

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO-UFRJ**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA**  
**CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS**

**ANÁLISE MOLECULAR PARCIAL DA REGIÃO PROMOTORA DO**  
**GENE QUE CODIFICA PARA INTERLEUCINA -10 (IL-10):**  
**DETERMINAÇÃO DE HAPLÓTIPOS E ASSOCIAÇÃO COM A**  
**SUSCETIBILIDADE A TUBERCULOSE.**

**LIZÂNIA SPINASSÉ BORGES**

**RIO DE JANEIRO**  
**FEVEREIRO DE 2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



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

Análise molecular parcial da região promotora do gene que codifica para Interleucina -10 (IL-10): determinação de haplótipos e associação com a suscetibilidade a tuberculose.

**Lizânia Spinassé Borges**

**Orientadores:**

**Dr. Adalberto Rezende Santos**

Pesquisador Titular – Lab. de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

**Prof. Dr. José Roberto Lapa e Silva**

Professor Titular-Instituto de Doenças do Tórax - IDT  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro  
Fevereiro 2009

**Análise molecular parcial da região promotora do gene que codifica para Interleucina - 10 (IL-10): determinação de haplótipos e associação com a suscetibilidade à tuberculose.**

Lizânia Spinassé Borges

Orientadores:

Dr. Adalberto Rezende Santos

Prof. Dr. José Roberto Lapa e Silva

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica em 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.

Aprovada em 13 de fevereiro de 2009

**Banca Examinadora:**

---

Dr. Neio Lúcio Fernandes Boechat  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Dr. Harrison Magdinier Gomes  
FIOCRUZ - Rio de Janeiro

---

Dr. Gil Fernando da Costa Mendes de Salles  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Aos meus pais, que sem todos os seus ensinamentos de vida, seu carinho e amor eu não conseguiria realizar todas as minhas conquistas. Que perto ou longe de mim, sempre foram o meu exemplo de vida...

Agradeço e dedico as minhas vitórias.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minhas irmãs, pelo carinho, amor, suporte, força, durante a realização desse trabalho. Que sempre tiveram perto de mim nas horas de dificuldades, a distância é apenas física. Poucas são as palavras de gratidão a vocês. Amo vocês.

Agradeço aos meus amigos de infância, Renato, Letícia, Clarinha, embora longe de mim pelas circunstâncias da vida, sempre tentamos manter o contato, compartilhando as alegrias e as tristezas desse período. A minha querida amiga Taís, que sempre mostrou ser uma irmã para mim me ajudando muito em todas as horas em muitos momentos, obrigado por essa amizade de infância existir até hoje. A Daniella pela amizade e paciência de dividir o apartamento em Niterói desde a época da faculdade.

Ao Chefe do Laboratório Dr. Philip Noel Suffys pela oportunidade, e principalmente pelo apoio financeiro para execução desse trabalho, serei eternamente grata.

O meu querido orientador Dr. Adalberto Rezende Santos, é um grande amigo, uma das pessoas mais humanas que conheci, e que tenta transmitir que a vida é uma longa lição de humildade. “Para ter sentimentos nobres não é necessário nascer nobre”, Charles Lamb. Muito obrigada Chefe.

Ao meu orientador Prof. José Roberto Lapa e Silva que me deu a oportunidade da realização desse trabalho com apoio e confiança.

Ao Prof. Maurício Gama pela paciência com as análises estatísticas.

A minha amiga Raquel pela amizade pessoal, carinho, companheirismo, ser minha família em Niterói. Obrigada também pelas ajudas científicas compartilhadas ao longo dos anos.

A Carol, que de uma simples carona transformou em uma grande amiga, que compartilha comigo sua família nas datas festivas, me ajudou muito na formatação dessa dissertação.

As “Amigas da Carona”, Mariana, Carol, Raquel, Larissa, Paula e Renata, por transformarem essa carona em laços de amizades. Obrigada pelo carinho e amizade nesse trabalho.

A minha amiga querida e “mãe” Marcinha Quinhones, que ajudou a dar os primeiros passos na minha vida científica desde a época do PIBIC, sempre me ajudou com seus conhecimentos na elaboração dos experimentos, compartilhou comigo as dificuldades enfrentadas nessa dissertação, ensinou a trabalhar de forma organizada e econômica. Muito obrigada por ter uma pessoa como você do meu lado.

Ao amigo Harrison, que sempre encontrava palavras certas e muita paciência para me acalmar, quando eu fazia uma tempestade nas piores horas da execução desse trabalho. Obrigada por sua amizade.

Ao amigo e colaborador Dr. Antônio Basílio de Miranda, que compartilhou seus conhecimentos na área de bioinformática para a utilização dos softwares. Muito obrigada pela dedicação.

A todos do laboratório: Amanda, Mara, Milena, Sidra, Lia, Márcia Aparecida, Rafael, Vinicius, Diego, Alexandre, Adalgiza, Luís Cláudio, Luís Ney, Luciene, Roger, Érica, Atiná, Jorge Luís, Chyntia, Paulo, pelo convívio, e por compartilhar os momentos desse trabalho.

Aos amigos do pavilhão 26 que sempre estavam prontos para me ajudar na hora que precisei, principalmente, a Aline “perturbei” muito, obrigada pela paciência, aos amigos Érico, Marcelo e Leonardo.

Aos amigos da UPT, principalmente a Joseane, a Adriana, que sempre solícitas, sem elas as amostras seriam impossíveis. Obrigada.

A banca pela disponibilidade.

A Teresa Gouda pela sua dedicação aos alunos de pós na parte burocrática.

A todos da Hanseníase que participaram direta ou indiretamente, obrigada.

A plataforma PDTIS/Sequenciamento/Fiocruz.

"A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar."

Eduardo Galeano

## RESUMO

A Tuberculose (TB) é uma das enfermidades infecciosas mais antigas que assolam a humanidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 9,2 milhões de novos casos são identificados por ano. O Brasil encontra-se em 16º lugar na lista dos 22 países responsáveis por 80% dos casos de TB no mundo. A resistência à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) depende de uma resposta imune complexa que pode controlar todo o processo de infecção ou permitir o progresso da tuberculose latente para a doença ativa. Como descrito na literatura, as variações interindividuais na produção das moléculas envolvidas com esta resposta, principalmente nos genes de citocinas, está diretamente relacionada ao “background” genético. A Interleucina-10 (IL-10) é uma importante citocina anti-inflamatória envolvida em diversas etapas da resposta imune, e variações genéticas como os polimorfismos de base única (SNPs), principalmente na região promotora do gene que codifica para esta citocina, podem influenciar na produção da mesma. No presente estudo, procedemos ao mapeamento de parte da região promotora do gene que codifica para IL-10 em de amostras de DNA provenientes de 492 indivíduos, sendo 221 pacientes e 271 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 da tuberculose em 139 portadores de TB pulmonar, 43 portadores de TB extrapulmonar e 271 contatos, sendo 126 positivos no teste intradérmico de tuberculina (TST+) e 145 negativos (TST-). Após a genotipagem por sequenciamento, treze SNPs foram identificados na região de interesse, sete das quais ainda não descritos na literatura. No estudo de associação, baseado na comparação das frequências alélicas, genótípicas e de haplótipos, sugerimos uma forte associação com a suscetibilidade a tuberculose dos SNPs nas posições -1189, -840 e -464. No desfecho associado a proteção contra o desenvolvimento de TB ativa, houve associação dos SNPs nas posições -750. Os SNPs mais estudados e caracterizados (posições -1117, -854, -627, também reportados respectivamente como -1082, -819 e 592), não apresentaram associação com nenhum dos desfechos analisados, bem como os outros SNPs descritos. Foram analisados para o estudo de associação 3 haplótipos com as maiores frequências alélicas e não houve associação haplotípica com a suscetibilidade *per ser*, gravidade ou proteção à tuberculose.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is one of the oldest infectious diseases which affect humankind. According to the World Health Organization (WHO 2008), there are 9.2 million new patients a year. Brazil is the 16<sup>th</sup> nation in the list of 22 countries responsible for 80% of TB cases in the world. The infection by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) depends on a complex immune response which can control the whole infection process or can permit the tuberculosis progress from latent to the active disease. As previously described in a number of studies, the interindividual variations in the production of these molecules particularly in the cytokine genes are directly related to the genetic background. Interleukin-10 (IL-10) is an important anti-inflammatory regulatory cytokine involved in several areas of the immune system, and genetic variations such as polymorphisms (SNPs), mainly in the promoted region, can influence its production. In the present study, the mapping of part of the gene promoted region which codifies to IL-10 in DNA samples from 492 individuals was done, being 221 patients and 271 healthy control subjects, not related and without previous TB history, all of them living in Rio de Janeiro, and the possible polymorphism found with different results in tuberculosis in 139 pulmonary TB patients, 43 extra-pulmonary TB patients and 271 control subjects were investigated, being 126 positive (TST+) and 145 negative (TST-) in the tuberculin intradermic test. After genotyping, thirteen polymorphisms (SNP) were identified in the promoted region of IL-10, 7 of them (SNPs) have not yet been described in the literature. In the association study, based in the comparison of allelic, genotypic and haplotypic frequencies, there is a strong association with tuberculosis susceptibility, SNPs in the -1189, -840 and -464 positions. In the outcome associated to the protection, SNPs in the -750 position was found. The most studied and characterized SNPs (positions -1117, -854, -627, also reported respectively as -1082, -819 and -592), did not present any association with analyzed results, as well as with the other described SNPs. Three haplotypes with the highest allelic frequencies were analyzed for the study of the association, and there was no haplotypic association with the susceptibility *per se*, gravity or protection to tuberculosis.

## LISTA DOS QUADROS

	<b>Página</b>
<b>Quadro 1:</b> Esquema de tratamento da TB preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil.	15
<b>Quadro 2:</b> Iniciadores utilizados na reação de seqüenciamento.	41
<b>Quadro 3:</b> Variação na concentração de Mg <sup>2+</sup> e dNTPs.	49
<b>Quadro 4:</b> Condições ideais para a amplificação do gene de <i>IL-10</i> (fragmento 1).	51
<b>Quadro 5:</b> Condições ideais para a amplificação do gene de <i>IL-10</i> (fragmento 2).	52
<b>Quadro 6:</b> Haplótipos ausentes no grupo dos Pacientes.	75
<b>Quadro 7:</b> Haplótipos ausentes no grupo dos Contatos.	75

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Estimativa do número de casos novos de TB no mundo em 2006 (Adaptado de: OMS report 2008).	8
<b>Figura 2:</b> Distribuição do Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> na espécie humana (círculos preenchidos) e animais (círculos abertos). Os círculos verdes representam <i>M. canetti</i> , os círculos azuis <i>M. caprae</i> , em rosa <i>M. microti</i> , e em laranja <i>M. pinnipedii</i> (Djelouadj et al, 2008).	10
<b>Figura 3:</b> Hospedeiro e patógeno. O reconhecimento no pulmão do hospedeiro: ligação do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (laranja) ao receptor TLR2 na superfície do macrófago (verde). Adaptado de Kaufmann HE, 2008.	12
<b>Figura 4:</b> Ilustração da estratégia utilizada para a amplificação de parte da região promotora do gene que codifica para <i>IL-10</i> . O fragmento 1 com 1001 pb e o fragmento 2 com 565pb.	38
<b>Figura 5:</b> Ilustração da ciclagem na metodologia de sequenciamento.	41
<b>Figura 6:</b> Página inicial do Software SeqScape® versão 2.6 mostrando os projetos programados.	43
<b>Figura 7:</b> Ilustração da utilização do Software v.2.6. 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 foram detectado 2 SNPs, ou seja, 2 bases se apresentam distintas da seqüência referência (7B). A imagem 7C mostra o indivíduo sem nenhuma SNP encontrado nesta região do gene.	44
<b>Figura 8:</b> Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Contendo amostras de DNA extraído de sangue total com o kit “Flexigene Qiagen”. Linhas: 1-17 DNA proveniente de 17 amostras de pacientes.	48
<b>Figura 9:</b> PCR de gradiente para a padronização da amplificação da região promotora do gene de <i>IL-10</i> ( <b>fragmento 1</b> ): Linhas: (1) Marcador molecular de 100 pb (DNA ladder); (2 a 13) produtos amplificados nas diferentes temperaturas: (2) 66,°C, (3) 66,1°C, (4) 66,3°C, (5) 66,9°C, (6) 67,1°C, (7) 67,6°C, (8)68,3°C, (9) 68,8°C, (10) 69,3°C, (11) 69,6°C (12) 69,9°C (13) 70,0°C.	50
<b>Figura 10:</b> PCR de gradiente para padronização da amplificação da região promotora do gene de <i>IL-10</i> ( <b>fragmento 2</b> ): Linhas: (1) Marcador molecular 100 pb (DNA ladder); (2 a 11) produtos amplificados nas diferentes temperaturas: (2) 55,1,°C, (3) 55,3°C, (4) 56,3°C, (5) 57,7°C, (6) 59,4°C, (7) 61,4, (8) 63,3°C, (9) 65,3°C, (10) 67,6°C, (11) 69°C.	51

<b>Figura 11:</b> Poços 2-16 amplificação do fragmento 1 (1001pb) das amostras dos pacientes 1P-16P; (1) Marcador molecular de 100pb (DNA ladder).	52
<b>Figura 12:</b> Poços 2-11 amplificação do fragmento 2 (565pb) das amostras dos pacientes 1P-11P; (1) Marcador molecular de 100pb (DNA ladder).	53
<b>Figura 13:</b> Purificação dos produtos amplificados do fragmento 1 (1001pb) com Kit ChargeSwitch da Invitrogen, amostras dos contatos 1C a 16C.	53
<b>Figura 14:</b> Purificação dos produtos amplificados do fragmento 2 (565pb) com kit ChargeSwitch® da Invitrogen, amostras dos contatos 1C a 16C.	53
<b>Figura 15:</b> Estratégia de amplificação e sequenciamento do gene de <i>IL-10</i> (Seqüência parcial da região promotora do gene que codifica para <i>IL-10</i> retirada das seqüências referências AF418271 para o <b>fragmento 1</b> e Z30175 para <b>fragmento 2</b> ). O esquema mostra a região de anelamento dos iniciadores utilizados para amplificação e/ou sequenciamento bem como a região de interesse (negrito) mostrando em amarelo o ATG, códon de início da tradução. Em verde, os iniciadores Sense e Antisense usados para amplificação e sequenciamento do <b>fragmento 2</b> . Em vermelho iniciadores externo sense e interno Antisense ( <b>fragmento 1</b> ) e em azul primer interno Antisense e o externo Antisense ( <b>fragmento 1</b> ), os iniciadores externos Sense e Antisense foram utilizados para a amplificação (produto de 1001pb) e sequenciamento, os iniciadores internos sense e antisense do <b>fragmento 1</b> , foram utilizados somente para a reação de sequenciamento.	55
<b>Figura 16:</b> Ilustração na identificação dos SNPs no gene de <i>IL-10</i> através da visualização do cromatograma apresentado pelo programa SeqScape. Esta figura ilustra um SNP tri-alélico na posição -1162 encontrada na região promotora do gene <i>IL-10</i> . (A) um indivíduo (40P) homozigoto tipo selvagem, a imagem mostra apenas um pico referente à base nucleotídica Adenina; (B) indivíduo (116P) homozigoto mutante, a imagem mostra apenas um pico referente à base nucleotídica Guanina; (C) indivíduo (33P) heterozigoto, a imagem mostra 2 picos referentes às bases nucleotídicas Adenina e Guanina e (D) indivíduo (58P) heterozigoto, a imagem mostra 2 picos referentes às bases nucleotídicas Adenina e Timina.	57
<b>Figura 17:</b> Seqüência representando o produto amplificado da região promotora do gene de <i>IL-10</i> (fragmento 1 1001pb e fragmento 2 565pb) com a identificação dos SNPs encontrados. O esquema mostra a região de anelamento dos iniciadores externos utilizados para amplificação e os iniciadores internos usados somente para o sequenciamento (sublinhados em lilás).	58
<b>Figura 18:</b> Esquema da região amplificada do gene <i>IL-10</i> contendo os SNPs encontrados em relação aos sítios de ligação dos fatores de transcrição. (Adaptada de Eskdale <i>et al</i> 1997).	59

**Figura 19:** Visão da tabela de contingência em 3D do SNP na posição -627 substituição de uma Citosina (C) por uma Adenina (A). Esta figura mostra a frequência aumentada do genótipo heterozigoto CA nos dois grupos analisados (paciente e contatos). 67

**Figura 20:** Visão da tabela de contingência em 3D do SNP na posição -854 substituição de uma Citosina (C) por uma Timina (T). Esta figura mostra o genótipo heterozigoto CT é o mais freqüente nos dois grupos analisados (paciente e contatos). 67

**Figura 21:** Visão da tabela de contingência em 3D do SNP na posição -1117 substituição de uma Guanina (G) por uma Adenina (A). Esta figura mostra que a variável mutante Adenina encontra-se em alta frequência nos dois grupos analisados, sendo o homozigoto mutante mais frequente em ambos os grupos. 68

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1:</b> Descrição das frequências absolutas e alélicas dos 13 SNPs encontrados na população estudada.	60
<b>Tabela 2:</b> Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos identificados na região de interesse do promotor do gene de <i>IL-10</i> no total de indivíduos analisados.	62
<b>Tabela 3:</b> Descrição dos haplótipos identificados no gene de <i>IL-10</i> (n=492) e suas respectivas frequências.	64
<b>Tabela 4:</b> Avaliação de associação entre os diferentes genótipos presentes no promotor do gene <i>IL-10</i> com a suscetibilidade <i>per se</i> a ocorrência de TB ativa.	69
<b>Tabela 5:</b> Avaliação de associação entre os diferentes genótipos presentes no promotor do gene <i>IL-10</i> com suscetibilidade <i>per se</i> a ocorrência de TB ativa. Comparação com os Contatos TST positivos.	70
<b>Tabela 6:</b> Avaliação da associação entre os diferentes genótipos presentes no promotor do gene <i>IL-10</i> com a gravidade da TB.	71
<b>Tabela 7</b> Avaliação da associação entre os diferentes genótipos separadamente com capacidade de infecção TST+/TST-.	72
<b>Tabela 8:</b> Avaliação da associação entre os diferentes genótipos presentes no promotor do gene <i>IL-10</i> suscetibilidade a gravidade da Tuberculose. (TB extrapulmonar – TST+).	73
<b>Tabela 9:</b> Avaliação de associação entre o haplótipo 1, 4 e 16 com a suscetibilidade <i>per se</i> a ocorrência de TB ativa. Analisando os Contatos TST positivos.	75
<b>Tabela 10:</b> Avaliação de associação entre o haplótipo 1, 4 e 16 com a suscetibilidade <i>per se</i> a ocorrência de TB pulmonar. Analisando os Contatos TST positivos.	76
<b>Tabela 11:</b> Avaliação da associação entre os haplótipos 1, 4 e 16 com a suscetibilidade a gravidade da Tuberculose. (Tuberculose Extrapulmonar <i>versus</i> TST+).	76

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	Adenina
aa	Aminoácido
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
C	Citosina
DHEA	<i>Dehydroandrosterone</i>
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DNA	Ácido desoribonucléico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato (N= A, C, G ou T)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
G	Guanina
GLcB	Malato sintetase
HAART	<i>Highly active anti-retroviral therapy</i>
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular tipo 1
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-12RB1	Receptor B1 de Interleucina12
IL-6	Interleucina-6
INH	Isoniazida
LAM	Lipoarabinomana
LBP	Proteína ligante de LPS
LPS	Lipopolissacarídeos

LSPs	<i>Large Sequences Polymorphims</i>
LTA	Linfotoxina- $\alpha$
LTB	<i>Heat-labile enterotoxin</i>
<i>M.tb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MBL	Mannose Binding Lectin
MDR	Multidrogas resistentes
Mg <sup>++</sup>	Magnésio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MPT51	proteína de ligação à fibronectina
MR	Receptor de manose
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MTC	Complexo <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFkB	Fator nuclear kappa B
NK	Natural killer
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Razão de Chance
PAS	Ácido paramino salicílico
pb	Par (es) de base (s)
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PPD	Derivado protéico purificado
PT	Prova tuberculínica
PZA	Pirazinamida
RFLP	Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucléico
RNI	Radicais intermediários de nitrogênio
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sufato de Sódio
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SLC11A1	<i>Solute carrier family 11 member 1</i>
SNPs	Polimorfismos de Base Única
SP	Proteína surfactante
STAT	Sinal Tradutor e Ativador da Transcrição
T	Timina
TAE	Tris-Acético-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Tuberculose
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de células T
TE	Tris-EDTA
Th1	Células T <i>helper</i> tipo 1
TLR	Receptor tipo Toll
TLR2	Toll Like receptor 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral -alfa

Tris-	Trishidroximetilamino metano
TST	Teste Cutâneo da Tuberculina
UTR	Região não transcrita
UV	Ultravioleta
VDR	Receptor de vitamina D
XDR-TB	Extensively drug resistant

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão da Literatura.....</b>	<b>5</b>
2.1 Tuberculose: História Natural.....	5
2.2 Epidemiologia da Tuberculose.....	7
2.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	8
2.4 Patogênese da doença.....	11
2.5 Tratamento Quimioterápico da Tuberculose.....	13
2.6 Suscetibilidade Genética as doenças Infecciosas e Tuberculose.....	16
2.6.1 Imunopatogenia da Tuberculose e Imunidade Inata.....	18
2.6.2 Formação do Granuloma.....	21
2.6.3 Imunidade Adaptativa na Tuberculose.....	22
2.6.4 As citocinas e os polimorfismos nos genes candidatos influencia na resposta imune a Tuberculose.....	24
2.6.5 Estado da arte do gene avaliado nesse estudo.....	27
2.6.5.1. <i>Interleucina -10</i> .....	27
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>32</b>
3.1 Objetivo Principal.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
<b>4. Pacientes e Métodos.....</b>	<b>33</b>
4.1 Delineamento do Estudo.....	33
4.2 Período de Estudo.....	33
4.3 Local de Estudo.....	33
4.3.1 Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz - IOC/ Laboratório de Biologia Molecular aplicada a Micobactérias.....	33
4.3.1.1 Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz / IOC / Departamento de Biol. Molecular / Lab. de Genômica Funcional e Bioinformática.....	33
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).....	34
4.3.3 Hospital Estadual Santa Maria.....	34
4.4 Critérios de inclusão.....	34
4.4.1 Pacientes com tuberculose ativa.....	34
4.4.2 Contatos.....	34
4.5 Critérios de exclusão.....	35
4.6 Grupos de estudo.....	35
4.7 Coleta e processamento das amostras clínicas.....	35
4.8 Suporte Financeiro.....	35
4.9 Metodologia.....	36
4.9.1 Extração de DNA genômico.....	36
4.9.1.1 Método “in house”: purificação de DNA genômico a partir de sangue total por fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1).....	36
4.9.1.2 Purificação de DNA genômico a partir do Kit Flexigene (Qiagen).....	37
4.9.2 Amplificação de parte da região regulatória do gene que codifica para IL-10.....	37

4.9.3 Eletroforese em gel de agarose.....	38
4.9.4 Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento com acetato de amônio 7,5 M.....	39
4.9.5 Purificação dos produtos de PCR, para sequenciamento, com Kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up (Invitrogen).....	39
4.9.6 Sequenciamento automatizado.....	40
4.9.7 Análise das seqüências e identificação das SNPs presentes na região promotora do gene que codifica para Interleucina-10 (IL-10).....	42
4.10 Construção haplótica dos SNPs encontrados na região promotora do gene que codifica para Interleucina-10 (IL-10) utilizando o Software PHASE versão 2.1.1.....	45
4.11 Análise estatística.....	45
4.12 Aspectos Éticos.....	46
<b>5. Resultados.....</b>	<b>47</b>
5.1 Padronização do procedimento técnico utilizado.....	48
5.1.1 Extração de DNA genômico a partir de sangue total utilizando o Kit “FlexiGene DNA” (Qiagen).....	48
5.1.2 Padronização das condições para a amplificação da região de interesse do gene que codifica para Interleucina-10.....	49
5.2 Amplificação das amostras após a padronização e purificação dos produtos amplificados.....	52
5.3 Sequenciamento e análise dos SNPs encontrados em parte da região promotora do gene que codifica para IL-10 através do programa SeqScape (Applied Biosystems) v 2.6.....	54
5.4 Mapeamento dos SNPs encontrados em relação aos possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição com importância molecular nesta região.....	59
5.5 Análise descritiva dos polimorfismos identificados na região de interesse do gene de <i>IL-10</i> na população estudada (n=492).....	60
5.6 Estudo de associação.....	66
<b>6. Discussão.....</b>	<b>77</b>
6.1 Polimorfismos na região promotora de <i>IL-10</i> e sua associação com TB.....	79
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>84</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>99</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa de evolução crônica e tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*, uma bactéria aeróbia que estabelece a sua infecção preferencialmente nos pulmões. Devido ao seu ressurgimento, em abril de 1993 a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou a doença como uma emergência global. Dentre os principais fatores envolvidos com o agravamento e progressão da doença, estão alguns fatores, como a desigualdade social e suas implicações, aglomerados populacionais, o advento da AIDS, movimentos migratórios e envelhecimento da população. Neste contexto, o impacto econômico da TB nos países em desenvolvimento é dramático: cerca de 83% dos casos notificados pertence a esses países e o Brasil hoje ocupa o 16º lugar no “ranking” dos 22 países com as maiores taxas de incidência da doença, com cerca de 90-95 mil casos novos e re-tratados de TB em todo território nacional. Também contribuem para o adoecimento por TB fatores genéticos de risco, como polimorfismos de base única em genes que codificam para marcadores de inflamação, principalmente citocinas e seus receptores. Paralelamente, um outro fator marcante para o ressurgimento e disseminação da TB foi o aparecimento de cepas de *M. tuberculosis* apresentando resistência ao tratamento com múltiplas drogas (MDR), e, mais recentemente, as cepas de *M. tuberculosis* extensivamente resistentes (XDR).

Após a infecção humana com o *M. tuberculosis*, diferentes desfechos podem ocorrer, desde o desenvolvimento da TB ativa ou a infecção latente. As estatísticas demonstram que, dos indivíduos que se infectam, apenas de 5 a 10% desenvolvem TB ativa, e a capacidade de resposta imune do hospedeiro frente ao *Mycobacterium tuberculosis* com a regulação dos componentes imunes é que influencia o decurso e a progressão da doença no seu hospedeiro natural, o homem. Quando a infecção ocorre, uma ampla cascata de eventos, incluindo a resposta imune inata, dá início a ativação de uma resposta imune específica (resposta imune adaptativa) provida de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> regulada por citocinas e outros mediadores imunológicos. Cerca de 70% dos indivíduos expostos ao bacilo contêm a infecção na porta de entrada. Dos 30% que desenvolvem a infecção latente, a imensa maioria não apresenta qualquer conseqüência clínica, e cerca de 10% dos indivíduos infectados desenvolvem a doença ativa. Dados da literatura demonstram que um terço da população mundial, aproximadamente 2 bilhões de pessoas, possuem a forma latente da tuberculose, esses indivíduos representam um reservatório da doença, podendo posteriormente desenvolver a forma ativa, através de uma reativação ou re-infecção. Uma vez que a resposta imune efetiva, mediada por um conjunto de moléculas e seus receptores tem como origem o perfil genético,

variações interindividuais na resposta do hospedeiro frente a um determinado patógeno representam fatores de extrema importância para a determinação de suscetibilidade, gravidade ou mesmo proteção à doença a qual provavelmente é o resultado dos efeitos ambientais contra o perfil genético. Na tuberculose, especificamente, vários autores têm revisto a influência de polimorfismos em genes candidatos relacionados à resposta anti *Mycobacterium tuberculosis* na predisposição a doença ativa com resultados significativos para polimorfismos nos genes que codificam para; receptor de vitamina D<sub>3</sub>, IL-12 (interleucina-12), IL-12RB1 (receptor B1 de interleucina-12), IFN- $\gamma$  (interferon-gama), MBL (lectina ligadora de manose), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), SLC11A1 (*Solute carrier family 11 member 1*), IL-10 (interleucina 10) (Casanova, 2004; Malik, 2002 e Cooke, 2001) e no Locus genético HLA (antígenos leucocitários humanos). A expressão dos genes que codificam para as diferentes citocinas pode variar em decorrência de vários fatores ambientais e genéticos. Hoje, admite-se que a variabilidade genética, representada por polimorfismos de base única (SNPs) localizados principalmente na região promotora de vários genes de citocinas e seus receptores representam os principais fatores genéticos relacionados com os diferentes desfechos possíveis em doenças de origem infecciosa ou não. Neste contexto, os SNPs presentes no gene que codifica para a interleucina-10 (IL-10) têm sido extensamente estudados, uma vez que trata-se de uma citocina de comprovada importância, no controle das funções dos macrófagos e na resposta inflamatória regulando a produção de TNF- $\alpha$  e outras citocinas proinflamatórias. A IL-10 é produzida inicialmente, após a fagocitose do *M. tuberculosis*, pelos macrófagos. Níveis elevados de RNAm para esta citocina já foram identificados em células mononucleares circulantes, no sítio de infecção pleural e em lavado broncoalveolar (Shaw *et al*, 2000, Aubert Pivert *et al*, 2000). De acordo com Eskdale *et al* (1998), após estimulação em cultura de sangue com lipopolissacarídeo bacteriano, mostrou uma grande variação interindividual nos níveis da secreção de IL-10 entre gêmeos monozigóticos, dizigóticos e indivíduos não correlacionados sanguineamente, sugerindo que as diferenças hereditárias na produção de IL-10 pode ser estimada em 75%.

