

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

POLIMORFISMO DO ALELO DO GENE *TNF-ALFA* (-308 G/A), EM PACIENTES COM  
TUBERCULOSE PULMONAR

Bolsista FAPEAM: Nafaelly Gomes de Oliveira

MANAUS-AM  
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0029/2012

POLIMORFISMO DO ALELO DO GENE *TNF-ALFA* (-308 G/A), EM  
PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR

Bolsista FAPEAM: Nafaelly Gomes de Oliveira  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aya Sadahiro, UFAM

MANAUS-AM  
2013

## **IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO**

**Título:** Polimorfismo do alelo do gene *TNF-alfa* (-308 G/A), em pacientes com Tuberculose pulmonar

**N.º do projeto:** PIB-S/0029/2012

**RENOVAÇÃO:** Não

**PEDIDO DE RENOVAÇÃO:** Sim

**ORIENTADORA:** Aya Sadahiro – UFAM

**BOLSISTA:** Nafaelly Gomes de Oliveira- FAPEAM

---

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aya Sadahiro – UFAM

---

**Bolsista:** Nafaelly Gomes de Oliveira- FAPEAM

## RESUMO

A Tuberculose (TB), é uma doença infecciosa causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), é um importante problema de saúde pública mundial. A forma clínica mais frequente é a pulmonar. Considerando que somente 10% das pessoas infectadas irão desenvolver a TB em sua forma ativa, diversos estudos na área da imunogenética têm sido realizados para o melhor conhecimento da imunopatogenia da TB. Todavia, vários aspectos ainda necessitam ser elucidados, principalmente àqueles relacionados aos genes ligados à resposta imunológica. Dentre estes, está o gene *TNF- $\alpha$*  que codifica para a citocina Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF- $\alpha$ ). Esta citocina pleiotrópica exerce um papel importante durante a resposta ao bacilo, ajudando o hospedeiro na regulação, tanto da resposta inflamatória, quanto na formação e manutenção do granuloma. O objetivo do presente trabalho foi investigar se o polimorfismo do alelo do gene *TNF- $\alpha$*  na região promotora -308 (G/A) está associado com a TB pulmonar. O estudo é do tipo transversal. O objetivo do presente trabalho foi investigar se o polimorfismo do alelo do gene TNF- $\alpha$  na região promotora -308 (G/A) está associado com a TB pulmonar. Foram selecionados 192 pacientes confirmados para TB e 195 controles (indivíduos aparentemente saudáveis). O DNA foi extraído de sangue periférico pela técnica DTAB/CTAB e a determinação dos alelos foram realizadas utilizando a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). A frequência observada dos genótipos nos pacientes foi de 82,3% de GG; 16,1% de GA e 1,6% de AA, enquanto nos controles foi de 84,1% de GG e 15,9% de GA e o genótipo AA não foi encontrado no grupo controle. Após tratamento dos resultados, não houve diferença significativa na frequência dos genótipos entre pacientes de TB e controle, sugerindo que não há associação desse gene com a doença.

Palavras – chave: Tuberculose, TNF-alfa, polimorfismo

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB), an infectious disease caused by mycobacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*), is a major public health problem worldwide. The most frequent clinical form is pulmonary. Whereas only 10% of those infected will develop TB in its active form, several studies in the field of immunogenetics have been performed for a better understanding of the immunopathogenesis of TB. However, a lot of aspects still need to be elucidated, especially those related to genes related to immune response. Among these is *TNF-alpha* gene encoding the cytokine Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF-alpha). This cytokine plays an important role in the response to bacillus, helping the host to regulate both the inflammatory response and in the granuloma formation and maintenance. The aim of this study was to investigate whether the polymorphism allele of *TNF-alpha* promoter region -308 (G/A) is associated with pulmonary TB. We selected 192 patients confirmed TB and 195 controls (healthy subjects). DNA was extracted from peripheral blood by the technique DTAB / CTAB and determination of alleles was performed using the Polymerase Chain Reaction (PCR) and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). The observed frequency of genotypes in patients was 82.3% GG, 16.1 % GA and 1.6% AA, whereas in controls was 84.1% GG and 15.9% of GA and AA genotype was not found in the control group. After treatment of the results, no significant difference in the frequency of genotypes between TB patients and controls, suggesting no association of this gene with the disease.

**Keywords:** Tuberculosis, TNF- $\alpha$ , polymorphism.

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Tamanho dos fragmentos para cada genótipo.....	15
---	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema das possíveis bandas que podem ser observadas no gel.....	15
--	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características gerais dos pacientes de TB e controles saudáveis.....	16
--	----

<b>Tabela 2.</b> Distribuição da frequência genotípica e alélica do SNP de <i>TNF-<math>\alpha</math></i> , na região promotora -308, em pacientes com Tuberculose pulmonar e controles.....	16
--	----

