



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**ELISABETE LOPES CONCEIÇÃO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Estudo do polimorfismo dos genes das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10,  
IL-1 $\beta$  e dos receptores tipo Toll 2 e 4 em voluntários sadios  
revacinados com BCG**

**Salvador, BA**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**ELISABETE LOPES CONCEIÇÃO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Estudo do polimorfismo dos genes das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10,  
IL-1 $\beta$  e dos receptores tipo Toll 2 e 4 em voluntários sadios  
revacinados com BCG**

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa

**Salvador, Bahia**

**2010**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Conceição, Elisabete Lopes

C744e Estudo do polimorfismo dos genes das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-1 $\beta$  e dos  
receptores tipo Toll 2 e 4 em voluntários sadios revacinados com BCG [manuscrito]  
Elisabete Lopes Conceição. - 2010.

64  $\phi$ . : 1 $\lambda$ . ; 30  $\chi\mu$ .

Datilografado (fotocópia).

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto  
de Ciências**

**da Saúde, 2010.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>.Theolis Barbosa Costa Bessa, Laboratório Integrado de  
Microbiologia e Imunoregulação.

1. BCG. 2. Polimorfismos Genético. 3. Citocinas. I.Título.

CDU 615.371:575

*A perfeição não está na quantidade, mas na qualidade.  
As coisas muito boas sempre foram poucas e raras,  
A abundância traz a desvalorização. (Baltasar Gracián)*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter colocado as pessoas certas no meu caminho.

A meus pais Fátima e Oséas e ao meu noivo Giuseppe Scribani, por todo carinho e palavras de conforto nos momentos de crise.

A minha orientadora, Theolis Barbosa por ter me aceito novamente no grupo e por ter acreditado em mim e no meu trabalho.

Ao Professor Sérgio Arruda que também me orientou no início do curso.

À Professora Songeli Menezes que me deu a oportunidade de fazer a seleção sendo minha orientadora inicial.

Às Secretárias Dilcéia Reis e Sônia Costa por sempre serem gentis e prontas a ajudar qualquer aluno.

Aos meus colegas e professores de curso pela rica troca de experiências.

Ao LIMI-FIOCRUZ/Ba, coordenado por Dr. Manoel Barral pelo apoio no desenvolvimento do trabalho. A Jorge Tolentino, Natali Cerqueira e Elaine Arruda pela ajuda técnica. A Leonardo Arruda e Daniel Ruiz pelas sugestões.

Aos colegas de laboratório e amigos Evelin Oliveira, Jaqueline Solidade, Iukary Takenami, Tonya Duarte, Joilda Nery, Oliveira e Glaucea Cabral por toda ajuda para o desenvolvimento do trabalho e pelo companheirismo e amizade.

As estudantes Priscila Miranda, Beatriz Muller, Gislaine Aparecida Lacerda e Paula Fernanda Gonçalves da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo suporte técnico na realização das técnicas para avaliação dos polimorfismos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta construção.

### **APOIO FINANCEIRO**

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), Edital 004/2009 MS/CNPQ/FAPESB/SESAB.

Recebi bolsa de estudo da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> , AGENTE ETIOLÓGICO DA TUBERCULOSE .....	19
2.2 TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE DA TUBERCULOSE .....	19
2.3 IMPORTÂNCIA DA INFECÇÃO E DOENÇA TUBERCULOSA .....	20
2.5 PROFILAXIA DA TUBERCULOSE: A VACINA BCG .....	22
2.6 EFICÁCIA DA BCG NA VACINAÇÃO E REVACINAÇÃO .....	23
2.7 POLIMORFISMO GENÉTICO NA TUBERCULOSE .....	26
2.7.1 Tuberculose e polimorfismo no gene IFN- $\gamma$ .....	27
2.7.2 Tuberculose e polimorfismo no gene TNF .....	28
2.7.3 Tuberculose e polimorfismo no gene IL-10.....	29
2.7.4 Tuberculose e polimorfismo nos genes para receptores tipo Toll.....	30
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	33
3.1. OBJETIVO GERAL.....	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4. RESULTADOS</b> .....	34
4.1. MANUSCRITO:.....	34
Ausência de associação entre os polimorfismos dos genes das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-1 $\beta$ e dos receptores tipo Toll 2 e 4 e a produção de citocinas em voluntários sadios revacinados com BCG	
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	55
REFERÊNCIAS .....	56

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Foto da formação do Fator corda em uma cultura do <i>M. tuberculosis</i> .....	17
Figura 2: Coloração com fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen.....	18
Figura 3. Figura do granuloma clássico encontrado nas infecções latente e ativa .....	19
Figura 4. Estimativa do número de novos casos de Tuberculose, por país, 2009.....	21
Figura 5: Notificação dos casos de tuberculose por macrorregiões do Brasil.....	22
Figura 6: Estrutura do gene e localização do polimorfismo funcional do gene para IFN- $\gamma$ humano. ....	27
Figura 7: Estrutura do gene e localização do polimorfismo funcional do gene para IL-10 humano. ....	30



## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARMS	"Amplification Refractory Mutation System"
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DTH	Hipersensibilidade do Tipo Tardia
EUA	Estados Unidos da América
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL	Interleucina
IS	Seqüências de Inserção
LPS	Lipopolissacarídeo
LTBI	Infecção Tuberculosa Latente
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear – $\kappa$ B
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NRAMP1	Gene de Resistência Natural Associado a Proteína 1
PAMPs	Padrões Moleculares Associado a Patógenos
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PNI	Programas Nacional de Imunização
PPD	Derivado Protéico Purificado
RFLP	Polimorfismo de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucléico

SLC11A1 ..... '*Solute carrier family 11A member 1*'  
SNP ..... Polimorfismo de Base Única  
TB ..... Tuberculose 1  
T<sub>H</sub>1 ..... Linfócito T auxiliar tipo 1  
T<sub>H</sub>2 ..... Linfócito T auxiliar tipo 2  
T<sub>H</sub>17 ..... Linfócito T auxiliar tipo 17  
T $\gamma\delta$  ..... Linfócito T gamma-delta  
TNF ..... Fator de Necrose Tumoral  
TLR ..... Receptores Tipo Toll  
TST ..... Teste Tuberculínico Cutâneo  
WHO ..... '*World Health Organization*'

Conceição, E.L. Estudo do polimorfismo dos genes das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-1 $\beta$  e dos receptores tipo Toll 2 e 4 em voluntários sadios revacinados com BCG. 64 f. 2010. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Imunologia. Universidade Federal da Bahia.

## RESUMO

**Introdução:** O fato de apenas 10% das pessoas infectadas com *M. tuberculosis* desenvolverem a doença clínica sugere que fatores genéticos podem desempenhar um papel importante na patogênese da TB. Polimorfismos em genes de citocinas têm sido associados com susceptibilidade, gravidade e variação na resposta clínica em várias doenças, incluindo doenças infecciosas. Para combater a doença, a única vacina licenciada para uso contra a tuberculose é o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG). A proteção induzida pela vacinação contra o *M. tuberculosis* é mediada pela geração de células T específicas e produção aumentada de IFN- $\gamma$ . **Objetivo:** Avaliar a associação entre o polimorfismo de genes de citocinas e receptores em voluntários sadios revacinados com BCG ao perfil de resposta *in vitro* a antígenos micobacterianos. **Metodologia:** 25 voluntários com resultados negativos ao teste tuberculínico em dupla testagem (que fizeram parte de um estudo de revacinação com Bacilo de Calmette-Guérin, cepa Moreau), foram recrutados para o estudo. As citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6 e IL-1 $\beta$  foram avaliadas no sobrenadante das culturas de sangue total estimuladas com antígenos do *M. tuberculosis*. Os polimorfismos de interesse *IFNG* +874T>A, *IL10*-592C>A, *IL1B*-35C>T, *TLR2* G753A (Arg753Gln) e *TLR4* C399T (Thr399Ile) foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) e a análise dos polimorfismos foram identificados por tamanho dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) ou Amplificação pelo Sistema de Mutação Refratária (ARMS-PCR). **Resultados:** Não houve diferença significativa na produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  antes ou após a revacinação com BCG entre os diferentes genótipos dos polimorfismos estudados. **Discussão e Conclusão:** No presente estudo, foi observado que o aumento da produção de IFN- $\gamma$  (estudo de revacinação com Bacilo de Calmette-Guérin, cepa Moreau) após a revacinação de indivíduos saudáveis com BCG não foi influenciada por polimorfismos previamente associados com resistência e/ou susceptibilidade ao desenvolvimento da tuberculose em outras populações.

**Palavras-chave:** BCG, polimorfismos genético, citocinas, receptores Toll

Conceição, E.L. Genes polymorphism citokine IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-1 $\beta$  and Toll like receptors 2 and 4 in BCG-revaccinated health volunteers. 64f. 2010. Master's Degree. Post Graduation Program in Immunology. Federal University of Bahia.

## ABSTRACT

**Introduction:** Given that only 10% of the subjects infected with *M. tuberculosis* (Mtb) will develop active disease, it is plausible that the genetic background of the host will impact significantly on tuberculosis (TB) pathogenesis. Polymorphisms in cytokine genes, among other molecules involved in the anti-mycobacterial response are likely to have influence on TB susceptibility. BCG (Bacille of Calmette-Guérin) is the only licensed vaccine against tuberculosis. Vaccine-induced protection against *M. tuberculosis* is mediated by the generation of specific T cells and increased production of IFN- $\gamma$ . **Aims:** To correlate polymorphisms in genes for cytokines and receptors with the *in vitro* profile of immune response to mycobacterial antigens in healthy volunteers revaccinated with BCG. **Methods:** 25 subjects negative for the tuberculin test in double testing (which were part of a study of revaccination with Bacille of Calmette-Guerin, Moreau strain), were recruited for the study. The cytokines IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6 and IL-1 $\beta$  were evaluated in culture supernatants of whole blood stimulated with antigens of *M. tuberculosis*. The polymorphisms of interest *IFNG* +874 T> A, *IL10*-592C> A, *IL1B*-35C> T, *TLR2* G753A (Arg753Gln) and *TLR4* C399T (Thr399Ile) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and polymorphisms were identified by restriction fragment length (PCR-RFLP) or amplification refractory mutation system (ARMS-PCR). **Results:** No significant difference in IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF, IL-6 and IL-1 $\beta$  at time zero or after revaccination were observed among different genotypes for the polymorphisms studied. **Discussion and Conclusion:** In this study, we found that the increased *in vitro* production of IFN- $\gamma$  (study of revaccination with Bacille Calmette-Guerin, Moreau strain) after revaccination with BCG in healthy subjects was not influenced by polymorphisms previously associated with resistance and / or susceptibility to develop tuberculosis.

**Keywords:** BCG, genetic polymorphism, citokine, Toll receptors

## 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) humana é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, um bacilo álcool-ácido-resistente, de forma cilíndrica, que possui uma parede celular rica em ácidos graxos de cadeia longa, glicolípídeos e outros componentes. O *M. tuberculosis* é um microorganismo de crescimento lento com uma replicação de aproximadamente 20 horas. Esse crescimento lento contribui para a natureza crônica da infecção e da doença. Além do *M. tuberculosis*, outras espécies de *Mycobacterium* causam doenças exclusivamente ao homem (*M. africanum* e *M. canetti*) ou roedores (*M. microti*). Outros apresentam um grande número de hospedeiros (*M. bovis* subespécie *bovis*, *M. bovis* subespécie *caprae*) (DALL’STELLA e cols, 2003).

A TB é uma das doenças mais antigas de que se tem conhecimento, tendo sido descrita em múmias egípcias, anos antes de Cristo. Na Europa (região que hoje é a Itália) os médicos tentavam isolar os pacientes e seus pertences como forma de evitar o contágio desde o século XIV e XV, prova de que já desconfiavam que a doença se espalhava entre pessoas. No século XVI, época das grandes navegações, os pacientes portadores da tuberculose ganglionar iam uma vez por ano até os palácios da França e Inglaterra para que o rei os tocasse num ritual com orações do próprio rei ou de seus cardeais, o que ficou conhecido historicamente como “Toque do Rei”. Não se sabe o porquê, mas fato era que realmente havia muitos casos de melhora, talvez pela higienização prévia que faziam antes de serem tocados pela majestade. Esse mito se estendeu até o final do século XVIII. Com os estudos de anatomia dos séculos XVII e XVIII e achados de estruturas com formato de tubérculos, sobretudo nos pulmões de cadáveres, surgiu o atual nome da doença: tuberculose. Seu agente etiológico somente foi identificado por Robert Koch em 1882, que ficou conhecido desde então de “Bacilo de Koch” ou “BK” (KRITSKI e cols, 2000).

Com o advento do esquema tríplice de tratamento por volta de 1950, a doença foi praticamente erradicada nos países industrializados da Europa e nos EUA. No Brasil, ainda prevalece como doença de país em desenvolvimento. Nas últimas décadas, a tuberculose voltou a ter grande interesse no mundo devido sua estreita associação com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (FILHO e cols, 2006).

O *M. tuberculosis* é um dos patógenos mais eficazes no escape da resposta do sistema imune humano, com 1/3 da população mundial infectada, cerca de 2 bilhões de pessoas. Cerca de 90% dos infectados não desenvolve a doença, apesar da persistência do patógeno. Embora a tuberculose possa se manifestar em qualquer tecido, a doença pulmonar ocorre em mais de 70% dos casos, e é a forma capaz de disseminar o bacilo para novos hospedeiros (TUFARIELLO e cols, 2003).

Em muitos casos da infecção pelo *M. tuberculosis* o indivíduo permanece assintomático, caracterizando a forma latente da tuberculose. A história natural mostra que 10% dos indivíduos com a infecção tuberculosa latente desenvolvem a doença ativa. A reativação da infecção latente pode ocorrer por alterações na resposta imune do indivíduo, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-AIDS), tratamento com imunossupressores, uso abusivo de álcool e drogas ilícitas, além de fatores de susceptibilidade ainda desconhecidos (BARRY e cols, 2009).

O fato de apenas 10% das pessoas infectadas com *M. tuberculosis* desenvolverem a doença clínica sugere que fatores genéticos podem desempenhar um papel importante na patogênese da TB. Polimorfismos em genes de citocinas têm sido associados com susceptibilidade, gravidade e variação na resposta clínica em várias doenças, incluindo doenças infecciosas (LIO e cols, 2002). Polimorfismos na região promotora de genes de citocinas envolvidas na resposta imune contra micobactérias, tais como tais como *IFNG* +874 (VALLINOTO e cols, 2010) e *IL10* -1082 (HENAO e cols, 2005) têm sido associados com falha da transcrição gênica, e conseqüentemente da expressão proteica.