Com o término do projeto genoma humano e com a disponibilização de sequências referências e das informações contidas nas bases de dados, os estudos para a avaliação da variabilidade genética interindividual e determinação de fatores de risco para diferentes desfechos imunológicos, ou mesmo na área da farmacologia, vêm sendo desenvolvidos com frequência. De acordo com as informações obtidas no projeto genoma, os polimorfismos de base única (SNPs) representam a mais abundante fonte de variação genética no genoma

humano. Estudos de associação de SNPs com fenótipos de doenças humanas tem grande potencial para aplicação clínica direta para diagnóstico, prognóstico e possivelmente novos alvos terapêuticos. Portanto, a 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, e nenhuma estratégia simples poderia identificar todos os genes potencialmente envolvidos em tal desfecho devido às limitações nos desenhos de estudo. Dentre as estratégias disponíveis, os estudos de ligação no genoma humano podem ser usados para identificar regiões do genoma que potencialmente poderiam albergar um locus envolvido com o desfecho de suscetibilidade à doença na população em geral. Estudos de famílias com pares de irmãos ou com gêmeos monozigóticos e dizigóticos, que contenham dois irmãos afetados pela doença de interesse, são normalmente selecionados pois estes são mais prováveis ter a doença típica do que os estudos em uma população geral. Este método permite a localização de genes que estejam mais fortemente ligados com a 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). 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 microrganismo invasor e o sistema imune do hospedeiro é muito importante para a identificação dos mecanismos envolvidos na proteção, pois seria de extrema valia, por exemplo, no desenho de novas estratégias de vacina (Van Helden, 2003).

O gene de IL-10 localiza-se no braço longo do cromossomo 1 entre a região q31-q32 (GeneID: 3586 Pubmed) e apresenta cinco exons e quatro introns incluindo as regiões 5' e 3' UTR. A região promotora é caracterizada e descrita como um fragmento de 4200bp. O gene de 4.9Kb, transcreve um RNAm linear de 1.6Kb e traduz uma proteína de 178aa. O gene humano de IL-10 é extremamente polimórfico e essas variações são as responsáveis nos diferentes níveis de IL-10 (Kube *et al*, 2001): existem quarenta e nove polimorfismos descritos no gene que codifica para a *IL-10*, dos quais quarenta e seis são SNPs e dois são microsatélites (deleção de 3 pb). Vinte e oito destes polimorfismos estão na região promotora e vinte estão em regiões intrônicas (não codificantes) ou são substituições sinônimas. Somente uma resulta na troca de aminoácido (Howell *et al*, 2006). Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados para a avaliação da possível associação entre os polimorfismos presentes na região promotora do gene que codifica para a *IL-10* e os diferentes desfechos da TB, com resultados diversos. Dentre os polimorfismos mais estudados estão as variações

alélicas presentes em três diferentes posições da região promotora -627C/A, -854C/T e -1117G/A, de acordo com Eskdale *et al* (1997), também reportadas respectivamente como -592 C/A, -819 C/T e -1082 G/A por Turner *et al* (1997). Segundo Delgado *et al* (2002), em estudo realizado na população do Camboja, a heterozigozidade do SNP -1117 está diretamente associada a suscetibilidade à TB pulmonar. Em 2006, Henao e colaboradores mostraram uma forte associação entre o genótipo homozigoto A/A para o mesmo SNP (-1117) e a suscetibilidade a forma pleural da tuberculose associada à baixa produção de IL-10 na população da Colômbia. Neste estudo, nenhuma associação foi encontrada entre os três possíveis genótipos e a suscetibilidade a tuberculose pulmonar. Vários estudos foram conduzidos em outras populações e nenhuma associação entre os possíveis genótipos do SNP -1117 e os diferentes desfechos de TB foi observado. Em contrapartida as diferenças étnicas na distribuição da diversidade dos polimorfismos no gene de IL-10 também são fatores importantes para determinar a suscetibilidade ou gravidade das doenças infecciosas (Opdal 2004, Moraes *et al* 2003).

Neste contexto, este trabalho teve como principal objetivo mapear, através de sequenciamento, parte da região regulatória (região promotora) do gene que codifica para *IL-10* em um grupo de pacientes com tuberculose pulmonar e/ ou extrapulmonar, e um grupo de contatos domiciliares sem TB ativa sob risco de se infectarem pelo bacilo da TB, com ou sem informação sobre a resposta ao teste cutâneo da tuberculina (TST+;TST-). Como consequência do trabalho, realizamos também uma análise para identificar, através de um estudo caso controle, a possível associação dos polimorfismos encontrados com os diferentes desfechos clínicos e demográficos, tais como a suscetibilidade ao desenvolvimento de TB ativa, gravidade da doença e resistência do hospedeiro ao desenvolvimento de TB ativa após infecção pelo *M. tuberculosis*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Tuberculose: História Natural

A Tuberculose Humana (TB) é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb), uma bactéria aeróbia e patogênica que estabelece a sua infecção preferencialmente nos pulmões. De acordo com Frieden (2003), o *M. tuberculosis* mata mais indivíduos que qualquer outro agente infeccioso.

Dados históricos sugerem que a primeira descrição da doença veio de textos da Índia, da China e da Grécia antiga na qual a tuberculose pulmonar já era conhecida como tísica (do grego “phthisikos”). Relatos antigos demonstram que a TB foi documentada no Egito a cerca de 5000 anos, na Índia aproximadamente 3300 anos e na China á 2300 anos atrás, todos os relatos apresentando anormalidade e deformidade óssea, características da deformidade de Pott (Ducati *et al* 2006). Na América também foram documentados achados arqueológicos de múmias com tuberculose primária, especificamente na região dos Andes (Daniel, 2006). Segundo Daniel (2006), no ano de 460 a.C, Hipócrates descreveu uma maior incidência da tuberculose ativa em jovens no início da fase adulta (de 18 a 35 anos). Aristóteles, por volta de 384-322 a.C, acreditava na natureza infecciosa da doença, assim como nos tempos romanos, quando os médicos geralmente acreditavam nesta hipótese. Entretanto, outros autores da Grécia acreditavam que era uma doença hereditária. Contudo, o senso comum sobre o desenvolvimento da TB não foi alcançado antes da Renascença. O século XVII viu a tuberculose alcançar proporções epidêmicas. O norte da Europa apresentou seus valores máximos de prevalência até o final do século XIX, devido à rápida urbanização e industrialização, contudo, o início deste século presenciou os maiores progressos na guerra contra a TB: a) o desenvolvimento da patologia, que correlacionou à fase clínica com observações pós-morte, e b) o diagnóstico objetivo da TB.

As primeiras especulações acerca da TB foram propostas pelo médico britânico Benjamim Marten em 1722, o qual sugeriu que a tuberculose deveria ser transmitida através da respiração de um indivíduo doente para um indivíduo sadio através do processo de inalação. Em 1819, o francês René Laennec, inventor do estetoscópio, determinou pela primeira vez que o “tubérculo” conhecido como granuloma, estava presente em todas as manifestações da doença (Ducati *et al*, 2006). O ano de 1885 marca o começo da era moderna, ponto no qual as pesquisas experimentais finalmente começaram a desvendar o mistério sobre a exata natureza dessa patologia que foi responsável por milhões de mortes humanas no passado, quando ainda

não havia métodos de tratamento e diagnóstico. O médico francês, Jean-Antoine Villemim reportou seu sucesso na transmissão da tuberculose do homem para coelhos por inoculação, entretanto seus achados foram ignorados por seus contemporâneos por muito tempo. Um dos maiores marcos para a história da TB ocorreu em 24 de março de 1882, quando Hermann Heinrich Robert Koch apresentou para “Berlin Physiological Society” seu trabalho descrevendo o isolamento do *M.tb* de tubérculos macerados. Este trabalho experimental consistiu em: isolar, identificar e cultivar a bactéria *in vitro* em meio de cultura artificial, designando o postulado de Koch-Henle como: isolamento do organismo patogênico da lesão produzida pela enfermidade, propagação deste em meio de cultura *in vitro*, a inoculação do agente etiológico capaz de produzir a doença em cobaias, e o re-isolamento do agente etiológico provenientes das cobaias infectadas experimentalmente. Em 1890 Koch descobriu a tuberculina que foi documentada como a principal ferramenta para o diagnóstico da TB.

Finalmente, em 1905, Robert Koch foi agraciado com o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pela elucidação da etiologia da Tuberculose.

A primeira metade do século XX foi uma época de grandes progressos para o conhecimento sobre essa enfermidade, sendo um dos mais importantes a descoberta das diferentes formas clínicas da doença, o que levou a grandes avanços para a questão do tratamento. Especificamente, a década de 40 constituiu um novo período para o tratamento da TB, devido a introdução do uso de antibióticos.

Segundo os relatos históricos de Ducati (2006), acredita-se que a tuberculose tenha sido introduzida no Brasil por portugueses e missionários Jesuítas em 1500. Vários pesquisadores brasileiros, dentre os quais Ruffino-Netto e Pereira, têm procurado entender e discutir aspectos sobre a evolução da TB no Brasil, com base em fatores sócio-econômicos, demográficos e políticos, desde a chegada da família real Portuguesa em 1808 até o final da década de 80. De acordo com os mesmos, as medidas para a contenção da doença foram introduzidas inicialmente por Arlindo de Assis, em 1927, com a administração de BCG oral para recém-nascidos. Em 1973, a injeção intradérmica foi implementada, tornando-se obrigatória para menores de um ano a partir de 1976. Os índices de mortalidade caíram drasticamente, principalmente com a introdução das drogas tuberculostáticas em 1940, incluindo a estreptomicina (SM) em 1948, o ácido p-aminosalicílico (PAS) em 1949 e a isoniazida (INH) em 1952. A partir da década de 60 começava efetivamente a utilização de esquemas terapêuticos padronizados. Em 1964, utilizava-se o esquema padrão de 18 meses de duração contendo (SM + INH + PAS. Em 1970, uma outra droga chamada rifampicina (RMP) foi introduzida no tratamento, seguida da pirazidamida (PZA). Hoje, a RMP é a droga mais

importante no tratamento da TB, sendo a responsável pela redução do tempo de tratamento de nove para seis meses.

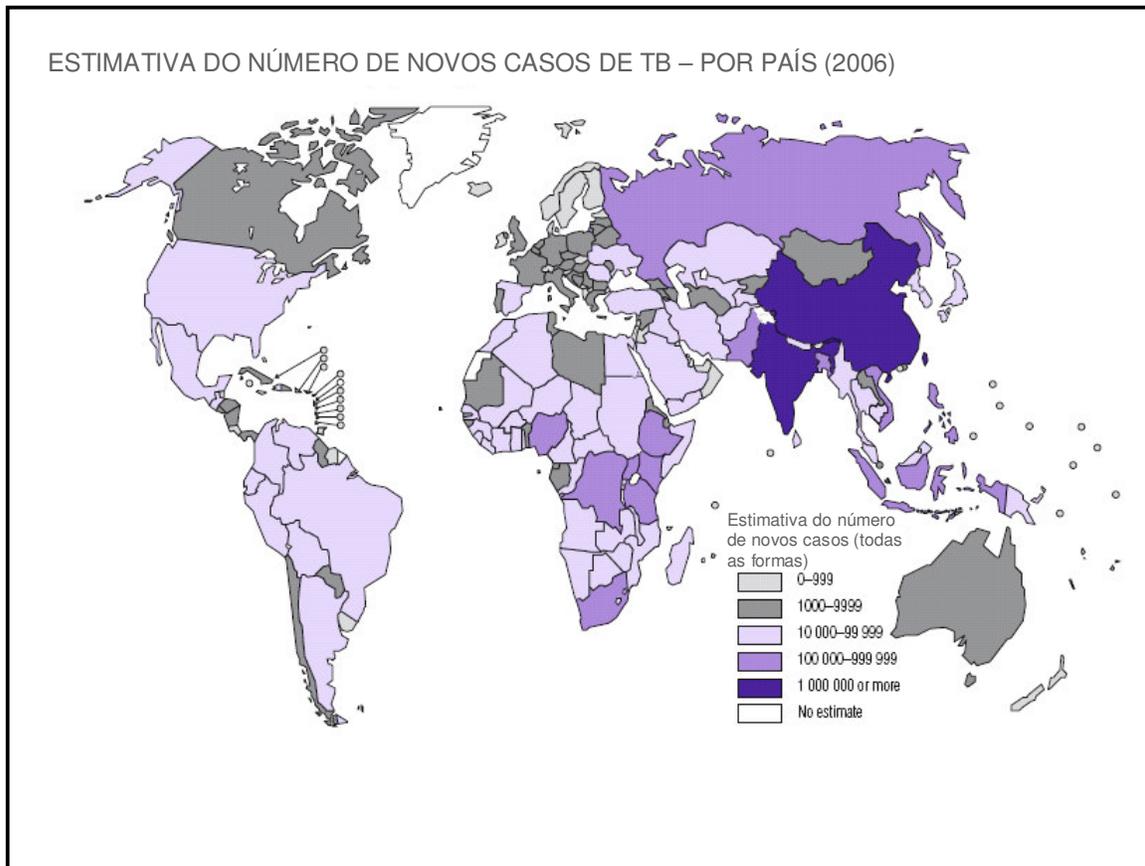
## 2.2. Epidemiologia da Tuberculose

A despeito de sua origem milenar, ainda hoje a tuberculose continua a ser uma doença de difícil controle. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), apesar de existir um tratamento com elevada taxa de cura estima-se que entre 2000 e 2020, um bilhão de pessoas estarão infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis*, cerca de 200 milhões desenvolverão a doença e 35 milhões irão a óbito se não forem desenvolvidos novos métodos diagnósticos, novas vacinas, novos medicamentos e o desenvolvimento de políticas mais apropriadas para controle dos pacientes com TB ativa e seus contatos (WHO, 2000). No Brasil, a TB, tem com raízes sociais a pobreza e a má distribuição de renda, de acordo com Ruffino-Neto (2002). O surgimento da epidemia da Aids e o aparecimento de cepas resistentes (MDR), agravaram ainda mais o problema da doença no Brasil e no mundo.

De acordo com a OMS, em 2006 foram notificados 9.2 milhões de novos casos de TB no mundo (figura 1) e uma prevalência de cerca de 139/100.000 habitantes, dos quais 500 mil casos tratavam-se de TB-MDR. Neste mesmo ano, houve 1,7 milhões de óbitos, dos quais aproximadamente 700 mil foram de pessoas infectadas pelo HIV. Em relação a distribuição geográfica, o continente africano é o que apresenta as maiores taxas da doença (363/100,000). Paralelamente, outros países da Ásia, como a Índia, China, Indonésia e do continente africano tais como Nigéria e África do Sul ocupam os 5 primeiros lugares em termos de casos absolutos de TB no mundo. O total de 83% dos novos casos de tuberculose são atribuídos as regiões da África, Ásia e Ocidente Pacífico (OMS report 2008). Hoje, estima-se que mais de um terço da população mundial esteja infectada pelo *M. tb*, sendo esta população um importante reservatório para a reativação da TB (OMS report 2007).

O Brasil ocupa hoje o 16º lugar na lista dos 22 países com as maiores taxas de incidência de TB no mundo (Santos Filho, 2006). Estima-se uma prevalência de 50 milhões de infectados, com cerca de 110.000 casos novos, com 6.000 óbitos ocorrendo anualmente, segundo dados do Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde em 2007. Neste cenário, a região sudeste apresenta cerca de 48% do total de casos, sendo o Rio de Janeiro o estado que apresenta a mais alta taxa de incidência do país, com cerca de 16,000 novos casos de tuberculose notificados anualmente. Segundo o boletim informativo da Secretaria Estadual de Saúde (Assessoria de Pneumologia Sanitária, 2005), os 32 municípios

prioritários no Rio de Janeiro concentram 95% dos casos e a região metropolitana 86% dos casos notificados no Estado.

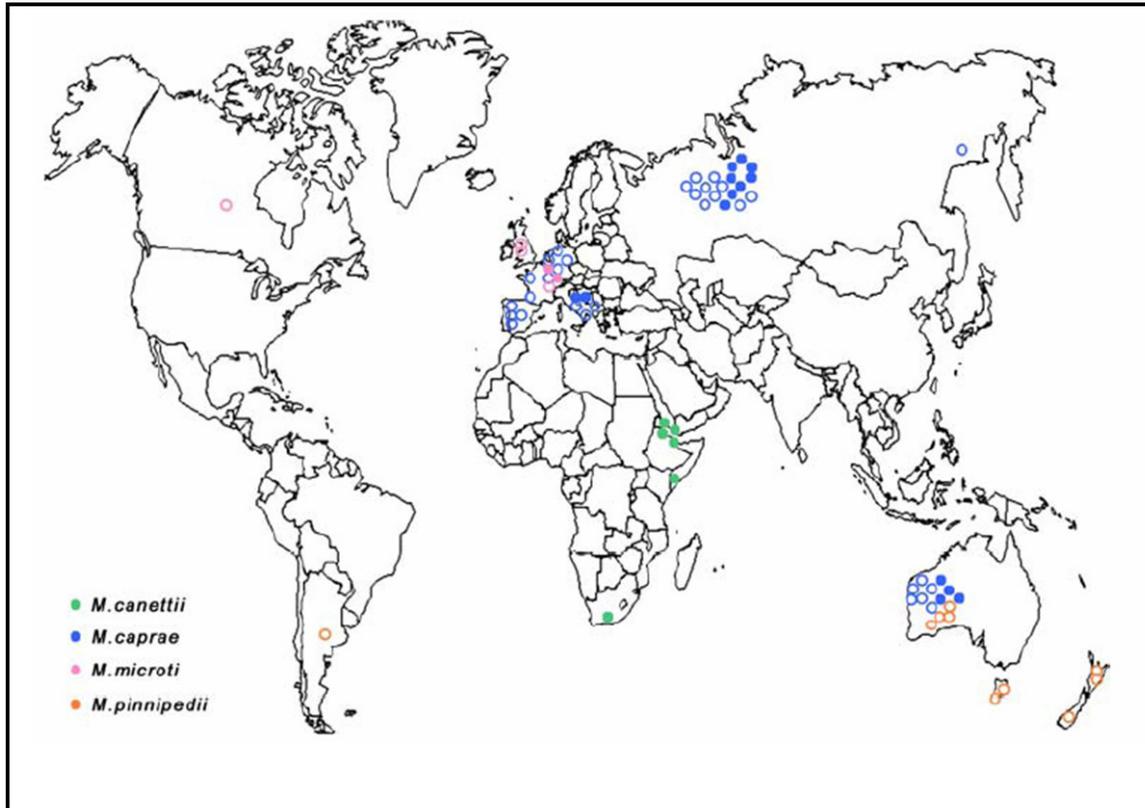


**Figura 1:** Estimativa do número de casos novos de TB no mundo em 2006 (Adaptado de: OMS report 2008).

### 2.3. *Mycobacterium Tuberculosis*

O *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) é uma forma de transição entre as eubactérias e os actinomicetos. Trata-se de um bacilo álcool-ácido-resistente, não formador de esporos, sem flagelos, não produtor de toxinas, aeróbio restrito e intracelular facultativo. Possui longo período de geração (16-20 horas) e de duplicação (18-48 horas) dependendo do oxigênio, nutrientes e pH do meio. A forma de crescimento lento esta associada à natureza crônica da infecção e da doença, dificultando desta forma o diagnóstico microbiológico e também a exigência de um tratamento longo.

As espécies do gênero *Mycobacterium* que causam tuberculose em humanos e animais estão agrupadas num complexo denominado Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) e incluem: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* (vários subtipos), *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium bovis* é um agente zoonótico re-emergente da tuberculose bovina, e sua cepa variante, o bacilo *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG), utilizada como vacina. Representam novas espécies e adicionadas ao MTC *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*. O *Mycobacterium canetti* é outra variante aceita nesse complexo, isolada recentemente em pacientes expostos na África (Djelouadj *et al*, 2008). Por último, existem variantes raras do MTC denominadas como bacilos “dassie” e “oryx”, que dependem de definição para sua inclusão definitiva no MTC (Mostowy *et al* 2004, van Soolingen *et al* 1994, Huard *et al* 2006). A figura 2 mostra a distribuição desses membros do MTC no mundo. Historicamente, a taxonomia e segregação do MTC era baseada em algumas características de cada espécie, como por exemplo: o crescimento, a morfologia, a fisiologia, e as características bioquímicas (Niemann, 2000), a variação na distribuição geográfica, a preferência pelo hospedeiro, a virulência, e a infecção humana também diferenciam o bacilo tubérculo (Huard *et al* 2006). Nos últimos anos, várias pesquisas têm sido realizadas a fim de verificar uma possível associação entre virulência das diferentes cepas com as diferenças genéticas entre o *M. tb.* e os outros membros do complexo MTC.



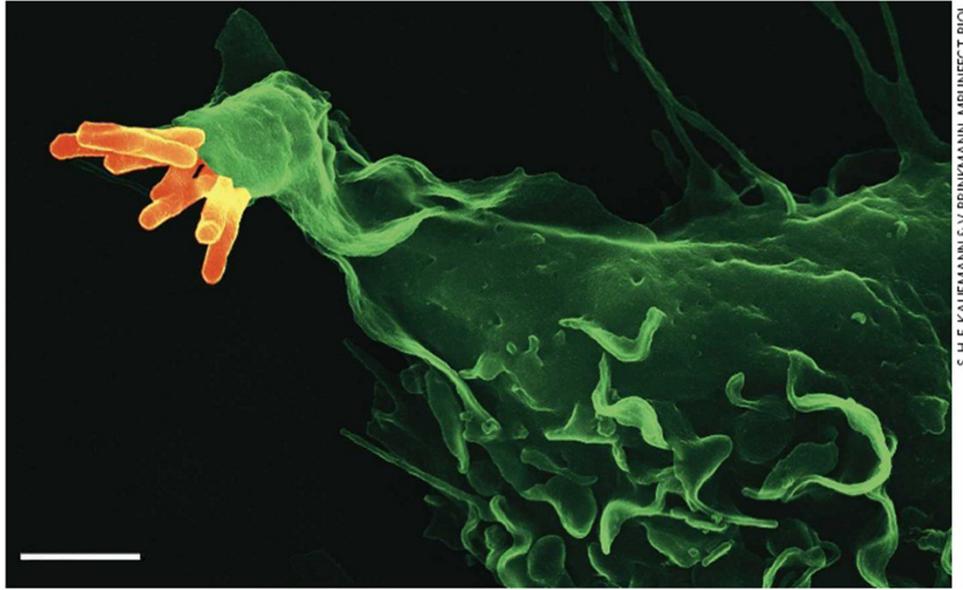
**Figura 2:** Distribuição do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* na espécie humana (círculos preenchidos) e animais (círculos abertos). Os círculos verdes representam *M. canettii*, os círculos azuis *M. caprae*, em rosa *M. microti*, e em laranja *M. pinnipedii* (Djelouadj *et al*, 2008).

Com o sequenciamento do genoma do *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, as características genéticas deste patógeno finalmente foram elucidadas. O genoma do mesmo possui 4.4Mb, contendo aproximadamente 4.000 genes, cerca de 2.441 genes com funções atribuídas, 911 genes com funções hipotéticas, 607 genes com funções desconhecidas, e 129 genes ausentes em relação ao *M. bovis* BCG (Smith, 2003). Cerca de 200 genes do *M. tb* codificam enzimas envolvidas com o metabolismo de ácidos graxos e aproximadamente 100 estão diretamente envolvidos com a função de  $\beta$ -oxidação no metabolismo do mesmo. A parede bacteriana do *M. tb* apresenta uma alta imunogenicidade devido a presença de proteínas específicas do *M.tb* descritas recentemente tais como a malato sintetase (GLcB) e a proteína de ligação à fibronectina (MPT51). Cerca de 90% dos pacientes com infecção latente por *M. tb* produzem anticorpos contra essas proteínas (Singh *et al*, 2005).

## 2.4. Patogênese da doença

O *Mycobacterium tuberculosis* é um patógeno intracelular transmitido primariamente pelas vias respiratórias. Inicialmente, a infecção ocorre nos pulmões, mas o microrganismo pode se disseminar para outros órgãos pela via hematogênica (Flynn & Chan, 2001). Normalmente, as pessoas infectadas pelo *M. tb* desenvolvem a doença ativa nos primeiros 3 anos após a infecção. A transmissão ocorre de uma pessoa para outra através do ar; com menor frequência, a transmissão pode ocorrer via cutânea, congênita ou por transplante de órgão. A tuberculose pulmonar é a forma mais freqüente da doença, contribuindo com 80% das formas clínicas e somente 20% dos pacientes com tuberculose apresentam formas extra-pulmonares, tais como pleural, linfática, óssea, gênito-urinária, peritonal, cutânea ou tuberculose meníngea, que afeta o cérebro e é responsável por 30% dos casos extra-pulmonares. Após a infecção, somente cerca de 1 em cada 10 pessoas desenvolvem a doença, mostrando claramente que a maioria dos humanos consegue controlar a infecção efetivamente (Kaufmann HE, 2008).

A infecção pelo *M. tb* ocorre inicialmente nos macrófagos alveolares, que representam a primeira linha de defesa do organismo após a infecção. A detecção deste patógeno é pela via de reconhecimento do receptor TLR2 na superfície dos macrófagos, conforme ilustração abaixo (figura 3).



**Figura 3:** Hospedeiro e patógeno. O reconhecimento no pulmão do hospedeiro: ligação do *Mycobacterium tuberculosis* (laranja) ao receptor TLR2 na superfície do macrófago (verde). Adaptado de Kaufmann HE, 2008.

Resumidamente, as células T-específicas são estimuladas no linfonodo periférico de drenagem da lesão inicial ao *M. tb* e induzidas a contenção bacteriana em pequenas lesões granulomatosas no pulmão, o que pode levar a eliminação do agente infeccioso (*M. tb*). A infecção latente, que se caracteriza por um equilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro e a bactéria, se estabelece e pode ser mantida por um longo período de incubação do indivíduo infectado sem o desenvolvimento da doença ativa. De acordo com as estatísticas, aproximadamente 5 a 10% dos indivíduos apresentam esta forma de latência. Contudo, esta infecção pode ser reativada, causando a doença ativa. De fato, nem todos os indivíduos que aspiram o bacilo eliminado por pessoas infectadas pelo *M. tb* desenvolvem a doença. Nesses casos, os mecanismos de defesa da árvore respiratória e a resposta inata são predominantes, contendo a infecção na porta de entrada, sem dano tecidual ao pulmão e sem o desencadeamento da resposta imune adaptativa.