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	9
<b>2.1 Tuberculose (TB): Aspectos Gerais</b> .....	9
2.1.1 Etiologia e Fisiopatologia.....	9
2.1.2 Diagnóstico da TB.....	11
<b>2.2 Tuberculose (TB) e Resposta Imune Celular</b> .....	11
<b>2.3 Tuberculose (TB) e Polimorfismo do gene de <i>TNF-<math>\alpha</math></i></b> .....	11
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	12
<b>3.1 Geral</b> .....	12
<b>3.2 Específicos</b> .....	12
3.2.1 Determinar a distribuição dos alelos polimórficos da região promotora de <i>TNF-<math>\alpha</math></i> (-308 G/A) nos pacientes com Tuberculose pulmonar e nos indivíduos do grupo controle.....	12
3.2.2 Avaliar a associação dos alelos de <i>TNF-<math>\alpha</math></i> (-308 G/A) com a Tuberculose pulmonar.....	12
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	13
<b>4.1 Estimativas do número de amostra</b> .....	13
4.1.1 Critérios de inclusão .....	13
4.1.2 Critérios de exclusão .....	13
4.1.3 Aspectos Éticos .....	13
<b>4.2 Materiais e métodos</b> .....	13
4.2.1. Exames bacteriológicos .....	13
4.2.2 Extração de DNA.....	14
4.2.3 Reação de Amplificação de DNA para o gene <i>TNF-<math>\alpha</math></i> , na posição – 308 da região promotora. ....	14
4.2.4 Ensaio de restrição (RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism) do produto com a enzima <i>Nco</i> I.....	14
<b>4.3- Análises Estatísticas</b> .....	15
<b>5. RESULTADOS FINAIS E DISCUSSÃO</b> .....	15
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	17
<b>7. CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES</b> .....	18
<b>8. EQUIPE DO PROJETO</b> .....	19
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	19
<b>10. ANEXOS</b> .....	21

## 1. INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (BRASIL, 2008), sendo a principal causa de morte por doenças infecciosas no mundo (FIORENZA et al., 2005).

A infecção por *M. tuberculosis* ocorre por via aérea, e os bacilos inalados atingem os alvéolos pulmonares e podem ser fagocitados por macrófagos. Após duas a quatro semanas, há predomínio da resposta imune mediada por células, resultando na hipersensibilidade do tipo tardio (HTD) (RAVIGLIONE & O'BRIEN, 2006).

Dos indivíduos expostos, estima-se que 30% tornam-se infectados, e deste percentual, mais de 90% permanecem em estado latente, e não há qualquer sinal ou sintoma da doença (LIN et al., 2007; SHALER et al., 2012). Assim, em relação às pessoas infectadas, em torno de 10% desenvolverão a TB ativa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; SELVARAJ, et al., 2008; SHALER et al., 2012), indicando que o perfil imunogenético do hospedeiro deve ser um importante fator a ser investigado.

Neste contexto, diversos estudos têm sido realizados sobre os genes do sistema imunológico associados a TB. Dentre esses estudos, estão os de polimorfismos dos genes de *TNF*. A citocina TNF- $\alpha$  é pleiotrópica e atua na resposta inflamatória a infecção por *M. tuberculosis* (EHLERS, 2003). Além disso, o TNF- $\alpha$  participa na formação e manutenção do granuloma, para conter a multiplicação do bacilo da TB.

Estudos verificaram a existência de SNP (polimorfismo de base única) no gene *TNF* nas posições: -1031 (T/C), -863 (C/A), -857 (C/A), -376 (G/A), -308 (G/A), -238 (G/A) da região promotora (HAJEER, HUTCHINSON, 2001; KAIJZEL et al, 2001). Variantes alélicas do gene *TNF- $\alpha$*  na posição -308 com perfil GA ou AA parecem expressar um fenótipo de bom produtor de TNF- $\alpha$  (WILSON et al., 1997; MORSE et al., 1999, KROEGER et al., 2000).

Pacientes com TB avançada apresentam níveis séricos de TNF- $\alpha$  elevados, quando comparados aos pacientes com TB moderada e controles, sugerindo que fatores imunogenéticos estão associados a TB (ATES et al., 2007; WANG et al., 2012; VARAHRAM et al., 2009).

Diante do exposto, investigou-se a frequência do gene de *TNF*, na posição -308 (G/A), nos pacientes de TB atendidos na cidade de Manaus, buscando encontrar associação de genes de *TNF* com a TB e, assim, poder ajudar a entender os principais motivos das taxas tão elevadas de TB no Amazonas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Tuberculose (TB): Aspectos Gerais

A TB é uma doença infecciosa e um grave problema de saúde pública mundial. No Brasil, em 2012, a incidência de TB foi de 37,1 casos/100 mil habitantes. Neste mesmo ano, no estado do Amazonas, a incidência da TB foi de 60,8 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2012), por sua vez, em Manaus, a incidência foi de 89,0 casos/100 mil habitantes (SEMSA, 2012).

Os bacilos causadores da TB são micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Deste complexo, a espécie mais frequente é *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) (BRASIL, 2008). A probabilidade de uma pessoa se infectar com o bacilo da TB depende basicamente de três fatores isolados ou associados, a citar: o número de microrganismos inalados; do tempo de contato entre um indivíduo hígido e o contaminado; da eficácia do sistema imunológico (HERNANDEZ *et al.*, 2008).

A maioria das infecções com o bacilo é adquirida por meio de transmissão pessoa a pessoa, de microrganismos veiculados pelo ar, de um caso ativo para um hospedeiro suscetível. A infecção por *M. tuberculosis* ocorre principalmente por via aérea e os bacilos inalados são levados diretamente aos alvéolos pulmonares. Em seguida, uma série de eventos imunológicos são desencadeados, podendo levar a erradicação do bacilo, na infecção primária ou na infecção latente (JACOB *et al.*, 2009). Bacilos viáveis podem permanecer dormentes nos pulmões por décadas, e no caso de algum desequilíbrio imunológico, a infecção pode ser reativada e evoluir para doença. A infecção contra o bacilo pode levar ao desenvolvimento da hipersensibilidade do tipo tardio, em resposta aos antígenos de *M. tuberculosis* (KUMAR *et al.*, 2010).

