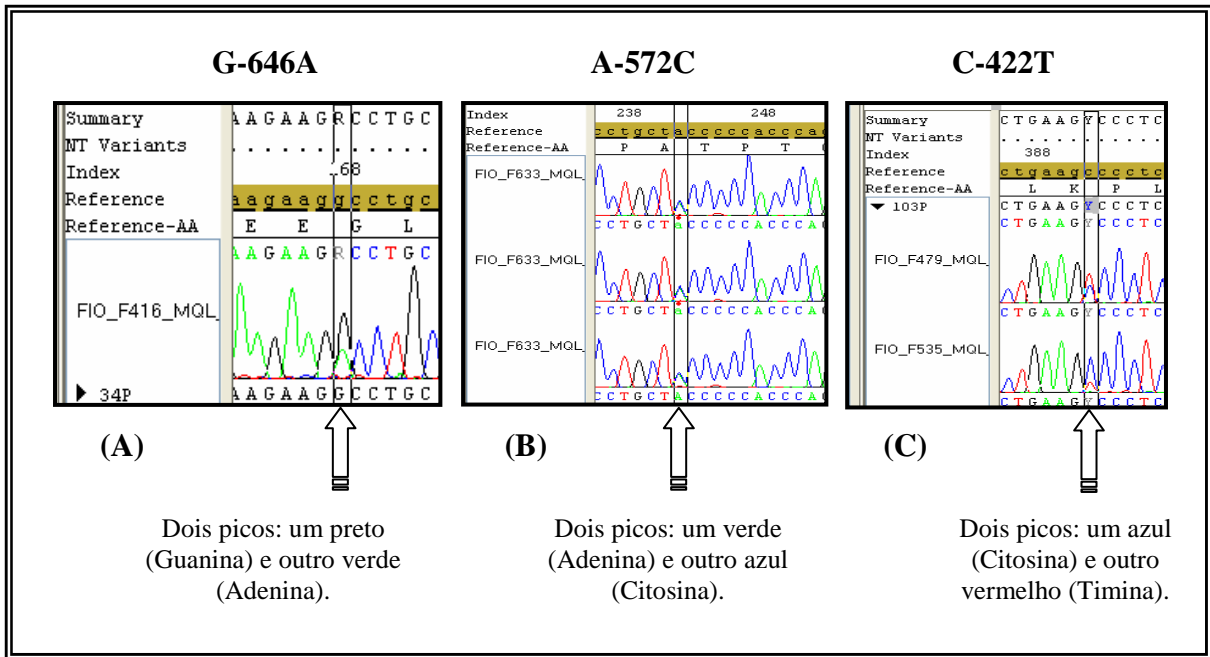


Figura 22: Identificação de SNPs e dos genótipos correspondentes no gene de TNF- α através da visualização do cromatograma apresentado no programa SeqScape. (A) G-646A; (B) A-572C e (C) C-422T (heterozigotos).

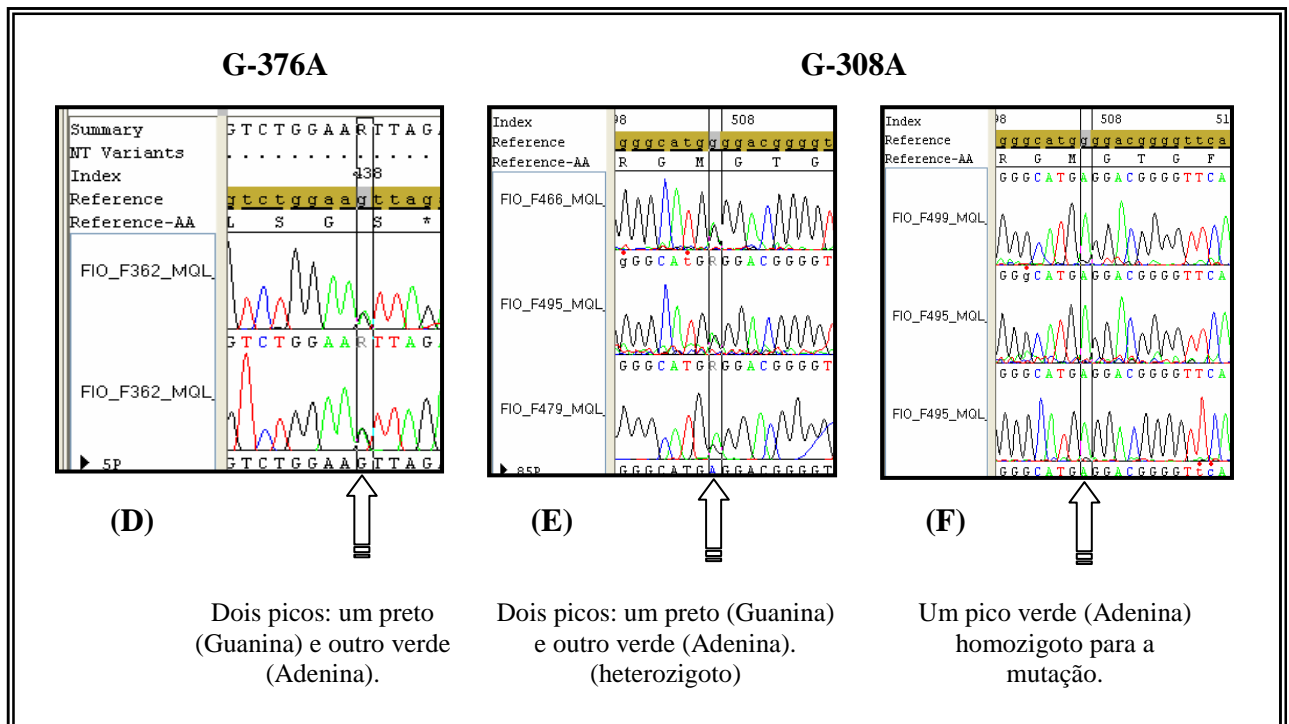


Figura 22.1: SNPs, (D) G-376A (heterozigoto); (E) G-308A (heterozigoto) e (F) G-308A (homozigoto) para a variante mutante.

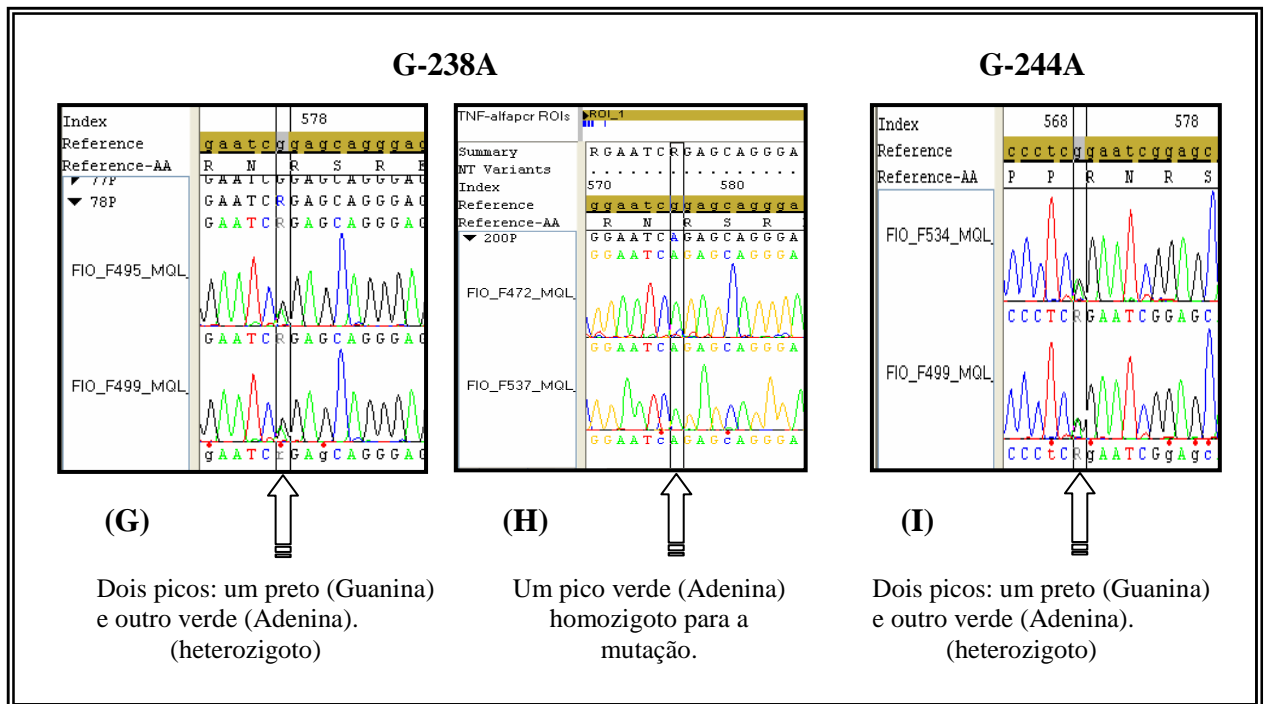


Figura 22.2: (G) A-238G heterozigoto; (H) A-238G homozigoto para a variante mutante e (I) G-244A heterozigoto.

Após a identificação dos SNPs presentes nas amostras estudadas, procedemos ao mapeamento dos mesmos na seqüência correspondente ao fragmento amplificado (parte da região promotora do gene de *TNF- α*). A figura 23 mostra a localização dos mesmos na seqüência.

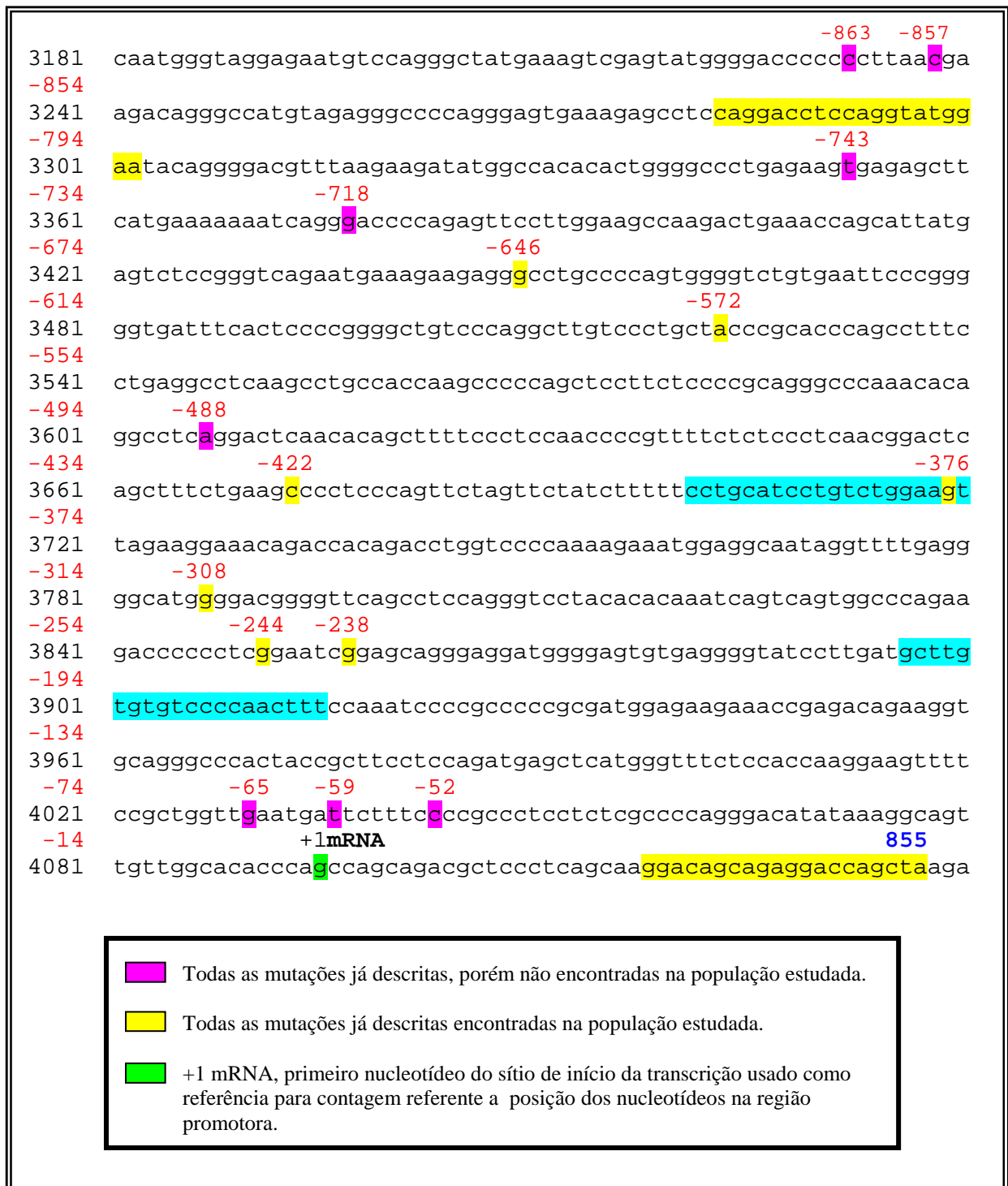


Figura 23 – Produto de PCR TNF- α (855pb): Mapeamento dos SNPs encontrados em parte da região promotora do gene *TNF- α* na população de estudo. O esquema mostra a região de anelamento dos iniciadores externos utilizados para amplificação e seqüenciamento grifados em amarelo bem como dos iniciadores internos usados somente para o seqüenciamento em azul.



Exposição de monócitos e macrófagos ao lipopolissacarídeos (LPS) resulta na ativação da via MAPK(mitogen-activated protein kinase), incluindo a ERK (extracellular signal-related kinase), JNK (c-jun NH₂-terminal kinase) e cascatas p38. A transcrição de *TNF-α* mediada por LPS é dependente em CBP (CREB binding protein) e proteínas coativadoras p300 e a atividade transcricional intrínseca de CBP e p300 é potencializada por LPS. O promotor do gene *TNF-α* pode responder a diferentes vias de sinalização pelo recrutamento de diferentes proteínas para o mesmo elemento enhancer, isto é, grupos distintos de fatores de transcrição são recrutados para um grupo fixo de sítios de ligação dependendo do estímulo (Tsai e cols., 2000).

Embora tenha sido publicado um sítio de ligação funcional na região -600 para NF-κβ, isto parece controverso (Tsai e cols., 2000; Goldfeld e cols., 1990; Trede e cols., 1995). Kinight e cols., 1999 reportaram um sítio de ligação OCT-1 na posição -376 e que polimorfismo neste sítio altera a expressão do gene em monócitos. Alguns autores reportaram que a posição -308 da região promotora deste gene pode alterar o sítio de ligação de fator de transcrição (Abraham e cols., 1999) e a presença do alelo -308A resulta no aumento da produção de TNF-α (Louis e cols., 1998; Kroeger e cols., 1997). Embora os autores acima tenham encontrado associação entre o SNP-308A e síntese de citocina, Bayley e cols., 2004 sugerem que o TNF SNP-308 e -238 não são funcionais

5.11- Análise descritiva dos polimorfismos identificados na região de interesse do gene de *TNF-α* na população estudada (n=500)

Após análise das seqüências das 500 amostras de DNA provenientes dos indivíduos arrolados no estudo através do software SeqScape, 7 SNPs, já descritos na literatura, foram identificados na parte da região promotora estudada (fragmento de 855pb) do gene que

codifica para TNF- α . A tabela 16 mostra as frequências absolutas dos diferentes SNPs antes da estratificação dos indivíduos em grupos para o estudo de associação (N=500).

5.11.1- Frequências absolutas e alélicas dos SNPs encontrados na população estudada (n=500):

Tabela 16: Descrição das frequências absolutas dos sete SNPs encontrados na população estudada.

SNP	Nº de Amostras	Amostras heterozigotas	Amostras Homozigotas	Frequência absoluta
G-646A	5	5	-	1.0%
A-572C	5	5	-	1.0%
C-422T	1	1	-	0.2%
G-376A	29	28	1	5.8%
G-308A	82	77	5	16.4%
G-244A	11	11	-	2.2%
G-238A	47	44	3	9.4%

5.11.2- Distribuição genotípica e alélica encontrada na população geral.