## 2.5. Tratamento Quimioterápico da Tuberculose

Em 1944, foi descoberta por Schatz e Walsman a primeira droga anti-tuberculose, a SM (Smith, 2003). Dois estudos clínicos envolvendo a administração e a utilização da SM no tratamento de pacientes com TB revelaram falhas e resistência a este agente (Palomino, *et al* 2007). Os avanços no tratamento da TB surgiram somente na década de 60, século XX, com a descoberta da RMP. Outras drogas como a INH e a PZA também foram incluídas no esquema terapêutico contra a TB, mas não foram suficientes para eliminar a doença. A difusão do uso de *M. bovis*, (BCG) também não conseguiu diminuir a incidência da doença. Nos casos em que a infecção se dá por cepas sensíveis a esses antibióticos a cura efetiva pode se estabelecer de 6 a 9 meses com o regime de múltiplos antibióticos. O quadro 1 mostra o esquema de tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde. Contudo, a interrupção do tratamento, mutações espontâneas conferindo resistência, mutações em genes de resistência as drogas, e tratamento com drogas empíricas sem sensibilidade testada, levaram à seleção de cepas resistentes no mundo nos últimos 50 anos de acordo com Godman *et al*, 2007. A seleção e a multiplicação dessas cepas multi-drogas-resistentes (MDR-TB) define a resistência a vários antibióticos, dentre os quais a INH e RMP, duas das mais efetivas drogas utilizadas no tratamento de primeira linha contra a TB. Em 2006 foram definidas as cepas (XDR-TB), resistentes a 3 ou mais das 6 classes de antibióticos utilizados no esquema de segunda linha incluindo por exemplo: aminoglicosídeos, polipeptídeos, fluoroquinolonas, tiamídeos, cicloserina entre outras (Goldman *et al*, 2007). Dados estatísticos mostraram que, de acordo com a classificação correta de MDR-TB e XDR-TB, de 17,690 isolados resistentes a drogas registrados de 2000-2004, 20% eram MDR-TB e 2% XDR-TB. Hoje, de acordo com Goldman *et al*, 2007, a maior incidência das cepas XDR-TB encontra-se na África do Sul.

Sabe-se hoje que a infecção por HIV é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da TB ativa, devido ao comprometimento da resposta imunológica do paciente. Os pacientes que apresentam a co-infecção TB/HIV são severamente imunodeprimidos e apresentam uma alta carga viral e o tratamento com anti-tuberculostáticos é crítico para esses pacientes (Quy 2007). A RMP é considerada uma droga essencial para o tratamento desta co-infecção, visto que a mesma é um importante indutor do citocromo P450, especificamente a isoforma CYP3A, cujo substrato são alguns dos anti-retrovirais mais usados. Assim, ocorre uma interação desfavorável entre estas drogas resultando em concentrações sub-terapêuticas dos anti-retrovirais. Sempre que ocorre o diagnóstico simultâneo da co-infecção TB-/HIV, o tratamento da TB deve ser iniciado imediatamente.

Entretanto, o uso simultâneo das duas terapias induz um alto risco de efeitos adversos. Segundo as discussões da comunidade científica sobre a recidiva da tuberculose, segundo Verver *et al*, 2005, em pacientes avaliados em um período de 5 anos, 14% dos pacientes submetidos ao tratamento completo apresentaram recidiva, e 77% apresentaram re-infecção por uma cepa de *M. tb* diferente da apresentada no primeiro episódio.

Esses dados sugerem que alguns indivíduos apresentam uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento da TB, o que provavelmente pode ser explicado pela presença de alguns fatores genéticos do próprio indivíduo, associados a variabilidade genética das cepas infectantes que podem influenciar neste desfecho.

**Quadro 1:** Esquema de tratamento da TB preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil

Esquemas Indicados	Fase	Duração	Drogas
<b>Esquema I – 2RHZ/RH</b> Doentes virgens de tratamento com baciloscopia positiva; tuberculose miliar e tuberculose extra-pulmonar, exceto para os portadores das formas meningoencefálicas	1 <sup>a</sup>	2 meses	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida
	2 <sup>a</sup>	4 meses	Rifampicina Isoniazida
<b>Esquema II – 2RHZ/7RH</b> Forma meningoencefálica	1 <sup>a</sup>	2 meses	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida
	2 <sup>a</sup>	7 meses	Rifampicina Pirazinamida
<b>Esquema I reforçado – 2RHZR/4RHE</b> Recidiva após cura ou retorno após abandono	1 <sup>a</sup>	2 meses	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida Estreptomicina
	2 <sup>a</sup>	4 meses	Rifampicina Isoniazida Estreptomicina
<b>Esquema III – 3SEtEZ / 9EtE</b> Falência do tratamento dos esquemas I e II reforçados	1 <sup>a</sup>	3 meses	Estreptomicina Pirazinamida Etionamida Etambutol
	2 <sup>a</sup>	9 meses	Etambutol Etionamida

Fonte: Guia de Vigilância Epidemiológica da Tuberculose, publicado no Ministério da Saúde sobre Programa Nacional de Controle a tuberculose, ano de 2007.

## 2.6. Suscetibilidade Genética as doenças Infecciosas e Tuberculose

Sabe-se que alguns indivíduos aparentemente apresentam algum tipo de herança em relação a predisposição para doenças infecciosas, ou seja, esses indivíduos responderiam diferentemente a uma infecção particular (Cooke & Hill, 2001). Em 1927, uma administração acidental de *M. tb* na população de Lubeck, na Alemanha, resultou no desenvolvimento de uma imunidade específica contra *M. tb* na maioria dos indivíduos, enquanto outros desenvolveram a doença severamente e alguns morreram. Tais dados mostram claramente que os indivíduos apresentavam uma resposta diferenciada contra o *M. tb* (Fernando & Britton, 2006). Nos anos 80, alguns hemofílicos foram contaminados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), mostrando que a evolução da AIDS era diferente entre eles. Em experiência mais recente envolvendo pacientes co-infectados com malária foi observada uma resposta diferenciada contra o *plasmodium*, parasita causador da malária (Cooke & Hill, 2001). Estudos realizados no modelo hanseníase, também mostram claramente o envolvimento de fatores genéticos na suscetibilidade a doença em pacientes residentes no Rio de Janeiro (Santos *et al* 2002; Moraes *et al* 2003). Nas últimas duas décadas, os modelos de estudos dominantes para a investigação de bases genéticas herdadas, estiveram ligadas aos estudos de famílias, ferramenta tradicionalmente utilizada na epidemiologia genética das doenças complexas. Esses estudos em família permitiram a análise de regiões do genoma com um grande número de alelos presentes em indivíduos infectados dentro de um núcleo familiar, indicando a existência nesta região do genoma de, pelo menos um alelo responsável pela predisposição genética a para doença (Carlson *et al*, 2005). Nas doenças infecciosas, a transmissão do patógeno entre os membros da família pode aumentar o risco da doença e contribui para a observação desses fenótipos de segregação (Burgner *et al* 2006). Os estudos com gêmeos podem também providenciar uma contribuição desses genes e do ambiente, comparando o risco geneticamente idêntico dos gêmeos monozigóticos com os gêmeos dizigóticos. Alguns desses estudos foram clássicos na tuberculose, demonstrando a existência de um risco aumentado para o desenvolvimento da tuberculose de acordo com o histórico de incidência da infecção na ancestralidade familiar (Kallmann FJ, *et al* 1943, Simonds B, 1963, Comstock *et al*, 1978). Estudos mais recentes consideram vários fatores relacionados a suscetibilidade à tuberculose, tais como a reatividade celular, apresentação antigênica, fagocitose, cooperação dos linfócitos T e B e atividade bactericida com base na dependência da especificidade do sistema HLA. O complexo envolvendo os Antígenos Leucocitários Humanos (HLA), com cerca de 4 Mb e mais de 160 genes que codificam para diversas

proteínas, é extremamente polimórfico, apresenta alta densidade e diversidade gênica além de baixa taxa de recombinação, representando portanto uma região de extrema importância em termos de associação com a suscetibilidade ou resistência a um grande número de doenças infecciosas, autoimunes e outras. Evidências substanciais suportam que o patógeno e o equilíbrio da seleção são as maiores forças para manter a diversidade do HLA. Em estudo realizado por Kim *et al*, (2005), na população Coreana, descrevendo aspectos ligados a suscetibilidade a tuberculose, os autores mostraram que, dentre os vários haplótipos de HLA, o HLA-B51, DQB1\*05 e DRB1\*0803 mostraram correlações estatisticamente significativas com a resistência a drogas, formação de lesões avançadas e recidiva desses pacientes com TB. Outros estudos de base populacional têm estabelecido a correlação da tuberculose com polimorfismos nos genes que codificam para a resistência natural associada a proteína de macrófago (*NRAMP1- SLC11A1*), receptor de vitamina D<sub>3</sub>, *IL-1*, *IL-10*, *IFN-γ*, *IL12p40*, *STAT1* (Frieden *et al* 2003, Fernando & Britton, 2006, Dupuis *et al*, 2001). Embora a importância funcional da maioria desses polimorfismos não esteja estabelecida, para vários genes a relação de associação com diferentes desfechos, incluindo suscetibilidade a diferentes doenças infecciosas, já é fato comprovado. No caso, por exemplo, da vitamina D<sub>3</sub>, um imunomodulador hormonal produzido em grandes quantidades pelos macrófagos alveolares, capaz de ativar os monócitos humanos, suprimir o crescimento da micobactéria (Tsoukas *et al*, 1984 Rook *et al* 1986), ativada pelo receptor de vitamina D<sub>3</sub> (VDR), tais polimorfismos podem ter importantes implicações na formação do granuloma (Cadranel *et al*, 1988). Estudos relacionados a presença de polimorfismos no receptor de vitamina D (VDR), presença do alelo t ou ausência do alelo T no sítio da endonuclease *TaqI*, mostraram uma relação direta com os níveis de RNAm para VDR e da vitamina D<sub>3</sub> (altos níveis de RNAm e altos níveis séricos de vitamina D<sub>3</sub> para o alelo t). De acordo com Bellamy, (1999), em estudo realizado com a população da Gâmbia, o genótipo homocigoto tt apresentou um efeito protetor contra o desenvolvimento de tuberculose pulmonar. Em contraste, o mesmo genótipo foi associado à suscetibilidade à TB pulmonar em mulheres da África do Sul (Selvaraj *et al*, 2000). Resultados controversos em estudos de associação de fatores genéticos com diferentes desfechos para doenças infecciosas têm sido relatados constantemente para diferentes loci. Em estudo conduzido por Bellamy *et al*, (1998) vários polimorfismos foram identificados na população da Gâmbia, as variantes (D543N, 3'UTR, INT4 e o alelo 2 da extremidade 5' do *NRAMP1-SLC11A1*) foram associadas a suscetibilidade à TB, e de acordo com Awomoyi *et al*, (2002) estão associadas ao aumento da produção de IL-10. A heterocigose nos polimorfismos das variantes INT4 e 3 UTR confere um risco elevado para o desenvolvimento

da tuberculose (Bellamy *et al*, 1998), entretanto, a variação D543N na população do Camboja foi associada como um fator de proteção contra a TB pulmonar (Delgado *et al*, 2002). Uma outra citocina crucial na defesa contra *M. tb* é o interferon- $\gamma$  e vários SNPs associados aos diferentes desfechos possíveis de TB têm sido descritos. O mais importante refere-se ao polimorfismo A+874T, localizado no intron I, que se liga ao sítio de fator de transcrição NF $\kappa$ B. Estudos funcionais demonstraram que a variante alélica +854A está relacionada a baixa produção de IFN- $\gamma$ . Posteriormente um estudo de associação conduzido na população miscigenada da África do Sul mostrou um aumento no risco a tuberculose para indivíduos portadores dessa variante alélica +854A (Rossouw *et al*, 2003). Em estudo recente, realizado na população do Rio de Janeiro e Goiás, estes dados foram corroborados por Amim e colaboradores (Amim *et al*, 2007). Segundo Reuss *et al* (2002), cerca de 50% da produção de IL-10 é determinada geneticamente e os outros 50% são por determinação dos fatores ambientais, Calado *et al* (2006) descrevem que o gene de IL-10 apresenta expressões monoalélicas em células T CD4 em modelos murinos e o início da transcrição monoalélica depende da força de ligação ao receptor de células T (TCR) e a subsequente capacidade de sobrepor a restrição imposta pela hipoacetilação da cromatina. De acordo com Paixão *et al* (2007), os genes de citocinas são regulados via expressão estocástica monoalélica, provavelmente devido ao número de modificações cumulativas na cromatina e por seleção indireta de células ativadas. Outras associações entre a predisposição genética e tuberculose também envolvem as variações étnicas, que refletem nas diferentes contribuições desses diferentes alelos em um modelo poligênico. Entretanto, o efeito desses polimorfismos, que conferem suscetibilidade em uma população e proteção em outra permanece inconclusivo, devido a grandes dificuldades de separação das influências ambientais e genéticas.

### **2.6.1. Imunopatogenia da Tuberculose e Imunidade Inata**

Cerca de 90% das pessoas saudáveis dificilmente desenvolvem tuberculose (TB), esses indivíduos se protegem desse patógeno inalável através de barreiras físicas como pelos nasais, secreções traqueobrônquicas, depuração mucociliar; entretanto outros aspectos, como a resposta imune inata, são fundamentais para a contenção do processo infeccioso. Alguns fatores ambientais e as baixas condições sócio-econômicas contribuem para o desenvolvimento da doença, assim como os pacientes portadores de HIV que possuem o sistema imunológico comprometido, mas permanecem desconhecidas as bases imunológicas

para o desenvolvimento da tuberculose em cerca de 10% dos indivíduos que são infectados pelo *M. tb* (Hanekom *et al* 2007). A resposta inata é a primeira barreira de contenção do patógeno, e a fagocitose, por células mononucleares é um dos principais componentes formadores dessa resposta. Outros componentes da resposta imune inata podem ser citados, como a produção da proteína do macrófago associada à resistência natural (NRAMP), crucial no transporte de nitrato para compartimentos intracelulares tais como o citosol, a participação de neutrófilos, células T CD-1, células T CD8<sup>+</sup> restritas, células natural “killer” (células T NK) envolvidas na produção de IFN- $\gamma$  e capaz de ativar os macrófagos para a eliminação da micobactéria (Raja, 2004). O reconhecimento do *M. tb* ou produtos micobacterianos é o passo crucial para a resposta efetiva do hospedeiro. Os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, *TLRs*) estabelecem a ligação da imunidade inata à imunidade adaptativa. De forma geral, os receptores TLR constituem uma família de proteínas transmembrana que reconhecem padrões moleculares de ligantes microbianos que são capazes de induzir a sinalização de vias inflamatórias e/ou anti-inflamatórias (Berrington & Hawn *et al*, 2007). De acordo com Raja (2004) na tuberculose, as interações do *M. tb* e dos TLRs são complexas, pois as moléculas do *M.tb* podem interagir com diferentes membros da família dos TLRs ao mesmo tempo. Segundo Berrington & Hawn *et al* (2007) as moléculas do *M.tb* reconhecíveis por TLRs são lipoproteínas reconhecidas por TLR2 ou pelo heterodímero de TLR1 ou TLR6, lipopolissacarídeos reconhecidos por TLR4, flagelina por TLR5 e DNA bacteriano (CpG por TLR9).

De acordo com Kriski *et al* (2000), alguns aspectos da imunidade inata não podem explicar os diferentes graus de resistência natural que ocorrem na espécie humana; portanto, a maior ou menor resistência natural parece estar relacionada com a maior ou menor velocidade que o hospedeiro infectado é capaz de desenvolver sua resistência adquirida. Assim, a resposta imune pode ser revista como os diferentes eventos específicos de resposta a uma molécula imunogênica. Como possíveis desfechos após a infecção com o *M. tb* podemos ter: a) o controle da infecção por *M.tb* pela resposta imune inata, b) latência e c) o desenvolvimento da TB ativa (Ehrt *et al* 1997).

Conforme citado acima, o controle da infecção por *M.tb* no hospedeiro humano pelos mecanismos da resposta imune inata envolve elementos como a fagocitose da micobactéria por células dendríticas, macrófagos alveolares com a secreção da IL-12, ou produção de NRAMP (Raja 2004). Portanto, esses processos se caracterizam como componentes da resposta imune inata que podem determinar direções que a resposta imune adaptativa mediada por células T seguirá na apresentação de antígenos micobacterianos, expressão de sinais co-

estimulatórios e produção de citocinas (van Crevel et al 2002). Outros dados da literatura sugerem que as lisozimas e outras enzimas são importantes na primeira linha de defesa na imunidade inata contra o *M. tb*.

A rota de entrada do *M.tb* no organismo humano é a via respiratória. Ao conseguir ultrapassar as barreiras naturais, o mesmo alcança os pulmões, e os macrófagos alveolares são os primeiros tipos celulares envolvidos no combate ao patógeno; posteriormente, células dendríticas e macrófagos derivados de monócitos recentemente recrutados tomam parte deste processo. A endocitose de *M. tb* envolve diferentes receptores nas células fagocíticas, que se ligam tanto ao bacilo não opsonizado ou reconhecem opsoninas na sua superfície.

A micobactéria pode invadir os macrófagos após a opsonização com o fator de complemento C reconhecido por receptores do tipo CR1, CR3 e CR4, encontrados na superfície celular do fagócito. Entretanto o *M. tb* pode se ligar diretamente aos receptores do tipo CR3 e CR4. A proteína surfactante do tipo A (Sp-A) é uma proteína da família das colectinas capaz de opsonizar *M. tb*, e assim facilitar a entrada do bacilo, através da ligação a receptores, em células fagocíticas como os macrófagos, neutrófilos e pneumócitos. Outro membro da família de colectinas é a lectina ligadora de manose (MBL), envolvida na entrada da micobactéria em células fagocíticas através do reconhecimento de resíduos de carboidratos na superfície micobacteriana. Os MBL também podem induzir a fagocitose, o reconhecimento de *M. tb* ou de componentes micobacterianos de parede celular de origem lipídica como lipoarabinomonana (LAM) e o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas, etapa crucial na resposta imune inata do hospedeiro (Zhang et al 1993). Outros fatores também estão envolvidos nesse processo, como as proteínas séricas ligadas ao LPS, podemos citar, a LBP (*LPS-binding protein*), capaz de aumentar a resposta de macrófagos a LPS e LAM via receptor de superfície CD14. Interessantemente, as concentrações de CD14 e proteínas associadas a LPS no soro estão elevadas em pacientes com tuberculose ativa (van Crevel et al 2002). Em paralelo, os receptores *Toll-like* (TLR), conservados filogeneticamente e participantes efetivos da imunidade inata, são essenciais para o reconhecimento microbiano por macrófagos e células dendríticas. Até o momento foram identificados mais de 10 diferentes membros da família TLR, como o TLR2, essencial no reconhecimento a lipopeptídeos e peptioglicanos bacterianos (Kaisho et al 2001), ou o TLR4, responsável pela resposta celular contra LPS (bactérias gram-negativas) ou ainda o TLR9, que reconhece dinucleotídeos CpG contendo DNA bacteriano (Subhendu Basu & Matthew J. F, 2004).

*M. tb* nos macrófagos alveolares, os aspectos de reconhecimento celular tais como a interação macrófagos-células T e o processamento e apresentação de antígenos via MHC de

classe II, produção de IFN- $\gamma$ , indução da síntese de ácido nítrico 2 (NOS<sub>2</sub>) e produção de mediadores de oxido nítrico e outros radicais de nitrogênio (RNIs) são essenciais para a contenção e eliminação do agente patogênico, em associação com outros aspectos da resposta imune inata e adaptativa. No entanto, em alguns casos mesmo os macrófagos alveolares ativado podem falhar na erradicação de *M. tb*. A micobactéria é capaz de resistir no endossomo primário e subsequentemente de impedir a fusão endossomo-lisossoma devido ao seqüestro de íons de ferro utilizados nos mecanismos de defesa da célula hospedeira (Schaible *et al* 1999, Andrews 2000).

O hospedeiro humano também é capaz de conter a replicação micobacteriana através da produção de IFN- $\gamma$ , seguida da ativação dos macrófagos e da produção de moléculas pró-inflamatórias como IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . As células dendríticas detêm a capacidade de capturar antígenos da periferia e direcioná-los para órgãos linfóides secundários. As células DCs precursoras, ao encontrar organismos patogênicos, são capazes de ativar outros tipos celulares como eosinófilos, macrófagos, e células NK, ou ainda conter a infecção através da formação do granuloma no pulmão.

Dados da literatura indicam que, uma vez detectada alguma anomalia na resposta imune, devido ao aumento de resposta do hospedeiro, *M. tb* é capaz de reprogramar os seus genes e entrar em uma fase de “latência” para uma posterior ativação em ambientes mais favoráveis. De acordo com as observações de Hisert *et al* (2004), três genes do *M. tb* foram aparentemente identificados e demonstraram ser essenciais para crescimento *in vivo* sob a pressão imune do IFN- $\gamma$ , esses genes reconhecem uma poliquetina sintetase 6 e uma potencial glicosil transferase. Portanto, acredita-se que *M. tb* regula esses genes para uma adaptação ao ambiente intracelular que ainda precisa ser moldado.

### **2.6.2. Formação do Granuloma**

A formação do granuloma caracteriza-se como uma marca da tuberculose que está associada a uma resposta crônica infecciosa antigênica, principalmente quando é acompanhada de uma necrose caseosa. Essa necrose pode também ser vista em outras patologias como esquistossomose, hanseníase e malária (Boros 1999, Modlin & Rea 1988). O granuloma é composto por diferentes tipos celulares, incluindo as células CD4, CD8 e células B (Raja, 2004). Nos granulomas humanos, os macrófagos estão localizados nas áreas centrais da estrutura e rodeados por linfócitos. Como revisto por Raja em 2004, o passo importante

para a estrutura do granuloma é o recrutamento intravascular das células imunes para a proximidade do foco da infecção e posterior localização nas regiões infectadas. As células CD4<sup>+</sup> T são predominantes na camada linfocítica ao redor do granuloma, assim também foi detectada a presença de células T CD8<sup>+</sup>. Granulomas maduros em humanos geram grandes quantidades de células em processo de apoptose e a proliferação da micobactéria ocorre tanto em linfócitos quanto em macrófagos derivados dessa estrutura biológica (Spector *et al*, 1966). Uma das funções do granuloma é o controle da infecção pela interferência na comunicação entre as células imunocompetentes. No desenvolvimento do granuloma, há células homotípicas e heterotípicas que utilizam moléculas de adesão tipo I (ICAM-1) e são induzidas efetivamente por *M. tb* ou por LAM, segundo Lopez Ramirez (1994). A diferenciação das células epitelióides produz proteínas de matriz extracelular (fibronectina e osteopontina), que promovem o ancoramento celular através de moléculas de integrinas (Nau *et al*, 1997). De acordo com Raja (2004), alguns autores subdividem a organização do granuloma com base no número de células e a natureza da necrose. De uma forma geral, o granuloma permite a infecção persistente do hospedeiro e a estimulação crônica das células forma a base para as lesões caseosas, ao mesmo tempo em que há um isolamento de *M. tb*; porém, este equilíbrio pode se romper caso ocorra alguma falha nos mecanismos imunes de defesa. Portanto, a tuberculose latente pode ser vista como uma relação harmônica de parasitismo entre o bacilo e o hospedeiro.

### 2.6.3. Imunidade Adaptativa na Tuberculose

As imunidades inatas e adaptativas estão conectadas. E tanto os tipos celulares primários envolvidos na resposta imune inata, macrófagos e células dendríticas, como a própria micobactéria desempenham um papel importante na iniciação da imunidade adaptativa através da apresentação de antígenos, co-estimulação e produção de citocinas. Os sinais co-estimulatórios estabelecidos na literatura são: B-7.1 (CD80) e B-7.2 (CD86), que são expressos na superfície dos macrófagos e células dendríticas e ligam-se a CD28 e CTLA-4 em células T. Segundo Saha *et al* (1994), observações *in vitro* de monócitos com *M. tb* determinam a diminuição da expressão de B-7.1. Em outro aspecto, a infecção de células dendríticas com *M. tb* induziria a expressão de B7.1, CD40 e ICAM-1, de acordo com van Crevel *et al* (2002). Contudo, a expressão de moléculas apresentadoras de antígenos e a ativação celular é um processo dinâmico que também é regulado pela presença de citocinas. Várias citocinas produzidas por monócitos e células dendríticas ativadas são essenciais para a

estimulação de linfócitos T, tanto que para o controle da infecção necessitam da resposta imune Th-1. A interleucina-12 é induzida pela fagocitose do *M. tb* pelos macrófagos e células dendríticas que direcionam o desenvolvimento da resposta Th-1 com a produção de IFN- $\gamma$  (Ladel *et al* 1997). O IFN- $\gamma$  é uma citocina importante no controle da infecção de *M. tb*, sendo produzida por células CD4<sup>+</sup> células T CD8<sup>+</sup> e células NK, sendo importante na ativação de macrófagos que inibem o crescimento do *M. tb in vitro* e produção de iNOS (Flesch *et al*, 1987). Neste contexto, uma outra citocina importante é o TNF- $\alpha$ , que possui múltiplas funções na resposta imune contra a tuberculose. O TNF- $\alpha$  é produzido por macrófagos e está envolvido no controle da infecção, morte bacteriana, produção de moléculas de adesão, quimiocinas e receptores de quimiocinas, controle da formação do granuloma e migração celular para os tecidos infectados (Raja 2004). Um estudo conduzido por Flynn *et al* (1995) mostrou que camundongos deficientes de TNF- $\alpha$  ou receptor de TNF- $\alpha$  infectados pelo *M. tb* morreram rapidamente, e foram observadas altas taxas da bactéria quando comparado ao grupo controle. As citocinas inflamatórias são capazes de induzir o dano tecidual e moléculas de *M. tb*, como o LAM e CFP32 (Flynn & Chan 2005), também promovem a expressão de citocinas do tipo Th-2 como TGF- $\beta$  e IL-10 (Martino *et al* 2004). Vários estudos têm demonstrado que a produção prematura ou a secreção desproporcional de citocinas anti-inflamatórias podem ajudar o *M. tb*. Níveis aumentados de IL-10 foram associados à ineficiência de processos infecciosos por agentes patológicos como *Mycobacterium leprae*, progressão do HIV e *Leishmania spp* (Sieling *et al*, 1993; Stockl *et al* 1999; Stylianou *et al*, 1999), de acordo com a literatura, acredita-se que este deve ser o caso na infecção por *M. tb* (Mason *et al* 2007).

O *M. tb* reside nos vacúolos alveolares e a apresentação de antígenos via MHC de classe II e células CD4<sup>+</sup> gera um dos principais desfechos da infecção. A função efetora de linfócitos CD4<sup>+</sup> é a produção de IFN- $\gamma$  e possivelmente de outras citocinas capazes de ativar macrófagos, para o controle e eliminação do microrganismo intracelular. Como descrito por Selwyn *et al*, 1989, em humanos, a patogênese da infecção por HIV demonstra que a perda de células T CD4<sup>+</sup> aumenta drasticamente a suscetibilidade tanto aguda quanto de reativação da TB. Camundongos “knockout” para MHC classe II ou CD4<sup>+</sup> apresentaram níveis baixos de IFN- $\gamma$  durante uma infecção experimental com *M. tb* (Caruso *et al*, 1999). As células CD8<sup>+</sup> são também capazes de secretar algumas citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-4 e podem ter importância na regulação celular de perfis Th1 e Th2 em pacientes com tuberculose pulmonar. Após a lise celular, as bactérias são liberadas no meio extracelular, podendo

disseminar, entretanto podem ser fagocitadas por células capazes de eliminá-las após a ativação. Esse mecanismo, que envolve a produção de granulísina e perforina pelas células CD8<sup>+</sup>, seria diretamente responsável pela morte de *M. tb* (Kaufmann *et al* 1999). A granulísina é responsável pela morte bacteriana devido ao acesso ao *M. tb* no interior dos macrófagos através dos poros formados pela perforina, é também uma molécula citotóxica para *M. tb* e outras bactérias, pois interage com lípidios e aumenta a permeabilidade da membrana plasmática (Flynn & Ernst 2000).