Para prevenir a doença, a única vacina licenciada para uso contra a tuberculose é o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Mundialmente, mais de 90% das crianças são imunizadas com essa vacina, sendo administradas mais de 120 milhões de doses anualmente (RITZ e cols, 2008). Em diversos países, inclusive no Brasil, a BCG faz parte do Programas Nacional de Imunização (PNI), seguindo as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) (BENÉVOLO-ANDRADE e cols, 2005).

A vacina BCG tem sido usada há mais de 80 anos na proteção contra a tuberculose e já está bem estabelecida sua proteção contra formas extrapulmonares graves, especialmente em crianças, mas sua proteção contra a tuberculose pulmonar é variável. Apesar disso, muitos estudos mostram boa eficácia da BCG *in vitro* na indução da proliferação celular e secreção de citocinas da resposta imune contra o *M. tuberculosis*. O interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) e a interleucina-12 (IL-12) são citocinas induzidas pela vacinação com BCG e possuem papel

importante na resposta imune inata e adaptativa para o controle da infecção (AGUIRRE-BLANCO e cols, 2007), e em modelos experimentais são importantes na redução da carga bacilar e patologia pulmonar (CASTILLO-RODAL e cols, 2006).

Os fatores que influenciam a resposta imune à vacina ainda não foram completamente elucidados. Recentemente verificou-se associação entre a resposta vacinal e a ocorrência de polimorfismo na região promotora do gene para o IFN- $\gamma$  (ANURADHA, 2008). Indivíduos com mutação nos genes para IL-12 e IFN- $\gamma$  geralmente são susceptíveis a infecções por micobactérias não-patogênicas (CASANOVA e cols, 2008).

Trabalhos anteriores do nosso grupo vêm demonstrando que células do sangue periférico de indivíduos revacinados têm capacidade diferenciada de responder *in vitro* ao estímulo com antígenos de *M. tuberculosis* (BARBOSA e cols, 2003), a qual pode estar associada *in vivo* a capacidade diferenciada de desenvolver uma resposta contra o bacilo (OLIVEIRA e cols, 2008). Neste trabalho, foi avaliada a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10 e IL-6 por estímulo de células do sangue total de indivíduos saudáveis com antígenos do *M. tuberculosis*, antes e após a revacinação com BCG. Esta resposta *in vitro* foi associada a polimorfismos nos genes para citocinas e receptores importantes na resposta imune contra micobactérias, visando elucidar se estes fatores genéticos podem influenciar na resposta imune induzida pela vacina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, AGENTE ETIOLÓGICO DA TUBERCULOSE

O *Mycobacterium tuberculosis* pertence à ordem *Actinomycetales*, sub-ordem *Corynebacteriaceae*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. Em conjunto, *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. caprae* formam o complexo *M. tuberculosis* (KONEMAN e cols, 1999).

As micobactérias são bacilos retos ou ligeiramente curvos, medindo 0,2 a 0,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 1 a 10  $\mu\text{m}$  de comprimento. São bactérias imóveis, não esporuladas, não capsuladas, aeróbicos estritos e bacilos álcool ácido resistentes pelas características da sua parede celular (BRASIL, 2002).

Essas bactérias crescem a um ritmo 20 a 100 vezes mais lento que outras bactérias, sendo necessárias quatro a seis semanas para obter uma colônia de *M. tuberculosis* em meio sólido específico (Lowenstein-Jensen) (BRASIL, 2002).

Os bacilos agrupam-se formando ramos alongados e tortuosos. Esse agrupamento deve-se a um glicolípido de superfície denominado *fator corda* (Figura 1), que leva o *M. tuberculosis* a crescer em cordões sinuosos *in vitro*. As cepas virulentas apresentam esse fator na sua superfície, enquanto as cepas avirulentas não o têm.



Figura 1: Foto da formação do Fator corda em uma cultura do *M. tuberculosis*  
Fonte: Microbiologia, Tortora, 2005, p.158

A parede micobacteriana é constituída principalmente por ácidos micólicos, formando uma barreira hidrofóbica que confere resistência à dessecação, à descoloração por álcool e ácido, a agentes químicos e a antibióticos. Apresenta um alto conteúdo lipídico, responsável



por importantes efeitos biológicos, como a indução da formação de granuloma (KONEMAN e cols,1999 ; ABEBE e BJUNE, 2006).

As micobactérias podem sobreviver por semanas em escarro seco e são muito resistentes aos antimicrobianos químicos usados como anti-sépticos e desinfetantes (mercúrio, fenólicos, bifenol, compostos quaternários de amônio, cloro e derivados, iodo, alcoóis, etc) (TORTORA, 2005). Elas também são relativamente resistentes aos procedimentos convencionais de coloração ao serem coradas com fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen ou a frio com auramina. As micobactérias retêm os corantes após lavagem com soluções de álcool-ácido, não podendo ser descoradas. Portanto, são identificadas como álcool-ácido resistentes (Figura 2) (TORTORA, 2005).

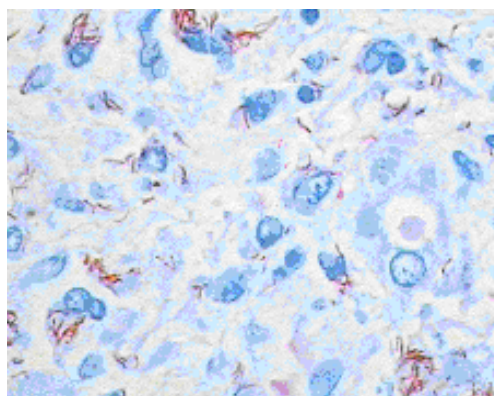


Figura 2: Coloração com fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen  
Fonte: Bogliolo Patologia, Filho, 2006, p.215

O genoma do *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv é composto de 4.411.529 pares de bases, dos quais 65,6% são constituídos por guanina e citosina. Foram identificados 3.924 quadros abertos de leitura, contabilizando aproximadamente 91% do seu potencial de codificação. Geneticamente, os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* são extremamente semelhantes, com 99,9% de homologia de sequência em nível de nucleotídeos, e com seqüências idênticas do RNA ribossomal 16S. O genoma do *M. tuberculosis* é rico em DNA repetitivo e seqüências de inserção (IS) como IS6110 e IS1081 (FERNANDES e cols, 2007).

## 2.2 TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE DA TUBERCULOSE

O *Mycobacterium tuberculosis* é transmitido via aerossol, e a patogênese da tuberculose se inicia quando gotículas contendo o bacilo são expelidas por um caso-índice e são inaladas por um contato. O *M. tuberculosis* atravessa o trato respiratório superior alcançando os pulmões onde são fagocitados pelos macrófagos alveolares. Estas células juntamente com as células epiteliais formam a primeira linha de defesa contra a micobactéria (PANDO e cols, 2009).

A infecção pelo *M. tuberculosis* pode ser classificada em três estágios: primária, latente ou reativação endógena. A infecção primária ocorre geralmente na infância depois do primeiro contato com o bacilo e frequentemente é assintomática. Após uma alveolite inicial, com infiltração de neutrófilos, monócitos, linfócitos T e Linfócitos B circundando macrófagos (alguns infectados), células dendríticas e fibroblastos, há a formação de um tubérculo granulomatoso (Figura 3). A formação do granuloma neste estágio é um mecanismo do sistema imune para limitar a disseminação bacilo pelo pulmão e/ou para outros órgãos (YANG e cols, 2010).

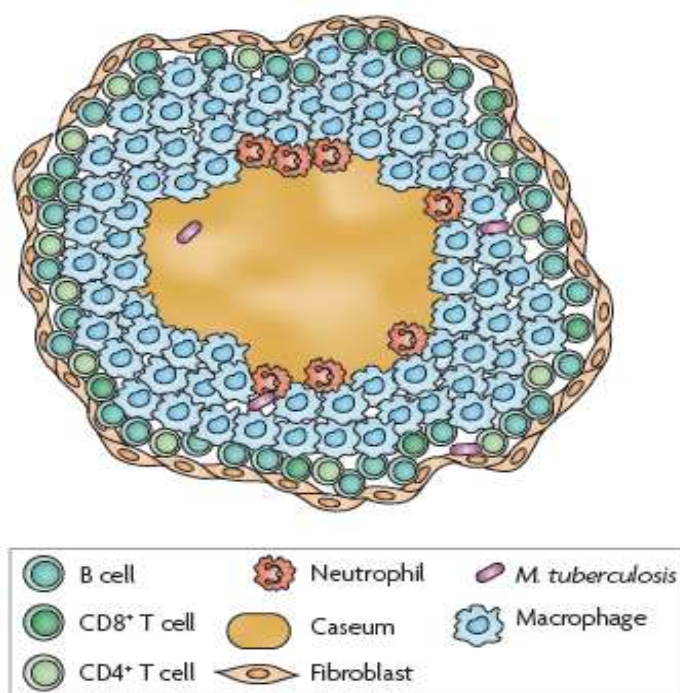


Figura 3. Figura do granuloma clássico encontrado nas infecções latente e ativa.

Fonte: Nature Reviews, 2009, p.84

A infecção primária frequentemente é abortada neste estágio, embora alguns bacilos persistam no tecido por meses ou décadas sem crescer, mas viáveis, uma característica classificada como infecção tuberculosa latente (LTBI). Neste estágio, o hospedeiro monta uma forte resposta imune que contém, mas não elimina a infecção. Uma desregulação do mecanismo de resistência imune pode conduzir à reativação da doença. Após a latência, a reativação endógena pode desencadear um processo inflamatório exudativo. Com a progressão, os sintomas clássicos como tosse, expectoração, febre, suores noturnos, anorexia e perda de peso podem aparecer (RAJA, 2004; YANG e cols, 2010).

Depois de penetrar no organismo pela via respiratória, o *M. tuberculosis* pode se disseminar e se instalar em qualquer órgão, seja durante a primo-infecção, quando a imunidade específica induzida pela vacina falha, ou após, a qualquer tempo, se houver redução na capacidade do hospedeiro em manter o bacilo nos seus sítios de implantação. As formas extrapulmonares mais frequentes, com pequenas variações de posição em diferentes períodos e regiões, são: pleural, linfática, osteoarticular, geniturinária e intestinal. No entanto, praticamente qualquer local do organismo pode ser afetado pela doença (LOPES e cols, 2006).

### 2.3 IMPORTÂNCIA DA INFECÇÃO E DOENÇA TUBERCULOSA

Apesar de ser uma das doenças infecciosas mais antigas, bem conhecida e há mais de meio século vulnerável ao tratamento medicamentoso, a tuberculose permanece como um dos principais agravos à saúde enfrentados em âmbito global. É um grave problema de saúde pública, por ocorrer principalmente na idade mais produtiva dos indivíduos, entre 15 e 49 anos. A forma latente é observada atualmente em cerca de um terço da população mundial. Contribuem para esse quadro as desigualdades sociais, os fluxos migratórios, as deficiências dos sistemas de saúde, a alta prevalência dos casos de tuberculose multi-droga resistentes e associação à co-infecção HIV-AIDS (BARREIRA, 2007; FERNANDES e cols, 2007)

Estima-se que em 2009 tenham ocorrido 9,4 milhões de novos casos de TB em todo o mundo, o equivalente a 137 casos por 100.000 habitantes. Dentre esses casos, 1,2 milhões corresponderam a indivíduos co-infectados com o HIV. No mesmo ano, a tuberculose foi responsável por 1,3 milhões de mortes. A maioria dos casos de tuberculose ocorreu no

Sudeste da Ásia, África e região Oeste do Pacífico, sendo 13% dos casos positivos para o HIV (Figura 4) (WHO, 2010).

Os cinco países com maior incidência de casos de tuberculose em 2009 foram a Índia (1.6-2.4 milhões), a China (1.1-1.5 milhões), a África do Sul (0.40 – 0.49 milhões), a Nigéria (0.37- 0.55 milhões) e a Indonésia (0.35-0.52 milhões). O Brasil é o único país da América Latina entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de TB no todo o mundo ocupando o 19º lugar entre esses países.

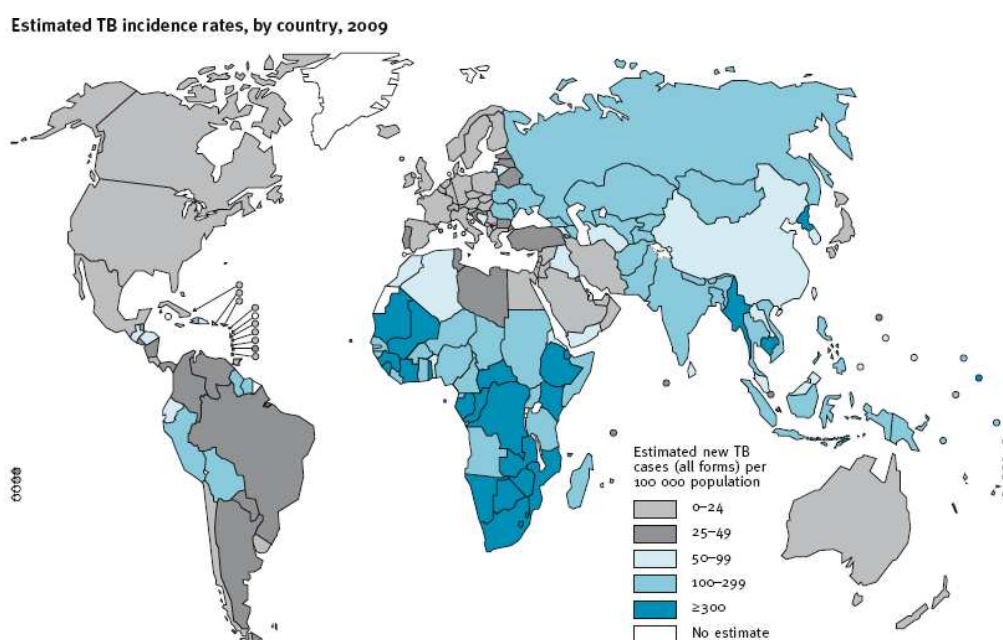


Figura 4. Estimativa do número de novos casos de Tuberculose, por país, 2009.  
Fonte: WHO, 2010, p.6

No Brasil a prevalência de tuberculose foi de 75.040 casos em 2009, sendo 39.267 casos confirmados por baciloscopia positiva (WHO, 2010). 70.207 foram casos novos de tuberculose, dos quais 57.932 corresponderam à forma pulmonar. 5.663 casos de tuberculose ocorreram entre indivíduos positivos para o HIV (BRASIL, 2010).