Após a identificação dos SNPs mostrados na tabela anterior analisamos os diferentes genótipos encontrados para cada SNP individualmente. A tabela 17 mostra a distribuição genotípica e a frequência alélica referente a variante mutante na população geral, antes da estratificação dos indivíduos em grupos para o estudo de associação (N=500). Como se pode

observar a substituição de C para T na posição -422 foi encontrada em somente um paciente e foi confirmada nas duas direções e em mais de uma reação de PCR e seqüenciamento.

Tabela 17: Distribuição dos genótipos e das frequências alélicas referentes à variante mutante de cada SNP individual encontrado na região de interesse do gene de *TNF- α* no total de indivíduos analisados.

SNP	Genótipo	Número de amostras	Frequência genotípica (%)	Frequência alélica (%)
G-646A	GG	495	0,990	-
	GA	5	0,010	-
	A	5	-	(f)0,005
A-572C	AA	495	0,990	-
	AC	5	0,010	-
	C	5	-	(f)0,005
C-422T	CC	499	0,998	-
	CT	1	0,002	-
	T	1	-	(f)0,001
G-376A	GG	471	0,942	-
	GA	28	0,056	-
	AA	1	0,002	-
	A	30	-	(f)0,030
G-308A	GG	418	0,836	-
	GA	77	0,154	-
	AA	5	0,010	-
	A	87	-	(f)0,087
G-244A	GG	489	0,978	-
	GA	11	0,022	-
	A	11	-	(f)0,011
G-238A	GG	453	0,906	-
	GA	44	0,088	-
	AA	3	0,006	-
	A	50	-	(f)0,050

5.11.3- Determinação dos diferentes haplótipos encontrados e suas frequências na população geral.

Dentre as 500 amostras de DNA seqüenciadas, somente 9 apresentaram homozigose para a variável mutante referente a 3 dos SNPs encontrados enquanto 171 foram heterozigotas para todos os SNPs. Vinte e nove apresentaram mutação para mais de um SNP, assim, foi possível a determinação de 14 diferentes haplótipos, sendo que 6 destes precisam de confirmação futura (haplótipos 9; 10; 11; 12; 13 e 14), por apresentarem heterozigose para mais de uma mutação. A tabela 18 mostra os diferentes haplótipos e a frequência com que eles aparecem na população geral.

Tabela 18: Descrição dos haplótipos identificados na região de interesse do gene *TNF- α* no total de indivíduos analisados (n=500).

Haplótipos	G-646A	A-572C	C-422T	G-376A	G-308A	G-238A	G-244A	Freq. (%)
1	G	A	C	G	G	G	G	0,710
2	G	A	C	A	G	G	G	0,006
3	G	A	C	G	A	G	G	0,146
4	G	C	C	G	G	G	G	0,006
5	G	A	C	G	G	G	A	0,020
6	G	A	C	G	G	A	G	0,040
7	A	A	C	G	G	G	G	0,008
8	G	A	T	G	G	G	G	0,002
9*	G	A	C	A	G	A	G	0,044
10*	G	A	C	A	A	A	G	0,06
11*	G	A	C	A	A	G	G	0,002
12*	G	A	C	G	A	G	A	0,002
13*	G	A	C	G	A	A	G	0,004
14*	G	C	C	G	A	G	G	0,004

*Haplótipos a serem confirmados.

5.12- Estudo de associação:

Para este tipo de análise referente ao gene de *TNF- α* utilizamos as frequências genótípicas e alélicas de todos os SNPs identificados, além das frequências haplotípicas observadas e comparamos entre os grupos que representaram os diferentes desfechos avaliados. Tanto o tamanho amostral (pacientes e controles) como os diferentes desfechos foram os mesmos avaliados para o estudo de associação com os SNPs presentes no gene de *IFN- γ* .

5.12.1- Avaliação da possível associação entre os genótipos identificados para os diferentes SNPs individuais presentes na região de interesse dentro do promotor do gene de *TNF- α* com a ocorrência de TB ativa.

A tabela 19 mostra a distribuição das frequências genótípicas de cada SNP individualmente nos grupos de pacientes com TB (TBP e TBE) e controles TST+. A avaliação da possível associação destes genótipos com suscetibilidade *per se* a ocorrência de TB ativa foi realizada através da comparação destas frequências entre estes grupos. Nenhuma diferença significativa foi observada. A avaliação da possível associação dos diferentes genótipos do gene de *TNF- α* com a ocorrência de TBP e TBE separadamente também foi realizada, porém, assim como para a TB *per se* (TBP mais TBE) nenhuma associação foi encontrada em nível de genótipo (dados não mostrados).



Tabela 19: Avaliação da associação entre os diferentes genótipos separadamente com suscetibilidade *per se* a ocorrência de TB ativa.

Loci	Genótipo	Pacientes (N=140)	Controles TST+ (N= 96)	P-valor	OR	IC
-646	GG	139	95	1,00	0,68	0,02<25,33
	GA	1	1			
-572	AA	138	95	1,00	1,38	0,10<38,92
	CA	2	1			
-422	CC	140	96	-	-	-
	CT	0	0			
-376	GG	127	93	0,11	3,17	0,81<14,46
	GA	11	3			
	AA	2	0			
-308	GG	118	83	0,78	1,19	0,54<2,67
	GA	19	11			
	AA	3	2			
-244	GG	136	92	0,71	0,68	0,14<3,31
	GA	4	4			
-238	GG	123	88	0,47	1,50	0,58<3,97
	GA	15	8			
	AA	2	0			

Para avaliação da associação dos SNPs encontrados em parte da região promotora do gene *TNF- α* com gravidade da doença, analisamos as frequências genotípicas de todos os SNPs identificados e comparamos entre os grupos TB pulmonar e TB extra-pulmonar. A tabela 20 mostra esta avaliação e podemos observar que o SNP-572A>C foi o único que apresentou diferença significativa com RR= 8,12; IC= 5,20<12,67 e P-valor = 0,0175, com indicação de risco para gravidade da doença. Este polimorfismo também foi avaliado quanto à frequência alélica e os diferentes grupos que compunham os desfechos em estudo e novamente observamos uma associação de risco com gravidade (RR= 7,72; IC= 5,69<10,47 e p-valor = 0,0179) (dados não mostrados).



Tabela 20: Avaliação da associação entre os diferentes genótipos separadamente com gravidade da TB pulmonar x extrapulmonar.

Loci	Genótipo	TBP N=121	TBE N=19	P-valor	RR	IC
-646	GG	120	19	1,00	0,00	0,00<115,2
	GA	1	0			
-572	AA	121	17	0,0175	8,12	5,20<12,67
	AC	0	2			
-422	CC	121	19	-	-	-
	CT	0	0			
-376	GG	111	17	0,506	1,25	0,33<4,79
	GA	10	1			
	AA	0	1			
-308	GG	101	17	0,392	0,63	0,16<2,54
	GA	18	1			
	AA	2	1			
-244	GG	117	19	0,554	#	#
	GA	4	0			
-238	GG	106	17	0,585	0,85	0,22<3,37
	GA	14	1			
	AA	1	1			

^{RR}Risco Relativo

A fim de avaliarmos a associação entre os diferentes genótipos com a capacidade de infecção, procedemos a comparação entre as frequências genotípicas presentes no grupo de controles TST+ com as encontradas no grupo TST- e nenhuma diferença significativa foi encontrada (dados não mostrados).

Assim como para *IFN- γ* , procedemos também uma análise para verificarmos uma possível associação entre as diferentes variantes alélicas mutantes e os desfechos em estudo. Seleccionamos os SNPs mais frequentes na região de interesse do gene de *TNF- α* : -376G>A, -308G>A, -244G>A e -238G>A e comparamos as respectivas frequências alélicas correspondentes a variante mutada entre os diferentes grupos que compunham os desfechos em estudo (tabelas 21A; 21B; 21C e 21D). O SNP *TNF- α* -376G>A apresentou diferença significativa para o desfecho suscetibilidade *per se* ($P=0,035$; OR=3,57; IC= 0,95<15,72). Na



avaliação do desfecho gravidade esta diferença foi mais significativa (P -valor = 0,038 e RR= 2,68), todos os outros desfechos avaliados não apresentaram diferenças significativas

Tabela 21A: Distribuição da frequência alélica referente a variante mutante *TNF- α* -376A e análise de associação com os diferentes desfechos estudados.

SNP <i>TNF-α</i> -376A					
Diferentes desfechos	Grupo				
Ocorrência de TB Ativa	Pacientes (fa) 0,054	TST+ 0,016	P -valor 0,035	OR 3,57	IC 0,95<15,72
Ocorrência de TBP	TBP (fa) 0,041	TST+ 0,016	0,201	2,72	0,68<12,62
Gravidade da doença	TBP (fa) 0,041	TBE 0,052	0,038	2,68*	1,22<5,86
Infecção Latente	TST+ (fa) 0,016	TST- 0,017	0,90	0,623	0,12<7,86

*Risco relativo

Tabela 21B: Distribuição da frequência alélica referente a variante mutante *TNF- α* -308A e análise de associação com os diferentes desfechos estudados.

SNP <i>TNF-α</i> -308A					
Diferentes desfechos	Grupo				
Ocorrência de TB Ativa	Pacientes (fa)0,089	TST+ 0,078	P -valor 0,795	OR 1,16	IC 0,57<2,38
Ocorrência de TBP	TBP (fa)0,091	TST+ 0,078	0,760	1,18	0,57<2,47
Gravidade da doença	TBP (fa)0,091	TBE 0,079	0,550	0,87*	0,29<2,64
Infecção Latente	TST+ (fa)0,078	TST- 0,060	0,720	1,32	0,49<3,70

*Risco relativo

**Tabela 21C:** Distribuição da frequência alélica referente a variante mutante *TNF- α* -244A e análise de associação com os diferentes desfechos estudados.

Diferentes desfechos	SNP <i>TNF-α</i> -244A				
	Grupo		<i>P</i> -valor	OR	IC
Ocorrência de TB Ativa	Pacientes (fa)0,014	TST+ 0,021			
Ocorrência de TBP	TBP (fa)0,017	TST+ 0,021	0,493	0,77	0,16<3,73
Gravidade da doença	TBP (fa)0,017	TBE 0,000	0,556	#	#
Infecção Latente	TST+ (fa)0,021	TST- 0,017	0,593	1,21	0,19<9,69

*Risco relativo

Tabela 21D: Distribuição da frequência alélica referente a variante mutante *TNF- α* -238A e análise de associação com os diferentes desfechos estudados.

Diferentes desfechos	SNP <i>TNF-α</i> -238				
	Grupo		<i>P</i> -valor	OR	IC
Ocorrência de TB Ativa	Pacientes (fa)0,068	TST+ 0,042			
Ocorrência de TBP	TBP (fa)0,066	TST+ 0,042	0,370	1,63	0,64<4,25
Gravidade da doença	TBP (fa)0,066	TBE 0,079	0,491	1,18*	0,40<3,48
Infecção Latente	TST+ (fa)0,042	TST- 0,069	0,434	0,59	0,19<1,78

*Risco relativo

A tabela 22 mostra a distribuição dos 14 haplótipos possíveis nos diferentes grupos utilizados para o estudo de associação. Nenhum haplótipo apresentou diferença significativa

de frequência entre os grupos estudados (dados não mostrados) e a distribuição dos mesmos foi bastante homogênea.

Tabela 22: Frequência haplotípica referente aos SNPs encontrados na região estudada do gene de *TNF- α* nos diferentes grupos estudados.

Haplótipo	TB Geral N= 140	TBP N=121	TBE N=19	Controles PPD+ N=96	Controles PPD- N=58
1	95 ^(67,9%)	82 ^(67,8%)	0	70 ^(72,9%)	40 ^(69%)
2	2 ^(1,4%)	1 ^(0,8%)	0	0	0
3	19 ^(13,6%)	17 ^(14,1%)	2 ^(10,5%)	11 ^(11,5%)	7 ^(12,1%)
4	1 ^(0,7%)	0	1 ^(5,26)	0	1 ^(1,72)
5	3 ^(2,1%)	3 ^(2,5%)	0	4 ^(4,2%)	2 ^(3,4%)
6	7 ^(5 %)	6 ^(5%)	1 ^(5, 3%)	5 ^(5,2%)	5 ^(8,6%)
7	1 ^(0,7%)	1 ^(0,8%)	0	1 ^(1,1%)	1 ^(1,7%)
9	9 ^(6%)	8 ^(6,6%)	1 ^(5,3%)	3 ^(3,1%)	2 ^(3,4%)
11	1 ^(0,7%)	1 ^(0,8%)	0	1 ^(1,1%)	0
12	1 ^(0,7%)	1 ^(0,8%)	0	0	0
13	1 ^(0,7%)	1 ^(0,8%)	0	0	0
14	1 ^(0,71)	0	1 ^(5,26)	1 ^(1,04)	0

Após a genotipagem de todas as amostras e avaliação de associação dos SNPs encontrados na região promotora do gene que codifica para *TNF- α* com os diferentes desfechos propostos, os polimorfismos encontrados com maior frequência absoluta (-376G>A, -308G>A, -244G>A e -238G>A) foram testados numa análise estratificada contra as variáveis demográficas gênero e idade para verificar a influência das mesmas. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para gênero ou idade (dados não mostrados).

5.13- Padronização das condições para amplificação por PCR da região de interesse do gene que codifica para SLC11A1 (NRAMP1)

Após o desenho dos oligonucleotídeos a serem utilizados para a amplificação e sequenciamento da região de interesse no gene que codifica para o NRAMP1, realizamos um experimento com um gradiente de temperatura com o objetivo de determinarmos as condições de estringência da reação de amplificação, onde foram testadas também as diferentes concentrações de Mg^{2+} , DNA alvo e glicerol. As variações de temperatura foram programadas no termociclador PX2 Thermal Cycle (Thermo Electron Corporation), que permite um gradiente de temperatura entre 50°C e 70°C com uma variação a ser estabelecida pela máquina. A figura 25 mostra o gradiente da temperatura de anelamento. Com base neste experimento, a temperatura de 65,9°C foi escolhida e as condições ideais para amplificação estão descritas na tabela 23.

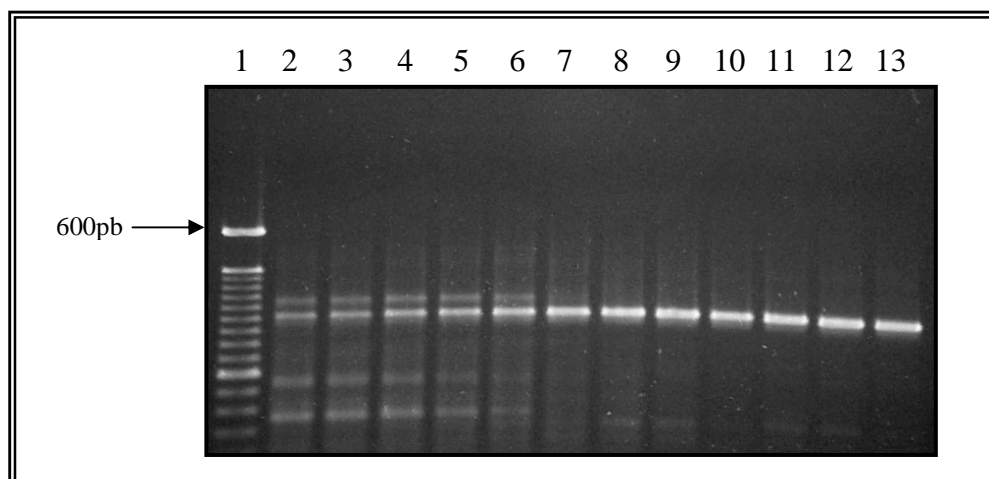


Figura 25: PCR de gradiente de temperatura para padronização do sistema para amplificação da região promotora de *NRAMP1*: linha 1: marcador de peso molecular 100 bp ladder DNA; linhas 2 a 13) gradiente de temperatura: (2) 51,1°C, (3) 51,5°C, (4) 52,3°C, (5) 54,7°C, (6) 56,4°C, (7) 58,4°C, (8) 61,5°C, (9) 62,3°C, (10) 64,0°C (11) 64,7°C, (12) 65,2°C e (13) 65,9°C.