#### **2.6.4. As citocinas e os polimorfismos nos genes candidatos: influência na resposta imune a Tuberculose**

A resposta imune desencadeada pelo hospedeiro contra a *M. tb* é regulada por vários mecanismos complexos e de múltiplas etapas. Dentre estes componentes estão as citocinas componentes desta rede de fatores moleculares, e a possível influência de seus polimorfismos no desfecho da infecção por *M. tb*. As citocinas são pequenas moléculas secretadas pelas células em resposta a um estímulo específico que podem alterar o comportamento das mesmas ou de outras células; agem nestas células através da ligação a um receptor específico iniciando a transdução de sinal e são importantes moduladores dos processos inflamatórios (Howel *et al*, 2007). O equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias determina a intensidade da resposta inflamatória nos limites fisiológicos e patológicos. Essas citocinas controlam ou modulam essa rede complexa contendo cascatas interativas na ativação e supressão de genes (Rao *et al*, 2007). Podem ser estimuladas ou reprimidas quando a célula é exposta um estímulo particular, sua expressão pode ser em uma célula restrita ou em vários tipos celulares. Acredita-se que a maioria dessas respostas são controladas a níveis transcricionais; o aumento desses níveis transcricionais e a indução dos genes após a ativação das células é muito rápida (Shannon *et al*, 2001). Nos últimos anos as regiões promotoras e as regiões de “*enhancer*” dos genes de citocinas, foram mapeadas e seus domínios funcionais caracterizados. Hoje está estabelecido que o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) regula vias importantes tanto na resposta inata quanto adaptativa protetora contra vários agentes patogênicos intracelulares. É uma citocina chave no controle da infecção por *M. tb* e é produzida por células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e células NK. O gene de IFN- $\gamma$  humano localiza-se no braço longo do cromossomo 12, na região q14 (humanGeneID 3458 – Pubmed). O gene humano é composto de quatro exons e três introns, com tamanho de 4.9 Kb, esta sequência genômica origina um

transcrito primário de 1.2 Kb, incluindo regiões de 3' e 5' não traduzida (UTR), que determina uma proteína de 166 aminoácidos (aa). Dados da literatura mostram que defeitos em genes que afetam o IFN- $\gamma$  conferem suscetibilidade a tuberculose (Picard *et al* 2002). Embora estudos demonstraram que a região codificante do IFN- $\gamma$  é muito conservada até hoje nenhum polimorfismo foi identificado e poucas são as variações na região promotora do gene de IFN- $\gamma$  descritas na literatura com potencial para afetar sua expressão. Entretanto um estudo conduzido por López-Maderuelo (2003) revelou que o polimorfismo de IFN- $\gamma$  na região intrônica (+874) está significativamente associado com tuberculose pulmonar; evidências mostram que este polimorfismo influencia a produção de IFN- $\gamma$ . Uma associação entre o polimorfismo IFN- $\gamma$  (+874) T/A e a tuberculose foi publicado em amostras de 45 pacientes Sicilianos portadores de TB ativa (Lio, 2002). Contudo, a significância funcional da associação não foi explorada. Além deste trabalho, a associação positiva do IFN- $\gamma$  (+874) com TB já foi registrada na população espanhola (Lopez-Maderuelo, 2003), Sul Africanas (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%). Em estudo realizado por Amin *et al*, (2007) foi verificada a influência desse polimorfismo IFN- $\gamma$  (+874) com a baixa produção de IFN- $\gamma$ , demonstrando que indivíduos heterozigotos possuem 25% mais de chance de desenvolver tuberculose ativa quando comparada a homozigotos portadores do genótipo A/A. Essas observações foram feitas na população brasileira que tem por característica uma mistura étnica, sugerindo que este SNP está associado a tuberculose em diferentes populações. Um estudo recente conduzido por Pacheco *et al*, (2008), utilizando meta-análise em 11 estudos conduzidos em Americanos, Africanos, Europeus e Asiáticos, revelou que o polimorfismo IFN- $\gamma$  (+874T/A) mostrou significante proteção associada a Tuberculose em diferentes etnias nas população mundiais.

O Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é um gene que codifica uma citocina pro-inflamatória multifuncional, secretada por macrófagos, envolvida em amplo espectro dos processos biológicos, incluindo, a proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismos de lipídeos e coagulação (Chouaib *et al*, 1992). Das várias citocinas associadas com a patogênese da tuberculose, incluindo IFN- $\gamma$  e IL-12, acredita-se que TNF- $\alpha$  seja responsável pela proteção contra o desenvolvimento da doença (Rook, 1990). O gene humano que codifica para TNF- $\alpha$  localiza-se no braço curto do cromossomo 6 na região p21.3, contém quatro exons e três introns de 2.7 Kb (Gene ID: 7124 – Pubmed). A sequência genômica dá origem a um RNA mensageiro de 1.6 Kb, incluindo as regiões 5' e 3' UTR, com respectivamente 180 e

793 pb. Conforme os dados da literatura, TNF- $\alpha$  é produzido como pró-hormônio de 233 aa, é processado em uma proteína madura (não glicosilada) com 157 aa por clivagem de um peptídeo de 76 aa. Vários polimorfismos de base única (SNPs) dentro do gene TNF já foram descritos. Há 621 SNPs cadastrados nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information - NCBI*, sendo mais de 10 na região promotora. Os efeitos dos SNPs presentes na região promotora, em relação a ligação de fatores de transcrição, não estão totalmente elucidados.

A proteína de macrófago associada à resistência natural NRAMP1 é uma proteína integral de membrana, expressa somente no lisossomo de macrófagos e monócitos. Após a fagocitose da bactéria, NRAMP1 é conduzida 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 *et al*, 2000). O gene homólogo humano de *Nramp1* foi originalmente designado *NRAMP1*, renomeado posteriormente como *SLC11A1* (*Solute carrier family 11 member 1*). No humano localizado no cromossomo 2q35, esse gene que codifica para *Nramp1* consiste em 15 exons distribuídos em um fragmento de DNA de 12 Kb e codifica uma proteína de 550 aminoácidos (Cellier *et al*, 1994). Diversos polimorfismos foram identificados no gene humano *NRAMP1* e foram realizados alguns estudos de associação desses SNPs com suscetibilidade a tuberculose em algumas populações. O estudo conduzido por Bellamy *et al* (1998) foi o pioneiro na associação de polimorfismos do gene de *Nramp1* e a suscetibilidade a ocorrência da TB, realizado no Oeste da África, onde foram identificados quatro diferentes polimorfismos: 5'(CA)<sub>n</sub>, INT4, D543N e 3'UTR, 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. De acordo com Bellamy *et al* (1998), estes polimorfismos são fatores de risco para TB no Oeste da África. Entretanto outros estudos mostraram que polimorfismo 3'UTR foi associado (na população da Coreia) com tuberculose enquanto polimorfismo na região 5'CA (repetição) é associado a tuberculose na população japonesa (Awomoyi *et al*, 2002).

A IL-12 é uma outra citocina que atua principalmente nas células T e nas células NK, e é um fator determinante na regulação dos padrões de Th-1 e Th-2 nas infecções (Seder *et al*, 1993). O eixo de ativação de IL-12 aparentemente desempenha um papel crucial no desenvolvimento e manutenção da resposta imune contra o *M. tb* (Flynn *et al*, 1993). Os

genes que codificam para cada sub-unidade da IL-12 localizam-se em cromossomos distintos em humanos. O gene da sub-unidade p40 (IL-12B) está localizado no braço longo do cromossomo 5 regiões q31.1 -33.1 (GeneID: 3593 – Pubmed), contém seis exons e cinco introns, incluindo regiões 5' e 3' UTR, esse gene apresenta 15 Kb, e transcreve um RNAm de 2.3Kb e traduz uma proteína de 238 aa. O gene que codifica para a subunidade p35 (IL-12A) localizado no braço longo do cromossomo 3 na região q25.33 – q26 (GeneID: 3592 – Pubmed), apresenta sete exons e seis introns, e traduz uma proteína de 253 aa. Como descrito por Yilmaz *et al*, (2005), vários polimorfismos na região promotora, em regiões intrônicas e na região 3'UTR foram identificados no gene *IL-12p40*; os SNPs presentes na região 3' UTR (+16974 A/C) foram correlacionados com altos níveis *in vitro* na secreção de IL-12 indivíduos homocigotos possuem níveis mais altos da citocina em relação a indivíduos heterocigotos. Em estudo realizado na Indonésia, foi observado que a heterocigotidade de polimorfismos na região promotora do gene de IL-12 foi associada à proteção contra a TB em indivíduos vacinados com BCG, de acordo com Sahiratmadja *et al* (2007).

### **2.6.5. Estado da arte do gene avaliado neste estudo**

#### **2.6.5.1. Interleucina -10**

A interleucina -10 (IL-10) é uma importante citocina multifuncional, secretada por vários tipos de células e assume um papel fundamental no controle das funções dos macrófagos e na resposta inflamatória através da sua direta habilidade de regular a produção de TNF- $\alpha$  e outras citocinas pró-inflamatórias (de Waal Malefyt *et al* 1991).

A IL-10 é produzida inicialmente após a fagocitose do *M. tb* por macrófagos e em pacientes com TB a expressão de RNAm foi demonstrada em células mononucleares circulantes, no sítio de infecção pleural e de lavado broncoalveolar (Shaw *et al*, 2000, Aubert Pivert *et al*, 2000). A IL-10 antagoniza a produção de citocinas proinflamatórias através da regulação negativa das citocinas INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12. A participação desse citocina é essencial à resposta imune protetora contra a TB (van Crevel 2002, Murray *et al* 1997) e já foi mostrado que camundongos transgênicos que expressam altos níveis de IL-10 são mais suscetíveis à infecção micobacteriana, mesmo que esses camundongos continuem produzindo IFN- $\gamma$  em níveis normais semelhantes aos detectados nos controles. Em estudo realizado por Boussiotis *et al* (2000), em indivíduos com tuberculose, a produção de IL-10 foi alta em

pacientes anérgicos, ambos, antes e após o tratamento, sugerindo que *M. tb* induz a produção de IL-10, suprimindo a resposta imune efetiva. Conforme descrito por Salgame e colaboradores (2005), a presença de IL-10 seria induzida pela sinalização do TLR2 em resposta a infecção com *M. tb* como parte da regulação negativa da resposta imune visando a inibição da resposta inflamatória para limitar o dano. Em estudo avaliando células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com TB ativa, negativos para reação tuberculínica, Jang e colaboradores mostraram que os pacientes apresentaram altos níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$  na resposta imune a TB (Jang *et al* 2006). Alguns estudos verificaram o perfil imunossupressor de IL-10 na inibição das infecções virais persistentes, segundo Brooks *et al* (2006), a administração terapêutica de anticorpos que bloqueiam o receptor de IL-10 seria capaz de induzir o retorno das funções das células T, atingindo dessa maneira a eliminação da infecção viral.

O gene de IL-10 localiza-se no braço longo do cromossomo 1 entre a região q31-q32 (GeneID: 3586 Pubmed) e apresenta cinco exons e quatro introns incluindo as regiões 5' e 3' UTR. A região promotora é caracterizada e descrita como um fragmento de 4200-bp. O do gene, de ~4.9 Kb, transcreve um RNAm linear de 1.6Kb e traduz uma proteína de 178aa. Os níveis da secreção de IL-10 são variáveis entre os indivíduos e cerca de 75% dessas variações são inter-individuais e hereditárias. O gene humano de IL-10 é extremamente polimórfico e essas variações são as responsáveis nos diferentes níveis de IL-10 (Kube *et al*, 2001). Existem hoje 49 polimorfismos em associação com IL-10 e um grande número de SNPs depositados em bancos de dados, como por exemplo o Ensembl, sendo que desses 49 polimorfismos, 46 são SNPs, dois são polimorfismos de microsátélites e o último é uma pequena deleção de 3 pb de bases. 28 polimorfismos estão na região promotora, 20 estão na região intrônica (não codificante) ou são substituições sinônimas, e somente 1 resulta em troca de aminoácido (Howell *et al*, 2006). O controle transcricional no gene humano de IL-10 não está bem definido, entretanto acredita-se que outras citocinas podem influenciar, tais como IL-12 e TNF (Trinchieri, 1997, Dickensheets *et al*, 1997, Meisel *et al*, 1996. Vários estudos tem sugerido que, quando a transcrição do gene é influenciada por TNF, existe uma associação direta com os complexos de NF $\kappa$ B e proteínas REL. Entretanto, um estudo recente sugere que o mitógeno p38, ativando a via cinase, também regula em humanos o promotor de IL-10 pela ativação do fator de transcrição sp1. A atividade de IL-10 é mediada por células específicas na superfície do receptor de IL-10, que expressa uma variedade de células, inclusive as do sistema imune (Zhang *et al* 2006). Uma outra característica é a interação de IL-10/IL-10R na

ativação das tirosinas kinases Jak1 e Tyk2, inibindo a atividade de NFκB, resultando dessa maneira na ativação da transcrição de numerosos genes (Clarke *et al*, 1998) . Vários elementos polimórficos no promotor de IL-10 e nas regiões 5 foram associados com a suscetibilidade a diferentes patologias. O melhor exemplo foi o Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE), onde Kube *et al*, (2001) e outros pesquisadores, encontraram associação entre uma região do genótipo microsatélite de IL-10.G e a suscetibilidade à doença e gravidade. A variabilidade genética no gene de *IL-10* e outros genes de citocinas são usados nos estudos das doenças imunes para determinar a suscetibilidade e gravidade. Nos últimos anos, chamou a atenção o papel dos níveis de citocinas nos processos inflamatórios e resposta imune. Vários alelos de IL-10 foram diferentemente associados a outras patologias como a artrite reumatóide, asma, colite ulcerativa, hepatite, tuberculose, hanseníase e câncer (Hajeer *et al*, 1998, Eskdale *et al*, 1998, Rosenwasser *et al*, 1997, Lim *et al*, 1998). Como comentado acima o promotor de IL-10 é altamente polimórfico e polimorfismos de base única (SNPs) nesta região formam combinações com as três mutações mais estudadas nas posições contadas a partir do sítio de tradução ATG de acordo com (Eskdale *et al* 1997), sendo a -627 C/A (reportada como -592), -854 C/T (reportada como -819) e -1117 G/A (reportada como -1082), cujos haplótipos (ATA, ACC, GCC) foram associados com as diferentes expressões de IL-10 (Eskdale *et al*, 1999). A substituição C/A na posição -627 esta em completo desequilíbrio de ligação com a substituição C/T na posição -854 e o polimorfismo na posição -1117 G/A existe em desequilíbrio de ligação entre o alelo A na posição -627 e -1117 (Eskdale *et al*, 1997). Estudos *in vitro* indicaram que a variante alélica -627\*A está associada com uma baixa atividade transcricional bem como uma diminuição da secreção dos níveis de IL-10 (Turner *et al*, 1997, Crawley *et al*, 1999). Existem várias evidências que o haplótipo ATA na região promotora do gene *IL-10* é geneticamente relevante e está associado à baixa produção desta citocina. Entretanto, o haplótipo GCC foi identificado como alto produtor de IL-10, sugerindo dessa maneira que existem diferenças na progressão de determinadas doenças nos indivíduos, resultando em uma herança genética dos polimorfismos no promotor do gene de *IL-10* (Zhang *et al*, 2006).

Nos últimos anos, vários trabalhos foram publicados estudando os polimorfismos presentes na região promotora do gene *IL-10*, principalmente as variações que ocorrem nas posições 3 (-627 C/A, -854 C/T e a -1117 G/A) e a suscetibilidade a ocorrência da TB. Em um estudo caso-controle conduzido por Delgado *et al* (2002) em pacientes com TB pulmonar na população da Camboja, foi observada uma associação entre a heterozigotidade para o SNP -1117 na região do promotor de IL-10 e a suscetibilidade a Tuberculose pulmonar nos

Cambojanos, o que não foi confirmado para a população da Gambia. Segundo Henao *et al* (2006) existe uma forte associação principalmente com a forma pleural da tuberculose e o SNP -1117 genótipo homozigoto A/A está associado à baixa produção de IL-10, nesse estudo não foi encontrado associação do SNP -1117 e suscetibilidade a tuberculose pulmonar como reportado em outros estudos. Os dados publicados na literatura por Oral *et al*, (2006), sugere que o SNP -1117 genótipo A está associado à progressão da TB pulmonar. Entretanto existem alguns contrastes com outros dados da literatura em outras populações onde nenhuma associação significativa foi encontrada em relação a frequência dos genótipos referentes ao SNP -1117 entre pacientes e a suscetibilidade a TB. Neste contexto podemos citar o trabalho publicado recentemente por Prabhu Anand *et al* (2007), que não encontrou associação do SNP -1117 com a suscetibilidade ou resistência a tuberculose pulmonar na população do Sul da Índia. Em contraste aos achados na população do Camboja, Lopez-Maderuelo *et al*, (2002) não observou na população espanhola diferenças entre IL-10 e a frequência do SNP -1117 em pacientes, tuberculina-reativa e tuberculina negativa no grupo de contatos, e em indivíduos normais. Interessantemente, a distribuição dos casos de tuberculose entre diferentes genótipos é similar respectivamente a seus níveis da produção de IL-10, avaliando células mononucleares do sangue periférico (PBMCs); seus dados sugerem portanto que fatores genéticos associados normalmente a um controle positivo ou negativo da produção de IL-10 por células (PBMCs), não estão relacionados à predisposição de euro-descendentes a tuberculose ou proteção da mesma. Os dados na literatura são extremamente conflitantes nos estudos de associação entre os SNPs presentes na região promotora de IL-10, principalmente o SNP na posição -1117 e variante alélica A e a suscetibilidade a TB. Um estudo conduzido por Pacheco *et al* (2008) utilizando meta-análise para correlacionar polimorfismos presente no promotor de IL-10 na posição -1117 G/A e a suscetibilidade a Tuberculose, analisou 8 trabalhos estabelecidos no Medline. Os resultados mostraram que não existe nenhuma evidência de associação IL-10 -1117 G/A relacionado com a suscetibilidade *per se* a tuberculose, embora possa haver alguns efeitos específicos com a forma da doença e gravidade. Na literatura vários outros SNPs estão descritos na região proximal do promotor de IL-10, tais como -627 C/A e -854C/T que foram associadas com TB, mas existem poucos trabalhos, os resultados são contraditórios e várias podem ser as causas para tais contradições. A maioria desses estudos tipo caso-controle fazem uma análise usando o  $\chi^2$  para cada SNP e isto pode gerar resultados confusos como os descrito na literatura, pois alguns destes SNPs estão em desequilíbrio de ligação e não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em um estudo experimental sobre regiões maiores do genoma, foi observado que o genoma humano

contém longos segmentos que estão em alto desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*) o que limita a diversidade de haplótipos, sugerindo dessa maneira a necessidade de usar a informação dos haplótipos para os estudos de associação (Daly *et al.*, 2001; Gabriel *et al.*, 2002). Em contrapartida, as diferenças étnicas na distribuição da diversidade dos polimorfismos no gene de IL-10 também são fatores importantes para determinar a possível relação doença-gene nos diferentes desfechos possíveis para as doenças infecciosas (Opdal 2004, Moraes *et al* 2003).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Principal:

- Definir a diversidade genética da região promotora do gene que codifica para a Interleucina-10 em diferentes grupos de indivíduos portadores ou não de tuberculose ativa.

#### 3.2. Objetivos Específicos:

- Definir as variações nas seqüências da região regulatória do gene em estudo através de sequenciamento de 1500pb acima do sítio de iniciação da tradução;
- Disponibilizar haplótipos de alta resolução da região regulatória deste gene;
- Utilizar os haplótipos de alta resolução encontrados para avaliar a possível associação dos mesmos com a suscetibilidade a ocorrência de TB ativa e infecção recente por *M. tuberculosis*;
- Identificar novos SNPs ainda não descritos na literatura;
- Descrever as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas das variantes alélicas.

## **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 do gene que codifica para a Interleucina-10 (IL-10) b) um estudo de associação do tipo caso-controle, envolvendo pacientes com TBP (Tuberculose Pulmonar) e TBE (Tuberculose Extrapulmonar) e seus contatos diretos não relacionados consanguineamente.

### **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 a 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, Rio de Janeiro. Este laboratório foi o responsável pela execução de toda a 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 sequenciamento utilizando a Plataforma de Sequenciamento do PDTIS - Fiocruz e todo o suporte na parte de bioinformática (análise dos resultados).

#### **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 ativa.

### **4.4. Critérios de inclusão**

#### **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 assinaram 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) no intervalo de dois tempos, tamanho de 0 e acima de 10mm de induração;

- c) Aceitaram participar do estudo e assinaram 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 controles 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 “vacuntainer” contendo EDTA ou tampão citrato com o anticoagulante. Após homogeneização por inversão o mesmo foi congelado a -20°C para posterior extração do DNA.

#### **4.8. Suporte Financeiro**

- \* FAPERJ- CNPq- PRONEX/2006

- \* Programa de Orçamentos e Metas (POM) – Fundação Oswaldo Cruz/ 2007
- \* FIOCRUZ/PDTIS/Plataforma de sequenciamento
- \* CAPES (bolsa de mestrado) ano 2007

## **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 desenvolvida “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 sequenciamento. Após a realização dos testes comparativos entre os dois métodos, o método comercial foi escolhido por permitir o isolamento do DNA a partir de volumes muito pequenos de amostra (100µL), 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 utilizar 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)**

Para um volume de 100µL de sangue periférico, 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 foram adicionados em tubo de microcentrífuga. A solução foi agitada em vortex por 10 segundos e incubada em banho-maria a 56°C por 16-18horas. Após a incubação, 500µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foram adicionadas seguido de uma agitação por 10 segundos em vortex e centrifugação a 14000 rpm por 2 minutos, em seguida a fase aquosa (superior) foi transferida para outro tubo. Para o isolamento do DNA, 0,25M, concentração final, de NaCl, juntamente com 2 volumes de etanol absoluto foram adicionados seguido de agitação lenta e precipitação por 30 minutos. Após este período a mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Para a evaporação do etanol o tubo foi mantido aberto a temperatura ambiente por 20 minutos (nesta

etapa pode-se lavar o sedimento com etanol 70% gelado). Após a secagem o DNA foi ressuspensionado em 50µL de água Milli Q ou TE 1X (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA).

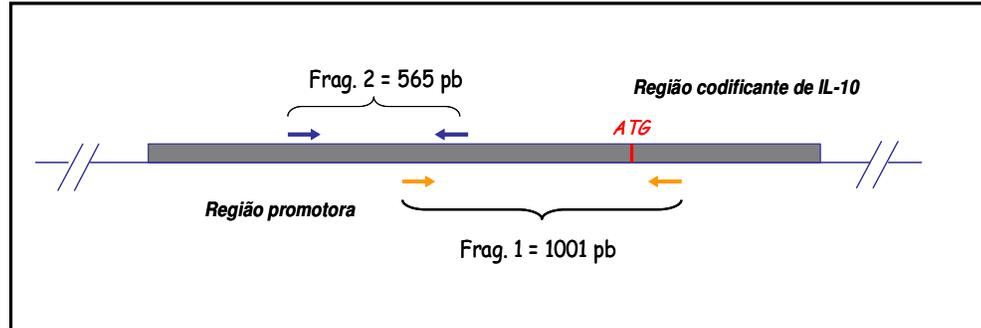
#### **4.9.1.2. Purificação de DNA genômico a partir do Kit Flexigene (Qiagen)**

Este Kit permite variação da quantidade de sangue total a ser utilizado de 100µL-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 100µL 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 hidrocloreto) 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 do gene que codificam para IL-10**

Como estratégia de amplificação da região de interesse (parte da região promotora do gene que codifica para IL-10), aproximadamente 1500pb acima do sítio de transcrição, optamos pela geração de dois fragmentos; o primeiro com 1001pb e o segundo com 565pb como mostrado na figura 4. O desenho dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação foi realizado com base na sequência, do respectivo gene, extraída do GenBank (Release AF418271 (fragmento 1) e Z30175 (fragmento 2) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>) utilizando o programa Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)).

A padronização das condições de amplificação 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 na temperatura de anelamento, a fim de obtermos uma banda específica para o sequenciamento. Adicionalmente foram testadas também diferentes concentrações dos dNTPs, de magnésio e de DNA alvo.



**Figura 4:** Ilustração da estratégia utilizada para a amplificação de parte da região promotora do gene que codifica para IL-10. O fragmento 1 com 1001 pb e o fragmento 2 com 565pb.

#### 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 eletroforese foi realizada a 80V, em tampão 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 sequenciamento com acetato de amônio 7,5 M**

Esta purificação é um método “*in house*”, que permite a purificação dos produtos de PCR de iniciadores, dNTPs e outros que não ácidos nucleicos. 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 14000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante é desprezado e o sedimento lavado com etanol 70% 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 sequenciamento com Kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up (Invitrogen)**

Este sistema permite rápida e eficiente purificação dos produtos amplificados de resíduos de sal, iniciadores, dNTPs e outros reagentes que não ácidos nucleicos. 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 a 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 nucleico. Em baixo pH, as esferas magnéticas têm uma carga positiva e liga o ácido nucleico 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 nucleico, 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. Sequenciamento automatizado**

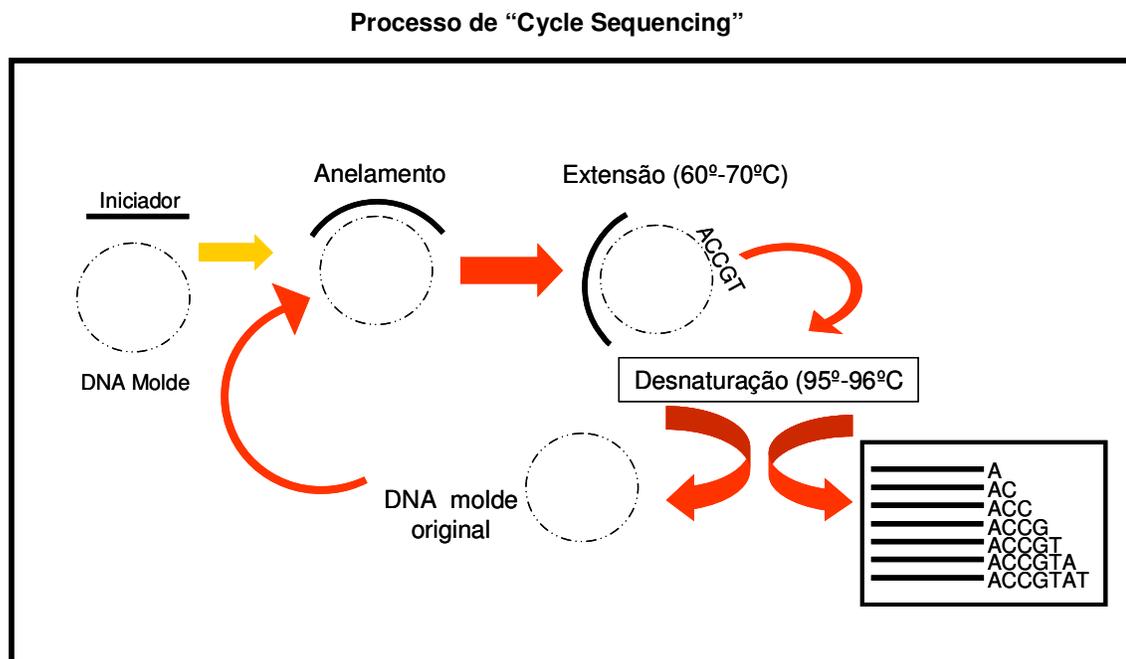
Tendo em vista o tamanho do produto amplificado a ser sequenciado do primeiro fragmento (1001pb), foram utilizados dois iniciadores externos e dois iniciadores internos a fim de poder atingir de forma bem resolvida as extremidades. Para o segundo fragmento foram utilizados apenas iniciadores externos, pois o segundo fragmento era de apenas 565pb.

Os métodos de sequenciamento 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 sequência de DNA.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o “kit ABI PRISM<sup>®</sup> Big Dye<sup>®</sup> 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 a uma base específica. Sendo assim, é possível sequenciar 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 sequência pegando os iniciadores externos (quadro 1). As reações foram analisadas no sequenciador de 48 capilares “ABI PRISM<sup>®</sup> 3730 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems), situado no Laboratório de Biologia Molecular da FIOCRUZ/ Plataforma PDTIS. A figura (5) abaixo, mostra o processo de ciclagem na reação de sequenciamento.