A mortalidade por tuberculose tem apresentado tendência de redução na maioria dos países do mundo. No Brasil, essa redução iniciou a partir da década de 50, com o advento da quimioterapia, observando-se a redução de mortes nas décadas seguintes. Nas capitais brasileiras este decréscimo foi de 61,4% entre 1970-1979, havendo um declínio médio de

10% ao ano, mas com maior coeficiente de mortalidade nas regiões norte e nordeste (MOTA e cols, 2003).

Atualmente, as regiões norte e nordeste ocupam o primeiro lugar em notificações de tuberculose no país com 55% dos casos (Figura 5). O estado da Bahia está entre os estados da região nordeste com maior número de casos da doença. Em 2009 foram notificados 6.826 casos de TB na Bahia, sendo 5.465 casos novos, 4.820 na forma pulmonar e 130 em indivíduos HIV positivos. Em Salvador foram registrados 3.226 casos da doença com 2.363 casos novos (WHO, 2010; BRASIL, 2010).

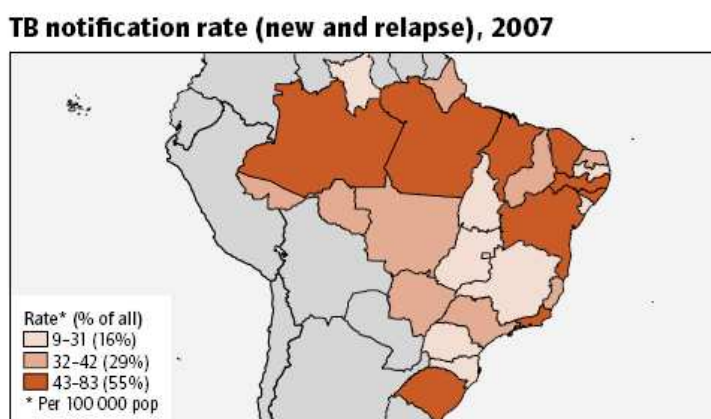


Figura 5: Notificação dos casos de tuberculose por macrorregiões do Brasil  
Fonte: WHO, 2009, p.89

## 2.5 PROFILAXIA DA TUBERCULOSE: A VACINA BCG

A vacina Bacilo de Calmette-Guérin, usada na prevenção da tuberculose, foi desenvolvida pelos pesquisadores Albert Calmette e Camille Guérin entre os anos de 1908 e 1921 na França. A cepa do *Mycobacterium bovis*, que foi atenuada para a produção da vacina, foi isolada de um novilho alguns anos antes por Norcad em 1902 no Instituto Pasteur de Paris. No Instituto Pasteur de Lille, Calmette obteve acidentalmente uma cepa com mutações após passagens *in vitro* do *M. bovis* em culturas de fécula de batata. Guérin, seu assistente, observou após 231 passagens do *M. bovis* *in vitro*, durante 13 anos, alterações morfológicas e perda da virulência nas colônias. Anos após as primeiras culturas, a cepa do *M. bovis* tinha sido atenuada, mas ainda fornecia proteção contra desafios *in vivo* com o *M. tuberculosis*.

Após o primeiro teste em humanos em 1921 na França, a BCG foi distribuída pelo Instituto Pasteur para todo o mundo (BENÉVOLO-DE-ANDRADE e cols, 2005; RITZ e cols, 2008).

Apesar dos esforços para padronizar o crescimento e preparação da vacina, as diferentes condições de passagens da cepa nos laboratórios originaram diferentes cepas filhas. Atualmente existem 12 tipos de cepas da BCG (Rússia, Japan, Moreau, Sweden, Birkhaug, Prague, Denmark, Glaxo, Tice, Frappier, Phipps e Pasteur), mas quatro são mais utilizadas: BCG-Pasteur (1173P2), BCG-Japan (Tokyo-172), BCG-Danish (Copenhagen-1331) and BCG-Glaxo (1077) (LIU e cols, 2009). A BCG utilizada no Brasil é a BCG Moreau, que chegou ao país em 1925 e passou a ser chamada de cepa Moreau-Rio de Janeiro (BENÉVOLO-DE-ANDRADE e cols, 2005).

Atualmente a BCG é uma das vacinas mais utilizadas em todo o mundo, com 120 milhões de doses administradas todos os anos. A eficácia da BCG em crianças já está bem estabelecida, com mais de 80% de proteção contra as formas graves e disseminadas da tuberculose, incluindo as formas meníngea e miliar. A proteção contra a tuberculose pulmonar em adultos é controversa com estimativas de eficácia de 0 a 80% (LIU e cols, 2009).

## 2.6 EFICÁCIA DA BCG NA VACINAÇÃO E REVACINAÇÃO

Algumas pessoas infectadas pelo *M. tuberculosis* são resistentes ao desenvolvimento da tuberculose e essa resistência é mediada em parte pelo sistema imune. Essa indicação é confirmada por estudos com grupos de indivíduos imunocomprometidos que são susceptíveis ao desenvolvimento da doença. Esses grupos incluem pessoas com defeitos nos genes de mediadores imunes como o IFN- $\gamma$ , pacientes tratados com imunossuppressores ou portadores do HIV/AIDS. Embora a resistência à TB seja em parte propriedade da resposta imune do hospedeiro, em pessoas não naturalmente resistentes, a vacinação poderia conferir um grau adicional de proteção (YASIR e cols, 2006).

A proteção induzida pela vacinação contra o *M. tuberculosis* é mediada pela geração de células T específicas e produção aumentada de IFN- $\gamma$ . Muitos estudos avaliam a produção de IFN- $\gamma$  como um marcador de proteção após a vacinação com BCG. A produção de IFN- $\gamma$  e de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) antes e após a vacinação com BCG (Glaxo 1077)

foram utilizadas como parâmetro para investigar possíveis fatores associados à menor eficácia vacinal em duas populações: adolescentes do Reino Unido e adolescentes e adultos jovens do Malawi. A população do Malawi apresentou resposta aumentada de IFN- $\gamma$  e DTH antes da vacinação, atribuída pelos autores à grande exposição às micobactérias ambientais. Ambas as populações tiveram aumento na produção de IFN- $\gamma$  após um ano da revacinação, mas a resposta de IFN- $\gamma$  e DTH após um ano foi associada à boa proteção vacinal observada no Reino Unido (BLACK e cols, 2002).

Comparando-se a produção de quimiocinas e 21 citocinas (pró e anti-inflamatórias e regulatórias) entre crianças vacinadas e não vacinadas com BCG no Reino Unido foi possível verificar aumento de produção em 15 destes mediadores, dentre os quais IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-4, IL-5 e IL-6. O maior aumento foi observado nos níveis de IFN- $\gamma$ . O estudo sugere a importância da investigação de outros marcadores associados à proteção conferida pela vacina BCG, tendo as células T polifuncionais como alvo de futuras vacinas (LALOR e cols, 2010).

A eficácia protetora da BCG contra tuberculose pode diminuir com o tempo e isto pode ser devido a alguns fatores, como: redução da proteção entre os indivíduos vacinados; diminuição da suscetibilidade nos indivíduos não vacinados; mudança no balanço entre casos originários de TB progressiva, re-infecção e re-ativação.

Um dos objetivos no desenvolvimento de modelos vacinais mais eficazes é conseguir uma resposta persistente e duradoura. Em adolescentes do Reino Unido foi observada uma redução gradual da resposta de IFN- $\gamma$  comparando-se o tempo de três meses com o tempo de um ano após a administração da BCG, bem como se comparando o período de um ano com o período de três anos após a vacina. Apesar da redução na produção de IFN- $\gamma$  com o passar do tempo, o estudo mostrou que a produção desta citocina três anos após a vacinação foi seis vezes superior à encontrada para o grupo não vacinado. Adolescentes que foram vacinados na infância e testados após 14 anos tiveram capacidade de produção *in vitro* de IFN- $\gamma$  19 vezes maior que o grupo não vacinado (WEIR e cols, 2008). O estudo sugere que a vacinação na infância e na adolescência pode induzir uma resposta imunológica persistente a antígenos micobacterianos que pode ser detectada 14 anos após a primo-vacinação.

Muitos modelos de proteção vacinal foram propostos a partir da revacinação. Esta prática tem sido alvo de estudos controversos e existem algumas evidências que a segunda dose da vacina BCG não aumenta a eficácia protetora. Alguns países como Rússia, Portugal, Chile e Hungria usam doses repetidas da vacina contra a tuberculose pulmonar baseados na

diminuição da proteção com o passar do tempo (BARRETO e cols, 2006). Na Hungria após 1959, foi adotada a revacinação de indivíduos com menos de 20 anos de idade não reativos ao PPD (derivado protéico purificado). Alguns anos após, houve uma diminuição acentuada na incidência de TB entre as crianças revacinadas comparando-se a população adulta. No Chile em um estudo de caso-controle não foi encontrada proteção após as doses adicionais da BCG (TELA-HEIKKILA e cols, 1998).

No Brasil, em crianças com idade escolar em duas capitais, Salvador e Manaus, a administração de uma segunda dose da BCG não apresentou efeito protetor contra a tuberculose pulmonar (BARRETO e cols, 2006). Este estudo serviu de base para a descontinuidade desta prática pelo Ministério da Saúde. A resposta na produção de citocinas *in vitro* antes e após a revacinação em 136 crianças que foram revacinadas nesta coorte mostrou que parte destas crianças aumentaram a sua capacidade de produção de IFN- $\gamma$  após a revacinação. O estudo sugeriu que para alguns dos indivíduos revacinados poderia haver um benefício da administração de uma segunda dose da vacina (BARBOSA e cols, 2003). Grande parte dos indivíduos que apresentaram aumento da produção de IFN- $\gamma$  após a revacinação pertencia à faixa etária acima da mediana, sugerindo que indivíduos mais velhos poderiam se beneficiar mais de uma segunda dose de BCG do que indivíduos com idade abaixo da mediana. Essa hipótese e a possibilidade de persistência da modulação da resposta imune *in vitro*, medida através da produção *in vitro* de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-10 dois meses e um ano após a revacinação com BCG, foi testada revacinando adultos jovens universitários da área de saúde. Este estudo mostrou que houve aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  entre os indivíduos revacinados, os quais permaneceram aumentados um ano após a intervenção (OLIVEIRA e cols, 2008 dados não publicados).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a heterogeneidade observada na eficácia da BCG contra a tuberculose em diferentes populações. Parte da variabilidade observada é devido a diferenças genéticas entre as cepas de BCG utilizadas em diversos países (BENÉVOLO-DE-ANDRADE e cols, 2005). Outros fatores relacionados à heterogeneidade da eficácia da BCG estão na exposição contínua da população a micobactérias ambientais que podem bloquear ou mascarar a resposta imune induzida pela vacina e diferenças nutricionais entre as populações. (LIU e cols, 2009). Há poucos estudos a respeito da contribuição de fatores genéticos para a heterogeneidade da proteção conferida pela BCG.



## 2.7 POLIMORFISMO GENÉTICO NA TUBERCULOSE

Fatores genéticos do hospedeiro têm sido associados a maior susceptibilidade ou resistência a diversas infecções (CASANOVA, 2005). A associação de fatores genéticos do hospedeiro com susceptibilidade ou resistência à tuberculose tem sido investigada em estudos de caso-controle, de genes candidatos e de base familiar. Não está claro qual é a importância relativa dos fatores genéticos e ambientais, se os pacientes com tuberculose são inerentemente susceptíveis à doença ou se o desenvolvimento da doença é causado por fatores multifatoriais, como condições econômicas, má nutrição, estresse, agregação de indivíduos, dentre outros (LEANDRO e cols, 2009).

Alguns indivíduos e famílias que têm susceptibilidade a micobactérias não-patogênicas possuem defeitos genéticos raros. As doenças causadas por estas condições Mendelianas geralmente são causadas por defeito em um único gene que afeta principalmente a imunidade mediada pela secreção de IFN- $\gamma$  dependente de IL-12. Indivíduos com defeito genético na produção de IL-12, IFN- $\gamma$ , ou IL-17 normalmente são susceptíveis a infecções por patógenos de baixa virulência, como micobactérias ambientais ou vacinais (BCG). Além disso, muitos dos genes que conferem susceptibilidade à TB estão envolvidos na resposta imune inata, como o gene *Solute carrier family 11A member 1* (SLC11A1), anteriormente conhecido como gene de resistência natural associado a proteína 1 dos macrófagos (NRAMP1). Esse gene humano tem um homólogo no genoma de camundongos, *Nramp1*, que ativa a resposta microbicida dos macrófagos infectados. A deficiência no gene para o receptor da vitamina D também está associado com tuberculose (NEWPORT e cols, 2004; YIM e cols, 2009).

O aumento dos casos de tuberculose em indivíduos imunodeficientes, em particular nos indivíduos co-infectados com HIV-AIDS, demonstra a importância da resposta imune do hospedeiro no controle da infecção. Entretanto, muitas pessoas que desenvolvem tuberculose não são imunossuprimidas, o que indica que mesmo os indivíduos imunocompetentes possuem alterações na regulação da resposta imune do hospedeiro e essas alterações podem ser determinantes na susceptibilidade à TB. Em 1927, a administração acidental do *Mycobacterium tuberculosis* em crianças de Lubeck na Alemanha, resultou em alguns indivíduos não infectados e outros que desenvolveram a doença e foram a óbito. Isto indica que uma parte da população possui uma resistência inata efetiva contra a TB (COOKE e cols, 2001; JAE-JOON, 2010).

A resposta imune do hospedeiro contra a tuberculose é regulada pela interação entre os linfócitos, as células apresentadoras de antígenos e as citocinas secretadas por estas células. Embora as citocinas apresentem baixo grau de variação genética, têm aumentado o número de estudos sobre polimorfismos em regiões promotoras ou codificadoras de genes de citocinas como fatores susceptíveis a doenças infecciosas no hospedeiro. Mutações nestes genes podem resultar em alterações nas transcrições, afetando a ativação celular e os níveis das citocinas produzidas (VOSSE e cols, 2009).

### 2.7.1 Tuberculose e polimorfismo no gene *IFNG*

Interferon-gamma é uma citocina produzida em consequência da ativação de linfócitos T e de células *natural killer* (NK). Essa proteína possui efeito regulatório nas respostas imunes inatas e adaptativas, ativando fagócitos monomorfonucleares e células NK, aumentando a expressão de genes do complexo principal de histocompatibilidade de classe I e II, induzindo a maturação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e promovendo a troca de isotipo das imunoglobulinas dos linfócitos B (LEANDRO e cols, 2009).