Tabela 23: Condições ideais para a amplificação do gene *NRAMP1*

Gene	Seqüências dos Iniciadores (5'-3')	Ciclagem	Tamanho do produto
<i>NRAMP1</i>	F: CACCACTGCACTTCACACCT R: TCCACCCAGTGAGATTGAGTC	94°C – 5' 1X 94°C – 1' } 65,9°C – 1' } 35X 72°C – 1' } 72° – 5' 1X	1019pb

5.14 - Amplificação das amostras após padronização e purificação dos produtos

amplificados:

Com base no resultado do experimento acima, o sistema foi padronizado nas seguintes condições: temperatura de anelamento de 65,9°C utilizando 200ng de cada iniciador, 200µM de dNTPS, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 2mM de Mg²⁺, 10% glicerol e 100ng de DNA alvo. A figura 26 mostra a amplificação de 10 amostras de pacientes nas condições acima e a figura 27, a purificação dos produtos da PCR com o método “*in house*” com precipitação por acetato de amônia para concentração final de 2,5M, utilizado para todas as purificações dos produtos amplificados.

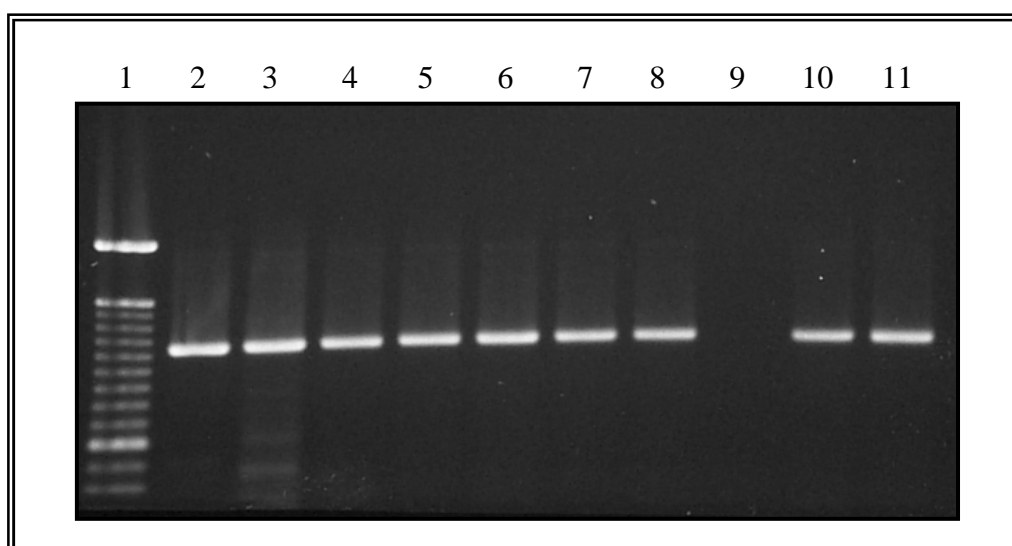


Figura 26: Amplificação da região de interesse do gene que codifica para TNF- α com temperatura de anelamento de 65,9°C. Linha 1: marcador de peso molecular 100pb ladder DNA; linhas: 2 a 8 amostras provenientes dos pacientes 1P-7P, linha 9 amostra referente ao paciente 8P não amplificada e linhas 10 e 11 amostra 9P e 10P.

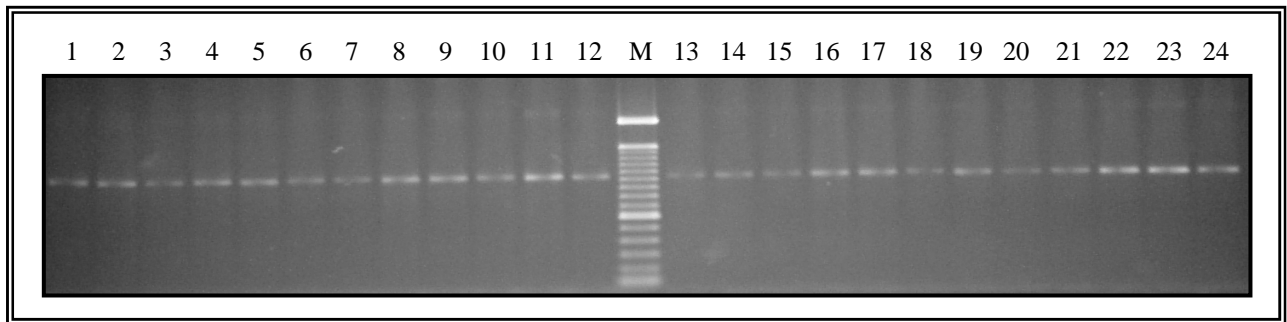


Figura 27: linhas 1 a 12, 13 a 24 purificação dos produtos amplificados por precipitação com acetato de amônia 2,5M (concentração final), (M) 100pb marcador de peso molecular Ladder DNA.

5.15 - Seqüenciamento e análise de SNPs em parte da região promotora do gene que codifica para NRAMP1.

Como para *TNF- α* e *IFN- γ* , os produtos da PCR de NRAMP1 purificados foram submetidos a quatro reações de seqüenciamento de forma a obter uma seqüência integral de boa qualidade da região de interesse no promotor. A figura 28 mostra a seqüência referência (AF229163) utilizada para a estratégia de desenho dos iniciadores bem como para a análise e identificação de SNPs. Como podemos observar, existem 3 seqüências repetitivas (sublinhadas em negrito) muito grandes, abrangendo partes importantes da região de interesse: A primeira começa exatamente no primeiro nucleotídeo do fragmento amplificado - 1 do promotor (repetição **tg**), outra no meio (**tgtgtgtgtgtacg/tg**) e outra no final, constituída de 31 adeninas (**aaaaaaaaaac/aaaaaaaaacg/aaaaaacc/aaaaaaaaaaaaa**). Isto tornou o seqüenciamento desta região muito difícil porque a reação com o iniciador externo antisense perde inicialmente de 80 a 100pb de leitura e quando a seqüência começa ficar boa encontra uma região repetitiva que é o início do promotor e daí em diante não prossegue (dados não mostrados). Os iniciadores internos sense e antisense também anelam dentro de uma região repetitiva o que deve dificultar o anelamento e com a perda inicial normal no início da leitura, o aproveitamento é muito pouco uma vez que logo atinge a repetição e não completa a reação. O mesmo acontece com o iniciador externo sense por estar muito próximo a uma seqüência repetitiva de adeninas não consegue seguir o seqüenciamento e desta reação não conseguimos aproveitar nada. Outra estratégia, mostrada na figura 29, consistindo de desenho de quatro

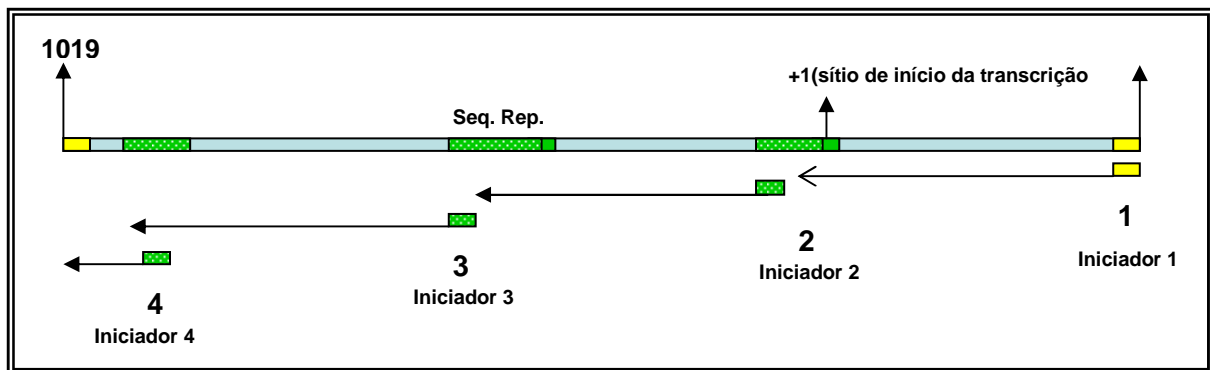


Figura 29: Estratégia para o seqüenciamento da região de interesse no promotor do gene que codifica para NRAMP1



6. Discussão

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica, que resulta das respostas de fatores imunológicos, genéticos e ambientais ao *Mycobacterium tuberculosis*. Dentre os principais fatores de risco para o desenvolvimento desta enfermidade encontram-se características exógenas como o alcoolismo, a desnutrição, a infecção pelo HIV e algumas condições de imunossupressão. Adicionalmente, vários fatores genéticos também têm sido associados com diferentes desfechos como: suscetibilidade *per se* do hospedeiro a ocorrência de TB ativa, gravidade da doença e/ou proteção ao desenvolvimento da mesma (Amim, 2007; Henao, 2006; Correa, 2005; Tso, 2005; Awomyi, 2002; Hill, 1996).

O estabelecimento de uma resposta imune eficiente envolve várias moléculas, dentre as quais, as citocinas e seus receptores que desempenham um papel extremamente importante. Deste modo, qualquer alteração genética levando a modificação na regulação da expressão gênica pode refletir nesta resposta. Sabe-se que a variação interindividual na produção destas moléculas está diretamente relacionada ao “background” genético. Dados da literatura têm demonstrado claramente que a variabilidade genética dos genes que codificam para estas moléculas pode afetar a regulação da expressão gênica positiva ou negativamente influenciando na produção final da molécula em questão. Na última década, vários Polimorfismos de Base Única (SNPs) na região regulatória de diferentes genes de citocinas foram descritos e associados com suscetibilidade, gravidade ou proteção para um número crescente de doenças de etiologias diversas incluindo a tuberculose.

Dentre as variações genéticas possivelmente associadas com um aumento do risco de desenvolver TB, podemos citar, polimorfismos em genes que codificam para certas citocinas como IL-8 e IFN γ (Maderuelo e cols., 2003, Amim e cols, 2007), e alguns receptores de citocinas, tais como, IL-10R (Flynn e cols., 1995), IFN- γ R1 e R2 (Newport e cols, 1996; Jouanguy e cols, 1996; Fraser e cols., 2003) e IL-12R β 1 (Altare e cols., 1998; Fraser e cols.,



2003). Adicionalmente, polimorfismos presentes em genes que codificam para outras moléculas envolvidas ou não com a resposta imune, também foram identificados, tais como receptor de vitamina D (Wilkinson e cols., 2000), Proteína de Resistência Natural 1 Associada ao Macrófago - NRAMP 1 (Bellamy e cols., 1998; Abe e cols., 2003) , e HLA classe II DR2 (Brahmajothi e cols., 1991; Bothamley e cols., 1989). A presença ou não de variantes alélicas nos respectivos genes que codificam para estas moléculas influenciam em diferentes graus o risco relativo em diferentes grupos étnicos e paralelamente, podem também desempenhar um papel modificador em relação à gravidade da apresentação clínica.

Vários estudos têm demonstrado, que as manifestações clínicas dos pacientes com TB doença, podem estar associadas ao maior nível de produção de IFN γ pelas PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*), estimuladas pelo *M. tuberculosis*, em relação aos indivíduos com TB infecção (contatos TST+) (Sanchez e cols., 1994; Zhang e cols., 1995). O interferon- γ é essencial na resposta imune a infecções, é produzido principalmente por células NK e linfócitos T ativados e age como um regulador de apresentação de antígeno e proliferação da subpopulação de linfócitos na fase subsequente antígeno específica da resposta imune (Casanova, JL e cols., 2002; Lio, D e cols., 2002).

Assim como IFN- γ , TNF- α também é uma potente citocina pró-inflamatória e desempenha uma importante função na proteção de patógenos intracelulares (Rico, MA e cols., 2001; Guidotti, LG e cols., 1994).

A presença de polimorfismos nos genes de *TNF- α* e *IFN- γ* tem sido descritas desde a década passada (Arora, 2005; Chevillard, 2002; Bream, 2000; Giedraitis, 1999; Mira, 1999; D'Alfonso, 1996) inclusive com estudos de associação com tuberculose. Contudo, sabe-se também que a frequência dos polimorfismos já descritos varia muito de acordo com a etnia da população estudada. A maioria dos trabalhos é realizada em populações etnicamente homogêneas e, portanto, muitas das associações descritas para uma determinada variante



alélica pode não representar fator genético de risco em outras populações. No Brasil, país com uma população etnicamente mista, poucos são os dados referentes à frequência de polimorfismos de base única nestes genes e os poucos estudos existentes, prendem-se a um ou dois SNPs somente. Tendo em vista a importância da região promotora no que diz respeito à regulação da expressão gênica, resolvemos neste estudo proceder ao mapeamento de parte da região promotora dos genes de *TNF- α* e *IFN- γ* (800pb acima do sítio de iniciação de transcrição) através de seqüenciamento em indivíduos portadores de TB e controles sadios. Posteriormente, com base nas frequências encontradas dos diferentes SNPs individualmente para cada gene, procedemos um estudo de associação dos mesmos com diferentes desfechos da tuberculose. Trata-se do primeiro estudo realizado na população brasileira mostrando o mapeamento desta região do promotor através da utilização de seqüenciamento (padrão ouro), capaz não somente de identificar SNPs já existentes como também polimorfismos ainda não descritos na literatura.

6.1- Polimorfismos na região promotora de *IFN- γ* e sua associação com TB.

A parte mais importante do promotor do gene *IFN- γ* foi identificada através de estudos de análise de deleção (Chrivia e cols., 1990; Penix e cols., 1993). Ele envolve uma região altamente conservada de -117 a -47 e contém duas sub-regiões que podem formar complexo com proteínas. A sub-região proximal (-90 a -65) mostra forte homologia ao promotor IL-2 (Penix e cols., 1996). A ativação do fator-2 de transcrição (ATF-2), o c-Jun heterodímero e o c-Jun homodímero estão envolvidos na ativação da transcrição de *IFN- γ* por ligar-se a este elemento homólogo (NF-IL2). Contrariamente, o elemento de resposta AMP-cíclico que liga proteína (CREB- response element binding protein) inibe esta transcrição por intermédio da ligação a NF-IL2. A subregião distal (-113 a -97) liga o fator GATA-3 que desempenha uma função crucial na diferenciação Th1/Th2 (Chevillard, C. e cols., 2002; Young, HÁ e cols.,



1994). Por isto, o grande interesse de investigarmos a existência de sítios polimórficos na região promotora do gene *IFN- γ* , particularmente considerando a função crucial desta citocina na iniciação da resposta imune.

Em nossas análises após o sequenciamento dos produtos da PCR para parte do promotor do gene de *IFN- γ* detectamos sete sítios polimórficos, dos quais, quatro ainda não estão descritos na literatura nem em banco de SNPs. Uma transição de C para T ainda não descrita foi identificada na posição -787, a partir do sítio de transcrição, em cinco indivíduos, todos heterozigotos. Outra, também de C para T já descrita no banco de SNPs, na posição -785 também foi encontrada em cinco indivíduos, todos heterozigotos, porém, nenhuma referência a este SNP foi encontrada na literatura. Outros três SNPs ainda não descritos, transição de C para G na posição -599, C para T na posição -517 e A para G na posição -255 foram encontrados em nossa análise. Finalmente, mais dois SNPs transição de G para T na posição -200 e A para G na posição -172, já descritos e bem caracterizados Chevillard e cols., 2002 foram encontrados na nossa população.