**Quadro 2:** Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento.

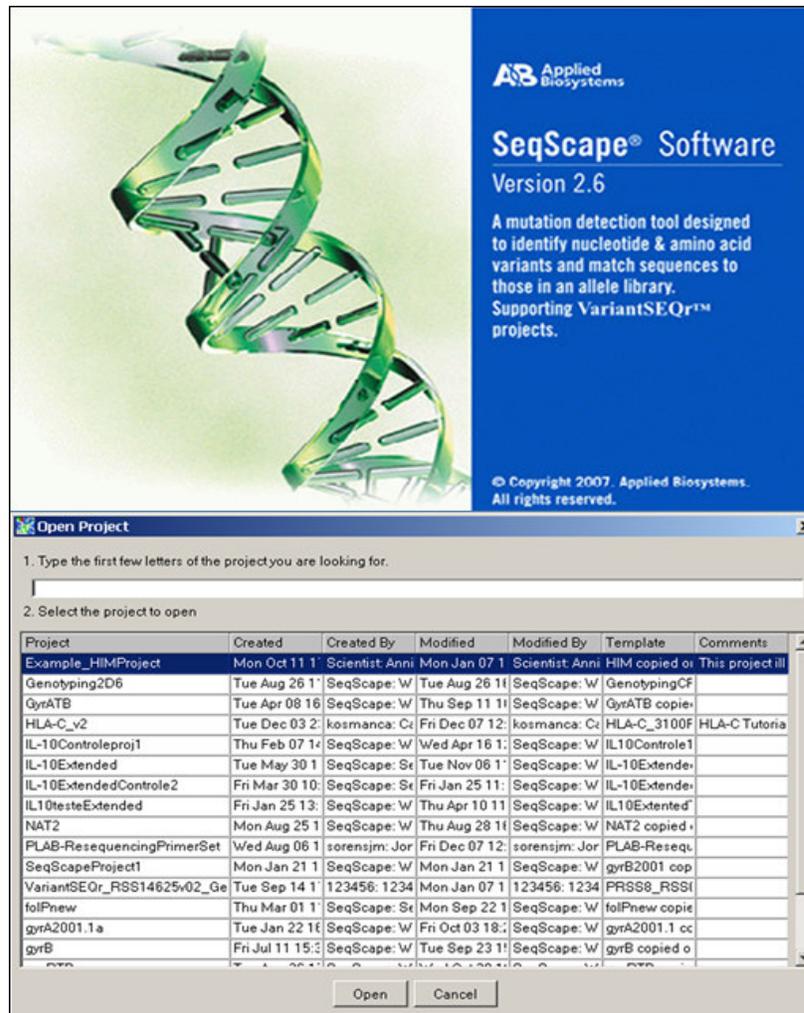
Gene	Iniciadores 5'-3'
<i>IL-10 fragmento 1</i>	Externo Sense: CTG TGC CTC AGT TTG CTC AC
	Externo Antisense: ACT CTG CTG AAG GCA TCT CG
	Interno Sense: GCA ATT TGT CCA CGT CAC TG
	Interno Antisense: TTG GTT GAA CAT GAA CTT CTG
<i>IL-10 fragmento 2</i>	Externo Sense: TTC CCC AGG TAG AGC AAC AC
	Externo Antisense: GGC ACA TGT TTC CAC CTC TT

**Figura 5:** Ilustração da ciclagem na metodologia de sequenciamento.

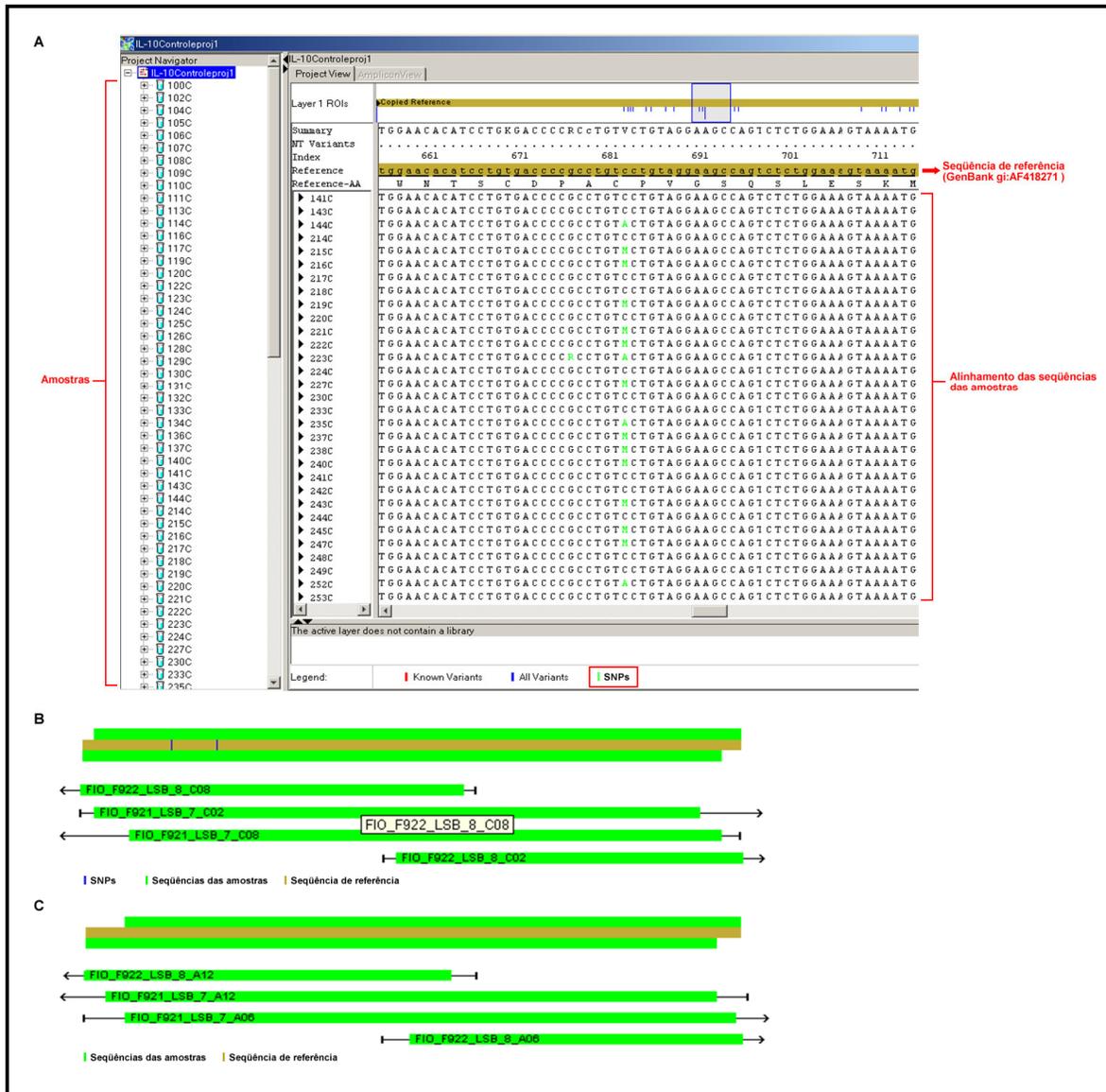
#### **4.9.7. Análise das sequências e identificação dos SNPs presentes na região promotora do gene que codifica para a Interleucina-10 (IL-10)**

As sequências foram analisadas pelo programa SeqScape versão 2.6 (<http://www.appliedbiosystems.com/catalog/myab/StoreCatalog/products/CategoryDetails.jsp?hierarchyID=101&category3rd=111917&trail=no>) da Applied Biosystems (figura 6 e 7). Este software é uma ferramenta de alinhamento e comparação de sequências que permite uma rápida identificação de variantes na sequência. O software permite alinhar e comparar sequências obtidas diretamente do sequenciador automático contra uma sequência referência. Ele é capaz de alinhar e comparar múltiplas amostras mostrando o eletroferograma e o índice de qualidade de cada sequência e o índice de qualidade do alinhamento e da comparação permitindo dois tipos de análise:

- \* Identificação de variantes nucleotídicas e aminoacídicas. O software identifica posições que diferem da sequência 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 sequência consenso.



**Figura 6:** Página inicial do software SeqScape® versão 2.6 mostrando os projetos programados.



**Figuras 7 A, B e C:** Ilustração da utilização do SeqScape v.2.6. Nesta janela podem ser observadas as sequências obtidas a partir de cada iniciador bem como a região de aproveitamento de cada uma delas (verde). Nesse indivíduo foram detectado 2 SNP, ou seja, 2 bases se apresentaram distintas da sequência referência (7B). A imagem 7C mostra um o indivíduo sem nenhum SNP encontrado nesta região do gene.

#### **4.10. Construção haplotípica dos SNPs encontrados na região promotora do gene que codifica para Interleucina-10 (IL-10) utilizando software PHASE versão 2.1.1**

No programa PHASE é implementado um método de estatística Bayesiana para reconstrução haplotípica para dados de genótipo populacional. Este software permite usar dados dos SNPs, microsátélites e outros loci multi-alélicos (ex: SNPs trialélicos e alelos HLA). A versão 2.1.1 é uma extensão da implementação do método original descrito por Stephens *et al* (2001). Algumas dessas extensões foram descritas por Stephens and Donnelly (2003). Esse programa é uma nova introdução computacional:

- Resultando mais rapidamente em haplótipos de alta resolução
- Introdução de um novo modelo para recombinações e declínio do desequilíbrio de ligação (LD) distante, que resultam em uma maior precisão dos haplótipos estimados;
- Facilita a execução do teste para frequência haplotípicas diferentes entre casos e contatos.
- Possui diversos formatos de saída incluindo;
- Estimativa da frequência haplotípica populacional,
- Lista dos mais prováveis pares de haplótipos para cada indivíduo,
- Facilidade no *output* nas amostras para posterior distribuição da reconstrução dos haplótipos.

#### **4.11. Análise estatística**

Os polimorfismos foram testados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o teste do qui-quadrado. As análises estatísticas empregadas neste estudo foram realizadas no programa XLSTAT 2008.7 (*Addinsoft Software Inc – New York -USA*). A magnitude das associações foi estimada como razão de chances (Odds e Ratio, OR) e o coeficientes de associação. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 0,05. O programa Epi Info (versão 3.5.1 2008, Centers for Disease Control and Prevention – USA) considerando o valor de 5% ( $p < 0,05$ ) como limiar de significância estatística no estudo de associação dos haplótipos entre os números observados e esperados separadamente em pacientes e contatos.

#### **4.12. Aspectos Éticos**

O presente estudo foi aprovado no comitê de ética em pesquisa (CEP) da Fundação Oswaldo Cruz no ano de 2005 com o número 294/05.

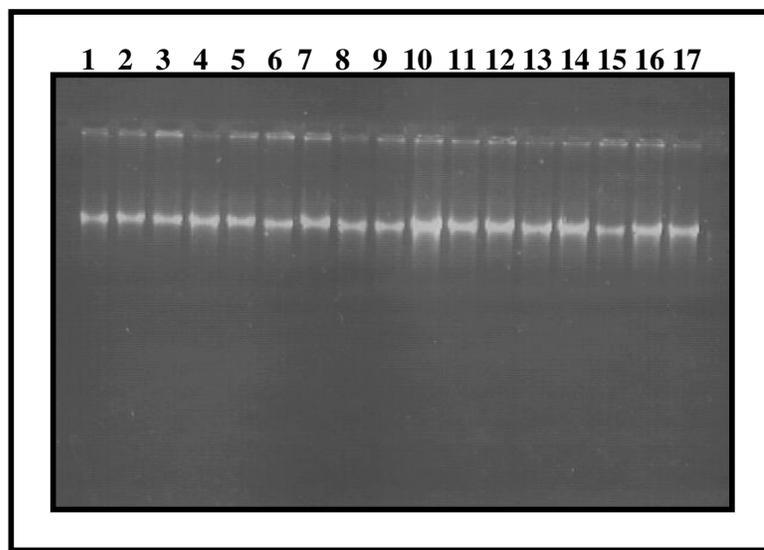
## 5. RESULTADOS

Neste estudo, realizamos, através de sequenciamento, o mapeamento parcial da região promotora do gene que codifica para IL-10. Descrevemos as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos encontrados e investigamos a possível associação dos mesmos com diferentes desfechos após a infecção pelo *M. tb*. Inicialmente, o grupo de estudo compreendeu um total de 492 indivíduos, sendo 221 pacientes com tuberculose nas diversas formas clínicas e 271 contatos sadios não consanguíneos e sem histórico de TB prévia. As amostras de DNA isoladas do sangue periférico foram amplificadas de acordo com a região de interesse para o alvo estudado e posteriormente genotipadas através de sequenciamento direto do produto amplificado. Tendo em vista que, após análise do banco de dados contendo as informações dos pacientes e contatos, retiramos 39 pacientes que não tinham informação sobre o sítio da TB (pulmonar e extrapulmonar), os pacientes desse estudo não tem sorologia positiva para HIV (HIV+), então nosso grupo de estudo constituiu de 182 pacientes com tuberculose bacteriologicamente confirmada (cultura), 139 portadores de TB pulmonar (TBP) e 43 portadores de TB extrapulmonar (TBE), que constituíram o grupo de casos para o estudo de associação. Considerando o grupo de pacientes de uma forma geral (TBP + TBE), a distribuição por gênero foi de 108 mulheres e 74 homens com uma média de 48 anos de idade. O grupo de contatos (indivíduos sadios) para o estudo de associação arrolou 271 indivíduos não relacionados consanguineamente e com informação do teste intradérmico da tuberculina (TST). Cento e vinte e seis indivíduos apresentaram resultados positivos no teste intradérmico de tuberculina (TST+) e 145 foram negativos (TST-) com uma idade média de 38 anos. O grupo constituiu-se de 103 mulheres e 168 homens, de acordo com o gênero. Após a genotipagem da população geral estudada (pacientes + indivíduos sadios), N=453, um total de 13 polimorfismos foram identificados na região de interesse do gene que codifica para IL-10, dos quais 7 ainda não descritos na literatura e 6 já depositados no banco de SNPs (GenBank – Entrez SNP). Análise de desequilíbrio de ligação (LD) mostrou que 2 destes SNPs encontravam-se em LD. A avaliação geral dos polimorfismos encontrados na população estudada bem como o estudo de associação com diferentes desfechos para TB, foi analisada por comparação das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas. Para todos os SNPs, as frequências genotípicas esperadas na população de estudo foram calculadas através do qui-quadrado e mostraram-se consistentes com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

## 5.1. Padronização do procedimento técnico utilizado

### 5.1.1. Extração de DNA genômico a partir de sangue total utilizando o Kit “FlexiGene DNA” (Qiagen)

Foi utilizado o Kit comercial “Flexigene DNA-Qiagen” para a extração de DNA genômico humano diretamente de amostras de sangue total congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Conforme mostrado na Figura 8, o rendimento e a integridade do DNA obtido foi satisfatório (DNA altamente concentrado e íntegro) em um curto espaço de tempo. Adicionalmente, este método apresenta a vantagem da não utilização de solventes orgânicos além de ser menos dispendioso, portanto, foi utilizado para todas as extrações de DNA realizadas neste trabalho.



**Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Contendo amostras de DNA extraído de sangue total com o kit “Flexigene Qiagen”. Linhas: 1-17 DNA proveniente de 17 amostras de pacientes.

Após a escolha da região de interesse (a ser mapeada) no gene de *IL-10* e o desenho dos oligonucleotídeos a serem utilizados para a amplificação, procedemos a padronização das condições de amplificação por PCR dos fragmentos individualmente (fragmento 1 e fragmento 2). A padronização envolveu os seguintes parâmetros: temperatura de anelamento

dos oligonucleotídeos, concentração de dNTPs, concentração de  $Mg^{2+}$  e a concentração de DNA alvo.

### 5.1.2. Padronização das condições para a amplificação da região de interesse do gene que codifica para Interleucina-10

A fim de determinarmos as condições de severidade da reação de amplificação para este gene, realizamos um experimento de gradiente de temperatura, onde foram testadas paralelamente algumas variações como diferentes concentrações de  $Mg^{2+}$  e a concentração de DNA alvo (quadro 3).

- **Variação de  $Mg^{2+}$ :**

Com o objetivo de determinarmos as condições de severidade da reação de amplificação, foi realizado um experimento de gradiente com os dois principais fatores envolvidos (concentração de  $MgCl_2$  e temperatura). Utilizando DNA extraído com o método anteriormente padronizado, procedemos a amplificação utilizando as condições descritas abaixo (quadro 1). A concentração de  $Mg^{2+}$  escolhida foi a de 2mM, que funcionou melhor desde o início dos testes de amplificação, e a dos dNTPs escolhidas foi de 200 $\mu$ M. As condições ideais de amplificação para cada gene estão descritas nos resultados.

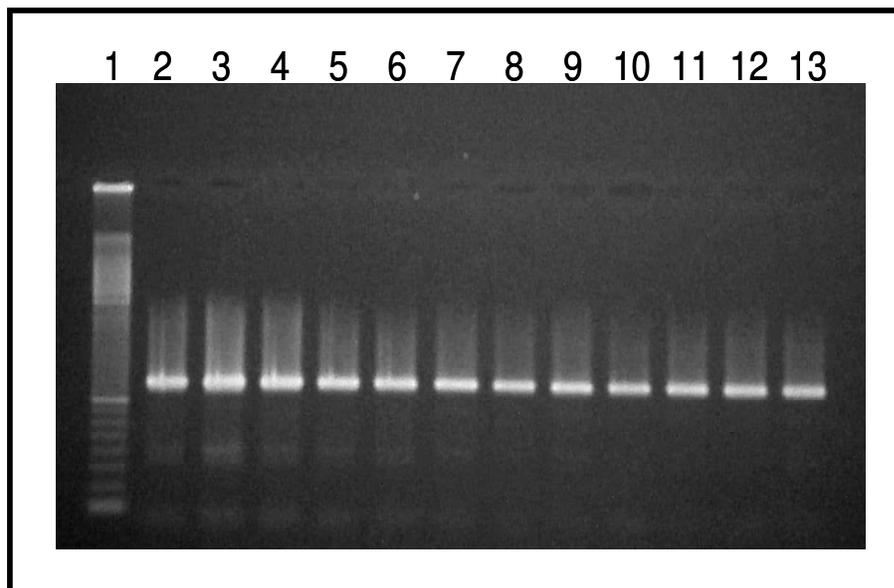
**Quadro 3:** Variação na concentração de  $Mg^{2+}$  e dNTPs

dNTP	$Mg^{2+}$				
50 $\mu$ M	1,0mM	1,5mM	2,0mM	2,5mM	3,0mM
100 $\mu$ M	1,0mM	1,5mM	2,0mM	2,5mM	3,0mM
200 $\mu$ M	1,0mM	1,5mM	2,0mM	2,5mM	3,0mM

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

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 do DNA) com uma variação a ser estabelecida

pela máquina (Figuras 9 e 10). Com base neste experimento, a temperatura de 70°C utilizando 200ng de cada iniciador, 2,5mM Mg<sup>2+</sup> e 100ng de DNA alvo foi escolhida para a amplificação da região de interesse do fragmento 1 (quadro 3) e a temperatura de 63,3°C 200ng de cada iniciador, 2,5mM Mg<sup>2+</sup> e 100ng DNA alvo para a amplificação da região de interesse do fragmento 2 (quadro 3). As amplificações dos fragmentos 1 e 2 são mostradas em amostras provenientes do estudo nas figuras 11 e 12. A purificação desses produtos amplificados com o Kit ChargeSwitch® (Invitrogen), o kit é específico para a purificação de fragmentos de DNA que variam de 90pb a 40kb, permitindo variação do volume a ser purificado de modo que se possa 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. A qualidade destas purificações são ilustradas nas figura 13 (fragmento 1) e figura 14 (fragmento 2).

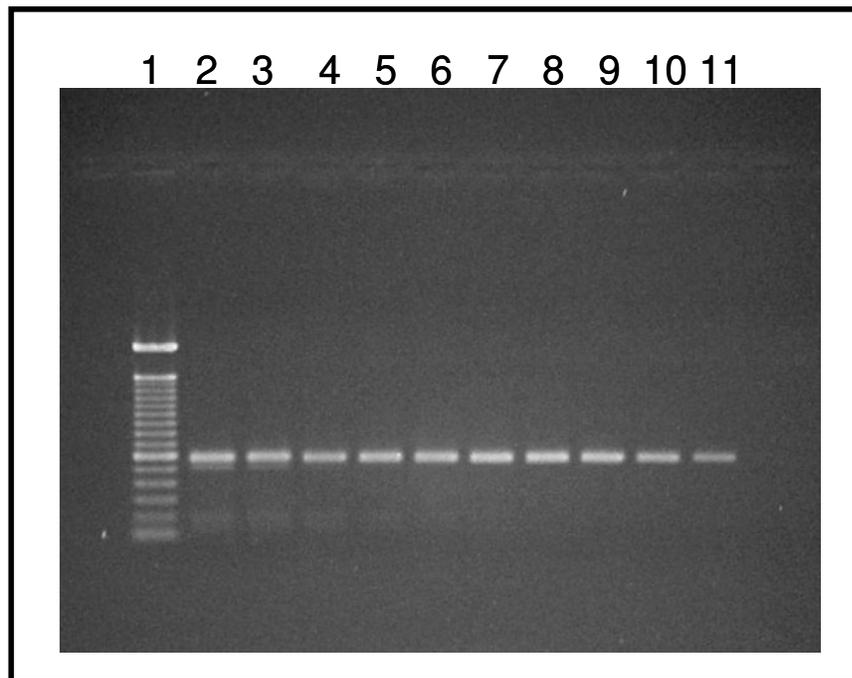


**Figura 9:** PCR de gradiente para a padronização da amplificação da região promotora do gene de *IL-10* (**fragmento 1**): Linhas: (1) Marcador molecular de 100 pb (DNA ladder); (2 a 13) produtos amplificados nas diferentes temperaturas: (2) 66,°C, (3) 66,1°C, (4) 66,3°C, (5) 66,9°C, (6) 67,1°C, (7) 67,6°C, (8) 68,3°C, (9) 68,8°C, (10) 69,3°C, (11) 69,6°C (12) 69,9°C (13) 70,0°C.

**Quadro 4:** Condições ideais para a amplificação do gene de *IL-10* (fragmento 1).

Gene	Seqüências dos Iniciadores (5'-3')	Ciclagem	Tamanho do produto
<i>IL-10</i>	<b>Sense:</b> CTGTGCCTCAGTTTGCTCAC <b>Antisense:</b> ACTCTGCTGAAGGCATCTCG	94°C – 5' 1X	1001pb
		94°C – 1' } 35X	
		70°C – 1' }	
		72°C – 1' }	
		72° – 5' 1X	

A PCR do fragmento1 foi realizada em 50µL de mistura de reação contendo tampão da enzima 1X; 1U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen); 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 200µM dNTPs; 200ng de cada iniciador; e 100ng de DNA molde.



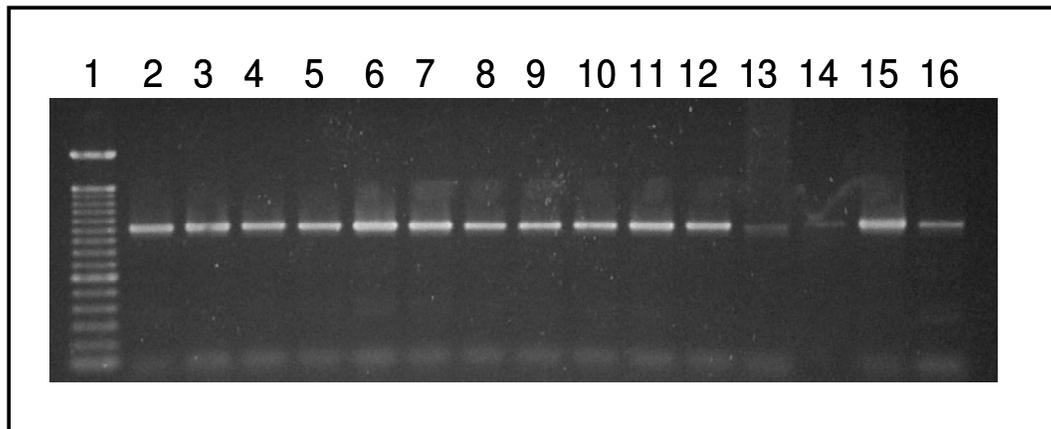
**Figura 10:** PCR de gradiente para padronização da amplificação da região promotora do gene de *IL-10* (**fragmento 2**): Linhas: (1) Marcador molecular de 100 pb (DNA ladder); (2 a 11) produtos amplificados nas diferentes temperaturas: (2) 55,1,°C, (3) 55,3°C, (4) 56,3°C, (5) 57,7°C, (6) 59,4°C, (7) 61,4°C (8) 63,3°C, (9) 65,3°C, (10) 67,6°C, (11) 69°C.

**Quadro 5:** Condições ideais para a amplificação do gene de *IL-10* (fragmento 2)

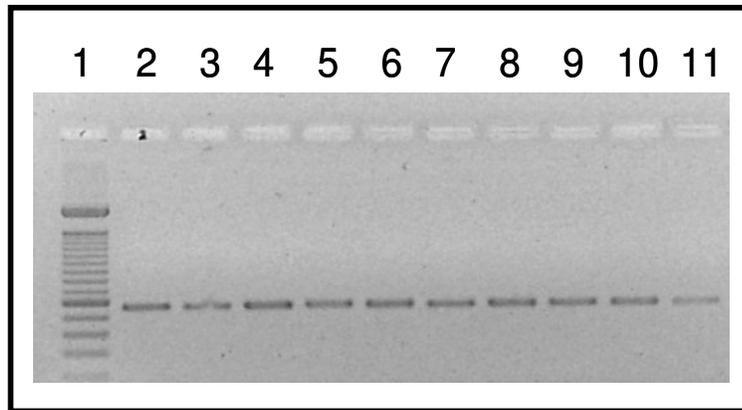
Gene	Seqüências dos Iniciadores (5'-3')	Ciclagem	Tamanho do produto
<i>IL-10</i>	Sense: TTCCCCAGGTAGAGCAACAC Antisense: GGCACATGTTTCCACCTCTT	94°C – 5' 1X 94°C – 1' } 63,3°C – 1' } 35X 72°C – 1' } 72° – 5' 1X	565pb

A PCR do fragmento 2 foi realizada em 50µL de mistura de reação contendo tampão da enzima 1X; 1U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen); 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 200µM dNTPs; 200ng de cada iniciador; e 100ng de DNA genômico.

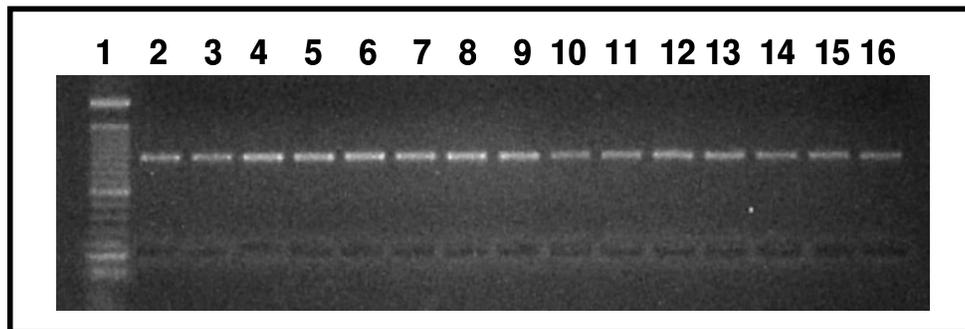
### 5.2. Amplificação das amostras após a padronização e purificação dos produtos amplificados



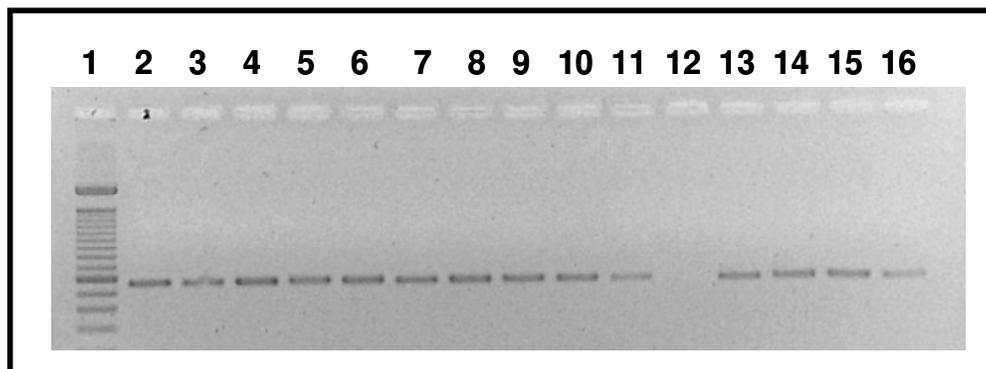
**Figura 11:** Poços 2-16 amplificação do fragmento 1 (1001pb) das amostras dos pacientes 1P a 16P; (1) Marcador molecular de 100pb DNA ladder.