Na maioria das pessoas a TB primária é assintomática, apesar de poder causar febre e efusão pleural, e é a forma da doença que se desenvolve em uma pessoa previamente não exposta e, portanto não sensibilizada. Já a TB secundária é o padrão da doença que surge em um hospedeiro previamente sensibilizado, sendo a TB pulmonar a manifestação mais comum. Dentre os fatores de risco para a reativação do foco existente inclui: infecção pelo HIV, ser portador de diabetes mellitus, ser transplantado, ter insuficiência renal crônica, ter idade avançada e fazer uso contínuo de medicações imunossupressoras (FRIEDEN *et al.*, 2003).

#### 2.1.1 Etiologia e Fisiopatologia

As bactérias do gênero *Mycobacterium* são bastonetes delgados, aeróbios obrigatórios e possuem uma parede celular cerácea, com ácido micólico em sua composição, que retêm corantes e resistem ao tratamento com ácido e álcool. Por isso, são conhecidos como bacilos ácido-álcool resistente (BAAR) (BOSHOF; BARRY, 2005).

Na fisiopatologia da TB é importante diferenciar a **infecção**, por *M. tuberculosis* (TB primária contida), da **doença** causada por essa micobactéria (TB primária progressiva e TB secundária). Considera-se infecção a

presença do microrganismo, o qual pode ou não causar a sintomatologia da doença. Em geral, a infecção ou TB primária contida ocorre em uma pessoa que não foi exposta previamente, portanto não sensibilizada e que apresentou uma resposta imune celular eficaz contra o patógeno. A maioria dos indivíduos infectados, cerca de 90%, é assintomática. Nessa fase, em geral, a única evidência, é a presença de um pequeno nódulo fibrocalcificado no local da infecção (KUMAR *et al.* adaptado, 2010).

Todavia, aproximadamente 5% dos pacientes não conseguem desenvolver uma resposta imune mediada por células eficaz e evoluem para TB ativa (primária) dentro de 1 a 2 semanas da infecção inicial (FRIEDEN *et al.*, 2003; JACOB *et al.*, 2009).

A TB secundária, por sua vez, é o padrão da doença que surge de um hospedeiro previamente sensibilizado (KUMAR *et al.*, 2010). Ela pode surgir logo após a TB primária, mas comumente se desenvolve muitos anos após a primo-infecção, quando o hospedeiro encontra-se em estado de imunossupressão. A TB secundária deriva tanto da reativação de uma infecção latente, quanto de uma reinfecção exógena. A sintomatologia inicia de forma insidiosa podendo apresentar: mal-estar, anorexia, perda de peso, febre no final da tarde, suores noturnos, hemoptise e dor pleurítica, quando a infecção se estende para as superfícies pleurais.

A resposta mediada por células tem início quando os macrófagos e as células dendríticas internalizam os bacilos e, as células dendríticas, migram para os linfonodos regionais e lá apresentam os antígenos micobacterianos para os linfócitos Th. Nessa etapa, sabe-se que cerca de 5% dos pacientes não conseguem ter uma resposta imune celular eficiente e, portanto, evoluem para TB ativa (FRIEDEN *et al.*, 2003; JACOB *et al.*, 2009). Os linfócitos Th efetores, migram para o foco de infecção e reconhecem os macrófagos infectados, estimulando-os a destruir a micobactéria. Além disso, a resposta por linfócitos Th orquestra a formação de granulomas, onde podem ocorrer a lise dos macrófagos e a ação enzimática resultando em necrose caseosa (KAUFMANN, 2005; ROBBINS, 2010).

A ativação dos macrófagos e a formação, manutenção e resolução do granuloma ocorrem devido à ação de citocinas. A ativação de linfócitos Th, tanto nos linfonodos, quanto nos pulmões resultam na liberação de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). Essas duas citocinas estimulam os macrófagos a conterem a infecção por *M. tuberculosis* e são responsáveis pela diferenciação de monócitos/macrófagos em histiócitos especializados que possuem atividades bactericida e bacteriostática aumentadas (HARTMANN; PLUM, 1999). As citocinas, em especial, o IFN- $\gamma$ , também estimula a expressão de óxido nítrico sintetase induzível, o qual produz óxido-nítrico, capaz de destruir diversos constituintes micobacterianos (KUMAR *et al.*, 2010). O TNF- $\alpha$  atua também no recrutamento de uma quantidade cada vez maior de monócitos/macrófagos. Além da resposta Th, as células *natural-killer* (NK) também reconhecem antígenos lipídicos micobacterianos e contribuem para a resposta imune. Entretanto, a imunidade a *M. tuberculosis* é primariamente mediada por subpopulações de linfócitos Th1, visto que alterações em qualquer etapa na geração de resposta Th1 resultam na ausência de resistência e consequente progressão da doença.

### 2.1.2 Diagnóstico da TB

Em relação ao diagnóstico laboratorial, 86,7% dos casos pulmonares são diagnosticados pela baciloscopia (BRASIL, 2008). O diagnóstico da TB pulmonar é baseado em parte na história clínica, epidemiológica e nos achados físicos e radiográficos de consolidação ou cavitação nos ápices dos pulmões. Apesar disso, a baciloscopia direta e a cultura do escarro de pacientes suspeitos de ter TB devem ser realizadas.