Um dos maiores problemas encontrados para realização do mepeamento dos SNPs através do seqüenciamento em relação aos dados da literatura e aos diferentes bancos de SNPs disponíveis *on line* é a falta de uma padronização em relação ao nucleotídeo referente ao sítio de iniciação da transcrição +1. Muitos autores denominam os SNPs identificados em relação ao sítio de tradução ou usam seqüências referências contendo erros de sequenciamento. Com isto, a denominação de um mesmo SNP pode diferir dependendo destes erros (ex: SNP -200G>T que foi primeiramente descrito por Chevillard e cols., 2002 como -183, posteriormente denominada -179 por Bream e cols., 2002 e finalmente corrigida neste estudo para a denominação correta de -200). A denominação atual, feita através deste estudo baseia-se na correção da seqüência referência utilizada nos estudos anteriores e que já se encontra disponível *on line*. Estes tipos de erros dificultaram sobremaneira a análise inicial



das seqüências obtidas em nosso estudo no que diz respeito à identificação de novos SNPs, pois tivemos que realizar uma busca dos SNPs identificados pela seqüência depositada no banco de SNPs e posteriormente procedermos um alinhamento com a seqüências obtidas em nosso estudo. Adicionalmente, problemas ainda maiores podem ocorrer como, por exemplo, associações divergentes de um único SNP, cuja denominação foi equivocada, em uma mesma população (Tuner e cols., 1997;).

A freqüência de cada polimorfismo foi determinada na população de estudo, como observamos na tabela 4. Nesta população, a freqüência alélica da variável mutante para todos os SNPs foi menor que 1% com exceção da variante -599G (0.014) e -200T (0.014). Conforme descrito por Chevillard e cols., 2002, em estudo realizado na população Sudanesa, embora próximos, os SNPs -183 e -155 (em nosso estudo -200 e -172) não estavam em desequilíbrio de ligação, pois nenhum indivíduo carregou ambas as mutações. Podemos destacar também que a freqüência encontrada para a variante -200T em nosso estudo (0,014), ficou entre as freqüências obtidas por Bream, JH, e cols., 2002 de (0,040) em Americanos Africanos e menor que (0,001) em Americanos Europeus, praticamente não polimórfico.

Funcionalmente, sabe-se que os polimorfismos (-200 e -172) podem afetar a transcrição do gene *IFN- γ* . A região de -213 a -200 induz a transcrição através do fator-1 (AP-1) (Barbulescu e cols., 1997). Um polimorfismo neste sítio (posição -200, por exemplo) deve alterar a ligação de AP-1 e a atividade do promotor nas células T. A seqüência contendo a transição -172 não tem forte homologia com algum suposto sítio de ligação para fator de transcrição conhecido. Contudo, ele está próximo ao sítio nuclear de fator de ativação de células T (sítio NFAT) (-186TAAAGGAAA-178) e deve afetar a estabilidade desta região (Bream, JH, 2002).

A variante *IFN- γ* -200T é altamente induzível por *TNF- α* e liga constitutivamente a extratos nucleares obtidos de células T, enquanto o alelo -200G não responde ao *TNF- α*



(Ping, AN e cols., 2003; Bream, JH e cols., 2002). A indução da atividade transcricional, proporcionando um aumento na produção de IFN- γ induzido por TNF- α quando o alelo T está presente, aumenta a proteção à tuberculose. Estes dados corroboram com o resultado obtido na nossa análise de suscetibilidade *per se* em que encontramos proteção conferida pela variante -200T ($P=0,033$; OR 0,18; IC 95%, 0,03-1,00) a ocorrência de TB ativa.

Segundo Bream, JH e cols., 2002, a região promotora do gene *IFN- γ* é altamente conservada, sugerindo assim que as variações na produção desta citocina são provavelmente devido a diferenciação na ligação a fatores regulatórios, em vez de polimorfismos no gene, o que é compatível com nossos resultados. Não encontramos muitas variações em nossa população e os poucos SNPs identificados se apresentaram numa frequência baixa. Os polimorfismos encontrados com uma frequência mais alta foram o -200G>T e -599C>G estando este último, localizado entre dois supostos sítios de ligação a fatores de transcrição. Como se trata de um SNP ainda não descrito na literatura, estudos funcionais fazem-se necessários para comprovação de sua importância funcional. O SNP -200 é de grande interesse nos estudos de associação pela importância discutida acima, contudo, este polimorfismo não foi encontrado nas populações predominantemente caucasiana, Indiana e Chinesa, o que sugere que diferentes forças seletivas podem estar operando em diferentes grupos étnicos ou raciais. Estes dados corroboram com a evidência de que *IFN- γ* seja muito importante na resposta imune e que mutações que interfiram na sua produção possam influenciar no desfecho da tuberculose ativa como mostrado recentemente por Amim e cols., 2007; Tso e cols., 2005 e Rossouw e cols., 2003 e que por isso, uma força seletiva faz com que esse gene seja tão conservado.



6.2- Polimorfismos na região promotora de *TNF- α* e sua associação com TB.

O *TNF- α* é uma citocina pró-inflamatória e imunoregulatória que desempenha uma função chave na iniciação, regulação e perpetuação da defesa do hospedeiro contra infecção, mas é fatal em excesso. Como esta molécula desempenha um papel importante contra uma variedade de patógenos envolvendo diferentes padrões de riscos e benefícios, espera-se que isto favoreça uma maior diversidade de elementos genéticos que controlam sua produção.

Os níveis de *TNF- α* circulantes são regulados em diferentes estágios: transcricional e pós-transcricional, envolvendo a estabilidade do mRNA, a clivagem da forma de membrana para liberar a forma solúvel da proteína e expressão de receptores. Vários polimorfismos dentro da região promotora de *TNF- α* têm sido associados com níveis circulantes alterados desta citocina.

Em humanos, o gene de *TNF- α* está localizado dentro do complexo envolvendo os Antígenos Leucocitários Humanos (HLA), uma região altamente polimórfica no cromossomo 6p21.3. Muitos dos polimorfismos encontrados no gene de *TNF- α* estão em desequilíbrio de ligação com genes do HLA e entre si. Por causa das diferenças na distribuição dos alelos de HLA poderíamos esperar variações em associações entre polimorfismos de *TNF* e várias condições em áreas geográficas diferentes.

A análise do genoma humano mostrou que o nível de variações do genoma é aproximadamente 1 SNP/1,71Kb (Cargill, M e cols., 1999). Contudo, o promotor do gene de *TNF- α* possui uma alta densidade de SNPs (aproximadamente 10 SNPs por Kb) em relação a outras porções do genoma e ao cromossomo 6. Apesar deste nível de variação, as regiões envolvidas na regulação do gene são altamente conservadas em humanos (Favo e cols., 2000; Tsai e cols., 2000 e Tsytsykova e cols., 2002). Uma das possíveis explicações para o alto



número de SNPs no promotor desse gene é que provavelmente eles tenham se acumulado nas regiões do promotor não essenciais para regulação do gene.

Em nosso trabalho, realizamos o mapeamento dos primeiros 800pb da região promotora, através de seqüenciamento direto do produto amplificado por PCR, em 500 amostras de DNA provenientes de indivíduos residentes na área metropolitana do Rio de Janeiro e encontramos sete polimorfismos já descritos na literatura, a maioria bem caracterizado. A frequência alélica de cada polimorfismo foi determinada na população de estudo e como podemos observar na tabela 17, nenhum polimorfismo novo foi identificado. O mapeamento mostrou também que dos sete SNPs identificados somente as variantes -376A, -308A, -244A e -238A apresentaram frequências maiores que 1% (0.030; 0.087; 0.011 e 0.050). A influência desses SNPs na ligação de fatores de transcrição ainda não foi completamente explorada, a maioria dos estudos se concentram na associação de um ou dois SNPs com diferentes doenças. Os SNPs -376; -308 e -238 têm sido os mais estudados. Embora os resultados dos estudos funcionais realizados até então para os SNPs -308 e -238 sejam controversos. Acredita-se que a variante -308A esteja associada a um aumento na taxa de transcrição levando a um aumento na produção de TNF- α (Wilson, AG e cols., 1997) e a variante -238A com uma diminuição da taxa de transcrição. Com relação ao SNP -376G>A diferentes estudos mostram que este polimorfismo está localizado em uma região de múltiplas interações entre proteínas e DNA e que o alelo menos comum, atua no recrutamento de proteínas OCT1 para esta região. Segundo Kinight e colaboradores (1999) existe uma importante interação entre a variante -376A e as proteínas OCT-1, esta variante liga as estas proteínas enquanto a variante -376G não o faz. Os autores reportam ainda, através de ensaios com sistema gene repórter, que esta variante mutante aumenta moderadamente os níveis basais de TNF- α e associam a mesma a um risco relativo de 4 para o desenvolvimento de malária cerebral (Kinight e cols., 1999). O fato é que o desequilíbrio de ligação é forte nesta área e é difícil estudar a função de um SNP



isolado. Em algumas populações caucasianas o alelo -376A está em associação alélica com o -308G e -238A (Knight e cols., 1999; Bayley e cols., 2001), contudo isto não foi observado em Africanos da Gâmbia. A associação alélica entre variantes -238G, -308A e -376G segundo Hajeer e colaboradores (2001) está relacionada com alta produção de TNF- α (Hajeer e cols., 2001).

Um número elevado de estudos tem investigado a associação entre polimorfismos na região promotora do gene de *TNF- α* e tuberculose. Os resultados variam de acordo com as diferentes populações estudadas, alguns não encontraram associação (Oh, JH e cols., 2007; Ö, Ates e col., 2007; Vejbaesya, S. e cols., 2007; Henao, MI e cols., 2006; Amirzargar, AA e cols., 2004 e Delgado, JC e cols., 2001) e outros sim (Correa e cols., 2005; Oliveira e cols., 2004; Hill e cols., 1996). Em nossa análise de associação o único SNP associado com TB foi o -376G>A. Neste caso, observamos uma associação do alelo menos freqüente -376A com o desfecho de suscetibilidade *per se* a ocorrência de TB ativa ($P=0,035$, OR3,57, IC0,95<15,72) e um risco relativo aumentado deste alelo para a ocorrência de TB extrapulmonar em nossa população de estudo ($P=0,038$, OR2,68, IC1,22<5,86). A associação desta variante alélica com suscetibilidade a ocorrência de TB e a um risco relativo aumentado para o desenvolvimento das formas extrapulmonares da TB é intrigante. Tendo em vista a influência deste alelo com aumento da expressão de TNF- α , era de se esperar uma associação do mesmo com proteção e não com associação. Acreditamos que uma das possíveis explicações para estas observações pode ser a redução do número amostral dos diferentes grupos utilizados. Podemos observar que os Intervalos de Confiança (IC) para ambos os desfechos são muito grandes, o que poderia ser um reflexo do tamanho amostral. Descartamos a possibilidade de erros de genotipagem porque a técnica utilizada foi o sequenciamento e todos os mutantes encontrados para todos os SNPs avaliados foram confirmados mais duas vezes por novo PCR e novo sequenciamento. Uma outra possibilidade seria devido ao forte desequilíbrio de



ligação observado nesta região do promotor do gene de *TNF- α* . É possível que outra variante alélica (ex.: -238A), com papel funcional contrário ao da variante -376A esteja anulando a mesma em nível de controle da expressão gênica.

Um aspecto importante deste estudo prende-se as características étnicas da população estudada. Trabalhamos com uma população etnicamente mista e isto contribui muito na literatura sobre o assunto, pois quase todos os estudos deste tipo são realizados com populações homogêneas etnicamente. Um estudo que comprova a importância da diferença étnica no estudo de associação de SNPs no promotor de *TNF- α* com doenças foi conduzido por Baena e cols., 2002, onde usaram SNPs da região promotora desse gene para identificar marcadores de ancestralidade, por entender que essa região estava muito bem caracterizada em estudos prévios com primatas e humanos. Vários estudos (Ugliaro e cols., 1998; Higuchi e cols., 1998; Zimmerman e cols., 1996; D'Alfonso e cols., 1994; Wilson, AG e cols., 1993) Já demonstraram que alguns polimorfismos como -238; -244 e -308 estão em associação com genes do HLA e além disso, os SNPs -308 (Wilson e cols., 1993); -863 e -857 (Ugliaro e cols., 1998), são marcadores de Caucasianos e estão incluídos dentro de haplótipos de HLA estendido (que exibem intervalo genômico de fixação entre HLA-Dr e HLA-B, que inclui *TNF- α* e regiões de complemento (complótipos). Para analisar a região promotora de *TNF- α* , Baena e cols. Selecionaram ao acaso 333 indivíduos de população etnicamente distintas: Caucasianos (Norte Americanos), Asiáticos (Cambodianos), Africanos (Malaia, Sul da Nigéria, Africanos-Americanos e Africanos-Caribenses) e Ameríndios (Quéchuas e Paez). Dez SNPs foram detectados neste estudo. Em conclusão, foi verificado que o SNP -857 é um marcador para Ameríndios, o -308 ocorreu com frequência alta em Caucasianos (21%), Malaia (12%); Nigerianos (13%); Africanos-Americanos (12%) e Cambodianos (8%) e não foi detectado nas duas populações indígenas analisadas, o mesmo resultado obtido em exemplos de outros Ameríndios (Chachi, índios do Equador e Pima, índios do Arizona) em



amostras previamente analisadas (Zimmerman e cols., 1996 e Hammond e cols., 1999). Estes dados mostram que SNPs em *TNF- α* ocorrem com padrões distintos em populações etnicamente distintas. O SNP -238 foi encontrado nas três populações analisadas, embora também tenha sido encontrado em Caucasianos (D'Alfonso e cols., 1994) e Asiáticos (Higuchi e cols., 1998). Ao contrário, o SNP -376 não foi detectado em algum dos não Africanos analisados e foram encontrados junto com o -238.

O SNP -244G>A foi o primeiro SNP de *TNF- α* ligado a um haplótipo HLA estendido derivado de Africano, são raros os exemplos de presença deste SNP em populações derivadas de não Africanos. Esses dados demonstram a importância de levar em conta o “background” das frequências de SNPs de *TNF- α* nos estudos de associação de gene-doença.

Estudos de associação de fatores genéticos com doenças infecciosas são difíceis de conduzir devido a natureza multifatorial dessas doenças que inclui hospedeiro, patógeno e variáveis ambiental em diferentes proporções para cada doença e para todo assunto estudado. Contudo, uma das indicações para tal estudo é a definição da função de genes específicos na aparência de diferentes formas clínicas da doença (Hill, AVS., 1998). Entendemos que tuberculose é uma doença multifatorial e, portanto, é importante olhar haplótipos nos promotores dos genes estudados. O fato de nossa população ser tão miscigenada nos permite encontrar mutações não existentes em outras populações, como o -308, por exemplo, que é relativamente raro em Asiáticos e Ameríndios. Dados recentes provenientes da genotipagem de um número grande de amostras para diferentes SNPs revelaram que o genoma humano tem uma estrutura de bloco de haplótipo (Kruglyak, L, 1999 e Collins, A e cols., 1999) e a configuração de um haplótipo ou diplótipo é às vezes mais importante que o genótipo do SNP para determinar as conseqüências fenotípicas (Hugot, JP e cols., 2001 e Drysdale, GM e cols., 2000). Além disso, a construção de um bloco de haplótipo é útil para identificar SNPs que isolados não teriam influência no fenótipo (Kamatani, N e cols., 2004) .



Em conclusão, este estudo mostrou que regiões regulatórias de IFN- γ são altamente conservadas, como visto em publicações anteriores devido às mutações encontradas estarem em frequência muito baixa e apesar de TNF- α ser bem polimórfico, somente um SNP (-376G>A) mostrou associação com TB, especificamente com suscetibilidade *per se* a ocorrência de TB ativa e risco aumentado para a ocorrência de TB extrapulmonar. Contudo, em relação ao gene de IFN- γ , a variante alélica -200T foi associada com proteção à ocorrência TB ativa, e a TB pulmonar. Além disso, esta variante foi também associada com infecção latente. Quatro SNPs novos na região promotora do gene de IFN- γ foram descobertos durante a execução deste trabalho e futuros estudos precisam ser realizados para a investigação da possível influência dos mesmos na regulação da expressão de IFN- γ . Adicionalmente, contribuímos também para a correção da nomenclatura de alguns SNPs (IFN- γ -183 e -179) que na verdade são o mesmo SNP, corrigidos e renomeados aqui como -200 e o SNP (IFN- γ -155), que na verdade representa o SNP -172. Finalmente, este é o primeiro estudo realizado no Brasil em que se faz um mapeamento, através de sequenciamento, desta região referente aos genes de IFN- γ e TNF- α . Os dados aqui apresentados retrata a realidade de uma população com características étnicas de alta miscigenação, disponibiliza os diferentes SNPs identificados possibilitando a realização de cálculo amostral real para eventuais estudos de associação que venham a ser idealizados com estes alvos e esta população para outras enfermidades e finalmente, disponibiliza haplótipos que podem ser utilizados em outros estudos de associação com outras doenças.