**Figura 12:** Poços 2-11 amplificação do fragmento 2 (565pb) das amostras dos pacientes 1P a 11P; (1) Marcador molecular de 100pb DNA ladder.



**Figura 13:** Purificação dos produtos amplificados do fragmento 1 (1001pb) com Kit ChargeSwitch® da Invitrogen, amostras dos contatos 1C a 16C.



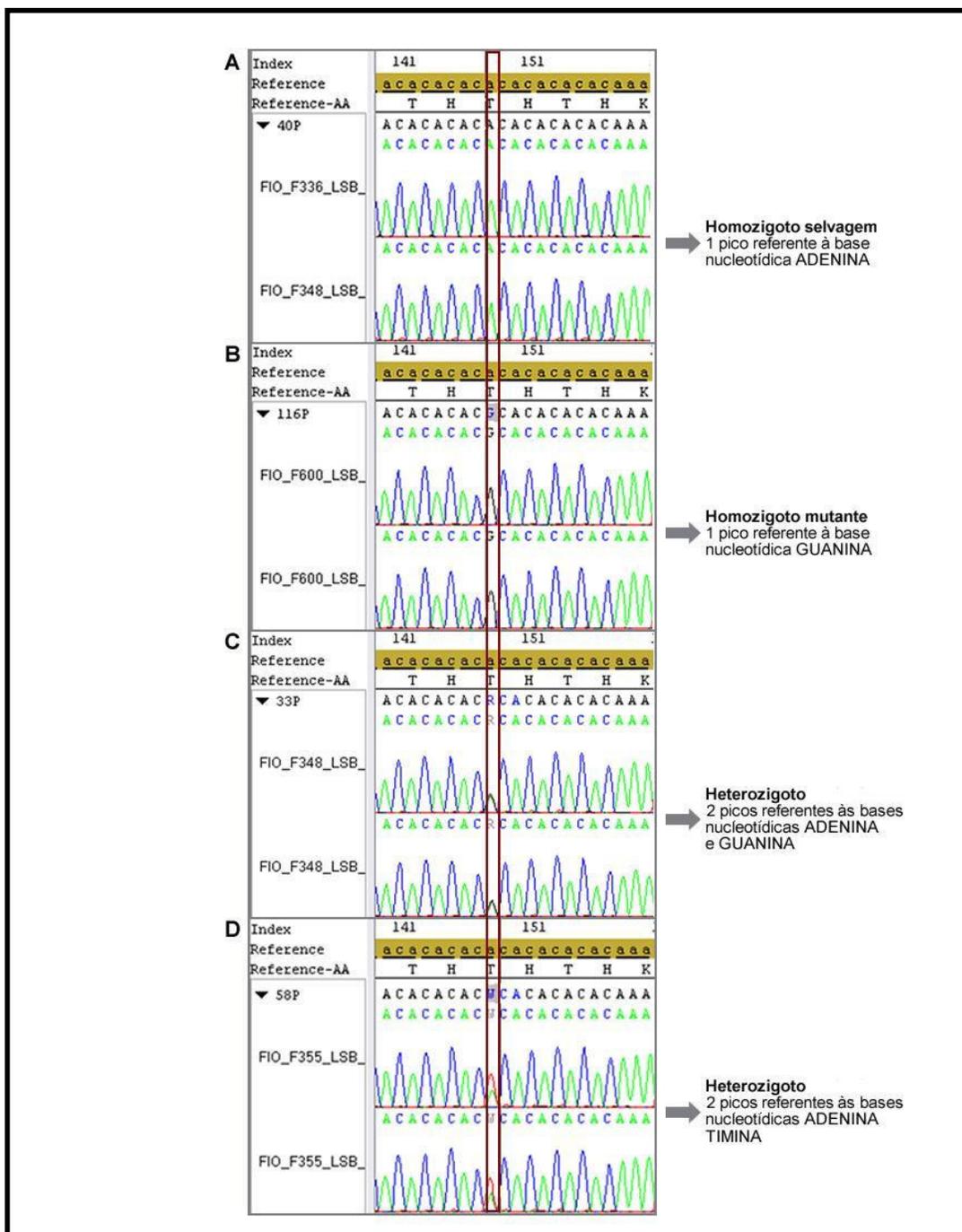
**Figura 14:** Purificação dos produtos amplificados do fragmento 2 (565pb) com kit ChargeSwitch® Invitrogen, amostras dos contatos 1C a 16C.

### **5.3. Sequenciamento e análise dos SNPs encontrados em parte da região promotora do gene que codifica para IL-10 através do programa SeqScape (Applied Biosystems) v 2.6**

Após a purificação dos produtos de PCR, o fragmento 1, principalmente devido ao tamanho, foi submetido a 4 reações de sequenciamento de forma a obter uma sequência completa e de boa qualidade do fragmento amplificado (1001pb), enquanto o fragmento 2 foi submetido a apenas 2 reações. Não houve necessidade de fazer reações com iniciadores internos, pois o fragmento amplificado era de apenas 565pb. A figura 15 mostra a estratégia de desenho dos iniciadores a partir da sequência referência (AF418271 para o fragmento 1 e Z30175 para o fragmento 2) utilizada para fazer a análise e identificação dos SNPs encontrados na população estudada. Após o sequenciamento do fragmento 1, verificamos que cerca de 80-100 pb iniciais de cada cada sequência gerada eram perdidos devido à má qualidade do sequenciamento nesta região (dados não mostrados). Entretanto, conseguimos obter a sequência relativa a toda a extensão do produto amplificado de todas as amostras após a realização das 4 reações independentes (aproveitamento de 850-950 pb de cada reação com iniciadores externos e 500-600 com iniciadores internos). No sequenciamento do fragmento 2 não houve problema devido ao tamanho do produto (565pb), para este fragmento, o aproveitamento foi de 535pb para cada reação, considerado muito bom .



As análises das sequências obtidas das 492 amostras foram realizadas através do programa SeqScape v.2.6 (Applied Biosystems). Com a utilização das seqüências AF418271 (fragmento 1) e Z30175 (fragmento 2). Como referência a contagem dos nucleotídeos iniciou-se imediatamente da base precedente A do códon de iniciação ATG o que correspondendo à posição -1. O alinhamento das sequências obtidas a partir das seqüências referências permitiu identificar (Figura 16), um SNP tri-alélico na posição -1162 da região promotora do gene, mostrando as três possíveis bases encontradas nessa posição. Após as análises foi possível a identificação de 13 diferentes SNPs nesta região do gene *IL-10* na população de estudo, que representa parte da Região Sudeste ( Rio de Janeiro).



**Figura 16:** Ilustração na identificação dos SNPs no gene de *IL-10* através da visualização do cromatograma apresentado pelo programa SeqScape. Esta figura ilustra um SNP tri-alélico na posição -1162 encontrada na região promotora do gene *IL-10*. (A) um indivíduo (40P) homocigoto tipo selvagem, a imagem mostra apenas um pico referente à base nucleotídica Adenina; (B) indivíduo (116P) homocigoto mutante, a imagem mostra apenas um pico referente à base nucleotídica Guanina; (C) indivíduo (33P) heterocigoto, a imagem mostra 2 picos referentes às bases nucleotídicas Adenina e Guanina e (D) indivíduo (58P) heterocigoto, a imagem mostra 2 picos referentes às bases nucleotídicas Adenina e Timina.



5.4. Mapeamento dos SNPs encontrados em relação aos possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição com importância molecular nesta região.

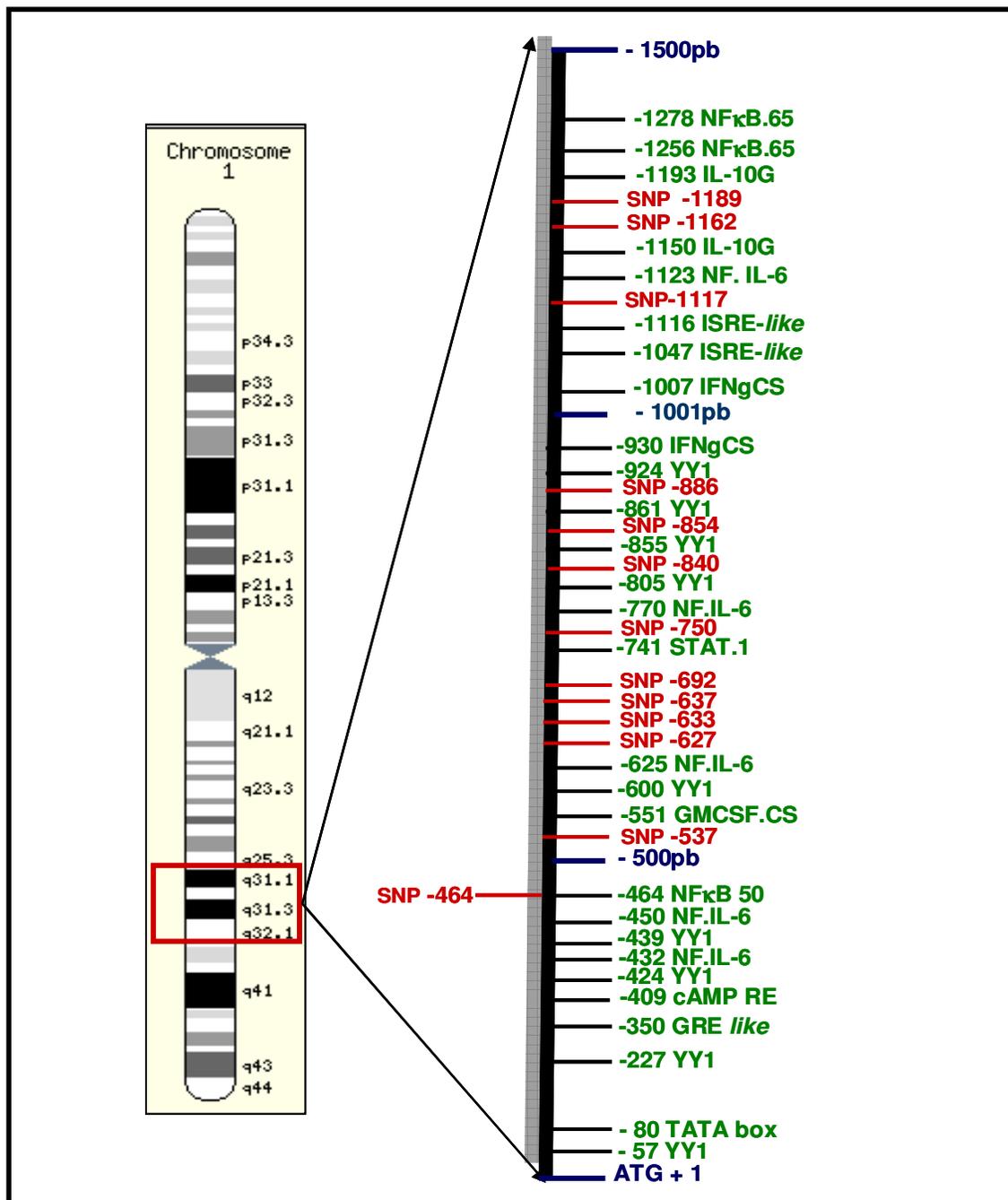


Figura 18: Esquema da região amplificada do gene *IL-10* contendo os SNPs encontrados em relação aos sítios de ligação dos fatores de transcrição (Adaptada de Eskdale *et al* 1997).

Em 1995 Kube *et al*, definiu a localização dos principais fatores de transcrição, que modifica o promotor de gene de *IL-10*. Uma busca computacional revelou a presença de vários sítios de ligação de fatores de transcrição incluindo SLE.L.P, ISRE-like, o cAMP e o GRE-like. Um total de 74 potenciais sítios foram identificados no promotor do gene de *IL-10* (Eskdale *et al* 1997) a Figura 18 mostra os fatores de transcrição e os SNPs encontrados no promotor de *IL-10* neste estudo.

### 5.5. Análise descritiva dos polimorfismos identificados na região de interesse do gene de *IL-10* na população estudada (n=492)

Posteriormente as análises das seqüências de 492 amostras através do software SeqScape, 6 SNPs já descritos na literatura foram identificados. Os outros 7 não foram encontrados em bancos de dados públicos (GenBank – Entrez SNP) podendo portanto serem considerados como SNPs novos. A tabela 1 mostra as frequências absolutas e alélicas dos SNPs encontrados na população de estudo.

**Tabela 1:** Descrição das frequências absolutas e alélicas dos 13 SNPs encontrados na população estudada.

SNP	Nº de amostras	Amostras heterozigotas	Amostras homozigotas	Frequência absoluta	Frequência alélica
<b>SNPs depositadas em banco de dados (GenBank - Entrez SNP)</b>					
G-1117A	437	207	230	0,888	<b>0,678</b>
G-886A	28	27	1	0,057	<b>0,295</b>
C-854T	294	224	70	0,598	<b>0,370</b>
G-692A	17	17	0	0,035	<b>0,017</b>
C-627A	300	229	71	0,610	<b>0,377</b>
G-464T	13	13	0	0,026	<b>0,013</b>
<b>SNPs não descritas</b>					
C-1189T	9	9	0	0,018	<b>0,009</b>
	7	5	2	-	-
A-1162G/T	4 (G)	2 (G)	2 (G)	0,008 (G)	<b>0,006 (G)</b>
	3 (T)	3 (T)	0	0,008 (T)	<b>0,003 (T)</b>
A-840C	8	8	0	0,016	<b>0,008</b>
C-750T	19	17	2	0,038	<b>0,0213*</b>
G-637C	5	5	0	0,011	<b>0,005</b>
G-633A	2	2	0	0,004	<b>0,002</b>
G-537T	1	1	0	0,200	<b>0,001</b>

\* frequência alélica da variante mutante

Segundo a análise descritiva, dos 13 SNPs identificados nas 492 amostras genotipadas em parte da região promotora do gene de *IL-10*, 3 apresentaram uma frequência muito alta, posições -627, -854, -1117 (também reportadas como -592, -819 e -1082 respectivamente segundo Tuner *et al*, 1997). Segundo a análise de LD, foi observado que os SNPs nas posições -627 e -854 se encontravam em desequilíbrio de ligação, e aparecem simultaneamente no mesmo alelo. Segundo dados da literatura, as frequências destes SNPs encontradas em outros grupos étnicos são similares as encontradas na população brasileira estudada (região sudeste - Rio de Janeiro).

Foram encontradas 7 mutações novas, sendo uma delas uma mutação tri-alélica na posição -1162 (troca de A por G ou por T), embora a frequência deste polimorfismo genético não tenha sido muito alta na população estudada este é um evento muito raro no genoma humano, sendo a primeira mutação tri-alélica identificada na região promotora do gene de *IL-10*. Todas as mutações ainda não descritas na literatura identificadas neste estudo foram confirmadas através da re-amplificação das amostras e por sequenciamento nas duas direções. A distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos de *IL-10* encontrados no total de indivíduos analisados pode ser vista na tabela 2.

**Tabela 2:** Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos identificados na região de interesse do promotor do gene de *IL-10* no total de indivíduos analisados.

Locus	Genótipo	Número de amostras (N=492)	Frequência absoluta	Frequência alélica
-1189*	CC	483	0,9820	<b>0,0090</b>
	CT	9	0,0180	
	(fa) T	9	-	
-1162*	AA	485	0,9860	<b>0,0060 (G)</b> <b>0,0030 (T)</b>
	AG	2	0,0040	
	AT	3	0,0060	
	GG	2	0,0040	
	(fa) T	3	0,0060	
	(fa) G	4	0,0080	
-1117	GG	55	0,1118	<b>0,6780</b>
	GA	207	0,4210	
	AA	230	0,4670	
	(fa) A	667	0,8883	
-886	GG	464	0,9430	<b>0,0295</b>
	GA	27	0,0550	
	AA	1	0,0020	
	(fa) A	29	0,0570	
-854	CC	198	0,4025	<b>0,3700</b>
	CT	224	0,4550	
	TT	70	0,1422	
	(fa) T	364	0,5972	
-840*	AA	484	0,9840	<b>0,0080</b>
	AC	8	0,0160	
	(fa) C	8	-	
-750*	CC	473	0,9600	<b>0,0213</b>
	CT	17	0,0340	
	TT	2	0,0040	
	(fa) T	21	0,0380	
	GG	475	0,9650	
-692	GA	17	0,0350	<b>0,0170</b>
	(fa) A	17	-	
	CC	487	0,9890	
-637*	CG	5	0,0110	<b>0,0050</b>
	(fa) G	5	-	
	GG	490	0,9960	
-633*	GA	2	0,0040	<b>0,0020</b>
	(fa) A	2	-	
	CC	192	0,3900	
-627	CA	229	0,4650	<b>0,3770</b>
	AA	71	0,1440	
	(fa) A	371	0,6100	
	GG	491	0,9980	
-537*	GT	1	0,0020	<b>0,0010</b>
	(fa) T	1	-	
	GG	479	0,9730	
-464	GT	13	0,0260	<b>0,0130</b>
	(fa) T	13	-	

\* SNPs não descritos, (fa) frequência alélica

Após a determinação das frequências alélicas e genotípicas, devido ao grande número amostral e de SNPs encontrados, utilizamos o programa de bioestatística Phase versão 2.1.1 para a identificação dos possíveis haplótipos. Através desse programa, foi possível a identificação de 32 haplótipos para os 13 SNPs identificados na região estudada no gene de *IL-10* dos 492 indivíduos arrolados neste estudo, perfazendo um total de 984 alelos. A tabela 3 abaixo mostra os haplótipos identificados e suas frequências.

**Tabela 3:** Descrição dos haplótipos identificados no gene *IL-10* (n=492) e suas respectivas frequências

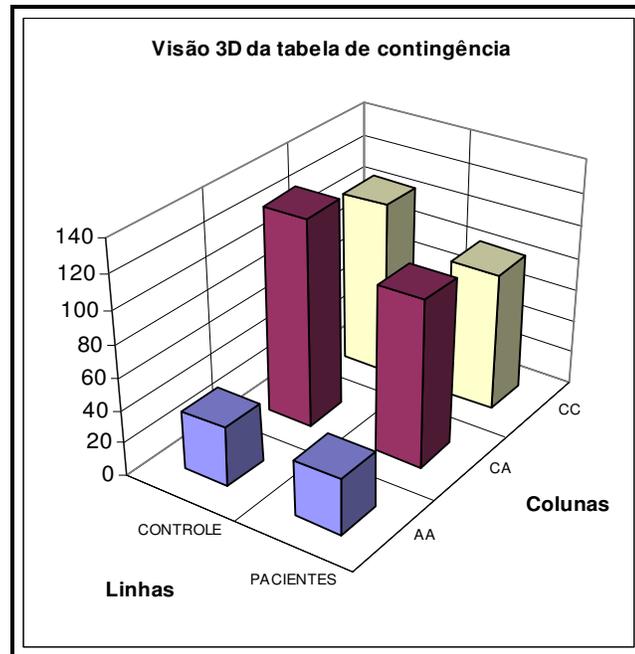
<i>Haplótipos</i>	-1189	-1162	-1117	-886	-854	-840	-750	-692	-637	-633	-627	-537	-464	<i>Alelos</i>	<i>Frequência</i>
1	C	A	G	G	C	A	C	G	C	G	C	G	G	265	0,270
2	<b>T</b>	A	G	G	C	A	C	G	C	G	C	G	G	2	0,002
3	C	<b>T</b>	G	G	C	A	C	G	C	G	C	G	G	2	0,002
4	C	A	<b>A</b>	G	C	A	C	G	C	G	C	G	G	274	0,280
5	C	A	G	<b>A</b>	C	A	C	G	C	G	C	G	G	28	0,028
6	C	A	<b>A</b>	G	<b>T</b>	A	C	G	C	G	C	G	G	10	0,010
7	C	A	<b>A</b>	G	C	<b>C</b>	C	G	C	G	C	G	G	2	0,002
8	C	A	G	G	C	A	<b>T</b>	G	C	G	C	G	G	6	0,006
9	C	A	<b>A</b>	G	C	A	<b>T</b>	G	C	G	C	G	G	2	0,002
10	C	A	G	G	C	A	C	<b>A</b>	C	G	C	G	G	2	0,002
11	C	A	<b>A</b>	G	C	A	C	<b>A</b>	C	G	C	G	G	2	0,002
12	C	A	G	G	C	A	C	G	<b>G</b>	G	C	G	G	2	0,002
13	C	A	G	G	C	A	C	G	C	G	<b>A</b>	G	G	1	0,001
14	C	A	<b>A</b>	G	C	A	C	G	C	G	<b>A</b>	G	G	11	0,011
15	C	A	G	G	<b>T</b>	A	C	G	C	G	<b>A</b>	G	G	2	0,002
16	C	A	<b>A</b>	G	<b>T</b>	A	C	G	C	G	<b>A</b>	G	G	311	0,316
17	<b>T</b>	A	<b>A</b>	G	<b>T</b>	A	C	G	C	G	<b>A</b>	G	G	7	0,007

Haplótipos	-1189	-1162	-1117	-886	-854	-840	-750	-692	-637	-633	-627	-537	-464	Alelos	Frequência
18	C	<b>T</b>	<b>A</b>	G	<b>T</b>	A	C	G	C	G	<b>A</b>	G	G	1	0,001
19	C	A	<b>A</b>	G	<b>T</b>	<b>C</b>	C	G	C	G	<b>A</b>	G	G	6	0,006
20	C	A	G	G	C	A	<b>T</b>	G	C	G	<b>A</b>	G	G	1	0,001
21	C	A	<b>A</b>	G	<b>T</b>	A	<b>T</b>	G	C	G	<b>A</b>	G	G	10	0,010
22	C	A	G	G	C	A	C	<b>A</b>	C	G	<b>A</b>	G	G	2	0,002
23	C	A	G	<b>A</b>	C	A	C	<b>A</b>	C	G	<b>A</b>	G	G	1	0,001
24	C	A	<b>A</b>	G	<b>T</b>	A	C	<b>A</b>	C	G	<b>A</b>	G	G	10	0,010
25	C	A	<b>A</b>	G	<b>T</b>	A	C	G	<b>G</b>	G	<b>A</b>	G	G	2	0,002
26	C	A	<b>A</b>	G	<b>T</b>	A	C	G	C	<b>A</b>	<b>A</b>	G	G	2	0,002
27	C	A	G	G	C	A	C	G	C	G	C	<b>T</b>	G	1	0,001
28	C	A	<b>A</b>	G	C	A	C	G	C	G	C	G	<b>T</b>	7	0,007
29	C	A	G	G	C	A	<b>T</b>	G	C	G	C	G	<b>T</b>	2	0,002
30	C	A	<b>A</b>	G	<b>T</b>	A	C	G	C	G	<b>A</b>	G	<b>T</b>	3	0,003
31	C	A	<b>A</b>	G	C	A	C	G	<b>G</b>	G	<b>A</b>	G	<b>T</b>	1	0,001
32	C	<b>G</b>	<b>A</b>	G	C	A	C	G	C	G	C	G	G	6	0,006

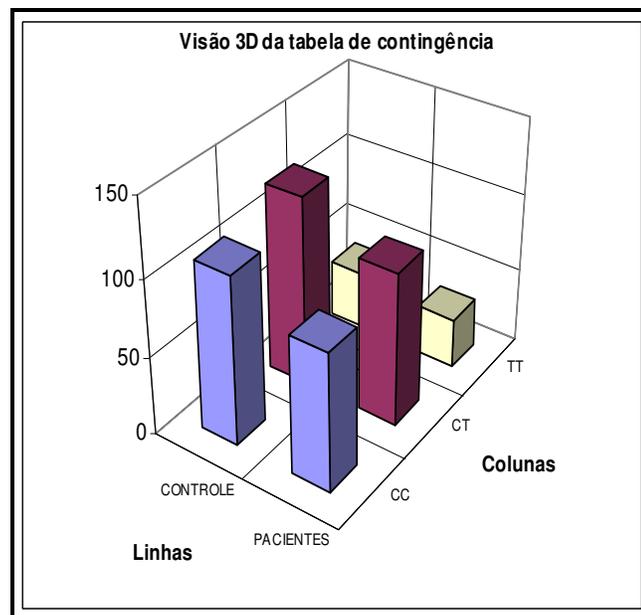
## 5.6. Estudo de associação

Para a realização desse estudo utilizamos as frequências genóticas, alélicas e haplóticas de todos os SNPs encontrados e as comparamos entre os grupos que representaram os diferentes desfechos avaliados. Conforme exposto anteriormente, excluímos 39 pacientes. Portanto, esta avaliação foi realizada com um número amostral de 182 pacientes e 271 casos. Os desfechos avaliados neste estudo foram: a) suscetibilidade *per se* a TB (pacientes de TB *versus* contatos sadios); b) gravidade da doença (TB pulmonar - TBP *versus* TB extrapulmonar - TBE) e c) infecção latente (contatos sadios TST+ *versus* TST-).

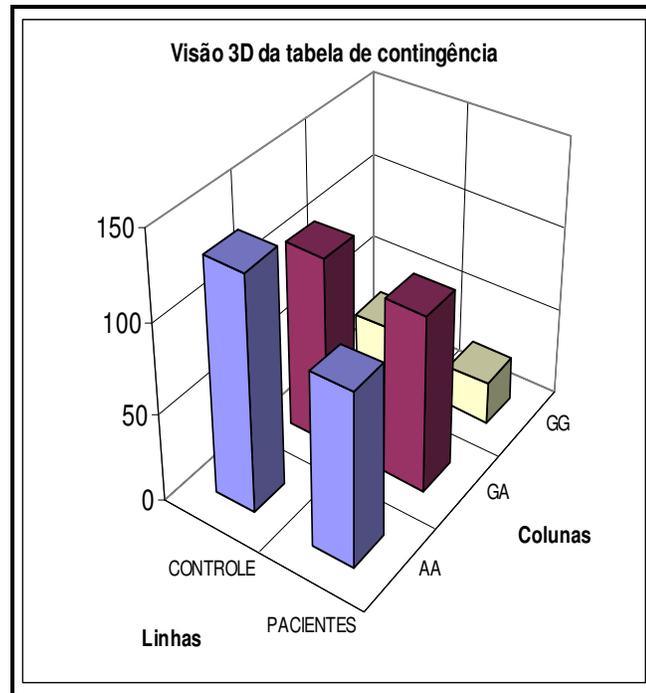
Na primeira avaliação, onde os genótipos identificados referentes aos diferentes SNPs foram testados para verificar a possível associação com a ocorrência de tuberculose ativa, verificamos que, dos treze SNPs testados, alguns foram encontrados em grupos distintos, como os SNPs nas posições -750 (C>T) e -633 (G>A), os quais somente foram observados no grupo controle. Adicionalmente, quatro SNPs, respectivamente nas posições -1189 (C>T), -840 (A>C), -637 (C>G) e -537 (G>T) foram encontrados somente no grupo de pacientes. Para todos estes SNPs não foi possível fazer nenhum tipo de análise estatística comparativa entre os dois grupos (pacientes e de contatos). Para as variações tri-alélicas, calculamos o coeficiente de associação, ao invés da razão de chance devido as três possibilidades encontradas, tipo selvagem, heterozigoto e homozigoto. Como o cálculo da razão de chance é feito com base numa tabela 2X2, só foi calculada para os SNPs que tinham apenas duas possibilidades de genótipo. Dos SNPs já descritos na literatura em outros grupos étnicos, os mais frequentes, mostrado foram os presentes nas posições posições -627, -854 e -1117. As figuras 19, 20 e 21 mostram numa visão 3D a tabela de contingência destes SNPs (-1117, -854 e -627). A tabela 4 mostra a avaliação de todos os loci estudados em relação a sua possível associação com o desfecho (suscetibilidade *per se* a ocorrência de TB ativa). Como podemos observar nesta tabela, existe uma forte associação entre a presença da variante alélica T na posição -464 e a ocorrência de TB ativa.