O gene responsável pela transcrição do IFN- $\gamma$  está localizado no braço longo do cromossomo 12. Os polimorfismos de base única (SNPs) na posição +874 (T>A) está localizado próximo a região 5'. O alelo T está ligado a 12 sequências repetidas (CA) no primeiro intron e o alelo A está ligado a 12 CA não repetidos (Figura 6) (TSO e cols, 2005).

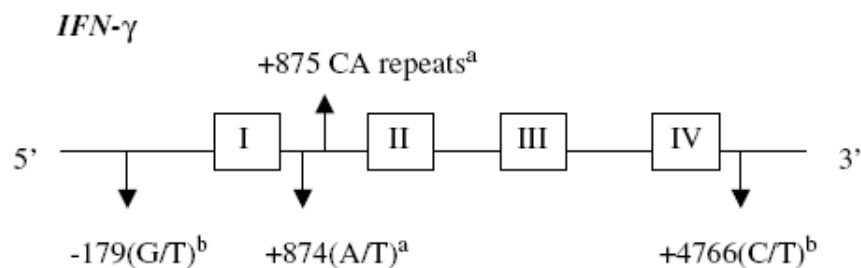


Figura 6: estrutura do gene e localização do polimorfismo funcional do gene para IFN- $\gamma$  humano  
Fonte: TSO e cols, 2005, p.359

A sequência específica do alelo T fornece um sítio de ligação para o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, o que induz a expressão de IFN- $\gamma$ . Conseqüentemente, o alelo T está

associado à alta expressão de IFN- $\gamma$ , enquanto o alelo A está associado à baixa expressão deste gene.

A frequência dos alelos T e A do locus *IFNG* +874 têm sido associada com a proteção ou a susceptibilidade ao desenvolvimento da tuberculose em indivíduos infectados (TSO e cols, 2005). Em pacientes diagnosticados com tuberculose pulmonar ativa foi observada menor frequência do genótipo homozigoto TT do que em indivíduos controles (8.9% vs 25.8%, respectivamente;  $P=0.02431$ ), sugerindo que o alelo T está associado a resistência contra a tuberculose crônica (LIO e cols, 2002). O genótipo TT e a presença do alelo T foram também associados a menor risco de tuberculose em estudo de meta-análise de 11 estudos que compararam pacientes com tuberculose pulmonar com controles sadios em populações de diferentes etnicidades (PACHECO e cols, 2008), e a menor risco de apresentar a forma meníngea da tuberculose quando comparada à forma pulmonar (ANSARI e cols, 2009). Um estudo realizado por Haluk Oral e colaboradores (2006) na Turquia com pacientes diagnosticados com TB ativa não encontrou diferenças significativas na distribuição dos alelos T e A entre pacientes e controles.

Dosagens mais elevadas de IFN- $\gamma$  também foram obtidas no plasma de pacientes com tuberculose homozigotos para o alelo T, em comparação com indivíduos heterozigotos e indivíduos homozigotos para o alelo A (VALLINOTO e cols, 2010). Níveis elevados de IFN- $\gamma$  também foram obtidos em culturas de sangue periférico estimuladas com derivado protéico purificado (PPD) de voluntários com o genótipo TT positivos para o TST, em comparação com valores basais encontrados em voluntários com os genótipos TA e AA (ANSARI e cols, 2009).

### **2.7.2 Tuberculose e polimorfismo no gene *TNF***

O gene que codifica o TNF está localizado dentro da região de classe III do HLA no braço curto do cromossomo 6 entre a região do HLA de classe I e II. Esta citocina está envolvida em vários processos biológicos incluindo proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo lipídico e coagulação. O TNF contribui para a formação e manutenção do granuloma, além de sinergizar com IFN- $\gamma$  para ativação dos macrófagos infectados

(SHARMA e cols, 2010). Por outro lado, níveis aumentados de TNF têm sido associados a maior gravidade da doença pulmonar e extrapulmonar (FIORENZA e cols, 2005; KÜPELI e cols, 2008; BARBOSA e cols, 2006)

Muitos polimorfismos do *TNF* têm sido descritos em diversos estudos, incluindo onze *loci* nas regiões promotoras 1031 (T>C), -863 (C>A), -857 (C>T), -308 (G>A), -238 (G>A), -1196 (C>T), -1125 (G>C), -572 (A>C), -316 (G>A), -163 (G>A) e -70 (G>A). A implicação funcional do polimorfismo *TNF* -308 G>A é ainda controversa, muitos estudos revelam não associação deste *locus* com susceptibilidade ou proteção à tuberculose, enquanto outros estudos demonstram susceptibilidade ao desenvolvimento da doença (FAN e cols, 2010).

A ocorrência do alelo *TNF*-238A tem sido associada à tuberculose, em estudos que comparam pacientes com controles saudáveis (SCOLA e cols, 2003; MERZA e cols, 2009). Esse alelo e os genótipos GA e AA também foram associados à ocorrência tanto de tuberculose como de co-morbidade pneumoconiose e tuberculose em trabalhadores de mineração (FAN e cols, 2010). Esse alelo, no entanto não foi associado à tuberculose ou com altos níveis séricos de TNF em pacientes com tuberculose comparados com controles sadios no estudo de Shilpy Sharma e colaboradores na Índia (2010).

### **2.7.3 Tuberculose e polimorfismo no gene *IL10***

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica de efeito imunorregulatório. Essa citocina anti-inflamatória, secretada por células T<sub>H</sub>2 e células T regulatórias do tipo Tr1 ou Foxp3+, regula negativamente a produção de IFN- $\gamma$ , de TNF e de óxido nítrico, bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias e do MHC classe II nos macrófagos (SABAT e cols, 2010).

O *IL10* está localizado no braço longo do cromossomo 1. A produção da IL-10 é controlada por vários elementos polimórficos na região 5' no locus 1q32 envolvendo dois alelos nos microsátélites e diversos SNP na região promotora. Existem três polimorfismos bialélicos no promotor do *IL10*: -1082 (G>A), -819 (C>T) e -592 (C>T) (Figura 7). Indivíduos que possuem o alelo -1082G estão associados à alta produção de IL-10, enquanto os indivíduos que apresentam dois alelos -1082A estão associados com a baixa produção

desta citocina. A IL-10 tem uma função importante na transição do estágio latente da TB para a doença ativa (TSO e cols, 2005).

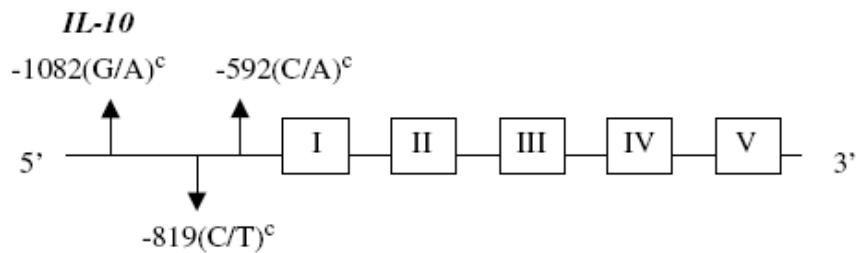


Figura 7: estrutura do gene e localização do polimorfismo funcional do gene para IL-10 humano  
Fonte: TSO e cols, 2005, p. 359

A ocorrência dos haplótipos GCC e ACC foi associada a predisposição à tuberculose. O alelo *IL10* -1082G é mais frequente em pacientes com TB (ORAL e cols, 2006). Em outro estudo realizado na Colômbia foi observada maior frequência do alelo A e do genótipo AA na posição -1082 nos pacientes com TB pleural quando comparados aos controles (HENAO e cols, 2006). Não houve associação com polimorfismos nos outros *loci*. Outros estudos não observam associação entre os polimorfismos citados e a produção de IL-10 ou a ocorrência de tuberculose em comparação com controles saudáveis (SELVARAJ e cols, 2008).

#### 2.7.4 Tuberculose e polimorfismo nos genes para receptores tipo Toll

Os TRLs humanos compreendem uma família de proteínas da superfície celular que estimulam a transcrição de genes de citocinas inflamatórias em resposta a vários ligantes microbianos. Estes receptores contribuem para o sistema imune inato através do reconhecimento de patógenos e induzem o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Os TLRs são proteínas transmembranares caracterizadas por um domínio extracelular rico em leucina que participa do reconhecimento do ligante e um domínio intracelular chamado *Toll/interleukin 1 receptor (TIR) domain*, homólogo ao encontrado no receptor para IL-1. Treze TLRs são encontrados em mamíferos.

A ativação destes receptores inicia uma cascata de sinalização que envolve diversas proteínas intracelulares como MyD88 e receptor de IL-1 associado a cinase. Esta cascata de

sinalização induz a ativação do NF- $\kappa$ B, o qual induz a síntese de citocinas inflamatórias (ALI e cols, 2003; YIM e cols, 2010). Além das células do sistema imune inato, os TLRs também são encontrados nas células T, incluindo células T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T $\gamma\delta$  e principalmente células T<sub>H17</sub>. Essas células expressam os receptores TLR2, TLR1 e TLR6 em níveis abaixo do que macrófagos, mas foi demonstrado um papel destes receptores na indução da diferenciação e proliferação das células T<sub>H17</sub> (REYNOLDS e cols, 2010).

#### 2.7.4.1 Receptor *Toll Like 2*

O gene *TLR2* está localizado no cromossomo 4 e este receptor reconhece padrões moleculares associado à patógenos (PAMPs) expressos pelo *M. tuberculosis*, como lipoproteína de 19kDa, lipoarabinomanan e antígenos solúveis. Ao reconhecer estas moléculas o TLR2 induz a produção de citocinas inflamatórias como TNF e IFN- $\gamma$ , as quais têm função importante no controle da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Mutações que afetam a expressão dos TLR2 podem prejudicar a resposta do hospedeiro contra o *M. tuberculosis* o que o tornaria susceptível ao desenvolvimento da tuberculose (CHEN e cols, 2010).

O primeiro estudo descrevendo a ocorrência do polimorfismo do *TLR-2G753A* (Arg753Gln) ocorreu no ano de 2000 demonstrando que este polimorfismo leva a diminuição da resposta dos macrófagos a peptídeos bacterianos resultando na atenuação da resposta imune do hospedeiro (LORENZ e cols, 2000). Os genótipos AA e GA do *locus TLR2 G753A* (Arg753Gln) em pacientes com tuberculose na Turquia foram mais frequentes do que nos controles, constituindo fatores de risco para o desenvolvimento da TB (OGUS e cols, 2004). Um estudo realizado na China investigou a ocorrência dos polimorfismos dos genes dos receptores TLR2 (Arg677Trp e Arg753Gln) e TLR4 Asp299Gly e (Thr399Ile) em pacientes com tuberculose e controles e demonstraram que estes polimorfismos são raros nesta população e não estão associados ao desenvolvimento da tuberculose (XUE e cols, 2009).

#### 2.7.4.2 Receptor *toll like 4*

O gene que codifica o *TLR4* está localizado no cromossomo 9 e este receptor também está associado ao reconhecimento de PAMPs e ativação do sistema imune inato. O TLR4 está envolvido no reconhecimento de Lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram negativas. Duas mutações *missenses* foram identificadas no domínio extracelular do *TLR4* humano (Asp229Gly e Thr399Ile), as quais estão associados a hiporesponsividade a LPS em macrófagos, células epiteliais e células mononucleares do sangue periférico. Os TLR4 inicialmente identificados como mediadores da resposta inflamatória via LPS, também interagem com o fator termolábil solúvel de micobactérias e com o *M. tuberculosis* para iniciar a resposta inata (NEWPORT e cols, 2004).

Em pacientes com tuberculose, não foi encontrada associação da doença com o polimorfismo do *TLR4* Asp299Gly (NEWPORT e cols, 2004; ROSAS-TARACO e cols, 2007). Porém, em pacientes com TB co-infectados com o HIV foi observada associação da co-infecção com este locus, comparando-se com indivíduos HIV+ sem tuberculose. Os dados sugerem que pacientes infectados com HIV portadores do alelo Asp299Gly são mais susceptíveis ao desenvolvimento da TB (FERWEDA e cols, 2007).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre o polimorfismo dos genes das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-1 $\beta$  e dos receptores tipo Toll 2 e 4 em voluntários sadios revacinados com BCG ao perfil de resposta *in vitro* a antígenos micobacterianos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a possível associação entre a produção de IFN- $\gamma$  em resposta a antígenos micobacterianos nos tempos zero e dois meses após a revacinação com BCG e os genótipos observados para os polimorfismos situados nos *loci* *IFNG* +874T>A, *IL10*-592C>A, *TLR2* G753A (Arg753Gln) e *TLR4* C399T (Thr399Ile);
- Avaliar a possível associação entre a produção de citocinas moduladoras da inflamação (TNF, IL-10, IL-1 $\beta$  e IL-6) e os genótipos observados para os polimorfismos estudados;
- Comparar os resultados obtidos com dados da literatura que associam estes polimorfismos à susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento da tuberculose



## 4. RESULTADOS

5.1 MANUSCRITO: Ausência de associação entre os polimorfismos dos genes das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-1 $\beta$  e dos receptores tipo Toll 2 e 4 e a produção de citocinas em voluntários saudáveis revacinados com BCG

O presente estudo avaliou a possível associação entre polimorfismos de genes de citocinas e receptores que participam da resposta imune contra o *Mycobacterium tuberculosis* e a produção de citocinas *in vitro* por células do sangue periférico de adultos jovens revacinados com a vacina BCG. As avaliações incluíram os polimorfismos relevantes que vêm sendo associados à susceptibilidade ao desenvolvimento da doença. Este é o primeiro estudo que busca avaliar fatores genéticos subjacentes a diferenças na resposta imune entre indivíduos revacinados com BCG, sendo esta abordagem importante tendo em vista que a BCG é considerada como potencial veículo recombinante ou componente de vacina heteróloga em vacinas novas atualmente em teste para a tuberculose. O manuscrito foi formatado para ser apresentado para publicação pelo periódico **Human Immunology**, tendo em vista que esta é uma revista voltada para pesquisas em Imunologia, incluindo imunogenética, imunidade inata e adaptativa e doenças infecciosas, com importantes publicações na área da imunogenética da tuberculose (ZHENG e cols, 2010).