7. Conclusões

Foram detectados na população de estudo:

- Sete sítios polimórficos na região promotora do gene que codifica para IFN- γ , sendo quatro destes ainda não descritos na literatura.
- Divergências de nomenclatura em SNPs descritos na literatura que podem acarretar associações divergentes de um único SNP em uma mesma população.
- Associação com proteção conferida pela variante IFN- γ -200T à ocorrência de TB ativa e TB pulmonar quando da análise de suscetibilidade *per se*.
- Sete sítios polimórficos na região promotora do gene que codifica para TNF- α já descritos na literatura.
- Associação do alelo TNF- α -376A com suscetibilidade *per se* à ocorrência de TB ativa e um risco relativo deste alelo para ocorrência de TB extrapulmonar.
- Associação genotípica e alélica do TNF- α -572G>A com risco de ocorrência de TB extrapulmonar.
- Características étnicas importantes na população, que por ser tão miscigenada nos permite encontrar mutações não existentes em outras populações.



8- Bibliografia

- Abe, T., Linuma, Y., Ando, M., Yokoyama, T., et al. NRAMP1 polymorphisms, Susceptibility and Clinical Features of Tuberculosis. *Journal of Infection* 2003; 46: 215-220.
- Abraham e cols., 1999
- Aderka, D., Engelmann, H., Maor, Y., Brakebusch, C., Wallach, D. Stabilization of bioactivity of tumor necrosis factor by soluble receptors. *J Exp Med* 1992; 175:323.
- Allison, M.J., Mendoza, D., Pezzia, A. Documentation of a case of tuberculosis in pre-Columbian América. *Am Rev Respir Dis* 1973; 107: 985-91.
- Amim, L.H.L.V., Oliveira, M.M., Fonseca-Costa, J., et al. Role of IFN- γ +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol Biol Rep.* 2007;
- Amirzargar, A.A., Rezaei, N., Jabbari, H., et al. Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *Eur. Cytokine netw.* 2006; 17: 84-9.
- Amirzargar, AA, Danesh, AA, Khosrav, F. et al. Cytokines genes polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *IJI* 2004; 2: 125-9.
- Anes, E., Kühnel, M.P., Bos, E., Moniz-Pereira, J, Habermann, A., Griffiths, G. Selected lipids activate phagosome actin assembly and mutaration resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 793-802.
- Arora, R., Saha, A., Malhotra, D., Rath, P., Kar, P. & Bamezai, R. Promoter and intron-1 region polymorphisms in the IFNG gene in patients with hepatitis E. *International Journal of Immunogenetics* 2005; 32: 207-212.
- Awata, T., Matsumoto, C., Urakami, T., Hagura, R., Anemiya, S., Kanazawa, Y., Association of polymorphism in the interferon gamma gene with IDDM. *Diabetologia.* 1994; 37: 1159-1162.
- Awomoyi, A.A., Marchant, A., Howson, J.M., McAdam, K.P., Blackwell, J.M., Newport, M.J. Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis* 2002; 186: 1808-14.
- Awomoyi, A.A., Marchant, A., Howson, J.M.M., et al. Interleukin-10, Polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis 2002; 186: 1808-14.
- Azmy, I, Hajeer, A., Ollier, W.E.R., Wilson, A.G. Association between an intronic TNFA polymorphism (+691) and TNF locus microsatellites. *Ann Rheum Dis* 58 (Abstracts supplement) 1999; 41
- Baena, A., Leung, J.Y., Sullivan A.D. et al. TNF- α promoter single nucleotide polymorphisms are markers of human ancestry. *Genes Immun* 2002; 3: 482-487.
- Bailly, S., di Giovine, F.S. & Duff, G.W. Polymorphic tandem repeat region in interleukin-1 alpha intron 6. *Human Genetics* 1993; 91: 85.



Barbulescu, K., Meyer, Zum Buschenfelde, K.H. & Neurath, M.F. Constitutive and inducible protein/ DNA interactions of the interferon-gamma promoter in vivo in [corrected] CD45RA and CD45R0 T helper subsets. *European Journal of Immunology* 1997; 27:1098.

Bayley, J.P., Ottenhof, T.H., Verweij, C.L. Is there a future for TNF promoter polymorphism? *Genes Immun.* 2004; 5: 315-29.

Bean, A.G., Roach, D.R., Briscoe, H. et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene targeted mice underline the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J. Immunol* 1999; 162: 3504-11.

Bellamy, R. Genome-Wide approaches to identifying genetics factors in host susceptibility to tuberculosis. *Microbes and Infection* 2006; 8: 1119-1123.

Bellamy, R., Beyers, N., McAdam, K.P.W.J., Ruwende, C., Gie, R., et al. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8005-8009.

Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, K.P.W.J., Whittle, H.C., Hill, A.V.S. Assessment of the interleukin 1 gene cluster and other candidate gene polymorphisms in host susceptibility to tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 1998a; 79: 83-89.

Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, K.P.W.J., Whittle, H.C., Hill, A.V.S. Variation in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* 1998b; 338: 640-644.

Bidwell, J.P. Nuclear matrix proteins and osteoblast gene expression. *J. Bone Miner Res* 1998; 13: 155-167.

Bidwell, J.L., Keen, L.J., Gallagher, G., et al. Galla Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun* 1999; 1:3-19.

Blackwell, J.M., Barton, C.H., White, J.K., et al. Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. *Mol Med* 1995; 1: 194-205.

Blackwell, J.M., Searle, S., Goswami, T., Miller, E.N. Understanding the multiple functions of Nramp1. *Microbes Infect* 2000; 2: 317-21.

Boise, L.H., Petryniak, B., Mão, X., June, C.H., et al. The NFAT-1 DNA binding complex in activated T cells contains Fra-1 and Jun B. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 1911-1919.

Bouma, G., Xia, B., Crusius, J.B., et al. Distribution of four polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1996; 103: 391.

Bradley, D.J. Genetic control of Leishmania populations within the host. II. Genetic control of acute susceptibility of mice to *L. donovani* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 1977; 30: 130-140.



- Bradley, D.J., Taylor, B.A., Blackwell, J.M., Evans, E.P., Freeman, J. Regulation of Leishmania populations within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.* 1979; 37: 7-14.
- Bream, J.H., Carrington, M., O'Toole, S., et al. Polymorphisms of the human IFNG gene noncoding regions. *Immunogenetics* 2000; 51: 50-58.
- Bream, J.H., Ping, A., Zhang, X., Winkler, C. & Young, H.A. A single nucleotide polymorphism in the proximal IFN-gamma promoter alters control of gene transcription. *Genes and Immunity* 2002; 3:165.
- Brennan, F.M. Transgenic models for arthritis: useful clues to be gained? *Ann Med* 1996; 28: 271.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 3684-9.
- Buchmeier, N.A. and Schreiber, R.D. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of Listeria monocytogenes infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985; 82: 7404.
- Bureau, J.F., Bihl, F., Brahic, M., Le Paslier, D. The gene coding for interferon-gamma is linked to the D12S335 and 12S313 microsatellites and to the MDM2 gene. *Genomics* 1995; 28:109.
- Cabrera, M., Shaw, M-A, Sharples, C., et al. Polymorphisms in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1995; 182: 1259-64.
- Camínero, J.A. Pena, M.J., Campos-Herrero, M.I. et al. Epidemiological evidence of the spread of a mycobacterium tuberculosis strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Resp Crit Care Med* 2001; 164: 1165-70.
- Caracta, C.F. Gender Differences in pulmonary Disease. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 2003; 70(4):215-224.
- Cargill, M, Altshuler, D., Ireland, J. et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 1999; 22: 231-238.
- Casanova, J.L., Abel, L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model, *Annu. Ver. Immunol.* 2002; 20: 581-620.
- Casanova, J.L., Abel, L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Ver Immunol* 2004; 4: 55-66.
- Cellier, M., Govoni, G., Vidal, S., Kwan, T., Groulx, N., Liu, J., Sanchez, F., Skamene, E., Schurr, E., Gros, P. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J. Exp. Méd.* 1994; 180: 1741-1752.



- Cervino, A.C., Lakiss, S., Sow, O. et al. Fine mapping of a putative tuberculosis-susceptibility locus on chromosome 15q11-13 in African families. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1599-603.
- Cervino, A.C., Lakiss, S., Sow, O., Hill, A.V. Allelic association between the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in Guinea-Conakry. *Ann Hum Genet* 2000; 64: 507-12.
- Chang, H.R., Dulloo, A.G., Vladioianu, I.R., et al. Fish oil decreases natural resistance of mice to infection with *Salmonella typhimurium*. *Metabolism* 1992; 41:1-2.
- Cheong, J.Y., Cho, S.W., Hwang, I.L., et al. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor- α gene promoter polymorphisms. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006; 21: 1163-1169.
- Chevillard, C., Henri, S., Stefani, F., Parzy, D. & Dessein, A. Two new polymorphisms in the human interferon gamma (IFN-gamma) promoter. *European Journal of Immunogenetics* 2002; 29:53.
- Choi, H.S., Rai, P.R., Chu, H.W., Cool, C., Chan, E.D. Analysis of nitric oxide synthase and expression in human pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 166: 178-186.
- Chrivia, C., Wedrychowicz, T., Young, H.A. & Hardy, K.J. A model of human cytokine regulation based on transfection of gamma interferon gene fragments directly into isolated peripheral blood T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 1990; 172: 661.
- Cobertt, E.L., Churchyard, G.J., Clayton, T.C., Williams, B.G., Mulder, D., et al. HIV infection and silicosis: the impact of two potent risk factors on mycobacterial disease incidence in South African miners. *AIDS* 2000; 14: 2759-2768.
- Collins, A., Lonuou, C., Morton, NE. Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96(15) 173-7.
- Comstock, G.W. The international tuberculosis campaign: a pioneering venture in mass vaccination and research. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 528-40.
- Comstock, G.W. Tuberculosis in Twins: a re-analysis of the prophit survey. *Am.Respir. Dis.*1978; 117:621-624.
- Cooke, G.S., Hill, A.V. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 967-77
- Corbett, EL., Mozzato-Chamay, N., Buterworth, AE., et al. Polymorphisms in the Tumor Necrosis Factor- α Gene Promoter may predispose to severe silicosis in black South African miners. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 690-693.
- Correa, PA, Gómez, LM, Cadena, J. and Anaya JM. Autoimmunity and Tuberculosis. Opposite Association with TNF Polymorphism. *The journal of Rheumatology* 2005; 32:219-224.



Cosma, C.C., Humbert, O., Ramakrishnan, L. Superinfecting mycobacteria home to established tuberculous granulomas. *Nat Immunol* 2004; 5: 828-835.

Crum, N.F., Lederman, E.R., Wallace, M.R. Infections associated with tumor necrosis factor-alpha antagonists. *Medicine (Baltimore)* 2005 sep; 84(5): 291-302. Review.

D'Alfonso, S., Richiard, P.M. An intragenic polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNFA) chain-encoding gene. *Immunogenetics* 1996; 44:32.

D'Alfonso, S., Richiard, PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 1994; 39: 150-154.

Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, A. and Stewart, T.A. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science (Wash. DC)* 1993; 259: 1739.

Daniel, T.M. *Capitain of death: the story of tuberculosis*. Rochester, NY: University of Rochester Press; 1997.

Daniel, T.M. *Pioneers of medicine and their impact on tuberculosis*. Rochester, NY: University of Rochester Press; 2000.

Daniel, T.M. René Theophile Hyacinthe Laennec and founding of pumonary medicine. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 517-8.

Daniel, T.M. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 1181-2.

Daniel, T.M. The early history of tuberculosis in central East África: insights from the clinical records of the first twenty years of Mengo Hospital and review of the relevant literature. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 1998; 2: 1-7.

Daniel, T.M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine* 2006; 100: 1862-1870.

Daniel, V.S., Daniel, T.M. Old testament biblical references to tuberculosis. *Clin. Infect Dis* 1999; 29: 1557-8.

Davies, R.P.O., Tocque, K., Bellis, M.A., Rimmington, T., Davies, P.D.O. Historical declines in tuberculosis in England and Wales: improving social conditions or natural selection. *Int J tuberc Lung Dis* 1999; 3: 1051-4.

Davies, T.W., Davies, M. Mass radiography in Wales. Experience with amobile unit. *Br J Tuberc Dis Chest* 1945; 391: 2-37.

Delgado, J.C., Baena, A., Thim, S., Goldfeld, A.E. Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 2002; 186: 1463-8.



- Delgado, J.C. Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*. 2002 Nov 15;186(10):1463-8. Epub 2002 Oct 16.
- Den Boon, S., van Lill, S.W.P., Borgdorff, M.W., et al. Association between smoking and tuberculosis infection: a population survey in a high tuberculosis incidence area. *Thorax* 2005; 60: 555-557.
- Doetsch, R.N. Benjamin Marten and his "New Theory of Consumptions". *Microbiol Rev* 1978; 42: 521-8.
- Du, T., Guo, X.-H., Zhu, X.-L., Li, J.-H., et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *Journal of Viral Hepatitis* 2006; 13: 618-624.
- Eide, D.J., Clark, S., Nair, T.M., et al. Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biology* 2005; 6: R77.
- El Baghdadi, J., Remus, N., Benslimane, A., et al. Variants of the human NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in Morocco. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 599-602.
- Ellner, J.J. Review: The immune response in human tuberculosis: implications for tuberculosis control. *J Infect Dis* 1997;176: 1351-59.
- Eskdale J, Kude D, Tesch H et al. Mapping of the human IL-10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* 1997; 46:120-128
- F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74 (1977) 5463-5467.
- Falvo, J.V., Ugliarolo, A.M., Brinkman, B.M., Merika, M. et al. Stimulus-Specific Assembly of Enhancer Complexes on the Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Promoter. *Molecular and Biology*, Mar. 2000; 20(6): 2239-2247.
- Fine, P.E.M. Immunogenetics of susceptibility to leprosy, tuberculosis and leishmaniasis: an epidemiological perspective. *Int. J. Lepr Other Mycobact Dis*.1981; 49:437-54.
- Fitness, J., Floyd, S., Warndorff, D.K., et al. Large-scale candidate gene study of tuberculosis susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Méd Hyg* 2004; 71: 341-349.
- Fleischmann, J., Golde, D.W., Weisbart, R.H., Gasson, J.C. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* 1986; 68: 708-11.
- Flynn, J.L., Chan, J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 93-129.
- Flynn, J.L., Chan, J., Triebold, K.J., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Bloom, B.R. An essential role for interferon-gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Méd* 1993; 178: 2249-54.