## 2.2 Tuberculose (TB) e Resposta Imune Celular

Os bacilos da TB ao atingirem o tecido pulmonar são fagocitados pelos macrófagos alveolares, que podem processar e eliminar o bacilo ou este pode ainda permanecer viável no interior do fagócito.

Os macrófagos ativados passam a liberar diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como: Interleucina 1 (IL1), Interleucina 6 (IL6) e TNF- $\alpha$ , que ativam células locais e recrutam monócitos e neutrófilos.

Além dos macrófagos, as células dendríticas também internalizam o bacilo e migram até o linfonodo regional mais próximo para a apresentação de antígenos aos linfócitos Th (naive), que ao receberem estímulos de IL-12, fornecidas pela célula dendrítica, se diferenciam em linfócitos Th1 produtores de IFN- $\gamma$ . Esta citocina atua potencializando ação fagocítica dos macrófagos e modulando a resposta imune celular durante a infecção pelo bacilo. Na TB o TNF- $\alpha$  é uma citocina importante, pois atua como um segundo sinal na ativação de linfócitos T, assim como para a ativação de macrófagos, que juntamente com o IFN- $\gamma$  aumentam a ação fagocítica contra o patógeno (NICOD, 2007).

Estudos de polimorfismos, na região promotora, dos genes de TNF- $\alpha$  sugerem que podem estar associados à maior ou menor produção desta citocina no organismo.

## 2.3 Tuberculose (TB) e Polimorfismo do gene de TNF- $\alpha$

Dentre as citocinas envolvidas, o TNF- $\alpha$  tem sido bem caracterizado como uma das moléculas mais importantes na promoção da resposta inflamatória.

SMITH *et al.*, 2002 demonstraram que o TNF- $\alpha$  desempenha um papel complexo nos pulmões, em resposta à infecção por *M. tuberculosis*, principalmente na formação do granuloma. Além da sua contribuição para o “clearance” bacteriano, ele também participa ativamente na modulação da inflamação pulmonar.

A inibição da atividade de TNF- $\alpha$  nos pulmões, na fase inicial da infecção, leva a uma inflamação persistente. É sugerido que variações na produção de citocinas entre indivíduos possam estar associados com diferentes polimorfismos genéticos determinando, desta forma, a resposta imune durante a doença.

Polimorfismos de base única (SNP) na região promotora de *TNF- $\alpha$*  têm sido descritas nas posições -238 e -308. Nestes polimorfismos ocorre uma substituição de G/A. Estas mutações parecem estar relacionadas às diferenças na expressão gênica e secreção da citocina *TNF- $\alpha$* , embora tenham sido descritos resultados controversos. Variantes alélicas dos genes de *TNF- $\alpha$*  na posição -308 com perfil G/A ou A/A parecem expressar um fenótipo de bom produtor (WILSON *et al.*, 1997; MORSE *et al.*, 1999). No entanto, há resultados controversos, conforme descrito por Jong *et al.* (2002).

Na meta-análise realizada por Pacheco *et al.* (2008), sobre a associação dos genes de *TNF- $\alpha$*  na posição -308 com a TB pulmonar, não encontraram resultados significativos. Em outra meta-análise realizada por Wang *et al.* (2012), também não observaram associação do gene de *TNF- $\alpha$*  na posição -308. No entanto, neste último estudo, quando somente as populações asiáticas foram agrupadas, resultados significativos para o alelo A, do gene *TNF- $\alpha$*  na posição -308, foram associados ao risco para TB pulmonar.

Assim, fatores genéticos podem desempenhar um papel importante na suscetibilidade à TB ativa (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Investigar a distribuição dos alelos de *TNF- $\alpha$*  (-308 G/A) nos pacientes com Tuberculose pulmonar nascidos na Amazônia Legal.

#### **3.2 Específicos**

3.2.1 Determinar a distribuição dos alelos polimórficos da região promotora de *TNF- $\alpha$*  (-308 G/A) nos pacientes com Tuberculose pulmonar e nos indivíduos do grupo controle.

3.2.2 Avaliar a associação dos alelos de *TNF- $\alpha$*  (-308 G/A) com a Tuberculose pulmonar.

## 4. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo analítico, observacional de caso controle, que visa determinar se existe associação do polimorfismo do gene de *TNF- $\alpha$*  a Tuberculose (TB) pulmonar. A população do presente estudo foi composta por indivíduos oriundos da Amazônia Legal, constituído pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, além de parte dos estados de Mato Grosso, Tocantins e Maranhão.

Os pacientes de TB foram selecionados na Policlínica Cardoso Fontes, em Manaus-AM e para o grupo controle foram incluídos indivíduos aparentemente saudáveis, mas sem histórico de TB.

### 4.1 Estimativas do número de amostra

O número inicial estimado de pacientes foi de 126, baseado no número de casos de TB pulmonar em 2011 na cidade de Manaus (1.322 casos) (SEMSA, 2012), considerando 5% de erro amostral, 95% de intervalo de confiança, percentual máximo de 10%. O número de controles sugerido pelos membros avaliadores do PIBIC foi de 252.

#### 4.1.1 Critérios de inclusão

Pacientes diagnosticados para TB pulmonar (em qualquer fase da doença) com baciloscopia direta (BAAR) ou cultivo positivos para escarro, com idade entre 18 a 60 anos, não consanguíneos, de ambos os gêneros e sem uso de imunorreguladores.