**Ausência de associação entre os polimorfismos dos genes das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-1 $\beta$  e dos receptores tipo Toll 2 e 4 e a produção de citocinas em voluntários sadios revacinados com BCG**

**Elisabete L. Conceição<sup>a,b</sup>, Evelin S. Oliveira<sup>a,b</sup>, Jaqueline S. Rodrigues<sup>a,b</sup>, Thais S. Peleteiro<sup>b</sup>, Mauricio Reis Pedrosa<sup>b</sup>; Martha M. Oliveira<sup>c</sup>, Manoel Barral-Netto<sup>b</sup>, Theolis Barbosa<sup>ab</sup>**

*Programa de Pós-graduação em Imunologia/UFBA, Bahia, Brasil<sup>a</sup>*

*Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz, Bahia, Brasil<sup>b</sup>*

*Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil<sup>c</sup>*

Elisabete Lopes Conceição: [betejc@hotmail.com](mailto:betejc@hotmail.com); Evelin Santos Oliveira: [evelinoliveira@yahoo.com.br](mailto:evelinoliveira@yahoo.com.br); Jaqueline S. Rodrigues: [jsrbiologa@gmail.com](mailto:jsrbiologa@gmail.com); Thais Silva Peleteiro: [tsp.ba@hotmail.com](mailto:tsp.ba@hotmail.com); Mauricio Reis Pedrosa: [maupedrosa@yahoo.com.br](mailto:maupedrosa@yahoo.com.br); Martha Maria Oliveira: [martholiveira@yahoo.com.br](mailto:martholiveira@yahoo.com.br); Manoel Barral-Netto: [mbarral@bahia.fiocruz.br](mailto:mbarral@bahia.fiocruz.br)

\*Correspondência : Dra. Theolis Barbosa

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, 40296-710 Salvador, Bahia, Brasil. Tel. +55 71 3176-2215; fax +55 71 3176-2279, e-mail [theolis@bahia.fiocruz.br](mailto:theolis@bahia.fiocruz.br).

## **Resumo**

O fato de que a minoria dos indivíduos com tuberculose latente desenvolve a doença ativa em toda a vida reforça a visão de que a resposta imune em geral é capaz de conter o crescimento da micobactéria nos indivíduos infectados. Polimorfismos de citocinas e outras moléculas envolvidas na resposta anti-micobacteriana vêm por isso sendo investigados como fatores que podem causar predisposição à TB. Da mesma forma, está bem documentada a grande variabilidade na resposta protetora conferida pela vacina atualmente disponível, a BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). Alguns polimorfismos vêm sendo associados à capacidade de responder ou não a esta vacina. O estudo investigou polimorfismos em genes de citocinas e receptores em voluntários sadios revacinados com BCG. Esses voluntários mostraram aumento significativo na produção de interferon-gama em culturas de sangue total estimuladas com antígeno total de *Mycobacterium tuberculosis*, em comparação com voluntários sem aumento expressivo da produção desta citocina, dois meses após a revacinação. Vinte e cinco voluntários com teste tuberculínico negativo que foram revacinados com BCG foram genotipados para avaliação de polimorfismos associados aos loci *IFNG* +874T>A, *TNF*-238 G>A, *IL10*-592C>A, *IL1B*-35C>T, *TLR2* G753A (Arg753Gln) e *TLR4* C399T (Thr399Ile). Os polimorfismos encontrados foram investigados quanto a possíveis associações com a produção de IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 em culturas de sangue total antes e após a revacinação. Não houve associação entre as frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos investigados com a produção de citocinas *in vitro* nos indivíduos revacinados. Neste estudo a revacinação de adultos jovens com a vacina BCG foi capaz de modular a resposta *in vitro* a antígenos micobacterianos e esta resposta foi independente das características genóticas do indivíduo.

**Palavras-chave: BCG, polimorfismo genético, citocinas, receptores Toll**

## 1. Introdução

A tuberculose permanece um grave problema de saúde pública, apesar da ampla cobertura vacinal da vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), única atualmente disponível para a prevenção da tuberculose. Mundialmente, mais de 90% das crianças são imunizadas com essa vacina, sendo administradas mais de 120 milhões de doses anualmente [1]. Em diversos países, inclusive no Brasil, a BCG faz parte do programa nacional de imunização, seguindo as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) [2]. Entretanto a eficácia da BCG é heterogênea e diversos fatores já foram sugeridos para explicar essas variações, incluindo o uso de diferentes cepas da BCG, a exposição a micobactérias ambientais e as diferenças genéticas do hospedeiro ou do patógeno [3].

A vacinação pela BCG estimula a produção de IFN- $\gamma$  por células T antígeno-específicas e esta citocina desempenha um papel importante na resposta imune protetora contra a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* [4]. Embora por si só não seja um fator de proteção, o aumento na produção de IFN- $\gamma$  tem sido associado a uma resposta eficaz contra as micobactérias em diversos modelos animais [5] e em estudos de novas vacinas contra a tuberculose [6]. A revacinação com BCG é capaz de induzir aumento importante da produção de IFN- $\gamma$ , tanto em crianças [7] como em adultos jovens (Oliveira e cols, 2008, dados não publicados). A variabilidade encontrada nessa resposta já foi associada à exposição a micobactérias ambientais, em um estudo desenvolvido com adolescentes do Malawi e do Reino Unido [8], mas a possível participação de polimorfismos genéticos até o presente não foi investigada. A melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à variabilidade na proteção conferida pela BCG assume grande importância em virtude de muitas das novas vacinas atualmente em teste contra a tuberculose serem planejadas como booster heterólogo da BCG neonatal, ou conterem a BCG como veículo de expressão de genes que podem aumentar a resposta imune contra o *M. tuberculosis* [9].

O presente estudo avaliou a possível associação entre polimorfismos de genes de citocinas e receptores que participam da resposta imune contra o bacilo e a produção de citocinas *in vitro* por células do sangue periférico de adultos jovens revacinados com a vacina BCG, assumindo como correlato de proteção a capacidade de aumento de produção de IFN- $\gamma$  após a revacinação. As avaliações incluíram os polimorfismos que vêm sendo associados à susceptibilidade ao desenvolvimento da doença: *IFNG* +874T>A, *TNF*-238 G>A, *IL10*-592C>A, *IL1B*-35C>T, *TLR2* G753A (Arg753Gln) e *TLR4* C399T (Thr399Ile).

## 2. Métodos

### 2.1 Desenho do estudo e participantes

Estudo observacional realizado no contexto de um ensaio clínico randomizado controlado em Salvador, Bahia, Brasil. Neste ensaio clínico, 46 voluntários negativos ao teste tuberculínico cutâneo (TST) em dupla testagem (utilizando 100 µl de PPD RT23, Statens Serum Institute, Denmark, gentilmente cedido por DIVEP/SUS-BA), foram revacinados com a vacina *Mycobacterium bovis* BCG utilizada pelo Ministério da Saúde, cepa Moreau-Rio de Janeiro (gentilmente cedida pela Fundação Ataulpho de Paiva). 31 destes indivíduos revacinados compareceram para reavaliação após dois meses. Foi observado aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  no sobrenadante das culturas de sangue total estimuladas com antígenos do *M. tuberculosis* no período de dois meses após a revacinação ( $P= 0,0057$ ) (reproduzido de Oliveira e cols, 2008, dados não publicados; Figura1A). Foram identificados dois padrões de resposta: um grupo de indivíduos que em geral já tinham níveis aumentados de IFN- $\gamma$  no tempo zero, para os quais a razão de produção de IFN- $\gamma$  entre o tempo de dois meses após a revacinação com BCG e o tempo zero foi abaixo da mediana (loIFN- $\gamma$ ), e um grupo de indivíduos com baixa produção inicial de IFN- $\gamma$ , que tiveram a razão de produção de IFN- $\gamma$  entre o tempo de dois meses após a revacinação com BCG e o tempo zero acima da mediana (hiIFN- $\gamma$ ) (reproduzido de Oliveira e cols, 2008., dados não publicados; Figura 1B).

No presente estudo, 25 voluntários (10 homens e 15 mulheres) que foram revacinados como acima descrito e que retornaram dois meses após a intervenção, foram genotipados. Todos os voluntários concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento especificando a realização de análises genéticas. A realização destes ensaios em apenas parte dos indivíduos elegíveis deveu-se a dificuldades técnicas na etapa de extração de DNA em parte das amostras avaliadas. Todos os voluntários eram soronegativos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV1 e 2, Determine™ HIV 1/2 Abbott Laboratories, Illinois, US).

### 2.2 Coleta de sangue

O sangue foi coletados em tubos com heparina e 20 mL foram obtidos imediatamente antes da revacinação e dois meses após a revacinação, para realização de culturas de sangue

total, sorologia para HIV 1 e 2, extração de ácidos nucleicos (DNA), hematócrito e hemograma.

#### 2.4. Culturas de sangue total e dosagem de citocinas

Culturas de sangue total foram realizadas em placas de 96 poços (Corning, Corning, NY), utilizando uma triplicata por condição. Apenas 200µL foram diluídos 1:10 em meio RPMI (GibcoBRL, Rockville,) suplementado com 2mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, MO) e 40mg/mL de gentamicina (Schering-Plough, São Paulo, SP, Brasil ). As culturas foram mantidas por 72h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 98% umidade, com ou sem estímulo utilizando 10 µg/mL de antígenos do lisado total do *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MTBag, gentilmente fornecido pelo Laboratório de Pesquisa em Micobactéria como parte do NIH, NIAID contrato número HHSN266200400091C, intitulado "Tuberculosis Vaccine Testing and Research Materials", doado pela Universidade do Colorado USA). O sobrenadante das culturas foram mantidas a -20°C até as análises. A produção das citocinas IFN-γ, TNF, IL-10, IL-6 e IL-1β no sobrenadante das culturas foram avaliadas utilizando Human Th1/Th2 Cytometric Bead Array kit (Becton-Dickinson, Oxnard, CA, USA).

#### 2.6. Extração de DNA e genotipagem

A camada de polimorfonucleares formada pela centrifugação do sangue periférico com Ficoll-Histopaque foi removida e as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para lise das hemácias e obtenção do sedimento (pellet) por centrifugação. O DNA genômico foi extraído dos polimorfonucleares usando o método fenol-clorofórmio [18]. Os polimorfismos dos genes *IFNG* +874T>A, *TNF*-238 G>A e *IL1B*-35C>T foram investigados pelo método de Amplificação pelo Sistema de Mutação Refratária (PCR-ARMS) alelo-específica [19-20]. Os polimorfismos *IL10*-592C>A, *TLR2* G753A (Arg753Gln) e *TLR4* C399T (Thr399Ile) foram determinados com base no tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP) [21]. A amplificação foi realizada em volume final de 12 µL (*IFNG* +874T>A, *TNF*-238 G>A e *IL1B*-35C>T) e 25 µL (*IL10*-592C>A, *TLR2* G753A (Arg753Gln) e *TLR4* C399T (Thr399Ile)) de reação contendo 60ng de DNA genômico, 1µM de cada oligonucleotídeo, Tampão 10X, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, dNTP 25 mM e 5U/µL da Taq polimerase.

#### 2.7. Análises estatísticas

Os níveis de citocinas foram apresentados como mediana (mínimo e máximo) e a comparação entre os grupos foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney. Todos os testes estatísticos foram bicaudais e considerados significativos com valor de  $P < 0.05$ . Os dados foram analisados utilizando o software estatístico R (The R Foundation for Statistical Computing, Austria) e Prism (GraphPad Inc., San Diego, CA).

### 3. Resultados

#### 3.1. A produção de IFN- $\gamma$ *in vitro* em resposta a antígenos micobacterianos antes ou após a revacinação é independente dos polimorfismos estudados.

A Tabela 1 mostra a distribuição dos indivíduos estudados em relação aos genótipos encontrados para os polimorfismos *IFNG* +874T>A, *TNF*-238 G>A, *IL10*-592C>A, *IL1B*-35C>T, *TLR2* G753A (Arg753Gln) e *TLR4* C399T (Thr399Ile). Houve predominância de indivíduos heterozigotos para todos os genótipos estudados, à exceção do locus *TLR4* C399T (Thr399Ile). Apenas dois indivíduos foram homozigotos para o alelo T no locus *IFNG* +874T>A. Ao estratificar os indivíduos por genótipo, manteve-se a tendência de aumento da produção de IFN- $\gamma$  *in vitro* dois meses após a revacinação com BCG observada para o grupo revacinado, de forma independente do genótipo para qualquer um dos polimorfismos estudados. Diferenças significativas entre a produção de IFN- $\gamma$  antes e após a revacinação só puderam ser verificadas nos grupos de indivíduos heterozigotos (Figura 2). Não houve diferença significativa na produção de IFN- $\gamma$  no tempo zero ou após a revacinação entre os diferentes genótipos dos polimorfismos estudados (Figura 2).

#### 3.2. A produção *in vitro* das citocinas IL-10, TNF, IL-1 $\beta$ e IL-6 também é independente dos polimorfismos estudados.

Ao se estratificar os indivíduos revacinados quanto aos genótipos encontrados para os polimorfismos *IFNG* +874T>A, *TNF*-238 G>A, *IL10*-592C>A, *IL1B*-35C>T, *TLR2* G753A (Arg753Gln) e *TLR4* C399T (Thr399Ile). não foi observada diferenças na capacidade de produção de IL-10, TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 *in vitro* por estímulo com antígeno micobacteriano antes (Tabela 1) ou após a revacinação com BCG.

#### 3.2. Frequência genotípica dos polimorfismos estudados em indivíduos com alta e baixa produção de interferon-gama entre o tempo de dois meses e o tempo zero (*hiIFN- $\gamma$* e *loIFN- $\gamma$* )

A distribuição de frequências dos genótipos de acordo com os níveis de produção de IFN- $\gamma$  é mostrada na Tabela 2. Como observado para a amostra total, a maioria dos indivíduos hiIFN- $\gamma$  e loIFN- $\gamma$  foram heterozigotos para os genótipos estudados.

#### 4. Discussão

No presente estudo, foi observado que o aumento da produção de IFN- $\gamma$  por estímulo com antígenos micobacterianos após a revacinação de indivíduos saudáveis com BCG não sofreu influência de polimorfismos previamente associados com resistência e/ou susceptibilidade ao desenvolvimento da tuberculose. Adicionalmente, os polimorfismos investigados não puderam ser associados à capacidade diferenciada de produção das citocinas IL-10, TNF, IL-1 $\beta$  ou IL-6 em resposta aos mesmos antígenos.

Estudos realizados em diferentes populações, inclusive no Brasil, têm demonstrado que o polimorfismo do *IFNG* +874T>A influencia a produção de IFN- $\gamma$  em resposta a antígenos micobacterianos *in vitro* por indivíduos com doença ativa, estando associado a maior produção *in vitro* desta citocina por estimulação de células do sangue periférico [11-12; 19; 22-24]. Também em crianças saudáveis o genótipo TT e a presença de cicatriz vacinal foram associados a maior capacidade de produção de IFN- $\gamma$ , em comparação com crianças portadoras do genótipo TA ou AA. Observou-se que as crianças sem cicatriz vacinal tinham maior frequência do genótipo AA, o que pode indicar que estes indivíduos respondem de forma diferenciada ao *M. tuberculosis* [3].