- Flynn, J.L., Ernst, J.D. Immune responses in tuberculosis. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 432-36.
- Flynn, J.L., Goldstein, M.M., Chan, J., et al. Tumor Necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995; 2: 561-72.
- Forget, A., Skamene, E., Gros, P., Mialhe, A.E., Turcott, R. Differences in response among inbred mouse strains to infection with small doses of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 1981; 32: 42-47.
- Frieden, T.R., Sterling, T.R., Munisiff, S.S., et al. Tuberculosis. *Lancet* 2003;362:887-99.
- Fynn, J.L., Chan, J. Tuberculosis: Latency and Reactivation. *Infection and Immunity* 2001; 4195-4201.
- Gagneux, S.P., Hodgson, A., Smith, T.A., Wirth, T., et al. Prospective study of serogroup x *Neisseria meningitidis* outbreak in northern Ghana. *J Infect. Dis.* 2002; 185: 618-626.
- Gao, P., Fujishima, S., Mao, X., et al. Genetic variants of NRAMP1 and active tuberculosis in Japanese populations. International Tuberculosis genetics Team. *Clin Genet* 2000; 58: 74-76.
- Gao, P., Fujishima, S., Mao, X., et al. Genetic variants of NRAMP1 and active tuberculosis in Japanese populations. *Clin Genet* 2000; 58: 74-76.
- Goldfeld e cols. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation by virus and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Dec;87(24):9769-73
- Goldfeld, A.E., Delgado, J.C., Thim, S., Bozon, M.V. et al. Association of na HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. *JAMA* 1998; 279: 226-228.
- Govoni, G., Vidal, S., Cellier, M., Lepage, P., Malo, D., Gros, P. Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse *Nramp1* gene in macrophages. *Genomics* 1996; 64: 2923-2929.
- Gray, P.W. & Goeddel, D.V. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 1982; 298: 859.
- Greenwood, C.M., Fujiwara, T.M., Boothroyd, L.J., et al. Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 405-416.
- Grigg, E.R.N. The arcana of tuberculosis with a brief apidemiologic history of the disease in the U.S.A. Part III. *Am Rev Tuberc Pulm Dis* 1958; 78: 426-53.
- Gros, P., Skamene, E., Forget, A. Genetic regulation of natural resistance to *Mycobacterium bovis* BCG. *J Immunol* 1981; 127: 2417-21.
- Grotzke, J.E., Lewinsohn, D.M. Role of CD8+ T lymphocytes in control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes and Infection* 2005; 7: 776-788.



- Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M. et al. Ancient origin and mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2005; 1: e5.
- Hajeer, A.H. and Hutchinson, I.V. Influence of TNF α Gene polymorphisms on TNF α Production and Disease. *Human Immunology* 2001; 62: 1191-1199.
- Hajeer, A.H., Hutchinson, I.V. TNF-alpha gene polymorphism: Clinical and biological implications. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 216.
- Hamilton, C.D. Tuberculosis in the Cytokine Era: What Rheumatologists Need to know. *Arthritis & Rheumatism* 2003; 48(8): 2085-2091.
- Hardy, K.J., Manger, B., Newton, M., Stobo, J.D. Molecular events involved in regulating human interferon-gamma gene expression during T cell activation. *J Immunol* 1987; 138: 2353-2358.
- Hardy, K.J., Peterlin, B.M., Atchison, R.E., Stobo, J.D. Regulation of expression of the human interferon gamma gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 8173-8177.
- Hayman, J. *Mycobacterium ulcerans*: an infection from jurassic time? *Lancet* 1984; 2: 1015-6.
- Heesen, M., Kun, D., Wessiepe, M. Van der Poll, T. et al. Rapid genotyping for tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) -863C/A promoter polymorphism that determines TNF-alpha response. *Clin Chem* 2004; 50: 226-228.
- Heller, R.A., Song, K. Onasch, M.A., et al. Complementary DNA cloning of a receptor for tumor necrosis factor and demonstration of a shed form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6151.
- Henao, M.I., Montes, C., Paris, S.C., Garcia, L.F. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis* 2006; 86: 11-19.
- Higuchi, T, Seki N, Kamizono, S. et al. Polymorphism of the 5' - flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)- alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998; 51: 605-612.
- Hill, AVS, Ruwend, C., McGuire, W., et al. association of the -238 promoter polymorphism with susceptibility to tuberculosis and malaria in Africa. *Hum Immunol.* 1996; 47:118.
- Hill, AV. Host genetics of infectious diseases: old and new approaches converge. *Emerg Infect Dis.* 1998 Oct-Dec;4(4):695-7. No abstract available
- Hinshaw, H.V., Feldman, W.H. Streptomycin in the treatment of clinical tuberculosis: a preliminary report. *Proc Staff Meetings Mayo Clin* 1945; 20: 313-8.
- Hirsh, A.E., Tsolaki, A.G., DeReimer, K., Feldman, M.W., Small, P.M. Stable association between strains of *mycobacterium tuberculosis* and their human populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4871-6.



Hoal-van Helden, E.G., Lewis L.A. Jamieson, S. et al. SLC11A1 (NRAMP1) but not SLC11A2 (NRAMP2) polymorphisms are associated with susceptibility to tuberculosis in a high incidence community in south África. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 1464-1471.

Hohler, T, Kruger, A, Gerken, G., et al. A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol*. 1988; 111: 579.

Hoover, D.L., Nacy, C.A. and meltzer, M.S. Human monocyte activation for cytotoxicity against intracellular *Leishmania donovani*. *Cell. Immunol*. 1985; 94: 5005.

Huizinga, T.W., Westendorp, R.G., Bollen, E.L., et al. TNF- α promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol* 1997; 72:149.

Ishihara, K., Hirano, T. Molecular basis of the specificity of cytokine action. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1592: 281-296.

Jaber, B.L., Rao, M., Guo, D. et al. Cytokine gene promoter polymorphisms and mortality in acute renal failure. *Cytokine* 2004; 25: 212-219.

Jamieson, S.E., Miller, E.N., Black, G.F., et al. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. *Genes Immun*. 2004; 5: 46-57.

Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., christen, M.G. von Herrath, Schoenberger, S.P. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 2003; 421: 852-856.

Janulionis, E., Sofer, C., Schwander, S.K. et al. Survival and replication of clinical mycobacterium tuberculosis isolates in the context of human innate immunity. *Infect Immun* 2005; 2595-2601.

Jouanguy, E. Altare, F., Lamhamedi S., Revy, P., Emile, J.F., Newport M, et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in na infant with fatal bacillie Calmette-Guerin infection. *N Engl J Méd* 1996; 335: 1956-61.

Kallmann, F.J., Reisner, D. Twin studies on the significance of genetic factors in tuberculosis. *Am Rev Tuberc* 1943; 47: 549-74.

Kamatani, N., Sekine, A., Kitamoto, T. et al. Large-scale single-nucleotide polymorphism (SNP) and haplotype analyses, using dense SNP maps, of 199 drug-related genes in 752 subjects: the analysis of the association between uncommon SNPs within haplotype blocks and the haplotypes constructed with haplotype-tagging SNPs. *Am. J. Hum. Genet* 2004; 75:190-203.

Kaminuma, O., Kitamura, F., Kitamura, N., Miyagishi, M., et al. GATA-3 suppresses IFN- γ promoter activity independently of binding to cis-regulatory elements. *FEBS Letters* 2004; 570: 63-68.



- Kapur, V., Whittam, T.S., Musser, J.M. Is mycobacterium tuberculosis 15000 years old? *J. Infect Dis* 1994; 170: 1348-9.
- Kaufmann, S.H.E. A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: Those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis* 2003; 83: 86-90.
- Keane, J., Gershon, S., Wise, R.P. et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha- neutralizing agent. *New Engl.J.Med.*2001; 345: 1098-1104.
- Khani-Hanjani, A., Lacalle, D., Hoar, D., et al. Association between dinucleotide repeat in non-coding region of interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. *Lancet* 2000; 356:820-825.
- Kim, J.H., Lee,S.Y., Lee, S.H. et al. NRAMP1 genetic polymorphisms as a risk factor of tuberculosis pleurisy. *Int. J. tuberc. Lung Dis.* 2003; 7: 370-375.
- Kim, Y.J., Lee, H.S., Yon, J.H. et al. Association of TNF- α promoter polymorphisms with the clearance of the hepatitis B virus infection. *Hum Mol genet* 2003; 12: 2541-2546.
- Kinight, JC, Udalova, I., Hill, AV., Greenwood, BM, et al. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria {see coments}. *Nat Genet* 1999; 22: 145.
- Knight, J. Polymorphisms in tumor necrosis factor and other cytokines as risks for infectious diseases and septic Syndrome. *Curr Infect Dis Rep* 2001;3:427-39.
- Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R. et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2607-18.
- Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 106: 2747-27-57.
- Kroeger, K.M., Carville, K.S., Abraham, L.J. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; 34: 391-399.
- Kruglyak, L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat. Genet.* 1999; 22: 139- 44.
- Kubota, T., McNamara, D.M., Wang, J.J., et al. Effects of tumor necrosis factor gene polymorphisms on patients with congestive heart failure. VEST Investigators for TNF Genotype Analysis. Vsarinone Survival Trial. *Circulation* 1998; 97:2499.
- Lee, J.Y., Goldman, D., Piliero, L.M., Petri, M., Sullivan, K.E. Interferon-gamma polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *Genes immun* 2001; 2: 254-257.
- Leger, J.P. occupational diseases in South African mines-a neglected epidemics? *S Afr Med* 1992; 81: 197-201.



- Lewis, D.B., Yu, C.C., Meyer, J., English, B.K., et al. Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin 4 and interferon- γ production by neonatal T cells. *J. Clin. Invest.* 1991; 87: 194-202.
- Li, H.T., Zhang, T.T., Zhou, Y.Q., Huang, Q.H., Huang, J. SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2006; 10: 3-12.
- Liew, F.Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R.M. and Moncada, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 1990; 144: 4794.
- Lillebaek, T., Dirkesen, A., Baess, I. et al. Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. *J. Infect. Dis.* 2002; 185: 401-404.
- Lin Y, Zhang, M., Hofman, F.M., Gong, J, Barnes, P.F. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun* 1996; 64: 1351-6.
- Lio, D., Marino, V., Serauto, A., Gioia, V., et al. Genotype frequencies of the +874T/A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon- γ gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *European Journal of Immunogenetics* 2002; 29: 371-374
- Long, A.D., Langley, C.H. The power of association studies to detect the contribution of candidate genetic loci to variation in complex traits. *Genome Res.* 1999; 9: 720-731.
- Lopez, B., Aguilar, D., Orozco, H. et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different mycobacterium tuberculosis genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003; 133: 30-7.
- López-maderuelo, D., Arnalich, F., Serantes, R., et al. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 970-975.
- Louis, E., Franchimont, D., Piron, A., et al. Tumor Necrosis Factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in health humans. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 401.
- Lounden, R.G., Roberts, R.M. Droplet expulsion from the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis.* 1966; 95: 435-42.
- Ma, X., Dou, S., Wright, J.A., Reich, R.A., Teeter, L.D., et al. 5' dinucleotide repeat polymorphism of NRAMP1 and susceptibility to tuberculosis among Caucasian patients in Houston, Texas. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2002; 6: 818-23.
- Mah, A.W., Fanning, E.A. An epidemic of primary tuberculosis in a Canadian aboriginal community. *Can J Infect Dis* 1991; 2: 133-41.
- Malik, S., Abel, L., Tooker, H. et al. Alleles of the NRAMP1 gene are risk factors for pediatric tuberculosis disease. *PNAS* 2005; 34: 12183-12188.



- Malik, S., Schurr, E. Genetic susceptibility to tuberculosis. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 863-8.
- Malo, D., Vidal, S., Lieman, J.H., Ward, D.C., Gros, P. Physical delineation of the minimal chromosomal segment encompassing the murine host resistance locus Bcg. *genomics* 1993a; 17: 667-675.
- Malo, D., Vogan, K., Vidal, S., Hu, J., et al. haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* 1993b; 23: 51-61.
- Manca, C., Tsenova, L., Barry, C.E. III et al. Mycobacterium tuberculosis CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* 1999; 162: 6740-6.
- Manca, C., Tsenova, L., Bergtold, A. et al. Virulence of a mycobacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha/beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5752-7.
- Marino, M.W., Dunn, A., Grail, D., et al. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8093.
- Martin, E.R., Lai, E.H., Gilbert, J.R., et al. SNPing away at complex diseases: analysis of single-nucleotide polymorphisms around APOE in Alzheimer disease. *Am J. Hum. Genet.* 2000; 67: 383-394.
- McGuire, W, Hill A.V.S., Allsopp, C.E.M., et al. Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; 371: 508-11.
- McSHANE, H. Susceptibility to tuberculosis – the importance of the pathogen as well as the host. *Clin Exp Immunol* 2003; 133: 20-21.
- Medzhitov, R., Preston-Hulburt, P., Janeway, C.A.Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-7.
- Meyer, C.G., May, J., Stark, K. Human leukocyte antigens in tuberculosis and leprosy. *Trends Microbiol.* 1998; 6: 148-154.
- Mira, J.P., Cariou, A., Grall, F., Delclaux, C., et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study {see comments}. *JAMA* 1999; 282:561.
- Mogues, T., Goodrich, M.E., Ryan, L., LaCourse, R., North, R.J. the relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J.Exp. Med.* 2001; 193: 271-280.
- Molloy, A., Meyn, P.A., Smith, K.D. Kaplan, G. Recognition and destruction of bacillus Calmette-Guerin- infected human monocytes. *J Exp Med* 1993; 177:1691-8.



- Monot, M., Honore, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppee, J.Y., Lacroix, C., Sow, S., Spencer, J.S., Truman, R.W., Williams, D.L., et al. On the origin of leprosy. *Science* 2005; 308: 1040-1042.
- Murray, C.J., Salomon, J.A. Modeling the impact of global tuberculosis control strategies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:13881-6.
- Naik, S. Can we look forward to genetic tests for tuberculosis susceptibility & severity? *Indian J Med Res* 2006; 124: 379-382
- Negoro, K., Kinouchi, Y., Hiwatashi, N. et al. Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene. *Gastroenterology* 1999; 117: 1062-1068.
- Newport, M.J., Huxley, C.M., Huston, S. et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *New Engl Méd* 1996; 335: 1941-9.
- Ng, T.P., Chan, S.L., Lee, J. Predictors of mortality in silicosis. *Respir Med* 1992; 86: 115-119.
- Ö. Ates, B. Musellim, G. Ongen and A. Topal-Sarikaya. Interleukin-10 and Tumour Necrosis Factor- α Gene Polymorphisms in Tuberculosis. *J Clin Immunol* 2007 November;
- Oh, JH, Yang, CS, Noh, YK, Kweon, YM, et al. Polymorphisms of Interleukin-10 and tumour necrosis factor- α genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis. *Respirology*. 2007; 12:594-98.
- Old, L.J. Tumor Necrosis factor. *Sci Am*. 1988 May; 258(5): 59-60, 69-75. Review
- Oliveira, MM, Siva, JCS, Costa, JF, Amin, LH et al. Single Nucleotide polymorphisms (SNPs) of the TNF- α (-238/ -308) gene among TB occurrence. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004; 30:461-67.
- Oppenheim, J.J. & Feldmann, M. Cytokine Reference, Academic Press, London 2001; 1: 641
- Paul, K.P., Leichsenring, M., Pfisterer, M., et al. Influence of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on the resistance to experimental tuberculosis. *Metabolism* 1997; 46: 619-624.
- Penix, A.L., Sweetser, M.T., Weaver, W.M., hoeffler, J.P., Kerppola, T.K. Wilson, C.B. The proximal regulatory element of the interferon-gamma promoter mediates selective expression in T cells. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 31964
- Penix, L., Weaver, W.M., Pang, Y., Young, H.A. and Wilson, C.B. Two Essential Regulatory Elements in the Human Interferon γ promoter Confer Activation Specific Expression in T Cells. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 1483-1496.
- Picard, C., Fieschi, C., Altare, F., Al-Jumaah, S., Al-Hajjar, S., Feinberg, J., et al. Inherited interleukin-12 deficiency: IL-12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 336-48.