Os controles foram constituídos por indivíduos aparentemente saudáveis, com idade entre 18 a 60 anos, de ambos os gêneros, sem sintomas da TB pulmonar, que convivem ou residem nas mesmas localidades dos pacientes.

#### 4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os portadores de HIV, diabetes, neoplasias, doenças autoimunes ou ainda indivíduos em uso de algum tipo de imunorregulador.

#### 4.1.3 Aspectos Éticos

Este projeto está vinculado ao projeto maior aprovado sob título Polimorfismo dos genes de *HLA* classe II, *TNF- $\alpha$*  e *PDCD-1* em pacientes com TB pulmonar nascido no estado do Amazonas, aprovado pelo Comitê de Ética sob o número CAAE No. 0017.0.115.000-08.

## 4.2 Materiais e métodos

### 4.2.1. Exames bacteriológicos

As amostras de escarro foram processadas no laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, para os exames de baciloscopia direta e cultivo, este último de acordo com Salem et al., (2007).

#### 4.2.2 Extração de DNA

Coletou-se de cada indivíduo três mililitros (3 mL) de sangue periférico através da punção venosa, em tubos com EDTA estéreis.

A partir da camada de leucócitos foi extraído o DNA seguindo a técnica rápida com sais de brometo de tetrametilamônio (adaptado), descrito por Gustincich *et al.*, (1991).

#### 4.2.3 Reação de Amplificação de DNA para o gene *TNF- $\alpha$* , na posição – 308 da região promotora.

O sítio polimórfico GA na posição -308 da região promotora do gene *TNF- $\alpha$*  foi amplificado de acordo com o protocolo descrito por Jong *et al.*, (2002) com adaptações. A sequência alvo (147 pares de bases-pb) foi amplificada com os iniciadores 5'- GAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' e 5'- GGGACACACAGCATCAAG-3'.

A reação de amplificação foi realizada no termociclador “Veriti 96 Well Thermal Cycler”. A partir do DNA extraído, foram adicionados à reação 4 ng de DNA, em um volume final de 25 $\mu$ L, contendo 50mM KCL, 10 mM Tris-HCL pH 8.3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM dNTP (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 0,1 $\mu$ M de cada iniciador e 1,25 U Taq DNA Polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

O produto da PCR foi aplicado em um gel de agarose a 1,5% com SYBR Green. A eletroforese em gel de agarose foi realizada a 100 V, 90 mA por 50 minutos.

Protocolo de Amplificação: Os parâmetros de amplificação no termociclador constam de 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

#### 4.2.4 Ensaio de restrição (RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism) do produto com a enzima *Nco* I.

Após a detecção do produto amplificado foi realizado a determinação do polimorfismo GA para o gene *TNF- $\alpha$* . Esta envolve digestão do produto de PCR com a enzima de restrição *Nco* I (New England Biolabs), a 37°C no termobloco (Marca Labnet) por 8 horas de incubação.

Para preparação da reação com a enzima de restrição *Nco* I foram utilizados os seguintes componentes: H<sub>2</sub>O, Tampão de Reação (KCl a 100mM, Tris-HCl a 50mM, 1mM EDTA, 10mM 2-mercaptoethanol, 0,1mM PMSF, 500 $\mu$ g/ml BSA, 50% glycerol, 0,1% Triton X-100, 1 $\mu$ L da enzima *Nco*I a 10 UI e 10 $\mu$ L do produto amplificado, tem um volume total de reação de 20 $\mu$ L.

Depois do período da digestão, novamente foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 3% corado com “SYBR Green” e visualizado em transiluminador de luz azul, para a determinação dos fragmentos da digestão (Quadro 1 e Figura 1).

Quadro 1: Tamanho dos fragmentos para cada genótipo

GENÓTIPO	TAMANHO DO(S) FRAGMENTO(S)
AA	147 pb
GA	147 pb, 126 pb e 21 pb
GG	126 pb e 21 pb

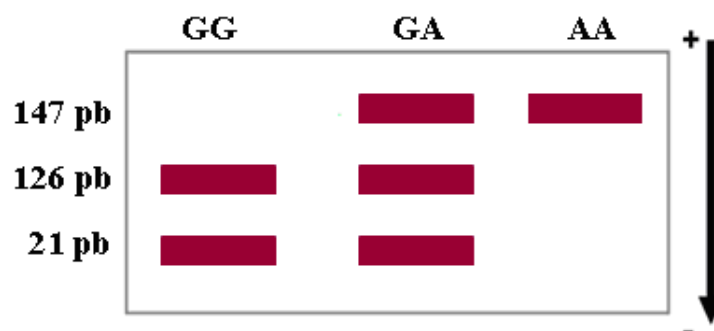


Figura 1: Esquema das possíveis bandas que podem ser observadas no gel

#### 4.3- Análises Estatísticas

Para análise da associação do polimorfismo do gene *TNF-alfa* com TB, foi aplicado o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com correção de Yates, ou teste Exato de Fisher, dependendo da natureza dos dados (ZAR, 1984). A frequência dos alelos foi testada para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

### 5. RESULTADOS FINAIS E DISCUSSÃO

Amostras de 387 indivíduos, sendo 192 pacientes com Tuberculose (TB) pulmonar e 195 do grupo controle foram utilizadas para determinar a frequência dos polimorfismos no gene de *TNF- $\alpha$*  G/A (posição – 308 da região promotora). As características gerais dos pacientes e controles incluídos no estudo estão descritas na Tabela 1. Os dados em relação à idade e sexo são compatíveis com os descritos na maioria dos estudos epidemiológicos para Tuberculose (TB), demonstrando que a doença é mais frequente nos homens e na fase produtiva de trabalho. No entanto, foi possível observar que o número de casos de TB em mulheres vem aumentando.