Pacientes coreanos com tuberculose também não diferiram de controles na frequência e distribuição alélica de polimorfismos do *IFNG* +874T>A e *IFNGRI* (-611, -270, -56 e +95). Os autores do estudo sugerem que os polimorfismos genéticos do *IFNG* +874T>A ou do receptor *IFNGRI* não são responsáveis pela susceptibilidade do hospedeiro à tuberculose na população coreana [25]. Outros estudos que demonstram não associação entre a ocorrência de polimorfismos do gene na posição +874T>A e produção de IFN- $\gamma$  ou ocorrência de tuberculose sugerem que diferenças étnicas nas frequências genotípicas entre as populações possam dificultar a demonstração de efeito do polimorfismo citado sobre estes parâmetros [26-28]. Entre os indivíduos estudados verificou-se uma baixa frequência de homozigotos para o alelo T, em consonância com esta hipótese, o que constitui uma limitação do nosso estudo. Este estudo também não descarta a possibilidade de que polimorfismos dos genes avaliados em posições não estudadas neste trabalho tenham um papel na capacidade de resposta de produção de IFN- $\gamma$  por indivíduos revacinados. Polimorfismos adicionais que



podem ser investigados incluem *IFNG* +875T>A, -179C>T e +4766 C>T, e *IL10* -1082G>A. Em relação a este último polimorfismo, o alelo G (*IL10* -1082G>A) tem sido associado com susceptibilidade para o desenvolvimento da tuberculose [14; 29-30].

Por outro lado, além de fatores genéticos, outras condições podem influenciar a resposta de produção de IFN- $\gamma$  após a revacinação. Diferentes graus de exposição a micobactérias ambientais podem influenciar na resposta a antígenos micobacterianos na faixa etária investigada [8; 31]. Também o estado nutricional do indivíduo pode estar associado à menor capacidade de resposta em termos de produção de IFN- $\gamma$  face à revacinação (Sampaio et al, 2008, dados não publicados).

Neste estudo, portanto, o aumento da produção de IFN- $\gamma$  induzido pela revacinação com BCG ocorreu de forma independente de polimorfismos em genes que codificam importantes citocinas e receptores envolvidos na resposta imune do indivíduo contra as micobactérias. Nossos resultados apontam para a necessidade de se investigar melhor os mecanismos envolvidos na variabilidade da resposta dos indivíduos à vacinação BCG.

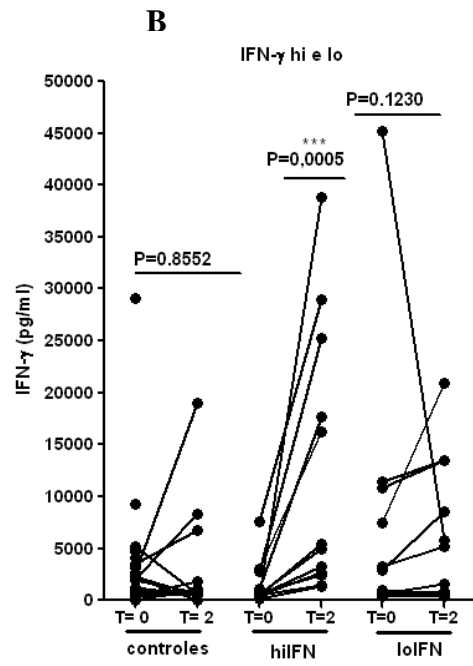
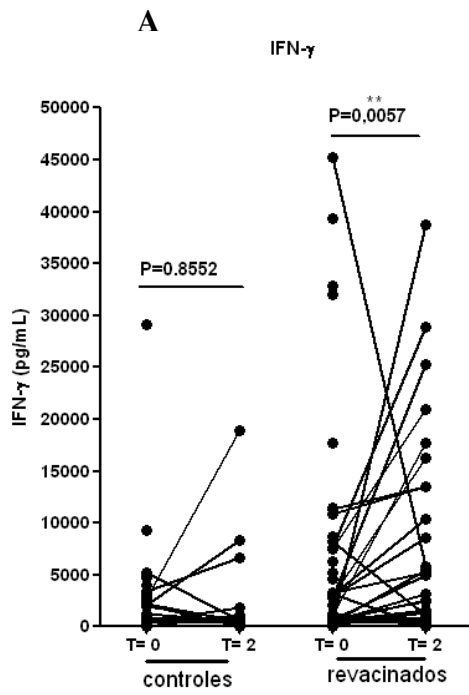
## **5. Agradecimentos**

A Leonardo Arruda e Daniel Ruiz pelas sugestões; a Silvana da Paz, Elaine Arruda, Jorge Tolentino, Beatriz Muller, Priscila Miranda, Gislaine Aparecida Lacerda e Paula Fernanda Gonçalves pelo apoio técnico. Às Instituições financiadoras Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

## 6. Legendas das Figuras

Figura 1: Produção de citocinas em culturas de sangue total estimuladas com antígeno total de *M. tuberculosis* nos tempos zero e dois meses após a revacinação com BCG. **(A)** Comparação da produção de IFN- $\gamma$  entre indivíduos controle e revacinados. **(B)** Estratificação dos indivíduos revacinados, tendo como ponto de corte a mediana de produção de IFN- $\gamma$  antes da revacinação- hiIFN- $\gamma$ , indivíduos com razão de produção de IFN-  $\gamma$  entre o tempo de dois meses e o tempo zero acima da mediana, e loIFN- $\gamma$ , indivíduos com razão de produção de IFN-  $\gamma$  abaixo desta mediana).

Figura 2: Associação da produção de IFN- $\gamma$  em culturas de sangue total estimuladas com antígeno total de *M. tuberculosis* nos tempos zero e dois meses após a revacinação com BCG com os genótipos encontrados para os *loci*: **(A)** *IFNG* +874 (não são mostrados os dados obtidos para dois indivíduos encontrados com o genótipo TT **(B)** *IL10* -592 (não são mostrados os dados obtidos para três indivíduos encontrados com o genótipo AA); **(C)** *TLR2* G753A (Arg753Gln; não foram encontrados indivíduos com genótipo AA); **(D)** *TLR4* C399T (Thr399Ile; não são mostrados os dados obtidos para um indivíduo encontrados com o genótipo CT).



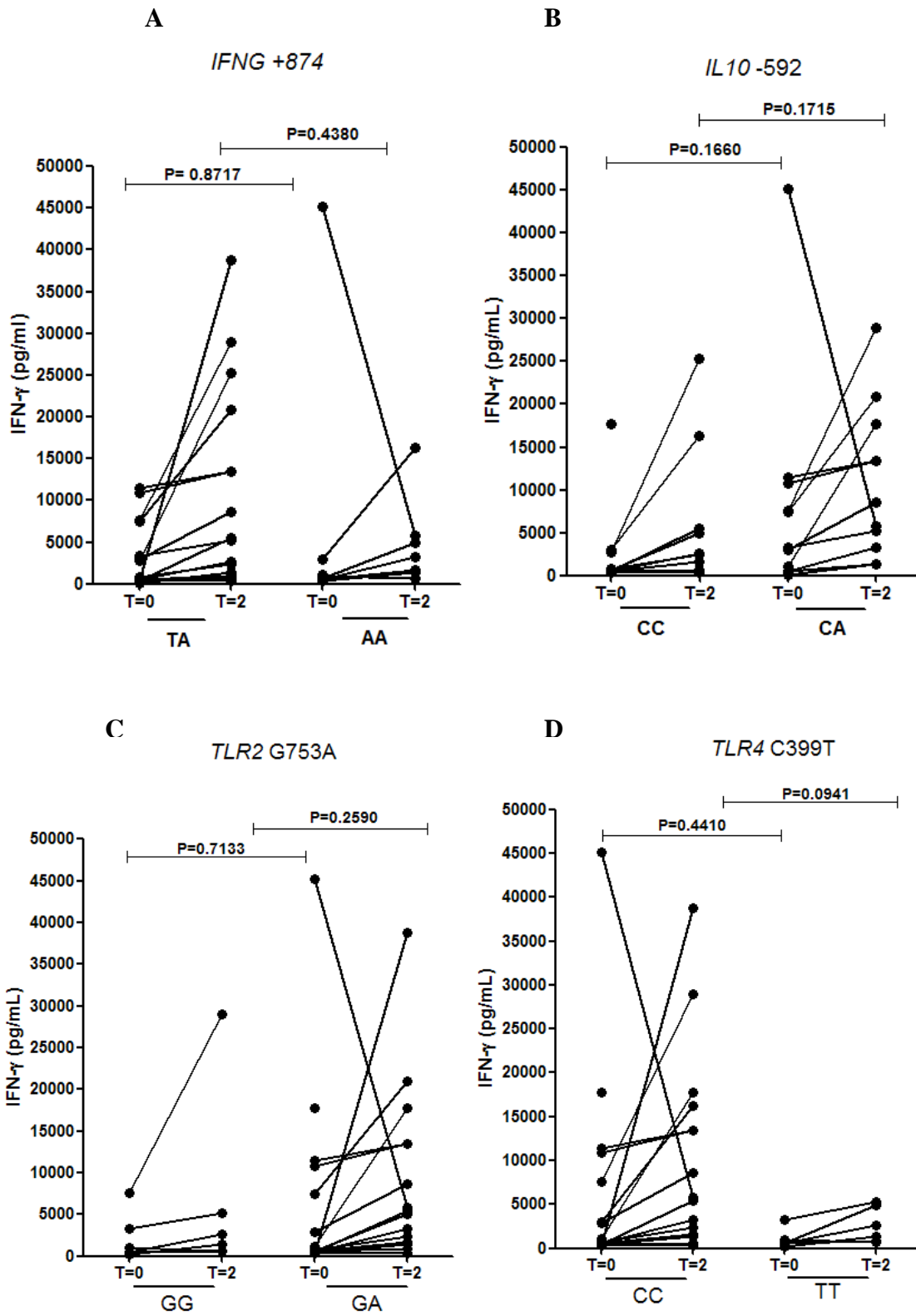


Tabela1: Produção de citocinas *in vitro* por estímulo com antígeno total de *M. tuberculosis* de voluntários revacinados estratificados por genótipo

<i>Genótipo</i>	<i>IFN-γ (pg/ml)</i>	<i>IL-10 (pg/ml)</i>	<i>TNF (pg/ml)</i>	<i>IL-1β (pg/ml)</i>	<i>IL-6 (pg/ml)</i>
<b><i>IFNG +874T&gt;A</i></b>					
TT* (2)	9423 [1128 - 17717]	17	44 [42-47]	0	6081 [1660-10503]
TA (15)	3347 [161 – 11409]	13 [0-74]	52 [9-214]	260 [81-778]	6424 [38-19786]
AA (8)	6549 [446 – 45179]	4 [0-23]	67 [0-161]	175 [102-248]	5613 [1615-11702]
<b><i>IL10 -592C&gt;A</i></b>					
CC (10)	2742 [400-17717]	15 [0 – 74]	64 [9-214]	241 [81-778]	6259 [514-19786]
CA (12)	7674 [161-45179]	9 [0 – 40]	51 [0-172]	237 [85-403]	6020 [1660-11702]
AA* (3)	645 [385-976]	12 [0 – 36]	83 [43-161]	308 [167-449]	6198 [38-11702]
<b><i>TNF -238G&gt;A</i></b>					
GG* (4)	2377 [539-7617]	20 [0-74]	77 [8.83 – 214]	446 [110-778]	8347 [1150-19786]
GA (18)	5531 [161-45179]	8 [0-36]	54 [39.2 – 161]	193 [81-403]	5260 [38-11702]
AA* (3)	4129 [446-11409]	21 [0-40]	46 [0 – 89]	260	8451 [4142-11702]
<b><i>IL1B -35C&gt;T</i></b>					
CC (0)	0	0	0	0	0
CT (24)	5036 [161-45179]	11 [0-74]	57 [0-214]	234 [81-778]	6107 [38-19786]
TT* (1)	574	0	43.12	449	6856
<b><i>TLR2 G753A</i></b>					
GG (7)	2021 [160-7617]	7 [0-36]	57 [21-160]	273 [102-449]	5724 [1615-11702]
GA (16)	6345 [385-45179]	13 [0-74]	56 [0 -214]	177 [81-264]	6737 [514-19786]
AA (0)	0	0	0	0	0
<b><i>TLR4 C399T</i></b>					
CC (17)	6174 [385-45179]	13 [0-74]	59 [0-214]	304 [81-778]	6809 [514-19786]
CT* (1)	7504	4	45	264	10652
TT (6)	1034 [161-3297]	9 [0-36]	54 [9-161]	172 [85-403]	4497 [1150-11702]

\*Dados insuficientes.  
Mediana [máximo-mínimo]

Tabela 2: Frequência genotípica nos indivíduos hiIFN- $\gamma$  e loIFN- $\gamma$

<i>Genótipo</i>	<i>hiIFN-<math>\gamma</math> (pg/mL)</i> <i>N (%)</i>	<i>loIFN-<math>\gamma</math> (pg/mL)</i> <i>N (%)</i>
<b><i>IFNG +874T&gt;A</i></b>		
TT	1 (8)	0
TA	8 (67)	8 (72)
AA	3 (25)	3 (27)
<b><i>IL10 -592C&gt;A</i></b>		
CC	6 (50)	3 (27)
CA	5 (42)	6 (54)
AA	1 (8.3)	2 (18)
<b><i>TNF -238G&gt;A</i></b>		
GG	3 (25)	1 (9)
GA	7 (58)	9 (89)
AA	2 (17)	1 (9)
<b><i>IL1B -35C&gt;T</i></b>		
CC	0	0
CT	12 (100)	9 (82)
TT	0	2 (18)
<b><i>TLR2 G753A</i></b>		
GG	2 (18)	3 (33)
GA	9 (82)	6 (67)
AA	0	0
<b><i>TLR4 C399T</i></b>		
CC	8 (73)	7 (64)
CT	0	1 (9)
TT	3 (27)	3 (27)

N= Frequência absoluta

## 7. Referências

- [1] Ritz N, Hanekom WA, Browne RR, Britton WJ, Curtis N. Influence of BCG vaccine strain on the immuneresponse and protection against tuberculosis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 821–841.
- [2] Benévolo-de-Andrade TC, Maia RM, Cosgrove C, Castello-Branco LRR. BCG Moreau Rio de Janeiro -cAn oral vaccine against tuberculosis – Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(5): 459-465.
- [3] Anuradha B, Rakh SS, Ishaq M, Murthy KJR, Valluri VL. Interferon- $\gamma$  Low Producer Genotype +874 Overrepresented in Bacillus Calmette-Guerin Nonresponding Children. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2007; 27: 325–329.
- [4] Smith SG, Lalor MK, Gorak-Stolinska P, Blitz R, Beveridge NER, Worth A, McShane H, Dockrell H. *Mycobacterium tuberculosis* PPD-induced immune biomarkers measurable *in vitro* following BCG vaccination of UK adolescents by multiplex bead array and intracellular cytokine staining. *BMC Immunology* 2010; 11:35.
- [5] Castillo-Rodal AI, Arreola MC, Pando RH, Calva JJ, Díaz ES, Vidal YL. *Mycobacterium bovis* BCG Substrains Confer Different Levels of Protection against *Mycobacterium tuberculosis* Infection in a BALB/c Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis. *Infection and immunity* 2006; 76: 1718–1724.
- [6] Martin C. Tuberculosis vaccines: past, present and future. *Curr Opin Pulm Med* 2006; 12:186–191.
- [7] Barbosa T, Arruda S, Fernandes BD, Carvalho LP, Cardoso S, Cunha S, Barreto ML, Pereira SM, Rodrigues LC, Barral-Netto M. BCG (Bacille of Calmette–Guérin) revaccination leads to improved *in vitro* IFN- $\gamma$  response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children. *Vaccine* 2003; 21: 2152–2160.
- [8] Black GF, Wei RE, Floyd S, Bliss L, Warndorff DK, Crampin AC, Ngwira B, Sichali L, Nazareth B, Blackwell JM, Branson K, Chaguluka SD, Donovan L, Jarman E, King E, Fine PEM, Dockrell HD. BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies *Lancet* 2002; 359: 1393–401.
- [9] Dheda K, Schwander SK, Zhu B, Van Zyl-Smit RZ, Zhang Y. The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. *Respirology* 2010; 15: 433–450.