- Ping, An, Viahov, D., Margolick, JB, Phair, J. et al. A tumor Necrosis Factor- α -Inducible Promoter Variant of Interferon- γ Accelerates CD4⁺ T Cell Depletion in human Immunodeficiency Virus-1-Infected Individuals 2003; 188:228-31.
- Plant, J.E., Glynn, A.A. Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Infect. Dis.* 1976; 133: 72-78.
- Plant, J.E., Glynn, A.A. Locating *Salmonella* resistance gene on mouse chromosome 1. *Clin. Exp. Immunol.* 1979; 37: 1-6.
- Pociot, F., Veijola, R., Johannensen, J., Hansen, P.M., et al. Analysis of an interferon gamma gene (IFNG) polymorphism in Danish and Finnish insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients and control subjects. *Journal of Interferon Cytokine Research* 1997; 17:87.
- Pravica, V., Asderakis, A., Perrey, C., Hajeer, A., Sinnott, P.J. & Hutchinson, I.V. In vitro production of IFN- γ correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- γ gene. *European Journal of Immunogenetics* 1999; 26:1.
- Pravica, V., Perrey, C., Stevens, A., Lee, J.H., Hutchinson, I.V. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000; 61: 863-66.
- Pritchard, J.K., Cox, N.J. The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11: 2417-2423.
- Raja, A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120: 213-232.
- Rao, A. NF- κ B: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol. Today* 1994; 15: 274-281.
- Ratcliffe L.T., Lukey, P.T., Mackenzie, C.R., Renshaw, S.R. Reduced NK activity correlates with multidrug-resistance pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 373-9.
- Raviglione, M.C. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis* 2003; 83: 4-14.
- Ravikumar, M., Dheenadhayalan, V. Rajara, K. et al. associations of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 alleles with pulmonary tuberculosis in South India. *Tuberc. Lung Dis.* 1999; 79: 309-317.
- Reich, D.E., Lander, E.S. On the allelic spectrum of human disease, *Trends Genet.* 2001; 17: 502-510.
- RELATÓRIO DAS ATIVIDADES DE PESQUISA 2002-2004 [da] Rede brasileira de Pesquisa em Tuberculose. Instituto Milênio REDE TB. FMRP/USP, São Paulo 2005.p.11
- Risch, N., Merikangas, K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273: 1516-1517.
- Roberts, C.A., Buikstra, J.E. The bioarchaeology of tuberculosis. A global view on a reemerging disease. Gainesville, FL.: University of Florida Press; 2003.



- Roberts, T., Herselman, M., Marais, D., Labadarios, D. Served versus actual nutrient intake of hospitalised patients with tuberculosis as compared with energy and nutrient requirements. *South African Journal of Clinical Nutrition* 2005; 18: 78-93.
- Rook, G.A., Hernandez-Pando, R. Pathogenetic role, in human and murine tuberculosis, of changes in the peripheral metabolism of glucocorticoids. *Psychoneuroendocrinology* 1997; 22 Suppl 1:S109-113.
- Rook, G.A.M. Mycobacteria, cytokines and antibiotics. *Pathol Biol.* 1990; 38:276-280.
- Rook, G.A.W., Dheda, K., Zumla, A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 661-667.
- Rooney, J.W., Hodge, M.R., McCaffrey, P.G., Rao, A., and Glimcher, L.H. A common factor regulates both Th1-Th2-specific cytokine gene expression. *EMBO J.* 1994; 13: 625-633.
- Rooney, J.W., Hoey, T., and Glimcher, L.H. Coordinate and cooperative roles for NF- κ B and AP-1 in the regulation of murine IL-4 gene. *Immunity* 1995a; 2(5): 473-483.
- Rooney, J.W., Sun, Y., Gimcher, L.H. and Hoey, T. Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-12 promoter in response to T-cell receptor stimulation. *Mol. Cell. Biol.* 1995b; 15(11): 6299-6310.
- Rosenberg, N.A., Pritchard, J.K., Weber, J.L., Cann, H.M., Kidd, K.K., Zhivotovsky, L.A. & Feldman, M.W. Genetic structure of human populations. *Science* 2002; 298: 2381-2385.
- Rossouw, M., Nel, H.J., Cooke, G.S., van Helden, P.D., Hoal, E.G. Association between tuberculosis and a polymorphic NF κ B binding site in the interferon gamma gene. *Lancet* 2003; 361: 1871-1882.
- Roy, S., McGuire, W., Macie-Taylor, C.G.N., et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J. Infect Dis.* 1997; 176: 530-2.
- Ruiz-Linares, A. Dinucleotide repeat polymorphism in the interferon-gamma (IFN) gene. *Human Molecular Genetics* 1993; 9: 1508.
- Ryan, F. *The forgotten plague. How the battle against tuberculosis was won and lost.* Boston, MA: Little, Brown and Company; 1992.
- Ryu, S., Park, Y.K., Bai, G.H., Kim, S.J., Park, S.N., Kang, S. 3'UTR polymorphism in the NRAMP1 gene are associated with susceptibility to tuberculosis in Koreans. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 577-580.
- Salo, W., Aufderheide, A.C., Buikstra, J., Holcomb, T.A. Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pré-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2091-4.
- Santos, A.R., Almeida, A.S., Suffys, P.N. et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. *Int J Lepr other Mycobact Dis* 2000; 68: 325-7.



- Sasaki, T. Mieno, M., Udono, H., et al. Roles of CD4⁺ and Cd8⁺ cells, and the effect of administration of recombinant murine IFN- γ in listerial infection. *J. Exp. Med* 1990; 171: 1141.
- Sassone-Corsi, P. Goals for signal transduction pathways: linking up with transcriptional regulation. *RMBO J.* 1994; 13: 4717-4728.
- Schatz, A., Bugie, E., Waksman, S.A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proc Exp Biol Med* 1944; 55: 66-9.
- Schurr, E. Is susceptibility to tuberculosis acquired or inherited? *J Intern Med* 2007; 261: 106-111.
- Schurr, E., Skamene, E., Forget, A., Gros, P. Linkage analysis of the Bcg gene on mouse chromosome 1: identification of a tightly linked marker, *J. Immunol.* 1989; 141: 4507-4513.
- Schurr, E., Skamene, K., Morgan, K., Chan, M.L., Gros, P. Mapping of Col3a1 and Col6a3 to proximal murine chromosome 1 identifies conserved linkage of structural protein genes between murine chromosome 1 and human chromosome 2q. *genomics* 1990; 8: 477-486.
- Searle, S., Blackwell, J.M. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter region of human NRAMP1 that correlates with infectious versus autoimmune disease susceptibility. *J Med Genet* 1999; 36: 295-9.
- Seder, R.A. and Paul, W.E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12: 635-673. Review
- Selvaraj, P. Host genetics and tuberculosis susceptibility. *Current Science* 2004; 86(1):115-121.
- Selvaraj, P., Sriram, U., Mathan Kurian, S., et al. Tumor necrosis factor α (-238 and -308) and β gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis: haplotype analysis with HLA-A, -B and DR genes. *Tuberculosis* 2001; 81: 335-41.
- Shaw, M.A., Collins, A., Peacock, C.S., et al. Evidence that genetic susceptibility to Mycobacterium tuberculosis in a Brazilian population is under oligogenic control: linkage study of the candidate genes NRAMP1 and TNFA. *Tuber Lung Dis* 1997; 78: 35-45.
- Shedlock, D.J., Shen, H. Requirement for CD4⁺ T cell help in generating functional CD8⁺ T cell memory, *Science* 2003; 300: 337-339.
- Sica, A., Tan, T.H., Rice, N., kretschmar, M., Ghosh, P., Young, H.A. The c-rel protooncogene product c-rel but not NF-kappa B binds to the intronic region of the human interferon-gamma gene at a site related to an interferon-stimulable response element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1740-1744.
- Silva, C.L., Bonato, V.L.D, Lima, K. et al. Cytotoxic T Cell and mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 197: 11-8.



- Skamene, E., Gros, P., Forget, A., et al. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* 1982; 297: 506-509.
- Soborg, C., Andersen, A.B., Madsen, H.O., Kok-Jensen, A., Skinhoj, P., Garred, P. Natural resistance-associated macrophage protein 1 polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *J Infect Dis* 2002; 186: 517-521.
- Soborg, C., Andersen, A.B., Range, N., et al. Influence of candidate susceptibility genes on tuberculosis in a high endemic region. *Molecular Immunology* 2007; 44: 2213-2220.
- Sodhi, A., Gong, J., Silva, C., Qian, D., Barnes, P.F. Clinical correlates of interferon-gamma production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 617-20.
- Song, Z., Casolaro, V., Chen, R., Georas, S.N., Monos, D., Ono, S.J. Polymorphic nucleotides within the human Il-4 promoter that mediate overexpression of the gene. *J. Immunol.* 1996; 156: 424-429.
- Spielman, R.S., Ewens, W.J. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 983-989.
- Stead, W.W., Senner, J.W., Reddick, W.T., Iofgren, J.P. Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *N. England J. Méd.* 1990; 322: 422-7.
- Stenson, P.D., Ball, E.V., Mort, M., et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum. Mutat.* 2003; 21: 577-581.
- Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M. and Bem-Neriah, Y. JNK is involved in signal integration during costimulation of lymphocytes. *Cell* 1994; 77: 727-736.
- Suh, Y., Vijg, J. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. *Mutation Research.* 2005; 573: 41-53.
- Sun, J.C., Bevan, M.J. Defective CD8⁺ T cell memory following acute infection without CD4⁺ T cell help. *Science* 2003; 300: 339-342.
- Sun, J.C., Williams, M.J., Bevan, M.J. CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection, *Nat. Immunol.* 2004; 5: 927-933.
- Suxia, QI, Bangwei Cǎo, Mingwei Jiang, Changqing Xu, et al. Association of the -183 polymorphism in the IFN- γ Gene promoter with Hepatitis B Virus Infection in the Chinese Population. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2005; 19: 276-281.
- Swaminathan, S., Gong, J., Zhang, M., Samten, B., Hanna, L.E., Narayanan, P.R., et al. Cytokine production in children with tuberculous infection and disease. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1290-3.
- Szabo, S.J., Gold, J.S., Murphy, T.L. and Murphy, K.M. Identification of cis-acting regulatory elements controlling. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 4793-4805.



Tartaglia, L.A., Weber, R.F., Figari, I.S., et al. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9292.

Taype, C.A., Castro, J.C., Accinelli, R.A., Herrea-Velit, P., Shaw, M.A., Espinoza, J.R. association between SLC11A1 polymorphisms and susceptibility to different clinical forms of tuberculosis in the Peruvian population. *Infection, Genetics and Evolution*. 2006; 6:361-367.

Terwilliger, J.D., Weiss, K.M. Linkage disequilibrium mapping of complex disease: fantasy or reality? *Curr. Opin. Biotechnol.* 1998; 9: 578-594.

Thakkinstian, A., McElduff, P., D'Este, C., Duffy, D., Attia, J.A. A method for meta-analysis of molecular association studies. *Stat Med* 2004; 24: 1291-1306.

Ting, L.M., Kim, A.C., Cattamanchi, A., Ernst, J.D. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol* 1999; 163: 3898-906.

Trede, N.S, Tsytsykova, A.V, Chatila T. Transcriptional activation of the human TNF-alpha promoter by superantigen in human monocytic cells: role of NF-kappa B. *J Immunol*. 1995 Jul 15;155(2):902-8

Trudeau, E.L. Relative immunity in tuberculosis and the use of tuberculin. *Br J Tuberc* 1916; 10: 29-30.

Tsai, EY, Falvo, JV, Tsytsykova, AV. et al. A lipopolysaccharide-Specific Enhancer Complex Involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB Binding Protein and p300 Is Recruited to the Tumor Necrosis Factor Alpha Promoter In Vivo. *Molecular and cellular Biology*, Aug. 2000,20(16) 6084-6094.

Tsenova, L., Ellison, E., Harbacheuski, R. et al. Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J Infect Dis* 2005; 192: 98-106.

Tso, HW, Ip WK, Chong, WP, et al. Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. *Genes Immun*. 2005; 6(4): 358-363.

Tsukamoto, K., Ohta, N., Shirai, Y., Emi, M. A highly polymorphic CA repeat marker at the human tumor necrosis factor alpha (TNFA alpha) locus. *J Hum Genet* 1998; 43:278.

Tsuruta, L., Lee, H.J., Masuda, E.S., Koyano-Nakagawa, N., et al. Cyclic AMP inhibits expression of the IL-2 gene through the nuclear factor of activated T cells (NF-AT) site, and transfection of NF-AT cDNAs abrogates the sensitivity of EL-4 cells to cyclic AMP. *J. Immunol*. 1995; 154: 5255-5264.

Tsytsykova, AV, Goldfeld, A.E. Inducer-specific enhanceosome formation controls TNF-alpha gene expression in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 2620-2631.

Tufariello, J.M., Chan, J., Flynn, J.L. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect. Dis.* 2003; 3:578-590.



Tuner DM, Williams DM, Sankaran D et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24:1-8

Udalova, I.A., Nedospasov, S.A., Webb, G.C., Chaplin, D.D., Turetskaya, R.I. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. *Genomics* 1993; 16:180.

Ugliaro, AM, Turbay, D, Pesavento, PA, et al. Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter. *Tissue Antigens* 1998; 52: 359-367.

Walway, S.E., Sanchez, M.P., Shinnick, T.F. et al. Na outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med* 1998; 338: 633-9.

Van Crevel, R., Ottenhoff, T.H.M. & Van der Meer, J.W.M. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*; *Clin. Microbiol. Ver.* 2002; 15.2: 294-309.

van Deventer, SJH. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in the infectious disease. *Intensive Care Med.* 2000; 26: 98-102.

van Heel, D.A., Udalova, I.A., De Silva, A.P., et al. Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF- κ β transcription factors. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1281-1289.

Van Helden, P.D. The economic divide and tuberculosis. *EMBO reports* 2003; Vol 4 special issue.

van Helden, P.D., Moller, M., Babb, C., Warren, R., Walzl, G., Uys, Pieter and Hoal, E. TB epidemiology and human genetics. *Novartis Foundation Symposium* 2006; 279: 17-41.

Van Rie, A., Warren, R.M., Richardson, M., et al. Exogenous reinfection is a common cause of tuberculosis recurrence after cure. *New Engl J Medicine* 1999; 341: 1174-1179.

Vassalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 411.

Vejbaesya, S., Chierakul, N., Luangtrakool and Sermduangprateep, C. NRAMP1 and TNF- α polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Thais. *Respirology* 2007; 12: 202-206

Vidal, S., Tremblay, M.L., Gonovi, G., et al. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J Exp Méd* 1995; 182: 655-666.

Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., Gros, P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 1993; 73: 469-485.

Vidyarani, M., Selvaraj, P., Prabhu Anand, S., et al. Interferon gamma (IFN γ) and interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 2006; 124: 403-10.



- Von Pirquet, C. Frequency of tuberculosis in childhood. *J Am Méd Assoc* 1909; 52: 675-8.
- Wallis, R.S., Broder, M.S., Wong, J.Y., Hanson, M.E., Beenhouwer, D.O. Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1254-5.
- Warren, R.M., Victor, T.C., Streicher, E.M., et al. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 610-614.
- Weitzman, D., de Wend Cayley F.E., Wingfield, A.L. Streptomycin in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Brit J Tuberc Dis Chest* 1950; 44: 98-104.
- WHO Tuberculosis Research Office. Further studies of geographic variation in naturally acquired tuberculin sensitivity. *Bull World Health Org* 1955; 12: 63-83.
- WHO. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. WHO Report. Geneva: WHO, 2006.
- Wiid, I., Seaman, T., Hoal, E.G., Benade, A.J.S., van Helden, P.D. Total antioxidant levels are low during active TB and rise with anti-tuberculosis therapy. *IUBMB Life* 2004; 56: 101-106.
- Wilson, AG. TNF is essential for the cell-mediated protective immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *J Immunol.* 1999 Oct 15;163(8):4489-94
- Wilson, AG, de Vries, N., Pociot, F., et al. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, b8, and DR3 alleles. *J Exp Med.* 1993; 177: 557-560.
- Wilson, AG, Symons, JA, McDowell, TL, et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Natl acad Sci USA* 1997; 94: 3195-9.
- Wilson, L.G., The historical decline of tuberculosis in Europe and América: its causes and significance. *J Hist Med Allied Sci* 1990; 45: 366-96.
- Winslow, C- EA. The life of Hermann M. Biggs, M.D., D. Sc., LL.D. Physician and statesman of the Public Health. Philadelphia: Lea & Feiberger; 1929.
- Winthrop, K.L. Risk and prevention of tuberculosis and other serious opportunistic infections associated with the inhibition of tumor necrosis factor α . *Nature Clinical practice Rheumatology* 2006; 2(11):602-610.
- Winthrop, K.L. Update on tuberculosis and other opportunistic infections associated with drugs blocking tumor necrosis factor α . *Ann Rheum Dis* 2005; 64:iv29-iv30.
- Woolhouse, M.E., Webster, J.P., Domingo, E., Charlesworth, B. & Levin, B.R. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat. Genet.* 2002; 32: 569-577. Review.