Tabela 1. Características gerais dos pacientes de TB e controles saudáveis.

Característica	Pacientes de TB (n=192)	Controles (n=195)
<b>Idade</b> (anos) (Média e Desvio padrão)	39,0 ± 14	35,0±12
<b>Gênero:</b>		
Masculino	60,1%	56,6%
Feminino	39,9%	43,4%
<b>Naturalidade:</b>		
Manaus	52,3 %	50,2%
Outros municípios do Amazonas	26,4 %	24,8%
Municípios de outros estados	21,3 %	25,0%

Estudos realizados por Kroeger et al., (1997) e Wilson et al., (1997) sugerem que a substituição de Guanina (G) por Adenina (A), na posição -308 da região promotora, representaria um polimorfismo funcional, o que levaria a diferentes taxas de transcrição para produção de TNF- $\alpha$ . Entretanto, os mecanismos moleculares e biológicos da interação entre polimorfismo do gene de *TNF- $\alpha$*  e risco a suscetibilidade a TB ainda não foram completamente elucidadas. Estudos sobre polimorfismos genéticos associados a TB ainda são muito controversos.

Em relação ao nosso estudo, a análise da frequência genotípica para o SNP *TNF- $\alpha$* , -308 G/A entre pacientes com TB pulmonar e o grupo controle não apresentou associação estatisticamente significativa, sendo que o genótipo AA foi observado apenas no grupo dos pacientes, conforme descrito na Tabela 2. As frequências genotípicas do SNP *TNF- $\alpha$* , -308 G/A estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos dois grupos analisados (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição da frequência genotípica e alélica do SNP de *TNF- $\alpha$* , na região promotora -308, em pacientes com Tuberculose pulmonar e controles.

Genótipo	Pacientes		Controles		Valor*
	N	%	N	%	<i>p</i>
<b>GG</b>	158	82,3	164	84,1	0,9609
<b>GA</b>	31	16,1	31	15,9	0,6461
<b>AA</b>	3	1,6	0	0,0	0,1212
<b>TOTAL</b>	<b>192</b>	<b>100,0</b>	<b>195</b>	<b>100,0</b>	

Observação: foi aplicado o teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e o \*Exato de Fisher (nas frequências esperadas menor que 5 em uma das caselas da tabela de contingência 2x2). *p*-HW = valor de *p* para equilíbrio de Hardy-Weinberg

A ausência de associação do gene *TNF- $\alpha$*  na posição -308 G/A com o risco a TB pulmonar corroboram com os resultados da meta-análise realizada por Pacheco et al., (2008), que também não evidenciaram associação dos genes de *TNF- $\alpha$*  com a TB, ao avaliarem 10 estudos em diferentes populações.

Posteriormente, Wang et al., (2012) realizaram uma nova meta-análise para *TNF- $\alpha$* , agora envolvendo 18 publicações do período de 2001 a 2010 e também não observaram associação do gene *TNF- $\alpha$*  na posição -308 G/A com a TB pulmonar. No entanto, ao estratificarem os grupos, observaram que na população asiática o alelo A do gene de *TNF- $\alpha$*  na posição -308 foi associado com o risco a TB pulmonar. Estes mesmos autores recomendam que mais estudos epidemiológicos moleculares, envolvendo vários SNP, entre diferentes etnias, possam ser realizados para avaliar associações e interações entre doenças, genes e ambientes.

Apesar da não detecção de alelos associados à TB, o conhecimento sobre a distribuição dos genes de *TNF- $\alpha$* , será um dado útil para investigações futuras sobre o papel modulador dos produtos proteicos desses genes e de seus ligantes nas doenças infecciosas.

## 6. CONCLUSÃO

O trabalho realizado permitiu comparar, a frequência genotípica das variantes polimórficas existentes na posição -308 da região promotora do gene *TNF- $\alpha$*  de pacientes com TB pulmonar e indivíduos do grupo controle. No entanto, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre a frequência dos alelos de *TNF- $\alpha$*  -308 dos grupos avaliados. Sugerindo que os polimorfismos na região investigada (-308) do gene *TNF- $\alpha$*  não estão associados à TB pulmonar.

Diversos estudos apontam que um resultado conclusivo depende também de fatores como a origem étnica, combinações múltiplas de outros polimorfismos e haplótipos, além da análise da relação gene-gene e gene-ambiente. Embora, não tenha sido encontrada a associação de alelos de *TNF- $\alpha$*  com TB pulmonar, esse resultado deve ser analisado com cautela, pois o número de amostras ainda é considerado pequeno para um estudo imunogenético.