**Figura 19:** Visão da tabela de contingência em 3D do SNP na posição -627 substituição de uma Citosina (C) por uma Adenina (A). Esta figura mostra a frequência aumentada do genótipo heterozigoto CA nos dois grupos analisados (paciente e contatos).



**Figura 20:** Visão da tabela de contingência em 3D do SNP na posição -854 substituição de uma Citosina (C) por uma Timina (T). Esta figura mostra o genótipo heterozigoto CT é o mais freqüente nos dois grupos analisados (paciente e contatos).



**Figura 21:** Visão da tabela de contingência em 3D do SNP na posição -1117 substituição de uma Guanina (G) por uma Adenina (A). Esta figura mostra que a variável mutante Adenina encontra-se em alta frequência nos dois grupos analisados, sendo o homocigoto mutante mais frequente em ambos os grupos.

**Tabela 4:** Avaliação de associação entre os diferentes genótipos presentes no promotor do gene *IL-10* com suscetibilidade *per se* a ocorrência de TB ativa.

Locus	Genótipo	Contatos		$\chi^2$	p-valor	OR	Coef. Associação
		Pacientes N=221	(TST+/TST-) N= 271				
<b>-1189</b>	CC	212	271	ND	ND	ND	ND
	CT	9	0				
<b>-1162</b>	AA	217	269	0,621	0,892	#	0,035
	AG	1	1				
	AT	2	1				
<b>-1117</b>	GG	1	1	1,699	0,428	#	0,058
	GA	24	31				
	AA	100	107				
<b>-886</b>	GG	97	133	0,931	0,638	#	0,043
	GA	208	256				
	AA	13	14				
<b>-854</b>	CC	0	1	0,025	0,988	#	0,007
	CT	89	109				
	TT	100	124				
<b>-840</b>	AA	32	38	ND	ND	ND	ND
	AC	213	271				
<b>-750</b>	CC	8	0	ND	ND	ND	ND
	CT	221	252				
	TT	0	17				
<b>-692</b>	GG	0	2	0,659	0,417	1,51	0,036
	GA	215	260				
<b>-637</b>	CC	6	11	ND	ND	ND	ND
	CG	216	271				
<b>-633</b>	GG	5	0	1,637	0,200	#	0,057
	GA	221	269				
<b>-627</b>	CC	0	2	0,299	0,861	#	0,024
	CA	85	107				
	AA	102	127				
<b>-537</b>	GG	34	37	ND	ND	#	ND
	GT	220	271				
<b>-464</b>	GG	1	0	5,528	0,019	4,23	0,105
	GT	211	268				
		10	3				

# indefinido; <sup>ND</sup> não determinado

**Tabela 5:** Avaliação de associação entre os diferentes genótipos presentes no promotor do gene *IL-10* com suscetibilidade *per se* a ocorrência de TB ativa. Comparação com os contatos TST positivos.

Locus	Genótipo	Pacientes N=221	Contatos TST+N= 126	$\chi^2$	p-valor	Coef. Associação	OR																																																																																																																																																	
<b>-1189</b>	CC	212	126	5,26	0,022	0,122	#																																																																																																																																																	
	CT	9	0					<b>-1162</b>	AA	217	125	1,16	0,763	0,058	#	AG	1	0	AT	2	1	GG	1	0	<b>-1117</b>	GG	24	12	1,20	0,547	0,059	#	GA	100	51	AA	97	63	<b>-886</b>	GG	208	123	2,23	0,135	0,080	0,39	GA	13	3	<b>-854</b>	CC	89	45	1,67	0,432	0,069	#	CT	100	66	TT	32	15	<b>-840</b>	AA	213	126	ND	ND	ND	ND	AC	8	0	<b>-750</b>	CC	221	114	ND	ND	ND	ND	CT	0	10	TT	0	2	<b>-692</b>	GG	215	121	0,41	0,521	0,034	1,48	GA	6	5	<b>-637</b>	CC	216	126	ND	ND	ND	ND	CG	5	0	<b>-633</b>	GG	221	125	ND	ND	ND	ND	GA	0	1	<b>-627</b>	CC	85	44	0,95	0,619	0,040	#	CA	102	65	AA	34	17	<b>-537</b>	GG	220	126	ND	ND	ND	ND	GT	1	0	<b>-464</b>	GG	211	123	1,02	0,311
<b>-1162</b>	AA	217	125	1,16	0,763	0,058	#																																																																																																																																																	
	AG	1	0																																																																																																																																																					
	AT	2	1																																																																																																																																																					
	GG	1	0																																																																																																																																																					
<b>-1117</b>	GG	24	12	1,20	0,547	0,059	#																																																																																																																																																	
	GA	100	51																																																																																																																																																					
	AA	97	63																																																																																																																																																					
<b>-886</b>	GG	208	123	2,23	0,135	0,080	0,39																																																																																																																																																	
	GA	13	3																																																																																																																																																					
<b>-854</b>	CC	89	45	1,67	0,432	0,069	#																																																																																																																																																	
	CT	100	66																																																																																																																																																					
	TT	32	15																																																																																																																																																					
<b>-840</b>	AA	213	126	ND	ND	ND	ND																																																																																																																																																	
	AC	8	0																																																																																																																																																					
<b>-750</b>	CC	221	114	ND	ND	ND	ND																																																																																																																																																	
	CT	0	10																																																																																																																																																					
	TT	0	2																																																																																																																																																					
<b>-692</b>	GG	215	121	0,41	0,521	0,034	1,48																																																																																																																																																	
	GA	6	5																																																																																																																																																					
<b>-637</b>	CC	216	126	ND	ND	ND	ND																																																																																																																																																	
	CG	5	0																																																																																																																																																					
<b>-633</b>	GG	221	125	ND	ND	ND	ND																																																																																																																																																	
	GA	0	1																																																																																																																																																					
<b>-627</b>	CC	85	44	0,95	0,619	0,040	#																																																																																																																																																	
	CA	102	65																																																																																																																																																					
	AA	34	17																																																																																																																																																					
<b>-537</b>	GG	220	126	ND	ND	ND	ND																																																																																																																																																	
	GT	1	0																																																																																																																																																					
<b>-464</b>	GG	211	123	1,02	0,311	0,054	0,514																																																																																																																																																	
	GT	10	3																																																																																																																																																					

#, indefinido; <sup>ND</sup> não definido

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 6). Para este desfecho, houve uma associação significativa entre o polimorfismo -1189 com a gravidade da doença (tuberculose extrapulmonar). Os demais SNPs não mostraram diferenças significativas entre os grupos analisados

**Tabela 6:** Avaliação da associação entre os diferentes genótipos presentes no promotor do gene *IL-10* com gravidade da TB.

Locus	Genótipo	TBP (N=139)	TBE (N=43)	$\chi^2$	p-valor	Coef. Associação	OR																																																																																																																								
<b>-1189</b>	CC	136	39	<b>4,532</b>	<b>0,033</b>	#	<b>0,215</b>																																																																																																																								
	CT	3	4					<b>-1162</b>	AA	137	42	3,854	0,278	0,130	#	AG	0	1	AT	1	0	GG	1	0	<b>-1117</b>	GG	19	2	2,619	0,270	0,108	#	GA	62	21	AA	58	20	<b>-886</b>	GG	130	42	1,089	0,297	0,070	#	GA	9	1	<b>-854</b>	CC	61	16	1,193	0,551	0,070	#	CT	58	22	TT	20	5	<b>-840</b>	AA	134	42	0,010	0,565	#	0,640	AC	5	1	<b>-692</b>	GG	134	43	ND	ND	ND	ND	GA	5	0	<b>-637</b>	CC	137	41	1,577	0,209	0,084	0,290	CG	2	2	<b>-627</b>	CC	60	14	1,802	0,406	0,089	#	CA	59	23	AA	20	6	<b>-537</b>	GG	139	42	ND	ND	ND	ND	GT	0	1	<b>-464</b>	GG	134	39	2,274	0,132
<b>-1162</b>	AA	137	42	3,854	0,278	0,130	#																																																																																																																								
	AG	0	1																																																																																																																												
	AT	1	0																																																																																																																												
	GG	1	0																																																																																																																												
<b>-1117</b>	GG	19	2	2,619	0,270	0,108	#																																																																																																																								
	GA	62	21																																																																																																																												
	AA	58	20																																																																																																																												
<b>-886</b>	GG	130	42	1,089	0,297	0,070	#																																																																																																																								
	GA	9	1																																																																																																																												
<b>-854</b>	CC	61	16	1,193	0,551	0,070	#																																																																																																																								
	CT	58	22																																																																																																																												
	TT	20	5																																																																																																																												
<b>-840</b>	AA	134	42	0,010	0,565	#	0,640																																																																																																																								
	AC	5	1																																																																																																																												
<b>-692</b>	GG	134	43	ND	ND	ND	ND																																																																																																																								
	GA	5	0																																																																																																																												
<b>-637</b>	CC	137	41	1,577	0,209	0,084	0,290																																																																																																																								
	CG	2	2																																																																																																																												
<b>-627</b>	CC	60	14	1,802	0,406	0,089	#																																																																																																																								
	CA	59	23																																																																																																																												
	AA	20	6																																																																																																																												
<b>-537</b>	GG	139	42	ND	ND	ND	ND																																																																																																																								
	GT	0	1																																																																																																																												
<b>-464</b>	GG	134	39	2,274	0,132	0,1	0,363																																																																																																																								
	GT	5	4																																																																																																																												

<sup>ND</sup>Não definido # indefinido.

Avaliarmos a associação entre os diferentes genótipos com a capacidade de infecção, comparamos a frequência genotípica dos SNPs identificados entre os grupos de contatos TST+ contra o grupo TST-. A tabela 7 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.

**Tabela 7:** Avaliação da associação entre os diferentes genótipos separadamente com capacidade de infecção TST+/TST-.

Locus	Genótipo	TST + (N= 126)	TST - (N= 145)	$\chi^2$	p-valor	OR	Coef. Associação
<b>-1162</b>	AA	125	143	2,891	0,409	#	0,102
	AG	0	1				
	AT	1	0				
	GG	0	1				
<b>-1117</b>	GG	12	19	5,991	0,652	#	0,056
	GA	51	56				
	AA	63	70				
<b>-886</b>	GG	123	133	4,653	0,098	#	0,129
	GA	3	11				
	AA	0	1				
<b>-854</b>	CC	45	64	4,201	0,122	#	0,123
	CT	66	58				
	TT	15	23				
<b>-750</b>	CC	114	138	3,500	0,174	#	0,112
	CT	10	7				
	TT	2	0				
<b>-692</b>	GG	121	139	3,841	0,944	1,04	0,004
	GA	5	6				
<b>-633</b>	GG	125	144	3,841	0,921	0,868	0,006
	GA	1	1				
<b>-627</b>	CC	44	63	2,367	0,306	#	0,093
	CA	65	62				
	AA	17	20				
<b>-464</b>	GG	123	145	ND	ND	#	ND
	GT	3	0				

# indefinido, <sup>ND</sup> não definido

**Tabela 8:** Avaliação da associação entre os diferentes genótipos presentes no promotor do gene *IL-10* suscetibilidade a gravidade da Tuberculose. (TB extrapulmonar – TST+).

Locus	Genótipo	TBE (N= 43)	TST+ (N=126)	$\chi^2$	p-valor	OR	Coef. Associação
<b>-1189</b>	CC	39	126				
	CT	4	0	ND	ND	#	#
<b>-1162</b>	AA	42	125				
	AG	1	0				
	AT	0	1	3,270	0,194	#	0,875
<b>-1117</b>	GG	0	0				
	GG	2	12				
	GA	21	51	0,869	0,647	#	0,101
<b>-886*</b>	AA	20	63				
	GG	42	123				
<b>-854</b>	GA	1	3	#	0,731	1.02	#
	CC	16	45				
	CT	22	66	3,830	0,146	#	0,401
<b>-840</b>	TT	5	16				
	AA	42	126				
<b>-750</b>	AC	1	0	ND	ND	#	ND
	CC	43	114				
	CT	0	10	ND	ND	#	ND
<b>-692</b>	TT	0	2				
	GG	43	121				
<b>-637</b>	GA	0	5	ND	ND	#	ND
	CC	41	126				
<b>-633</b>	CG	2	0	ND	ND	#	ND
	GG	43	125				
<b>-627</b>	GA	0	1	ND	ND	#	ND
	CC	14	44				
	CA	23	65	2,320	0,313	#	0,302
<b>-537</b>	AA	6	17				
	GG	42	126				
<b>-464</b>	GT	1	0	ND	ND	#	ND
	GG	39	123				
<b>-464</b>	GT	4	3	<b>3,87</b>	<b>0,0049</b>	0,24	#

\* Teste exato de Fisher; <sup>ND</sup> não definido, # indefinido

Tendo em vista as análises estatísticas realizadas anteriormente, tentamos uma avaliação da associação entre os diferentes genótipos presentes no promotor do gene *IL-10* suscetibilidade TB extrapulmonar. Os resultados mostraram que os SNPs -1189, -840, -637, -464 e -537 apresentaram forte associação com suscetibilidade a TBE. Para o SNP -1189 a variante alélica T mostrou-se fortemente associada a TBE uma vez que não foi encontrada

essa variante T no grupo de indivíduos TST+, a mutação na posição -840 também apresentou associação com TBE, lembrando que a variante alélica C só foi encontrada em um indivíduo com tuberculose extrapulmonar e não foi encontrada no grupo de TST+. Na posição -637 a variante alélica G também foi positivamente associada com gravidade da tuberculose e na posição -537 a variante alélica T também mostrou associação. No desfecho suscetibilidade *per se* a ocorrência de TB ativa, foi observado também que alguns SNPs estavam associados a proteção à doença. Os SNPs presentes nas posições -750 variante alélica T, -692 variante alélica A e -633 variante alélica A, uma vez que não foram observados no grupo de pacientes com TBE, isso nos sugere uma possível associação com proteção à Tuberculose.

Após a genotipagem de todas as amostras e a avaliação de associação dos SNPs encontrados na região promotora do gene que codifica para *IL-10* com os diferentes desfechos propostos, testamos todos os SNPs contra as variáveis demográficas gênero e idade para verificar a influência das mesmas. Após análise estratificada nenhuma diferença significativa foi encontrada para gênero ou idade com algum dos polimorfismos (dados não mostrados).

Para a realização do estudo de associação com a distribuição dos diferentes haplótipos identificados nos diferentes grupos, selecionamos os haplótipos que apresentam as frequências alélicas mais altas. Neste contexto, os haplótipos incluídos para o estudo de associação são o haplótipo 1 (CAGGCACGCGCGG), haplótipo 4 (CAAGCACGCGCGG) e o haplótipo 16 (CAAGTACGCGAGG) cuja frequências alélicas são 27% presente em 265 alelos, 28% presente em 274 alelos e 31.6% presente em 311 alelos (tabelas 9, 10 e 11). Embora alguns haplótipos tenham sido identificados em grupos distintos suas frequências são muito baixas para um estudo de associação. Os dois quadros abaixo (6 e 7) mostram os haplótipos que não foram encontrados nos grupos dos pacientes e contatos.

**Quadro 6:** Haplótipos ausentes no grupo dos Pacientes

Haplótipos	Ausentes nos grupo dos Pacientes
6	CAAGTACGCGCGG
8	CAGGCATGCGCGG
9	CAAGCATGCGCGG
11	CAAGCACACGCGG
13	CAGGCACGCGAGG
20	CAGGCATGCGAGG
21	CAAGTATGCGAGG
22	CAGGCACACGAGG
23	CAGACACACGAGG
26	CAAGTACGCAAGG
29	CAGGCATGCGCGT

**Quadro 7:** Haplótipos ausentes no grupo dos Contatos

Haplótipos	Ausentes nos grupo dos Contatos
2	TAGGCACGCGCGG
7	CAAGCCCGCGCGG
12	CAGGCACGGGCGG
15	CAGGTACGCGAGG
17	TAAGTACGCGAGG
18	CTAGTACGCGAGG
19	CAAGTCCGCGAGG
25	CAAGTACGGGAGG
27	CAGGCACGCGCTG
30	CAAGTACGCGAGT
31	CAAGCACGGGAGT

**Tabela 9:** Avaliação de associação entre o haplótipo 1, 4 e 16 com a suscetibilidade *per se* a ocorrência de TB ativa. Analisando os contatos TST positivos.

Suscetibilidade <i>per se</i> a ocorrência de TB ativa						
Haplótipo	Pacientes N= 442 alelos	Contatos		OR	$\chi^2$	p-valor
		TST+	N= 252 alelos			
1	126	62		1,22	1.05	0,305
4	115	72		0,88	0,41	0,522
16	138	81		0,96	0,03	0,868

**Tabela 10:** Avaliação de associação entre o haplótipo 1, 4 e 16 com a suscetibilidade *per se* a ocorrência de TB pulmonar. Analisando os contatos TST positivos.

<b>Suscetibilidade <i>per se</i> a ocorrência de Tuberculose Pulmonar</b>					
<b>Haplótipo</b>	<b>Pacientes TBP N= 278 alelos</b>	<b>Contatos TST+ N= 252 alelos</b>	<b>OR</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>p-valor</b>
<b>1</b>	81	62	1,26	1,16	0,281
<b>4</b>	69	72	0,83	0,77	0,380
<b>16</b>	75	81	0,78	1,46	0,227

**Tabela 11:** Avaliação da associação entre os haplótipos 1, 4 e 16 com a suscetibilidade a gravidade da Tuberculose. (Tuberculose Extrapulmonar *versus* TST+).

<b>Suscetibilidade a gravidade da Tuberculose</b>					
<b>Haplótipo</b>	<b>Pacientes TBE N= 86 alelos</b>	<b>Contatos TST+ N= 252 alelos</b>	<b>OR</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>p-valor</b>
<b>1</b>	19	62	0,87	0,11	0,745
<b>4</b>	23	72	0,91	0,03	0,851
<b>16</b>	28	81	1,02	0,01	0,943

Estes haplótipos foram analisados quanto à associação com os desfechos estudados. Como podemos observar na tabela 9, 10 e 11, nenhum apresentou associação significativa com nenhum dos desfechos avaliados.

## 6. DISCUSSÃO

A Tuberculose é uma das enfermidades mais antigas e conhecidas do mundo e hoje, representa um estado de emergência decretado pela Organização Mundial de Saúde desde 1993, como uma enfermidade reemergente. De acordo com a OMS, foram notificados 9,2 milhões de novos casos de TB no mundo em 2006 (OMS 2008) e, dentre os principais fatores que contribuem para essa enfermidade, destacam-se: a persistência da pobreza na nossa sociedade, o alcoolismo, a desnutrição, a ocorrência da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (Aids) nos grandes centros, e a ocorrência da resistência a múltiplas drogas resistente (MDR). Adicionalmente, vários fatores genéticos também têm sido associados com diferentes desfechos após a infecção com *M. tb* tais como: suscetibilidade *per se* do hospedeiro a ocorrência de TB ativa, gravidade da doença e/ou proteção ao desenvolvimento da mesma (Amim *et al*, 2007; Henao, 2006, Correa, 2005; Tso, 2005; Awomyi 2002; Hill, 1996).

A resposta imune do hospedeiro frente ao *Mycobacterium tuberculosis* envolve um amplo arsenal de moléculas envolvendo a resposta inata e a resposta imune adaptativa provida por células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e reguladas por citocinas e outros mediadores, como a produção de anticorpos específicos eficientes para eliminar a infecção e conter a progressão da doença ativa (Salgame 2005; Rook *et al*, 2005). Sabe-se hoje, que a variação interindividual na produção de grande parte destas moléculas está diretamente relacionada ao “background” genético. Nos últimos anos alguns 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 diferentes etiologias, como por exemplo, a Tuberculose. Especificamente no caso da TB, vários autores têm revisto a influência de polimorfismos genéticos em genes candidatos relacionados à resposta anti *Mycobacterium tuberculosis*. Neste contexto, resultados significativos de associação tem sido reportados para polimorfismos em diversos genes, tais como: receptor de vitamina D<sub>3</sub> (VDR), IL-12 (interleucina-12), IL-12RB1 (receptor B1 de interleucina-12), IFN- $\gamma$

(interferon-gama), MBL (lectina ligadora de manose), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), SLC11A1 (*Solute carrier family 11 member 1*), IL-10 (interleucina 10) (Casanova, 2004; Malik, 2002 e Cooke, 2001) e no locus genético HLA (antígenos leucocitários humanos). A presença ou não de variantes alélicas nos respectivos genes que codificam para estas moléculas influencia em diferentes graus o risco relativo em diferentes grupos étnicos. Paralelamente tais variantes, podem também desempenhar um papel modificador em relação à gravidade da apresentação clínica. A interleucina-10 é uma importante citocina imunoreguladora (Mosmann, 1994) e atua na inibição da produção de citocinas proinflamatórias como TNF- $\alpha$  em células T e monócitos. A IL-10 tem papel central na patogênese das doenças autoimunes como o lupus eritematoso sistêmico (SLE) e no decurso de várias doenças infecciosas (Murray *et al* 1997, van Furth *et al* 1995). A produção de IL-10 é completamente regulada por níveis transcricionais (Bienvenu *et al* 1995). Vários estudos têm sugerido que a capacidade de produção de IL-10 é influenciada por fatores genéticos. Estudos de família utilizando gêmeos monozigóticos e dizigóticos, mostraram uma significativa diferença interindividual na produção da mesma após a estimulação por LPS, sugerindo desta forma que 75 % da produção de IL-10 é geneticamente determinada (Reuss *et al* 2002). A região 5'flanqueadora do gene que codifica para IL-10 no cromossomo 1 (1q31) contém vários polimorfismos incluindo 2 microsátélites 1.1 e 4.0 kb acima do sítio de início da transcrição e três polimorfismos de base única (SNPs bialélicos) nas posições -1117 (G/A), -854 (C/T) e -627 (C/A) Eskdale *et al* (1997), reportadas respectivamente como -1082, -819, -592 (Turner *et al* 1997). Vários estudos foram conduzidos em diferentes populações a fim determinar a influencia desses polimorfismos na suscetibilidade a tuberculose; porém, a influência desses SNPs na produção de IL-10 e a associação dos mesmo com suscetibilidade, gravidade ou proteção ainda são contraditórios. A maioria desses estudos foram realizados 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 composta por euro-descendentes, afro-descendentes e ameríndios, poucos são os dados referentes à frequência de polimorfismos de base única neste gene e os poucos estudos existente, prendem-se a um, dois, ou três 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 do gene de *IL-10* (aproximadamente 1500pb acima do sítio de iniciação de tradução ATG) através de sequenciamento em indivíduos portadores de TB e controles sadios. Posteriormente, com base nas frequências encontradas dos diferentes SNPs, procedemos a 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 sequenciamento (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 *IL-10* e sua associação com TB**

Previamente descrito no estudo Kube *et al* (1995), a identificação e análise dos principais sítios de ligação dos fatores de transcrição na região 5'flanqueadora da sequência do gene humano de *IL-10*, +131 a -4082pb (região proximal), foi definida a localização dos fatores de transcrição que modifica de imediato o promotor do gene de *IL-10*, nesta região estão os potenciais fatores de transcrição, com os sinais de transdução para citocinas identificados: GM-CSF encontrado em várias citocinas, CD28-like, GAS-like, GAS-LKRE e YY1-like envolvidos no controle da resposta imune e inflamatória (Eskdale *et al* 1997) e sítios como SLE.LP, ISRE-like, cAMP e GRE-like, e outros elementos do sistema imune. Dentre os sítios descritos incluem-se: o NFκB/REL que media a sinalização com Fator de Necrose Tumoral (TNF) e o sítio de STAT.1, responsável pela sinalização das citocinas e de Interferon (IFN) (David *et al* 1995) e o fator de transcrição YY1-like, que como outros fatores está envolvido no controle imune e na resposta inflamatória (Yant *et al* 1995). Neste contexto podemos observar que a maioria dos SNPs encontrados nesse estudo estão bem próximos deste sítio, observamos que o SNPs na posição -464 está dentro de um importante sítio de transcrição NFκB.50 que sinaliza para a interferon-γ, desta maneira podendo influenciar nos níveis transcricionais do gene de *IL-10* e de outras citocinas.

Por isto, o grande interesse de investigarmos a existência de sítios polimórficos na região promotora do gene *IL-10*, particularmente considerando a função crucial desta citocina na resposta imune.

Em nossas análises, após o sequenciamento dos produtos da PCR em parte do promotor do gene de *IL-10* detectamos treze sítios polimórficos, dos quais sete ainda não estão

descritos na literatura nem em bancos de SNPs. Uma transição de C para T na posição -1189 foi identificada em 9 indivíduos (todos heterozigotos) e um SNP trialélico na posição -1162 (transição de A para G e T). Até então um SNP trialélico nunca mencionado na literatura específica de IL-10, esse tipo de SNP é muito raro no genoma humano e em nosso estudo foi identificado em 7 indivíduos, sendo a transição A para G identificado em 4 indivíduos, 2 heterozigotos e 2 homozigotos, e a troca A por T em 3 indivíduos, todos heterozigotos. Outros 5 SNPs novos foram identificados nas posições -840 A>C em 8 indivíduos (todos heterozigotos), -750 C>T em 19 indivíduos (sendo 2 homozigotos), -637 G>C em 5 indivíduos (heterozigotos), -633 G>A em 5 indivíduos (heterozigotos) e -537 G>T em apenas 1 indivíduo (heterozigoto). Em nossas análises identificamos também seis SNPs descritos e estudados na literatura e depositados nos bancos de dados: -1117 G>A com uma frequência absoluta em nosso estudo de 88,83% da variante alélica A, presente -886G>A, com uma frequência absoluta de 5,7%, -854C>T, com a variante alelica T presente em 59,8%, -692G>A, com uma frequência absoluta de 3,5% da variante A, -627C>A, com a variante alélica A presente em 61% dos indivíduos avaliados e -464G>T com uma frequência do nucleotídeo T de 2,6%. Observamos que os SNPs na posições -854 e -627 estão em desequilíbrio de ligação em todos os grupos analisados neste estudos. Um dos maiores problemas encontrados para o mapeamento dos SNPs através do sequenciamento 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 referência para o início da contagem referente ao sítio de iniciação da transcrição +1. A nomenclatura das posições dos SNPs no gene de *IL-10* é extremamente confusa na literatura: em 1997 dois pesquisadores (Eskdale *et al* 1997 e Turner *et al* 1997) descreveram os 3 SNPs mais estudados no promotor de IL-10, Porém, embora se tratando dos mesmos SNPs, os autores os descreveram em posições diferentes no DNA. Eskdale definiu na seqüência de DNA acima da posição -4082 para o início do sítio de transcrição do gene humano de IL-10, a base precedente o nucleotídeo A do ATG, o que indicaria a posição -1 do promotor. Por outro lado, Turner e colaboradores, definiram a contagem dos nucleotídeos a partir de um sítio de inicio da transcrição relativo a +1132 pb do promotor de IL-10 Turner *et al* (1997). Assim, temos 3 SNPs no mesmo gene que são exatamente as mesmas variações polimórficas e contudo foram descritas como se fossem SNPs distintas (em posições diferentes). Neste contexto, o que observamos na literatura são

associações divergentes de um único SNP, cuja denominação foi equivocada, em uma mesma população, um exemplo foi o estudo conduzido por Zhang *et al* 2006, que mostra as posições dos SNPs -627 e -592 como se fossem 2 SNPs distintos, quando na realidade é o mesmo SNP.