- [10] Mosaad YM, Soliman OE, Tawhid ZE, Sherif DM. Interferon-gamma +874 T/A and Interleukin-10 -1082 A/G Single nucleotide Polymorphism in Egyptian Children with Tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology* 2010; 72: 358–364.
- [11] Amim LH, Pacheco AG, Costa JF, Loredó CCS, Rabahi MF, Melo MH, Ribeiro FC, Fernanda Mello FCQ, 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* 2008; 35:563–566.
- [12] Vallinoto ACR, Graça ES, Araújo MS, Azevedo VN, Vallinoto IC, Machado LF, Ishak MO, Ishak R. IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection and clinical manifestation of tuberculosis. *Human Immunology* 2010; 71: 692–696.
- [13] Oliveira MM, Silva JCS, Costa JF, Amim LH, Loredó CCS, Melo H, Queiroz LF, Mello FCQ, Lapa e Silva JR, Kritski AL, Santos AR. Distribuição de Polimorfismos de Base única (SNPs) no gene de TNF- $\alpha$  (-238/-308) entre pacientes com TB e outras pneumopatias: Marcadores genéticos de susceptibilidade a ocorrência de TB? *J Brás Pneumol* 2004; 30: 461-7.
- [14] Ates Ö, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarıkaya A. Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene Polymorphisms in Tuberculosis. *J Clin Immunol* 2008; 28:232–236.
- [15] Motsinger-Reif AA, Antas PRZ, Oki NO, Levy S, Holland SM, Sterling TR. Polymorphisms in IL-1b, vitamin D receptor Fok1, and Toll-like receptor 2 are associated with extrapulmonary tuberculosis. *BMC Medical Genetics* 2010; 11:37.
- [16] Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, Coskun M, Cilli A, Yegin O. The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* 2004; 23: 219–223.
- [17] Ferwerda B, Kibiki GS, Netea MG, Dolmans WMV, van der Ven AJ. The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant and tuberculosis susceptibility in HIV-infected patients in Tanzania. *AIDS* 2007; 21: 1375-77.
- [18] Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 2006; 1: 581-85.
- [19] Ansari A, Talat N, Jamil B, Hasan Z, Razzaki T, Dawood G, Hussain R. Cytokine Gene Polymorphisms across Tuberculosis Clinical Spectrum in Pakistani Patients. *Plos One* 2009; 4: 4778.



- [20] Scola L, Crivello A, Marino V, Gioia V, Serauto A, Candore G, Colonna-Romano G, Caruso C, Lio D. IL-10 and TNF- $\alpha$  polymorphisms in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis: implication for ageing and life span expectancy. *Mechanisms of Ageing and Development* 2003; 124: 569-572.
- [21] Ma MJ, Xie L, Wu S, Tang F, Li H, Zhang Z, Yang H, Chen S, Liu N, Liu S, Cao W. Toll-like receptors, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-10 gene polymorphisms in risk of pulmonary tuberculosis and disease severity. *Human Immunology* 2010; 71: 1005–1010.
- [22] Rossouw M, Nel HJ, Cooke GS, van Helden PD, Hoal EG. Association between tuberculosis and a polymorphic NF- $\kappa$ B binding site in the interferon- $\gamma$  gene. *Lancet* 2003; 361: 1871–72.
- [23] Tso WH, Ip WK, Chong WP, Tam CM, Chiang AKS, Lau YW. Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. *Genes and Immunity* 2005; 6: 358–363.
- [24] 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: 477–484.
- [25] Hwang JH, Kim EJ, Kim SY, Lee SH, Suh GY, Kwon OJ, Yongick JI, Kang M, Kim D, Koh WJ. Polymorphisms of interferon- $\gamma$  and interferon- $\gamma$  receptor 1 genes and pulmonary tuberculosis in Koreans. *Respirology* 2007; 12: 906–910.
- [26] Vidyarani M, Selvaraj P, Anand SP, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, Narayanan PR. Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 2006; 124: 403-410.
- [27] Moran A, Ma X, Reich RA, Graviss EA. No association between the +874T/A single nucleotide polymorphism in the IFN- $\gamma$  gene and susceptibility to TB. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 111:113–115.
- [28] Selvaraj P, Alagarasu K, Harishankar M, Vidyarani M, Nisha Rajeswari D, Narayanan PR. Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Cytokine* 2008; 43: 26–33.
- [29] Henao MI, Montes C, París SC, García LF. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis* 2006; 86: 11–19.
- [30] Oral HB, Budak F, Uzaslan EK, Basturk B, Bekar A, Akalın H, Ege E, Ener B, Goral G. Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. *Cytokine* 2006; 35: 143–147.

[31] Bierrenbach AL, Cunha SS, Barreto M L, Pereira S M, Dourado I, Ichihara MY, Brito SC, Rodrigues LC. Tuberculin reactivity in a population of schoolchildren with high BCG vaccination coverage. *Pan American Journal of Public Health* 2003; 13: 285-293.

## 5. DISCUSSÃO

Os estudos de associação da resposta imune induzida pela BCG com possíveis polimorfismos atribuídos a proteção ou resistência a infecção pelo *M. tuberculosis* são limitados (ANURADHA *et al*, 2007), apesar de haver alguns relatos acerca da ocorrência de polimorfismos relevantes em estudos da resposta à vacina BCG aplicada a outras doenças, incluindo atopia e câncer de bexiga (ALM *et al*, 2002; BASTUK *et al*, 2006).

Os estudos que buscam avaliar a associação entre polimorfismos e proteção ou susceptibilidade à tuberculose comparam a frequência dos genótipos em pacientes com tuberculose ativa com a frequência em indivíduos saudáveis testados ou não para a tuberculose latente. Em algumas populações não é possível associar o polimorfismo do *IFNG* +874T>A ou o polimorfismo do seu receptor (*IFNGRI* -56 ou +95) com proteção ou susceptibilidade à doença tuberculosa. Nestes estudos, os autores sugerem que a ausência de associação possa ser devido a diferenças nas populações (pacientes vs controles) nas frequências genotípicas entre as populações ou pelo fato do polimorfismo não ter efeito mensurável sobre a proteção contra a TB nestas populações (AWOMOYI *et al*, 2004; MIRSAEIDI *et al*, 2006; MORAN, 2007). Apesar disso, estudos em outras populações mesmo com pequeno número de indivíduos avaliados foram capazes de demonstrar significância na ocorrência de polimorfismos relevantes associados a susceptibilidade à tuberculose (ALI *et al*, 2004; MOTSINGER-REIF *et al*, 2010). Na população do presente estudo a maioria dos indivíduos foram heterozigotos para os *loci* estudados, o que torna difícil avaliar uma possível contribuição dos diferentes genótipos na resposta à revacinação.

No nosso estudo também não observamos associação dos polimorfismos *IFNG* +874T>A, *TNF*-238 G>A, *IL10*-592C>A, *IL1B*-35C>T, *TLR2* G753A (Arg753Gln) e *TLR4* C399T (Thr399Ile) com a produção de IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 *in vitro* antes ou após a revacinação (Tabela 1). A observação de que a produção de IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF e IL-10 aumentou com a revacinação (OLIVEIRA 2008, dados não publicados) reforça nossa hipótese de que estes polimorfismos não tiveram influência sobre a capacidade de produção de citocinas em resposta a antígenos micobacterianos nestes indivíduos revacinados.

Alguns estudos têm revelado significativa associação do alelo G (*IL10*-1082G>A) com susceptibilidade à TB. Esses estudos revelam que a frequência dos polimorfismos do *TNF* -

238G>A, -308G>A, IL-10 -819C>T e -592C>A geralmente não difere entre pacientes e controles, atribuindo ao alelo G (*IL10*-1082G>A) a susceptibilidade para o desenvolvimento da doença (HENAO *et al*, 2006; ORAL *et al*, 2006; ATES *et al*, 2008). Um estudo realizado no Brasil avaliando o polimorfismo nas posições -238 e -308 do gene do TNF em pacientes com e sem tuberculose demonstrou que o genótipo homozigoto selvagem -238 GG foi significativamente mais frequente nos pacientes sem TB, enquanto o genótipo heterozigoto GA foi mais freqüente nos pacientes com TB. A frequência do genótipo homozigoto mutante -308 AA bem como a frequência do alelo A foi significativamente maior nos pacientes com tuberculose (OLIVEIRA *et al*, 2003). No presente estudo os polimorfismos dos genes *TNF*-238 G>A, *IL10*-592C>A não estiveram associados à produção de nenhuma das citocinas estudadas, observando-se maior frequência de heterozigotos GA (*TNF*-238). Um estudo avaliando possíveis polimorfismos associados à tuberculose com 24 pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar demonstrou que o polimorfismo do gene *IL1B*+3953C>T está associado à tuberculose extrapulmonar comparado aos indivíduos PPD positivos (MOTSINGER-REIF *et al*, 2010). O presente estudo investigou o polimorfismo do gene *IL1B*-35C>T e não encontrou associação com produção diminuída de IFN- $\gamma$  induzida pela vacina BCG.

Na Tunísia um estudo com 33 pacientes revelou que o polimorfismo do gene do receptor *TLR2* Arg677Trp pode estar associado à tuberculose (ALI *et al*, 2004). Um estudo realizado na Turquia revelou que o polimorfismo do receptor *TLR2* G753A(Arg753Gln) está associado à TB, demonstrando que os portadores do genótipo homozigoto AA possuem 6,04 a 1,60 vezes mais chances de desenvolverem a doença comparando-se aos portadores do genótipo homozigoto selvagem GG (ORGUS *et al*, 2004). Já na Índia observou-se que 99% dos pacientes e controles eram portadores do genótipo homozigoto selvagem GG (*TLR2* G753A) (SELVARAJ *et al*, 2010). Também em nosso estudo não houve ocorrência do genótipo homozigoto mutante AA. Quanto à ocorrência do polimorfismo para o receptor *TLR4* C399T, no estudo supracitado realizado na Índia 74% dos indivíduos controles e pacientes com TB eram portadores do genótipo homozigoto selvagem CC (*TLR4* C399T), sugerindo não associação deste polimorfismo com susceptibilidade à TB (SELVARAJ *et al*, 2010). Em nossos voluntários também se observou predominância do genótipo homozigoto selvagem CC. Desta forma, estes polimorfismos podem não influenciar na produção de citocinas face à vacina BCG em nosso meio.

Outros polimorfismos funcionais não incluídos no presente estudo têm sido associados a proteção ou susceptibilidade ao desenvolvimento da tuberculose. Entre estes, estão os polimorfismos nos *loci* *IFNG* -1616G>A e +3234C>T (COOKE *et al*, 2006) e *IL10* -1082G>A (ATES *et al*, 2008). Pretendemos estender o presente trabalho para incluir a avaliação destes polimorfismos. É possível também que a produção de citocinas *in vitro* não reflita a susceptibilidade imunológica à micobactéria tuberculosa conferida por polimorfismos genéticos nos *loci* estudados. Variações na produção inicial de citocinas a pequenas quantidades de antígeno, encontradas no início da infecção tuberculosa, decorrentes dos polimorfismos genéticos estudados, poderiam determinar o destino da resposta imunológica a longo prazo, ao determinar diferenças de recrutamento e ativação de células dendríticas, macrófagos alveolares, macrófagos derivados de monócitos e linfócitos que compõem o granuloma.

Adicionalmente, a variabilidade observada na resposta dos nossos voluntários à revacinação com BCG pode estar mais relacionada a outros fatores, que podem ter maior capacidade de modular a resposta à vacina. Neste sentido, estudos anteriores na mesma população sugerem uma exposição importante a micobactérias ambientais, que poderia influenciar na resposta a vacina (BIERRENBACH *et al*, 2003). Por outro lado, nesta mesma população foi observada associação entre o índice de massa corpórea (IMC) e a produção de IFN- $\gamma$  nos indivíduos revacinados com BCG (SAMPAIO *et al*, 2009, dados não publicados).

O estudo sugere que a resposta imune *in vitro* induzida pela revacinação com BCG em nosso meio não é influenciada por polimorfismos em genes para citocinas e receptores da resposta imunes previamente associados com a predisposição à doença tuberculosa em outras populações.