## 7. CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES

Atividades	Jul/12	Ago/12	Set/12	Out/12	Nov/12	Dez/12	Jan/13	Fev/13	Mar/13	Abr/13	Mai/13	Jun/13	Jul/13	Ago/13
Revisão bibliográfica	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Coleta e processamento das amostras de escarro e sangue dos pacientes e controles	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R			
Extração de DNA			R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
Genotipagem				R	R	R	R	R	R	R	R	R		
Análise parcial dos resultados					R	R								
Elaboração do relatório parcial							R							
Entrega do relatório parcial							R							
Análise final dos resultados												R	R	
Elaboração do resumo para o congresso do PIBIC/UFAM												R	R	
Elaboração do relatório final												R	R	
Entrega do relatório final														R

R=ATIVIDADES REALIZADAS

## 8. EQUIPE DO PROJETO

NOME	INSTITUIÇÃO	RESPONSABILIDADE NO PROJETO
Nafaelly Gomes de Oliveira (PIBIC)	UFAM	Executar o projeto de PIBIC
Aya Sadahiro (orientadora)	UFAM	Orientar o aluno de PIBIC na realização do projeto de pesquisa
Maurício Morishi Ogusku (pesquisador)	INPA	Assessorar nos ensaios de microbiológicos para o diagnóstico laboratorial da TB.
Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes	UFAM	Assessorar nas análises dos dados
Irineide Assumpção Antunes (Médica Pneumologista)	Policlínica Pneumologia Cardoso Fontes	Assessorar na seleção dos pacientes e controles


## 9. REFERÊNCIAS

1. ABBAS A. K.; LICHTMAN A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 7ª. Edição. 2012.
2. ATEES, O.; NUSELLIM, B.; ONGEN, G.; SARIKAYA, T.A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphisms in tuberculosis. **J Clin Immunol**. 28:232-36, 2007.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília, p.123, 2008.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. Boletim epidemiológico, p 43:5, 2012.
5. BOSHOFF, H. I.; BARRY, C.E. III. Tuberculosis—metabolism and respiration in the absence of growth. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 70-80, 2005.
6. DE JONG, B. A.; WESTENDORP, R. G.; BAKKER, A. M.; HUIZINGA, T. W. Polymorphisms in or near tumour necrosis factor (TNF)-gene do not determine levels of endotoxin-induced TNF production. **Genes and Immunity**. 3(1): 25-29, 2002.
7. EHLERS, S. Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against Tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 62, suppl. II, p. 37-42. 2003.
8. FIORENZA, G.; RATENI, L.; M. A.; BOGUE, C.; DLUGOVITZKI, D.G. TNF-alpha, TGF-beta and NO relationship in sera from tuberculosis (TB) patients of different severity. **ImmunolLett**. 98:45-48, 2005.
9. FRIEDEN, T. R. et al. Tuberculosis. **Lancet**, v. 362, p. 887-99, 2003.
10. GUSTINCICH, S.; MANFIOLETTI, G.; DEL SAL, G.; SCHNEIDER, G.; CARNINCI, P. A. Fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. 11(3): 298-300, 1991.
11. HAJEER, A.H.; HUTCHINSON, I. V. Influence of TNF-alpha gene polymorphisms on TNF-alpha production and disease. **Human Immunology**, v. 62, p. 1191-1199. 2001.
12. HARTMANN, P.; PLUM, G. Immunological defense mechanisms in tuberculosis and MAC-infection. **Diagn. Microbio. Infect. Dis.**, v. 34, p. 147-52, 1999.
13. HERNANDEZ, Claudia. et al. Tuberculosis in the age of biologic therapy. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 59, n. 3, p. 363-80, 2008.
14. JACOB, Jesse T. et al. Acute forms of tuberculosis in adults. **The American Journal of Medicine**, v. 122, p. 12-12, 2009.
15. KAIJZEL, E.L.; BAYLEY, J.P.; VAN KRUGTEN, M.V.; SMITH, L.; VAN DE LINDE P.; BAKKER, A.M.; BREEDVELD, F.C.; HUIZINGA, T.W.; VERWEIJ, C.L. Allele-specific quantification of tumor necrosis factor alpha (TNF) transcription and the role of promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis patients and healthy individuals. **Genes Immunology**, v. 2, p. 135-44. 2001.
16. KAUFMANN, S. H. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. **Trends Immunol.**, v. 26, p. 660-7, 2005.
17. KROEGER, K.M.; CARVILLE, K.S.; ABRAHAM, L.J. The-308 tumor necrosis factor-a promoter polymorphism effects transcription. **MolImmunol**, v. 34, p. 391-399, 1997.