Em nosso estudo, a frequência de cada polimorfismo foi determinada na população de estudo, como observamos na tabela 1. Nesta população, as frequências alélicas das variáveis mutantes para todos os SNPs descritos na literatura e bancos de dados públicos foram maiores de 1%. Para os SNPs novos encontrados, apenas o SNP na posição -750 apresentou uma frequência alélica de 2,13%. Um dado que merece destaque nesse estudo é a presença de alguns SNPs em grupos distintos. Os SNPs nas posições -537 G>T, -637 G>C, -840 A>C e na posição -1189 C>T foram identificados somente no grupo de pacientes, o que sugere fortemente uma associação dos mesmos com a suscetibilidade a tuberculose ativa. Por outro lado, os SNPs encontrados nas posições -633 G>A e -750 C>T foram identificados somente no grupo dos contatos, sendo que o SNP -750 C>T apresentou-se numa frequência absoluta 3,85%, podendo portanto ser considerado um SNP real, indicando uma associação com proteção contra a ocorrência de TB ativa. Podemos destacar também que a frequência encontrada para a variante -1117A em nosso estudo (88,83% na frequência absoluta e 67,8% para a frequência alélica), ficou coerente com as frequências obtidas por Malhotra *et al* 2005 na população brasileira em estudos realizados com pacientes de hanseníase na população Coreana (OH *et al*, 2007), na população espanhola (Lopez-Madurelo *et al* 2003) e na população italiana (Scola *et al* 2003). Contudo, estas frequências, foram completamente diferentes das observadas no estudo desenvolvido por Delgado *et al* 2002 na população do Camboja. Dados da literatura indicam do ponto de vista funcional, o polimorfismo na posição -1117 da região promotora do gene de *IL-10*, pode estar associado à baixa produção de IL-10 e a suscetibilidade à infecção por *M. tb* (Fortsch D *et al* 2000). No presente estudo, não encontramos associação entre o SNP na posição -1117 (alelo A) e a suscetibilidade a tuberculose; esse achado também foi observado por outros pesquisadores que conduziram estudos com um número amostral satisfatório para estudos de associação podendo citar, Lopez-Maderuelo *et al*, (2003) na população espanhola, Bellamy *et al* (1998). Em outros estudos, no entanto, como os realizados por Delgado *et al* 2002, na população da Camboja e OH *et al* 2007 na população coreana, foi observada uma associação entre a variante mutante

referente a este SNP em heterozigose com a suscetibilidade a TB. Possivelmente, a divergência de resultados entre os estudos deve-se a variações étnico-específicas, pois as frequências dos polimorfismos presentes na região promotora do gene de *IL-10* varia grandemente entre diferentes grupos étnicos, podendo assim influenciar a resposta imune contra a tuberculose, levando a observação de diferentes desfechos referentes a TB (Ö *et al* 2007).

Com o Projeto Genoma Humano foram identificados milhões de marcadores genéticos utilizados em diferentes estudos genéticos. Entretanto, esses marcadores genéticos foram estudados independentemente de outros marcadores, o que não é muito informativo para os estudos de associação. Uma forma mais consistente de analisar simultaneamente todos os marcadores de uma região de interesse, é a combinação de todos os alelos em um único cromossomo, denominado haplótipo (*Haplotype*) (Zhao *et al* 2003). As estruturas haplotípicas produzem informações cruciais para a história da evolução humana e a identificação de variantes genéticas subjacentes às várias características humanas através de desequilíbrio de ligação (LD), ou associação alélica. Tendo em vista a importância do estudo de associação utilizando haplótipos, realizamos através de um programa de bioestatística (PHASE versão 2.1.1) a construção haplotípica dos SNPs identificados na região promotora do gene *IL-10*. Como mostrado na tabela 3, 32 possíveis combinações haplotípicas foram descobertas, identificamos 11 haplótipos ausentes no grupo dos pacientes como mostrado no quadro 6, e 11 haplótipos ausentes no grupo de contatos mostrado no quadro 7. Para o estudo de associação com haplótipos, utilizamos os que apresentaram as frequências alélicas mais altas (haplótipo 1, 4 e 16) para a associação com suscetibilidade *per se* a ocorrência de TB ativa analisando os contatos positivos, com a suscetibilidade as formas mais graves da Tuberculose, (Tuberculose Extrapulmonar *versus* TST+). Como podemos observar nas tabelas 9, 10 e 11, nenhum haplótipo apresentou associação significativa com nenhum dos desfechos avaliados.

Em conclusão, este trabalho mostrou que a região regulatória do gene *IL-10* é extremamente polimórfica; como visto em publicações anteriores os 3 SNPs (-1117, -854 e -627) mais estudados na região promotora de *IL-10* encontram-se em frequências semelhantes, porém nenhuma associação a suscetibilidade *per se*, gravidade ou proteção a Tuberculose foi observado no presente estudo. Sete novos SNPs na região promotora de *IL-10* foram

descobertos durante a execução desse trabalho e futuros estudos precisam ser realizados para a investigação da possível influência dos mesmos na regulação da expressão de IL-10, tendo em vista que alguns desses SNPs foram em grupos distintos, sugerindo a associação destes SNPs com a suscetibilidade ou proteção contra a ocorrência de TB ativa. Finalmente, esse é o primeiro estudo realizado no Brasil em que se faz um mapeamento, através de sequenciamento, desta região referente ao gene de *IL-10*. Os dados aqui estudados representam a realidade de uma população etnicamente mista, disponibiliza os diferentes SNPs identificados possibilitando a realização de um cálculo amostral real para eventuais estudos de associação que venham a ser idealizados nesta população para outras enfermidades e, finalmente, disponibiliza os haplótipos de alta resolução identificados através de software (PHASE) de reconstrução haplótípica que podem ser utilizados em outros estudos de associação em outras doenças.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amim LH, Pacheco AG, Fonseca-Costa J, Loredó CS, Rabahi MF, Melo MH, Ribeiro FC, Mello FC, Oliveira MM, Lapa e Silva JR, Ottenhoff TH, Kritski AL, Santos AR. Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol Biol Rep* 2007.

Andrews NC. Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1:75-98.

Apanius V, Penn D, Slev PR, Ruff LR and Potts WK. The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Critical Reviews in Immunology* 1997; 17: 179.

Ates Ö, Musselim B., Ongen G., Topal Sarikaya A. Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Gene polymorphism in Tuberculosis. *J Clin Immunol* 2007; 9155-2.

Aubert-Pivert EM, Chedeveigne FM, Lopez-Ramirez JH *et al.* Cytokine transcripts in pediatric tuberculosis : a study with bronchoalveolar cells. *Tuber Lung Dis* 2000; 80:249-258.

Awomoyi AA, Marchant A, Howson JM *et al.* Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis* 2002; 186:1808-1814.

Backwell J. Genetics and genomics in infectious disease susceptibility. *Trends in Molecular Medicine* 2001; 7: 11.

Backwell JM, Black GF, Peacock CS, Miller EN *et al.* Immunogenetics of leishmanial and mycobacterial infection: the Belem Family Study. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997; 352: 1331-1345.

Bellamy R, Ruwend C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV. Variation in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N. Engl. J. Med* 1998; 338:640-44.

Bellamy R, Ruwende C, Corrah T *et al.* Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in African and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 1999; 179:721-4.

Bellamy R. Genome-wide approaches to identifying genetic factors in host susceptibility to tuberculosis. *Microbes Infect* 2006; 1119-23.

Berrington WR & Hawn TR. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* 2007; 219:167-86.

Bienvenu J, Doche C, Gutowski MC, Lenoble M, Lepape A, Perdrix JP. Production of proinflammatory cytokines and cytokines involved in the TH1/TH2 balance is modulated by pentoxifylline. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25(Suppl 2): S80-S84.

Boros DL. T help cell population, cytokine dynamics, and pathology of the schistosoma egg granulome. *Microbes Infect* 1999; 1: 511-516.

Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, Berezovskaya A, Rousset D, Reynes JM, and Goldfeld AE. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J. Clin. Investig* 2000; 105:1317-1325.

Brooks DG, Trifili MJ, Edelmann KH, Teyton L *et al.* Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 2006; 12(11):1301-9.

Brosch SV, Gordon M, Marmiesse P, Brodin C, Burchrieser K, Eiglmeier T, Garnier, C, Gutierrez G, Hewinson K, Kremer LM, Parsons AS, Pym S, Samper, D, van Soolingen and Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 3684-9.

Burgner D, Jamieson SE, Blackwell J.M. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis.* 2006; 6(10):653-63.

Cadranel J, Hance AJ, Milleron B, Paillard F, Akoun GM, Garabedian M. Vitamin D metabolism in tuberculosis. Production of 1,25(OH)2D3 by cell recovered by bronchoalveolar lavage and the role of this metabolite in calcium homeostasis. *Am. Rev. Respir. Dis* 1988; 138:984-9.

Calado DP, Paixão T, Holmberg D and Haury M. Stochastic monolallelic expression of IL-10 in T Cells. *J Immunol* 2006; 177: 5358-5364.

Carlson CS, Reider MJ, Nickerson DA, Eberle MA, Kruglyak L. Comment on 'Discrepancies in dbSNP confirmations rates and allele frequency distributions from varying genotyping error rates and patterns. *Bioinformatics* 2005; 21(2):141-3.

Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JLMice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol* 1999; 162(9):5407-16.

Casanova JL, 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 Med.* 1994; 1:180(5):1741-52.

Chouaib S, Robinet E, Zyad A and Branellec D. Tumor necrosis factor : pleiotopic cytokine. *Bull Cancer* 1992; 79: 935-949.

Christopher S. Carlson, Michael A. Eberle, Leonid Kruglyak & Deborah A Nickerson. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature* 2004; 429.

Clarke CJ, Hales A, Hunt A, Foxwell BM. IL-10 mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit Nf kappa beta activity. *Eur J Immunol* 1998; 28: 1719-1726.

Comstock GW. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am Rev Respir Dis,* 1978, 117, 621-24.

Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 967-77.

Crawley E, Ray R, Sillibourne J, Patel P *et al.* Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1101-1108.

Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, and Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* 2001; 29(2):229-32

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

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

Daniel VS, Daniel TM. Old testament biblical references to tuberculosis. *Clin. Infect Dis* 1999; 29: 1557-8.

David M. Transcription factors in interferon signaling. *Pharmacol Ther* 1995, 65:149-161.

De Tomaso, Nyholm AW, Palmeri SV, Ishizuka KJ, Ludington KJ, Mitchel WB, and Weissman IL. Isolation and characterization of a protochordate histocompatibility locus. *Nature*, 2005, 438, 45.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174(5):1209-20.

De Waal Mayefyt, Abrams R, Bennet J, Figdor B, and Vries J. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: antiregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp Med* 1991; 174:1209-1220.

Delgado JC, Tsai EY, Thim S, Baena A, Boussiotis VA, Reynes JM, Sath S, Grosjean P, Yunis EJ and Goldfeld AE. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:7576-7581.

Dickensheets H, Freeman SL, Smith M, Donnelly R. Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes. *Blood* 1997; 90:4162-4171.

Djelouadji Z, Raoult D, Daffé M, Drancourt M. A Single-Step Sequencing Method for the Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex Species. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2(6):253.

Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption – A review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2006:101 (7), 697-714.

Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C *et al.* Impairment of mycobacterial but not immunity bt germline human STAT1 mutation. *Science*, 2001; 293:300-3003.

Erth S, Shiloh MU, Ruan J, Choi M *et al.* A novel antioxidant gene from Mycobacterium tuberculosis. *J. Exp Med* 1997; 186; 1885-1896.

Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the IL-10 gene and futher characterization of the 5´flanking sequence. *Immunogenetics* 1997; 46: 120-128.

Eskdate J, Keijsers V, Huizinga T, Gallagher G. Microsatellite aleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes Immun* 1999; 1:151-155.

Eskdate J, McNicholl J, Wordsworth P *et al.* Interleukin-10 microsatellite polymorphisms and IL-10 locus allele in rheumatoid arthritis susceptibility. *Lancet* 1998; 352: 1282-1283.

Fernando LS and Britton WJ. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. *Immunology and Cell Biology* 2006; 84:125-137.

Filho Santos ET. Public Health Watch.Políticas de Saúde no Brasil. Uma perspectiva da Sociedade Civil. Rio de Janeiro: Open Society Institute 2006.

Flesch I, Kaufmann SH, Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone narrow macrophages and differential suscetptibility among strains of Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 1987; 138:4408-13.

Flynn JL and Chan J. What´s good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol* 2005; 13:98-102.

Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect Immun*. 2001 (7):4195-201.  
Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, *et al*. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995; 2:561-72.

Fortsch D, Rollinghoff M, Stenger S. IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2000;165:978-87.

Frieden, TR., Sterling, TR., Munisiff, SS, *et al*. Tuberculosis. *Lancet* 2003; 362:887-99.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A., Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ and Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296:2225-9.

Goldman RC, Plumley KV and Laughon BE. The evolution of extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB) history, status and issues for global control. *Infections Disordens – Drug Targets* 2007; 7: 73-91.

Graham S Cooke and Adrian V.S Hill. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nature reviews*, vol 2 2001.

Hajeer A, Lazarus M, Turner D *et al*. IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scan J Reumatol* 1998; 27: 142-145.

Hammer SM, Saag MS, Schechter M, *et al*. Treatment for adult HIV infection. Recommendations of the international AIDS Society-USA Panel. *Jama*, 2006, 296: 827-43.

Hanekom WA, Abel B and Scriba TJ. Immunological protection against tuberculosis. *S Afr Med* 2007; 973-7.

Henao MI, Montes C, París SC, Garcia LF. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis* 2006; 86(1):11-9.

Haufmann SHE. Tuberculosis Deadly Combination. *Nature* 2008; 453: 295-296.

Hisert KB, Kirksey MA, Gomez JE, Sousa AO *et al.* Identification of Mycobacterium tuberculosis counter immune (cim) mutants in immunodeficient mice by diferential screening. *Infect Immun* 2004; 72: 5315-5321.

Hou J, Baichwal V and Cao Z. Regulatory elements and transcription factors controlling basal and cytokine- induce expression of the gene encoding intracellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1994; 91: 11641-11645.

Howell MW and Matthew J. Rose Zerilli. Cytokine gene polymorphism, cancer susceptibility and prognosis. *The Journal of Nutrition* 2007; 137: 194-99.

Howell WM. Interleukin-10 gene polymorphisms and cancer. In Marincola FM, editor. Interleukin-10. *Eurekah.com*; 2006; 1-17.

Huard RC, Chitale S, Leung M, Lazzarini LC, Zhu H, Shashkina E, Laal S, Conde MB, Kritski, Belisle JT, Kreiswirth BN, Lapa e Silva JR, Ho JL. The *Mycobacterium tuberculosis* complex-restricted gene cfp-32 encodes an expressed protein that is detectable in tuberculosis patients and is positively correlated with pulmonary interleukin-10. *Infect Immun* 2003a; 71:6871-6883.

Jang AS, Park MH, Ahn JS *et al.* Impact of circulating TGF-Beta and IL-10 on T cell cytokine in patients with asthma and tuberculosis. *J Korean Med Sci* 2006; 21: 30-34.

Jang AS, Park SW, Ahn MH, Park JS, Kim DJ, Lee JH, Park CS Impact of circulating TGF-Beta and IL-10 on T cell cytokines in patients with asthma and tuberculosis. *J Korean Med Sci* 2006; (1):30-4.

Joanne L Flynn & John Chan. Tuberculosis: Latency and Reactivation. *Infection and Immunity* 2001; 4195-4201.

Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta Odontol Scand* 2001; 59(3); 124-30.

Kallman JL. Heredity and eugenics. *Am J Psychiatry* 1953;109 (7):491-3.

Kallmann FL, Reisner D. Twin studies on significance of genetic factors in Tuberculosis. *Amer Rev Tuberc* 1943; 47:549-74.

Kaufmann SH. Killing vs suicide in antibacterial defense. *Trends Microbiol* 1999; 7:59-61.

Kim HS, Park, MH, Song EY, *et al.* Association of HLA-DR and HLA-DQ genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Korean : preliminary evidence od association with drug resistance, disease severity, and disesase recurrence. *Hum Immunol* 2005; 66:1074-1081.

Kritisk A, Conde MB, and Muzy de Souza G. Tuberculosis: do ambulatório a enfermaria. Editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte. 303 pp.

Kube D, Platzer C, von Knethen A, Straub H, Bohlen H, Hafner M and Tesch H. Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell line. *Cytokine* 1995; 7: 1-7.

Kube D, Rieth H, Eskdale J, Kremsner PG and Gallagher G. Structural characterization of the distal 5' flanking region of the human interleukin-10 gene. *Genes and Immunit* 2001; 2: 181-190.

Ladel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufmann SH. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages. *Infect Immu* 1997; 65:1936-8.

Lim S, Crawley E, Woo P, Barnes PJ. Haplotypes associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet* 1998; 352:113.

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- $\gamma$  gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *European Journal of Immunogenetics* 2002; 29: 371-374.

Lopez Ramirez GM, Rom WN, Ciotoli C, Tolbot A, Martiniuk F, Cronstein B, *et al.* Mycobacterium tuberculosis alters expression of adhesion molecules on monocytic cell. *Infect Immun* 1994; 62: 2515-20.

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.

Malik S, Schurr E. Genetic susceptibility to tuberculosis. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 863-8. Martino A, Sacchi A, Sanarico N, Spadaro F *et al.* Dendritic cells derived from BCG-infected precursors induce th2-like immune response. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 827-834.

Mason CM, Porretta E, Zhang P, Nelson S. CD4+ CD25+ transforming growth factor-beta-producing T cells are present in the lung in murine tuberculosis and may regulate the host inflammatory response. *Clin Exp Immunol* 2007; (3) 537-45.

Meisel C, Vogt K, Platzer C, Randow F *et al.* Differential regulation of monocyte tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. *Eur J Immunol* 1996; 26: 1580-1586.

Modlin RL and Rea TH. Immunopathology of leprosy granulomas. *Springer Semin Immunopathol* 1988; 10: 359-374.

Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ *et al.* Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun* 2004; 5:592-595.

Moraes MO, Santos AR, Schonkeren JJ *et al.* Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. *Immunogenetics* 2003; 54:896-899.

Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994; 56: 1–26.

Mostowy SD, Cousin and Behr MA. Genomic interrogation of classic bacillus reveals it as unique RD1 mutant within the Mycobacterium tuberculosis complex. *J Bacteriol* 2004, 186: 104-109.

Murray PJ, Wang L, Onufryk C, Tepper RI, and Young RA. T cell-derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. *J. Immunol* 1997; 158:315–321.

Nau GJ, Guilfoile P, Chupp GL, Berman JS, Kim SJ, Hornfeld H, *et al.* A chemo attractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6414-9.

Niemann SD, Harmsen, Rusch-Gerdes S and Richter E. Differentiation of clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates by gyrB DNA sequence polymorphisms analysis. *J. Clin Microbiol.* 2000; 38: 3231-3234.

Oh JH, Yang CS, Noh YK. Polymorphisms of interleukin-10 and tumor necrosis factor- $\alpha$  genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis. *Respiratory* 2007; 12: 594-598.

Opdal SH. IL-10 gene polymorphisms in infectious disease and AIDS. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 42:48-52.

Oral HB, Budak F, Uzaslan EK, *et al.* Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. *Cytokine* 2006; 35: 143–147.

Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet* 2008; 123(5):477-84

Paixão T, Carvalho TP, Calado DP and Carneiro J. Quantitative insights into Stochastic monolallelic expression of cytokine genes. *Immunol Cell Biol* 2007; 85:315-322.

Palomino JC, Leão SL, Ritacco V. Tuberculosis 2007 from basic Science to patients Care. [www.TuberculosisTextbook.com](http://www.TuberculosisTextbook.com)

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.

Prabhu Anand S, Selvaraj P, Jawahar MS, Adhilakshmi AR & Narayanan PR. Interleukin-12 & Interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 2007; 126: 135-138.

Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Vigilância Epidemiológica – Tuberculose. In Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde.

Prugnolle F, Manica A, Charpentier M, Guegan JF, Guernier V and Balloux F. Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Current Biology* 2005; 15:129.

Quy HT, Buu TN, Cobelens FG, Lan NT, Lambregts CS, Borgdorff MW. Drug resistance among smear-positive tuberculosis patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006; 10(2):160-6.

Raja A. Immunology of Tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120: 213-232.

Rao M, Wong C, Kanestsky P, Girndt M, Stenvinkel P, Reilly M, Ray SD. Cytokine gene polymorphism and progression of renal and cardiovascular diseases. *Kidney Int* 2007; 72 (5): 549-56.

Reuss E, Fimmer R, Krüge A, Becker C, Rittner C and Hohler T. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors a twin study. *Genes and Immun* 2002; 3: 407-413.

Richard C Huard, Michel Fabre, Petra de Haas, Luiz Cláudio Lazzarini, Dick van Soolingen, Debby Cousin and John L. Ho. Novel genetic polymorphisms that further delineate the Phylogeny of the Mycobacterium tuberculosis Complex. *J. Bacteriology* 2006;188: no 12 p 4271-4287.

Rook GA, Steele J, Fraher I, et al. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes. *Immunology* 1986; 57: 159-63.

Rook GA., 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.

Rosenwasser LJ, Borish L. Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). *Am J Respir and Crit Care Med* 1997; 156: S152-S155.

Rossouw M, Nel HJ, Cooke GS, van Helden PD, Hoal EG. Association between tuberculosis and a polymorphic NFkappaB binding site in the interferon gamma gene. *Lancet* 2003; 361:1871-2.

Ruffino-Netto A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2002, 35 (1), 51-58.

Saha B, Das G, Vohra H, Ganguly NK, Mishra GC. Macrophage-T cell interaction in experimental mycobacterial infection. Selective regulation of co-stimulatory molecules on Mycobacterium-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immune response. *Eur J Immunol* 1994; (11):2618-24.

Sahiratmadja E , Baak-Pablo R , de Visser A , Alisjahbana B, Adnan I, van Crevel R , Marzuki S , van Dissel J, Ottenhoff T, van de Vosse E. Association of polymorphisms in IL-12/IFN- $\gamma$  pathway genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Indonesia. *Tuberculosis*, 2007; 87: 4: 303 – 311.

Salgame P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. *Curr Opin Immunol* 2005; (4):374-80.

Santos AR Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 2002; 186(11):1687-91.

Schaible UE, Collins HL and Kaufmann SH. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. *Adv Immunol* 1999; 71:267-377.

Seder RA, Gazzinelli R, Sher A and Paul WE. Interleukin-12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin-4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:10188-10192

Selvaraj P, Narayanan PR, Reetha AM. Association of vitamin D receptor genotypes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in female patients & resistance in female contacts. *Indian J. Med. Res* 2000; 111:172-9.

Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, *et al.* A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl J Med* 1989; 320: 545-550.

Shannon MF, Coles LS, Attema J and. Diamond P. The role of architectural transcription factors in cytokine gene transcription. *Journal of Leukocyte Biology* 2001; 69:21-32.

Shaw TC, Thomas LH and. Friedland JS. Regulation of IL-10 secretion after phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytic cells. *Cytokine* 2000; 12:483-486.

Shin HD, Park BL, Kim LH, Cheong HS *et al.* Common interleukin-10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. *Experimental and Molecular Medicine* 2005; 37:128-132.

Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P *et al.* Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J Immunol* 1993; 153: 3639-3647.

Simonds B. Tuberculosis in twins. London: *Pitman Medical Publishing Co. Ltd*; 1963.

Singh, K.K, Dong Y, Belisle J.T, Harder J, Arora V.K and Laal S. Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* recognized by antibodies during incipient, subclinical tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005; 12:354-358.

Smity I. *Mycobacterium Tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology reviews*, 2003; 16 no 3: 463-496

Spector WG, Lykkle AW. The cellular evolution of inflammatory granulomata. *J Pathol Bacteriol* 1966; 92:163-77.

Stefan HE Haufmann. Tuberculosis Deadly combination. *Nature* 2008, vol 453. 295-296.  
Stockl J, Vert H, Majdic O, Zlabinger G *et al.* Human major group rhinovirus downmodulate the accessory function of monocytes by inducing IL-10. *J Clin Invest* 1999; 104: 957-965.

Stylianou E, Aukrust P, Kvale D *et al.* IL-10 and HIV infection : increasing serum IL-10 levels with disease progression –down regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:115-120.

Subhendu Basu and Matthew J. Fenton. Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L887–L892.

Suh Y, Vijg J. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. *Mutation Research*. 2005; 573: 41-53.

Trahern JA. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. Journal compilation. *International Journal of Immunogenetics* 2008; 35: 179-192.

Trinchieri G. Cytokine acting on or secreted by macrophages during intracellular infection. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:17-23.

Tsoukas CD, Provvedini DM, Manolagas SC. 1,25-dihydroxvitamin D3: a novel immunoregulatory hormone. *Science* 1984; 224:1438-40.

Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphisms in the Interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenetics* 1997; 24:1-8.

van Crevel R, Ottenhoff TH and van der Meer JWM. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology reviews* 2002; 294-309.

van Furth AM, Seijmonsbergen EM, Langermans JA, Groeneveld PH, de Bel CE, van Furth R. High levels of interleukin 10 and tumor necrosis factor alpha in cerebrospinal fluid during the onset of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 1995; 21(1): 220-2

Van Helden PD. The economic divide and tuberculosis. Tuberculosis is not just a medical problem, but also a problem of social inequality and poverty. *EMBO Rep* 2003; 24-8.

Van Soolingen DPE, de Haas J, Haagsma, Eger T, Hermans PW, Ritacco V, Alito A e. van Embden JD. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains

from animal and human for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J Clin. Microbiol* 1994; 32: 2425-2433.

Verver S, Warren RM, Beyers N, Richardson M *et al.* Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171:1430-1435.

World Health Organization. 2000. WHO Report 2000 – Global tuberculosis Control. Surveillance, planning, financing. In World Health Organization

World Health Organization. 2007. WHO Report 2007 – Global tuberculosis Control – Surveillance, planning, financing. In World Health Organization.

World Health Organization. 2008. WHO Report 2008. Global tuberculosis Control – Surveillance, planning, financing. In World Health Organization.

Yamazaki K and Beauchamp GK. Genetic bias for MHC-dependent mate choice. *Advances in Genetics* 2007; 59:129.

Yang X, Sugawara M, Ponath PD, Wessendorf L, Banerji J, Li Y and Strominger JL. Interferon-gamma response region in the promoter of human DPA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9226-9230.

Yant SR, Zhu W, Millinoff D, Slightom JL, Goodman M and Gumucio DL. High affinity YY1 binding motifs: identification of two core types (ACAT and CCAT) and distribution of potential binding sites within the human  $\beta$  globin cluster. *Nucleic Acids Res* 1995; 23; 4353-4362.

Yilmaz V, Yentür SP, Saruhan-Direskeneli G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine* 2005; 30(4):188-94.

Zhang LJ and Wang XZ. Interleukin-10 and chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12:1681-1685.

Zhang Y, Doerfler M, Lee TC, Guillemin B and Rom WN. Mechanisms of stimulation of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha by *Mycobacterium tuberculosis* components. *J. Clin Invest* 1993; 91: 2076-2083.

## 8. 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:  
 ( ) Sem profissão ( ) Bombeiro ( ) Do lar ( ) Médico  
 ( ) Aposentado ( ) Camelô ( ) Eletricista ( ) Motorista  
 ( ) Assistente social ( ) Cobrador ( ) Empregada ( ) Pedreiro  
 ( ) Auxiliar/Técnico de enfermagem ( ) Cozinheiro ( ) Enfermeiro (a) ( ) Rodoviário  
 ( ) Biscateiro ( ) Dançarina ( ) Faxineiro ( ) 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 (13, 14, 15 ou 16), 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

<input type="checkbox"/> Efavirenz	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> AZT	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> 3TC	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> D4T	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Ritonavir	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Saquinavir	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa

**m2) SIDA**

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

**Somatório**

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

<b>n) Hipertensão Arterial Sistêmica</b>	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> IGN
<input type="checkbox"/> Amilodipina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Diltiazem	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Felodipina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Lercanidipina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Nisoldipina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Nitrendipina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Verapamil	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Propanolol	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Carisoprostol	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Nifedipina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<b>o) Dislipidemia</b>	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> IGN
<input type="checkbox"/> Atorvastatina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Cerivastatina	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> Não Usa
<input type="checkbox"/> Outro (_____)	Dosagem: _____	Nº comprimidos ao dia: _____	<input type="checkbox"/> 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

**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](#)