Wright, A.F., Hastie, N.D. Complex genetic diseases: controversy over the Croesus code. *Genome Biol.* 2001; 2 (Comment 2007.1-2007.8).

Xu, X. Sun, Y.L., Hoey, T. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 1996; 273: 794-797.

Young, HA. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J. Interferon Cytokine Res* 1994; 16: 563-568.

Zhang, M., Lin, Y, Iyer, D.V., Gong, J., Abrams, J.S., Barnes, P.F. T cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63: 3231-4.

Zhang, W., Shao, L., Weng, X., Hu, Z., Jin, A., et al. Variants of the natural resistance-associated macrophage protein 1 gene (NRAMP1) are associated with severe forms of pulmonary tuberculosis. *Clin. Infect. Dis* 2005; 40: 1232-6.

Zimmerman, M.R. Pulmonary and osseous tuberculosis in an Egyptian mummy. *Bull NY Acad Méd* 1979; 55: 604-8. Zimmerman, PA, Guderian, RH, Nutman, TB. A new TNFA promoter allele identified in South American Blacks. *Immunogenetics* 1996; 44: 485-486

Zondervan, K.T., Cardon, L.R. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat. Rev. Genet.* 2004; 5: 89-100

**9-ANEXOS****ANEXO 1 – QUESTIONÁRIO PARA ENTREVISTA DOS PACIENTES****QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES COM TUBERCULOSE E
OUTRAS CO-MORMIDADES****Apresenta alguma das doenças citadas?**

- HIV DM (Tipo II)
 Dislipidemia Hipertensão Arterial Sistêmica

Caso apresente alguma das doenças acima, preencher o questionário abaixo.

Nome Completo: _____

Apresenta Termo de Consentimento assinado? Sim Não

1) Data do Questionário: ____/____/____

2) Endereço Residencial: _____

Bairro: _____ **Cidade:** _____ **UF:** _____

Telefone: (____) _____ IGN **Celular:** (____) _____ IGN

3) Endereço do trabalho: _____

Bairro: _____ **Cidade:** _____ **UF:** _____

Telefone: (____) _____ IGN

4) Data de Nascimento: ____/____/____ IGN **5) Idade:** _____

6) Gênero: Masc Fem

IGN

7) Estado Civil: Acompanhado Não acompanhado IGN

8) Cor de Pele: Branca Negra Parda Outros _____

IGN

9) Renda Familiar: Sem renda 1 a menos de 3 salários mínimos

3 a 5 salários mínimos Mais de 5 salários mínimos IGN

10) Profissão:

- | | | | |
|---|-------------------------------------|---|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Sem profissão | <input type="checkbox"/> Bombeiro | <input type="checkbox"/> Do lar | <input type="checkbox"/> Médico |
| <input type="checkbox"/> Aposentado | <input type="checkbox"/> Camelô | <input type="checkbox"/> Eletricista | <input type="checkbox"/> Motorista |
| <input type="checkbox"/> Assistente social | <input type="checkbox"/> Cobrador | <input type="checkbox"/> Empregada | <input type="checkbox"/> Pedreiro |
| <input type="checkbox"/> Auxiliar/Técnico de enfermagem | <input type="checkbox"/> Cozinheiro | <input type="checkbox"/> Enfermeiro (a) | <input type="checkbox"/> Rodoviário |
| <input type="checkbox"/> Biscateiro | <input type="checkbox"/> Dançarina | <input type="checkbox"/> Faxineiro | <input type="checkbox"/> Outros (10a) |

10a) Especificar: _____

11) Alfabetizado:

- 1º grau completo 2º grau completo 3º grau completo IGN
 1º grau incompleto 2º grau incompleto 3º grau incompleto Analfabetismo

12) Encontra-se em tratamento para tuberculose no momento?

Data do início: ____/____/____ Sim Não IGN

13) Caso sim, esquema em uso?

- Esquema I R (Dosagem: _____); H (Dosagem: _____); Z (Dosagem: _____)
 Esquema IR R (Dosagem: _____); H (Dosagem: _____); Z (Dosagem: _____)
E (Dosagem: _____)
 Esquema II R (Dosagem: _____); H (Dosagem: _____); Z (Dosagem: _____)
 Esquema III
 IGN

**14) Apresenta algumas das doenças abaixo**

- a) Hepatopatias? () Sim () Não () IGN
 b) Neoplasia () Sim () Não () IGN
 c) Doença do colágeno () Sim () Não () IGN
 d) Hanseníase () Sim () Não () IGN
 e) Outra? () Sim (1) () Não () IGN

e1) Especifique: _____

- f) Uso de Corticóide ou imunossupressores () Sim () Não () IGN
 >15mg de prednisona
 >30 dias consecutivos ou drogas citotóxicas

- g) Insuficiência renal crônica (IRC) () Sim () Não () IGN
 h) Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) () Sim () Não () IGN
 i) Desnutrição (perda >15% do peso corporal) () Sim () Não () IGN
 j) Alcoolismo (critério CAGE – Ver abaixo) () Sim () Não () IGN

- J1) Qual tipo de bebida o senhor (a) prefere? () Cachaça () Cerveja () Vinho
 () Whisky () Outros () Nenhum

Caso o paciente admita o uso de qualquer bebida citada acima, responda as perguntas, relacionadas com alcoolismo, abaixo:

- J2) O sr. (a) tem facilidades de fazer () Sim () Não () IGN
 amizades?
 j3) Alguma vez sentiu que deveria diminuir a () Sim () Não () IGN
 quantidade de bebida?
 j4) Alguém critica ou já criticou o seu modo () Sim () Não () IGN
 de beber?
 j5) O sr. (a) costuma beber pela manhã para () Sim () Não () IGN
 diminuir o nervosismo ou a ressaca?
 j6) O sr. (a) sente-se culpado pela maneira () Sim () Não () IGN
 que costuma beber?

Caso a resposta tenha sido SIM a pelo menos 02 das questões (j3, j4, j5 ou j6), assinale alcoolismo como positivo.

- l) Diabetes Mellitus (DM) () Sim () Não () IGN
 Se sim, qual tipo? () Tipo I () Tipo II

Se sim, utiliza algum destes medicamentos abaixo?

- () Tolbutamina Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () Glipizina Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () Clorpropamida Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () Gliburida Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () Glibenclamida Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () Glimepirida Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () Outro (_____) Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () Outro (_____) Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () Outro (_____) Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa

- m) HIV + () Sim () Não () IGN

m1) Uso de retroviral

- () Sim () Não () IGN
 () Efavirenz Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () AZT Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () 3TC Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () D4T Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () Ritonavir Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () Saquinavir Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () Outro (_____) Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () Outro (_____) Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa
 () Outro (_____) Dosagem: _____ Nº comprimidos ao dia: _____ () Não Usa

- m2) SIDA () Sim () Não () IGN

m2.1) Sarcoma de Kaposi

10



m2.2) Tuberculose disseminada/extrapulmonar/pulmonar não cavitária	10
m2.3) Candidíase oral ou leucoplasia pilosa	5
m2.4) Tuberculose pulmonar cavitária ou não especificada	5
m2.5) Herpes zoster em indivíduo com < 60 anos	5
m2.6) Disfunção do sistema nervoso central	5
m2.7) Diarréia > 1 mês	2
m2.8) Febre (38°C) > 1 mês	2
m2.9) Caquexia ou perda de peso > 10% do peso habitual	2
m2.10) Astenia > 1 mês	2
m2.11) Dermatite persistente	2
m2.12) Anemia e/ou linfopenia e/ou trombocitopenia	2
m2.13) Tosse persistente ou qualquer pneumonia (exceto tuberculose)	2
m2.14) Linfadenopatia > 1cm (> 2 sítios extra-inguinais há > 1 mês)	2

Somatório

O critério Caracas revisado para definição de SIDA requer uma sorologia anti-HIV positiva associada ao somatório = 10.

n) Hipertensão Arterial Sistêmica () Sim () Não () IGN

() Amilodipina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Diltiazem	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Felodipina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Lercanidipina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Nisoldipina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Nitrendipina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Verapamil	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Propanolol	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Carisoprostol	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Nifedipina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa

o) Dislipidemia () Sim () Não () IGN

() Atorvastatina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Cerivastatina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa

21) Está tomando qualquer outra medicação

() Sim () Não () IGN

Se sim, descrever

() _____	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() _____	Dosagem: _____	No comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() _____	Dosagem: _____	No comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() _____	Dosagem: _____	No comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() _____	Dosagem: _____	No comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() _____	Dosagem: _____	No comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() _____	Dosagem: _____	No comprimidos ao dia: _____	() Não Usa
() _____	Dosagem: _____	No comprimidos ao dia: _____	() Não Usa

22) No último mês apresentou:

() Poliúria	() Tosse	() Sonolência
() Polidipsia	() Dor precordial	() Turvação da visão
() Polifagia	() Cervicalgia	() Vômitos
() Cefaléia	() Cefaléia occipital	() Náuseas

23) Peso (kg): _____

24) Altura (metro): _____

25) ICM: _____

**26) Evolução****26.1) Glicemia**

Glicemia antes do início de tratamento: _____
Glicemia após 1º mês de tratamento: _____
Glicemia no 2º mês de tratamento: _____
Glicemia no 3º mês de tratamento: _____
Glicemia no 4º mês de tratamento: _____
Glicemia no 5º mês de tratamento: _____
Glicemia no 6º mês de tratamento: _____

26.2) Colesterol Total

Colesterol total antes do início de tratamento: _____
Colesterol total após 1º mês de tratamento: _____
Colesterol total no 2º mês de tratamento: _____
Colesterol total no 3º mês de tratamento: _____
Colesterol total no 4º mês de tratamento: _____
Colesterol total no 5º mês de tratamento: _____
Colesterol total no 6º mês de tratamento: _____

26.3) HDL Colesterol

HDL Colesterol antes do início de tratamento: _____
HDL Colesterol após 1º mês de tratamento: _____
HDL Colesterol no 2º mês de tratamento: _____
HDL Colesterol no 3º mês de tratamento: _____
HDL Colesterol no 4º mês de tratamento: _____
HDL Colesterol no 5º mês de tratamento: _____
HDL Colesterol no 6º mês de tratamento: _____

26.4) LDL Colesterol

LDL Colesterol antes do início de tratamento: _____
LDL Colesterol após 1º mês de tratamento: _____
LDL Colesterol no 2º mês de tratamento: _____
LDL Colesterol no 3º mês de tratamento: _____
LDL Colesterol no 4º mês de tratamento: _____
LDL Colesterol no 5º mês de tratamento: _____
LDL Colesterol no 6º mês de tratamento: _____

26.5) Pressão Arterial

Pressão Arterial antes do início de tratamento: _____
Pressão Arterial após 1º mês de tratamento: _____
Pressão Arterial no 2º mês de tratamento: _____
Pressão Arterial no 3º mês de tratamento: _____
Pressão Arterial no 4º mês de tratamento: _____
Pressão Arterial no 5º mês de tratamento: _____
Pressão Arterial no 6º mês de tratamento: _____

26.6) CD4

CD4 antes do início de tratamento: _____
CD4 no 3º mês de tratamento: _____
CD4 no 6º mês de tratamento: _____

26.7) Carga Viral

Carga Viral antes do início de tratamento: _____
Carga Viral no 3º mês de tratamento: _____
Carga Viral no 6º mês de tratamento: _____



ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo de polimorfismos em base única na região promotora de genes de citocinas e sua possível associação com a tuberculose.

Nos próximos meses será realizado um estudo em pacientes sob suspeita de apresentarem tuberculose. Neste estudo, pretende-se avaliar genes de citocinas que possibilitem correlacionar esses genes com possível proteção ou severidade à doença. Este estudo será coordenado pelo Dr. Afrânio Kritski, Dr. Adalberto Rezende, Dra. Fernanda Queiroz Mello, Dra. Martha Oliveira, profissionais em atividades no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ. Este termo de consentimento explica o estudo, portanto leia cuidadosamente. Pergunte o que julgar necessário. Durante o estudo será esclarecido quanto a eventos que possam alterar a sua permanência no estudo. Você deverá compreender adequadamente o estudo antes de assinar este termo de consentimento.

1) Procedimentos

Se eu concordar em participar deste estudo, responderei a um questionário padronizado que investigará algumas doenças que possam está relacionadas a estes genes.

Serão coletados 5ml de sangue no meu antebraço, na face anterior, com agulha e seringa descartáveis, antecedido por anti-sepsia local. O sangue será utilizado para avaliar a presença de variações genéticas existente na região promotora dos genes de citocinas. Os dados gerados pela análise imunogenética não serão divulgados nominalmente e sim sob forma de frequência.

2) Local do estudo

Estes procedimentos serão realizados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF – UFRJ.

3) Riscos/Desconfortos

Algumas das questões que constam dos questionários podem ser inapropriadas e produzir sentimentos indesejáveis, mas, caso eu ache necessário, poderei interromper a entrevista a qualquer momento. Os riscos da retirada de sangue incluem introdução da agulha, desconforto temporário, pequena ferida e, raramente, infecção local. Não haverá risco financeiro e todos os testes rotineiros para tuberculose serão realizados.

4) Tratamento e compensação por danos

Se eu tiver algum problema de saúde em decorrência deste estudo, o tratamento será fornecido pela instituição participante. O custo deste tratamento será totalmente coberto pelo HUCFF. O HUCFF não prevê nenhuma forma de compensação financeira por possíveis injúrias.

5) Alternativas

Se eu decidir não participar neste estudo, ou interromper a minha participação a qualquer momento, o meu tratamento médico será mantido no HUCFF.

6) Custos para os participantes

Não haverá custos para mim, caso decida pela minha participação neste estudo, nem para o tratamento que porventura necessitar.



7) Benefício

A retirada do meu sangue aos qual eu irei me submeter ajudará no entendimento do desenvolvimento da tuberculose nas pessoas. Com isso, espera-se que mais conhecimentos científicos sejam obtidos com conseqüente poder determinar quem tem mais chances de adoecer por tuberculose.

8) Reembolso

Não haverá benefícios financeiros para mim em participar no estudo.

9) Confidenciabilidade dos dados

Procedimentos serão adotados pelos responsáveis por este estudo no intuito de proteger a confidencialidade das informações que eu forneça. As informações serão codificadas e mantidas num local reservado o tempo todo. Somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso às informações e aos questionários. Após o término deste estudo, as informações serão transcritas dos questionários para arquivos no computador e aqueles serão mantidos em local reservado. Porém, o acesso permanecerá restrito aos mesmos pesquisadores. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida, portanto serão confidenciais como a lei determina, salvo eu conceda permissão para isso. Os resultados serão discutidos comigo e enviados para o meu médico (salvo eu não deseje isso).

CONSENTIMENTO

O Dr. Afrânio e outros pesquisadores discutiram as informações comigo, responderam as minhas perguntas. Receberei uma cópia deste consentimento para mantê-lo comigo. Nos próximos dias, se tiver qualquer dúvida sobre a minha participação neste estudo, poderei utilizar os seguintes números de telefone: (21) 2550-6903 ou (21) 2562-2426, para contactar o Dr. Afrânio Kritski ou Dra. Martha Oliveira.

A PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA É VOLUNTÁRIA

Eu tenho o direito de não concordar em participar ou mesmo de me retirar do estudo em qualquer momento que eu queira, sem riscos para o meu tratamento médico. Se eu desejar e concordar em participar, devo assinar na linha abaixo. Isso significa que compreendi adequadamente as informações fornecidas e este termo de consentimento.

Se eu desejar participar do estudo, permitirei também que meu endereço e telefone sejam anotados em uma folha separada, para facilitar contato comigo quando necessário. Como já foi esclarecida anteriormente, toda informação pessoal será mantida em sigilo.

Assinatura do voluntário
(ou responsável legal)

Nome completo

Nº do prontuário

Assinatura do entrevistador

Nome do entrevistador

_____/_____/_____
Data

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)