18. KROEGER, K.M.; STEER, J.H.; JOYCE, D.A.; ABRAHAM, L.J. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumor necrosis factor promoter polymorphism. **Cytokine**, v. 12, n. 2, p. 110-19, 2000
19. KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ASTER, J. Tuberculose. In: **ROBBINS e COTRAN Bases Patológicas das Doenças**[tradução de Patrícia Dias Fernandes et al], ed. 7°, p. 368-375, Elsevier, Rio de Janeiro, 2010.
20. LIN, P. L.; PLESSNER, H. L.; VOITENOK, N.N.; FLYNN, J. L. Tumor necrosis factor and tuberculosis. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 12, p. 22-25, 2007.
21. MORSE, H. R.; OLOMOLAIYE, O. O.; WOOD, N. A.; KEEN, L. J.; BIDWELL, J. L. Induced heteroduplex genotyping of TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 and IL-10 polymorphisms associated with transcriptional regulation. **Cytokine**, v. 11(10), p. 789-795, 1999.
22. NICOD, L.P. Immunology of tuberculosis. **Swiss Med WKLY.**, Berne, v. 137, p. 357-362, 2007. Disponível em: <<http://www.smw.ch/docs/pdf200x/2007/25/smw-11499.pdf>>. Acessado em: 17 Jul. 2014.
23. OLIVEIRA, M; SILVA, J; COSTA J; AMIN L; LOREDO, C; et al. Distribuição de polimorfismo de Base única (SNPs) no gene de *TNF-alfa* (-238/-308) entre paciente com TB e outras pneumopatias: Marcadores genéticos de susceptibilidade a ocorrência de TB?. **J Bras Pneumol**; 30(4) 461-7- Fiocruz- Rio de Janeiro, 2004.
24. PACHECO, A.G.; CARDOSO, C.C.; MORAES, M.O. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **Hum Genet**, v.123(5), p.477-84. doi: 10.1007/s00439-008-0497-5, 2008.
25. RAVIGLIONE, M. C.; O'BRIEN, R. J. Tuberculose. In: **Harrison Medicina Interna**. 16 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, v.1 p. 1002-6, 2006.
26. SALEM, J. I.; CARVALHO, C. M.; OGUSKU, M. M.; et al. PKO – Alternative method for isolating mycobacterium from sputum. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 3, p. 419-424, 2007
27. SELVARAJ, P. *et al.* Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. **Cytokine**, v. 43, p. 26-33, 2008.
28. SHALER, C.R.; HORVATH, C.; LAI, R.; XING, Z. Understanding Delayed T-Cell Priming, Lung Recruitment, and Airway Luminal T-Cell Responses in Host Defense against Pulmonary Tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, vol. 2012, Article ID 628293, 13 pages, 2012. doi:10.1155/2012/628293.
29. SMITH S, LIGGITT D, JEROMSKY E, Tan X, SKERRETT SJ, WILSON CB. Local role for tumor necrosis factor alpha in the pulmonary inflammatory response to Mycobacterium tuberculosis infection. **Infect Immun**, v.70, p. 2082-9, 2002
30. SEMSA, Secretaria Municipal de Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica e Ambiental. Análise das ações para o controle da Tuberculose em Manaus, 2012.
31. VARAHRAM, M.; FARNIA, P.; ANOOSHEH, S.; KAZAMPOUR, M.; MERZA, M.; SAEIF, S.; MASJEDI, R. M.; VELAYATI, A. A. The VDR and TNF- $\alpha$  gene polymorphisms in iranian tuberculosis patients: the study on host susceptibility. **Iran J Clin Infect Diseases**, v. 4(4), p. 207-213, 2009.
32. WANG, Q.; ZHAN, P.; QIU, L. X.; QIAN, Q.; YU, L. K. TNF – 308 gene polymorphism and tuberculosis susceptibility a meta-analysis involving 18 studies. **Mol Biol Rep**, v. 39(4), p. 3393-3400, 2012.
33. WILSON, A. G.; SYMONS, J. A.; MCDOWELL, T. L.; MCDEVITT, H. O.; DUFF, G. W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94(7), p. 3195-3199, 1997.
34. ZAR J.H., **Biostatistical Analysis**. Ed Prentice Hall, Inc, Englewood Cliff, p. 401. New Jersey, 1984.

## 10. ANEXOS

### ANEXO 1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

 UFAM	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS Comitê de Ética em Pesquisa – CEPI/UFAM	
<b><u>PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</u></b>		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0017.0.115.000-08, intitulado: “Polimorfismo dos genes de HLA classe II, TNF-alfa e PDCD-1 em pacientes com Tuberculose pulmonar nascido no estado do Amazonas”, tendo como Pesquisadora Responsável Aya Sadahiro.</p> <p>Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 05 de março de 2008.</p>		
 Profª Dra Maria de Meneses Pereira Coordenadora, em exercício		

## ANEXO 2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

(INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr(a). para participar do Projeto de Pesquisa “**Polimorfismo dos gene de HLA Classe II, TNF-alfa e PDCD-1 em pacientes com Tuberculose pulmonar nascidos do Estado do Amazonas**”, que será realizado na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e pretende saber em que forma se encontra um componente existente no sangue de pessoas com e sem a Tuberculose pulmonar. A pesquisadora responsável pelo projeto é a professora **Aya Sadahiro** e pede sua autorização para coletar (tirar) um pouquinho do seu sangue (cinco mililitros), para poder fazer este estudo. O Sr.(a) foi escolhido porque tem a doença ou porque não tem doença nenhuma, neste caso a informação do seu sangue vai servir para sabermos se o componente está ou não diferente em quem tem a doença e em quem não tem a doença. Se o(a) Sr.(a) autorizar esta coleta, seu sangue será utilizado como sangue de pessoa com a doença Tuberculose. O que não for usado não será guardado, sendo descartado com todo cuidado. A coleta de sangue será feita em uma veia de seu braço, podendo causar uma leve dor na hora e uma pequena mancha roxa que desaparecerá em 3 a 4 dias após a coleta, mas esperamos que nada disso aconteça. Se depois de autorizar a coleta, o (a) Sr.(a) não quiser que seu sangue seja usado, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta do sangue, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo. O (A) Sr.(a) não terá nenhuma despesa e também não ganhará nada. A sua participação é importante para o melhor conhecimento desta doença e de como pode ser melhor diagnosticada.

Os resultados desta pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em segredo para sempre. Para qualquer outra informação, o(a) Sr.(a) poderá entrar em contato com o(a) pesquisadora pelo telefone (92) 3647-4231 ou pelo e-mail: [asadahiro@ufam.edu.br](mailto:asadahiro@ufam.edu.br)

Consentimento Pós-informação

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa de minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Estou recebendo uma cópia deste documento, assinada, que vou guardar.

\_\_\_\_\_

Assinatura do Participante

ou

Impressão do dedo

polegar



Assinatura do Pesquisador

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_