## 6. CONCLUSÃO

1. A produção das citocinas moduladoras da inflamação (TNF, IL-10, IL-1 $\beta$  e IL-6) não foi influenciada pelos polimorfismos estudados
2. O polimorfismo dos genes *IFNG* +874T>A, *IL10*-592C>A, *TLR2* G753A (Arg753Gln) e *TLR4* C399T (Thr399Ile) não estão associados a produção de IFN- $\gamma$  em resposta a antígenos micobacterianos nos tempos zero e dois meses após a revacinação com BCG.
3. O polimorfismo dos genes *IFNG* +874T>A, *TNF*-238 G>A, *IL10*-592C>A, *IL1B*-35C>T, *TLR2* G753A (Arg753Gln) e *TLR4* C399T (Thr399Ile) não estão associados ao perfil da resposta imune induzida pela vacina em voluntários sadios revacinados com BCG.
4. Na população do estudo não foram observadas associações da frequência de genes que conferem resistência ou susceptibilidade ao desenvolvimento da tuberculose como mostrados na literatura em estudos com diferentes populações.

O estudo sugere que o polimorfismo dos genes das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-1 $\beta$  e IL-6 e dos receptores tipo Toll 2 e 4 não influenciam a capacidade da resposta imune *in vitro* induzida pela vacina BCG. O estudo também sugere que a vacina BCG é capaz de modular a resposta imune mostrada através da alta produção de IFN- $\gamma$  dois meses após a revacinação em alguns indivíduos, entretanto, esta modulação não está associada a polimorfismos que conferem resistência ou susceptibilidade ao desenvolvimento como observada em outras populações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEBE, F.; BJUNE, G. The emergence of Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* and low-level protection by bacilli Calmette-Guérin (BCG) vaccines: is there a link? **Clinical and Experimental Immunology**, Oslo, v.145, p. 389-397, 2006.
- AGUIRRE-BLANCO, A.M.; LUKEY, P.T.; CLIFF, J.M.; DOCKRELL H.M. Strain-Dependent Variation in *Mycobacterium bovis* BCG-Induced Human T-Cell Activation and Gamma Interferon Production In Vitro. **Infection And Immunity**, Londres, v, p. 3197–3201, June, 2007.
- ALI, M.B.; BARBOUCHE, M.H.; BOUSNINA, S.; CHABBOU, A, *et al.* Toll-Like Receptor 2 Arg677Trp Polymorphism Is Associated with Susceptibility to Tuberculosis in Tunisian Patients. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 625–626. May 2004.
- ALM, J.S.; SANJEEVI, C.B.; MILLER, E.N.; DABADGHAO, *et al.* Atopy in children in relation to BCG vaccination and genetic polymorphisms at SLC11A1 (formerly NRAMP1) and D2S1471. **Genes and Immunity**, v. 3, p. 71–77. Nov. 2001.
- ANURADHA, B.; RAKH, S.S.; ISHAQ, M.; MURTHY, K.J.R, *et al.* Interferon- $\gamma$  Low Producer Genotype +874 Overrepresented in Bacillus Calmette-Guerin Nonresponding Children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, India, v. 27, p. 325–329, Oct. 2007.
- ANSARI, A.; TALAT, N.; JAMIL, B.; HASAN, Z, *et al.* Cytokine Gene Polymorphisms across Tuberculosis Clinical Spectrum in Pakistani Patients. **Plos One**, v. 4, p. 4778. 2009.
- ATES, Ö.; MUSELLIM, B.; ONGEN, G.; TOPAL-SAR/KAYA A. Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene Polymorphisms in Tuberculosis. **J Clin Immunol**, v. 28, p. 232–236. 2008.
- AWOMOYI, A A.; NEJENTSEV, S.; RICHARDSON, A.; HULL, J, *et al.* No association between interferon-c receptor-1 gene polymorphism and pulmonary tuberculosis in a Gambian population sample. **Thorax**, v. 59, p. 291–294, December 2004.
- BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; FERNANDES, B.D.; CARVALHO, L.P, *et al.* BCG (Bacille of Calmette–Guérin) revaccination leads to improved in vitro IFN- $\gamma$  response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children. **Vaccine**, Bahia, v. 21, p. 2152–2160, Nov. 2003.
- BARREIRA, D.; GRANGEIRO, A. Avaliação das estratégias de controle da tuberculose no Brasil. **Rev Saúde Pública**, Brasília, v. 41(Supl. 1), p. 4-8, 2007.
- BARRETO, M.L.; PEREIRA, S.M.; FERREIRA, A.A. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. **Jornal de Pediatria**, Bahia, v.82(3 Suppl), p.45-54, 2006.

BARRY, C.E.; BOSHOFF, H.I.; DARTOIS, V.; DICK, T, *et al.* The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature Reviews Microbiology**, Bethesda, v.7, p. 845-855, Dec. 2009.

BASTURK, B.; YAVASCAOGLU, Y.; ORAL, B.; GORAL, G, *et al.* Cytokine gene polymorphisms can alter the effect of Bacillus Calmette–Gue´rin (BCG) immunotherapy. **Cytokine**, v. 35, p. 1–5, Nov. 2005.

BENÉVOLO-DE-ANDRADE, T.C.; MAIA, R.M.; COSGROVE, C.; CASTELLO-BRANCO, L.R.R. BCG Moreau Rio de Janeiro -cAn oral vaccine against tuberculosis – Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 100(5), p. 459-465. FEB. 2005.

BIERRENBACH, A.L; CUNHA, S.S; BARRETO, M.L; PEREIRA, S.M, *et al.* Tuberculin reactivity in a population of schoolchildren with high BCG vaccination coverage. *Pan American Journal of Public Health*; v. 13, p.285-293, 2003.

BLACK, G.F.; WEIR, R.E.; FLOYD, S.; BLISS, L, *et al.* BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. **Lancet**, v. 359, p.1393–401. 2002.

BRASIL. SINAM – Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>. Acesso em: novembro de 2010.

BRASIL. **Controle da Tuberculose – Uma Proposta de Integração Ensino-Serviço 5ª Edição**. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002.

CASANOVA, J.L.; LAURENT, A. Human genetics of infectious diseases: a unified theory. **The EMBO Journal**, Paris, v.26, p. 915–922, Jan. 2007.

CASTILLO-RODAL, A.I.; ARREOLA, M.C.; PANDO, R.H.; CALVA, J.J, *et al.* *Mycobacterium bovis* BCG Substrains Confer Different Levels of Protection against *Mycobacterium tuberculosis* Infection in a BALB/c Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis. **Infection and immunity**, México City, v. 76, p. 1718–1724, Sep. 2005.

CHEN, C.; HSIAO, C.C.; CHEN, C.J.; CHIN, C.H.; LIU, *et al.* Toll-like receptor 2 gene polymorphisms, pulmonary tuberculosis, and natural killer cell counts. **BMC Medical Genetics**, v. 11, p.17-27, 2010.

COOKE, G.S.; HILL, A.V.S. Genetics of Susceptibility to Human Infectious Disease. **Nature Reviews Genetics**, v.2, p.967-977, Dec.2001.

COOKE, G.S.; CAMPBELL, S.; SILLAH, J.; GUSTAFSON, P, *et al.* Polymorphism within the Interferon- $\gamma$  Receptor Complex Is Associated with Pulmonary Tuberculosis. **J Respir Crit Care Med.**, v. 174, p. 339–343, 2006.

DALL’STELLA, Renato. **Desenvolvimento de Bioprocessos para produção de tuberculina com cepas brasileiras de *Mycobacterium tuberculosis* para diagnóstico da**



**tuberculose em humanos.** 2003. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FAN, H.M.; WANG, Z.; FENG, F.M.; ZHANG K.L, *et al.* Association of TNF- $\alpha$ -238G/A and 308 G/A Gene Polymorphisms with Pulmonary Tuberculosis among Patients with Coal Worker's Pneumoconiosis. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 23, p. 137-145. 2010.

FERNANDES, Marcilio. **Estudo de Fatores Relacionados ao Controle da Tuberculose: Resistências às Drogas, Transmissão e Susceptibilidade do Hospedeiro.** 2007. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

FERRAZ, J.C.; MELO, F.B.S.; ALBUQUERQUE, M.F.M.P.; MONTENEGRO, S.M.L, *et al.* Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Recife, v. 39, p. 1387-1397, FEB. 2006.

FERWERDA B, KIBIKI GS, NETEA MG, DOLMANS WMV, *et al.* The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant and tuberculosis susceptibility in HIV-infected patients in Tanzania. **AIDS**. v. 21, p.1375-77, 2007.

FILHO, Geraldo. **Bogliolo Patologia.** Editora Guanabara Koogan. 2006. p.381-384;

HENAO, M.I.; MONTES, C.; PARÍS, S.C.; GARCÍA, L.F. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. **Tuberculosis**, Bogotá, v.86, p. 11–19, 2006.

KRITSKI, AL. Tuberculose: do ambulatório à enfermaria. Atheneu. São Paulo, p. 1-6, 2000.

KONEMAN, W. Elmer. **Diagnóstico Microbiológico.** São Paulo: Editora Médica Panamericana, 1999.

LALOR, M. K.; SMITH, S.G.; FLOYD, S.; GORAK-STOLINSKA, P, *et al.* Complex cytokine profiles induced by BCG vaccination in UK infants. **Vaccine**, v. 28, p.1635–1641, 2010.

LEANDRO, A.C.C.S.; ROCHA, M.A.; CARDOSO, C.S.A.; BONECINI-ALMEIDA, M.G. Genetic polymorphisms in vitamin D receptor, vitamin D-binding protein, Toll-like receptor 2, nitric oxide synthase 2, and interferon- $\gamma$  genes and its association with susceptibility to tuberculosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 312-322, Mar. 2008.

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**. Palermo, v. 29, p. 371–374, Feb. 2002.

LOPES, A.J.; CAPONE, D.; MOGAMI, R.; TESSAROLLO, B, *et al.* Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. **Pulmão**, Rio de Janeiro, v.15(4), p.253-261, Dec. 2006.

LORENZ, E.; MIRA, J.P.; CORNISH, K.L.; ARBOUR, N.C, *et al.* A Novel Polymorphism in the Toll-Like Receptor 2 Gene and Its Potential Association with Staphylococcal Infection. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 6398–6401, Nov. 2000

LIU, J.; TRAN, V.; LEUNG, A.S.; ALEXANDER, D.C, *et al.* BCG vaccines. **Human Vaccines**, Toronto, v. 5:2, p. 70-78; February 2009.

MERZA, M.; FARNIA, P.; ANOOSHEH, S.; VARAHRAM, M, *et al.* The NRAMPI, VDR and TNF- $\alpha$  Gene Polymorphisms in Iranian Tuberculosis Patients: The Study on Host Susceptibility. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.13(4), p. 252-256, Apr. 2009.

MIRSAEIDIA, S.M.; HOUSHMAND, M.; TABARSI, P.; BANOEI, M.M, *et al.* Lack of association between interferon-gamma receptor-1 polymorphism and pulmonary TB in Iranian population sample. **Journal of Infection**, v. 52, p. 374–377, Oct. 2006.

MOTA, F. Distribuição espacial da mortalidade por tuberculose em Salvador, Bahia, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19(4), p. 915-922; 2003.

MOTSINGER-REIF, A.A.; ANTAS P.R.Z.; OKI NO, O.; LEVY, S, *et al.* Polymorphisms in IL-1b, vitamin D receptor Fok1, and Toll-like receptor 2 are associated with extrapulmonary tuberculosis. **BMC Medical Genetics**, v. 11, p. 37, 2010.

NEWPORT, M.J.; ALLEN, A.; AWOMOYI, A.A.; DUNSTAN, S.J, *et al.* The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant: no influence on LPS responsiveness or susceptibility to pulmonary tuberculosis in The Gambia. **Tuberculosis**, v. 84, p. 347–352, Feb. 2004.

PANDO, R.H.; OROZCO, H.; AGUILAR, D. Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, México, v. 57, p. 355–367, Aug. 2009.

OGUS, A.C.; YOLDAS, B.; OZDEMIR, T.; UGUZ, A, *et al.* The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. **Eur Respir Journal**, v. 23, p.219–223, 2004.

ORAL, H.B.; BUDAK, F.; UZASLAN, E.K.; BASTURK, B, *et al.* Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. **Cytokine**, v. 35, p. 143–147. 2006.

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 Genetic**, v. 123, p.477–484, 2008.

RAJA, Alameda. 2004. Immunology of tuberculosis. **Indian Journal Medical Research**, India, v. 120, p. 213-232, Apr. 2004.

REYNOLDS, J.M.; PAPPU, B.P.; PENG, J.; MARTINEZ, G.J, *et al.* Toll-like Receptor 2 Signaling in CD4+ T Lymphocytes Promotes T Helper 17 Responses and Regulates the Pathogenesis of Autoimmune Disease. **Immunity**, v. 32, p. 692–702, May 2010.

RITZ, N.; HANEKOM, W.A.; BROWNE, R.R.; BRITTON, W.J., *et al.* Influence of BCG vaccine strain on the immuneresponse and protection against tuberculosis. **FEMS Microbiol Rev**, Sydney, v. 32, p. 821–841, Jul. 2008.

SCOLA, L.; CRIVELLO, A.; MARINO, V.; GIOIA, V., *et al.* IL-10 and TNF- $\alpha$  polymorphisms in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis: implication for ageing and life span expectancy. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, p.569–572. 2003.

SELVARAJ, P.; ALAGARASU, K.; HARISHANKAR, M.; VIDYARANI, M., *et al.* Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. **Cytokine**, v. 43, p. 26–33. 2008.

SHARMA, S.; RATHORED, J.; GHOSH, B.; SHARMA, S.K. Genetic polymorphisms in TNF genes and tuberculosis in North Indians **BMC Infectious Diseases**, India, v. 10, p.165–174, 2010. TALA-HEIKKILA, M.M.; TUOMINEM, JE.; TALA, E.O. Bacillus Calmette-Guérin revaccination questionable with low tuberculosis incidence. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 157, p. 1324–7. 1998.

TORTORA, Gerard. FUNKE, Berdell. CASE, Christine. **Microbiologia**. 8<sup>o</sup> Edição, Porto Alegre: Editora Artemed, 2005.

TSO, W.H.; CHONG, W.P.; TAM, C.M., *et al.* Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. **Genes and Immunity**; v. 6, p. 358–363, 2005.

TUFARIELLO, JM.; CHAN, J.; FLYNN JAL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. **Lancet Infect Disease**. Pittsburgh, v.3, p. 578–90, Set. 2003.

VALLINOTO, A.C.R.; GRAÇA, E.S.; ARAÚJO, M.S.; AZEVEDO, V.N., *et al.* IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection and clinical manifestation of tuberculosis. **Human Immunology**, Pará, v. 71:p. 692–696, Mar. 2010.

VAN DE VOSSE, E.; VAN DISSEL, J.T.; OTTENHOFF, T.H.M. Genetic deficiencies of innate immune signalling in human infectious disease. **Lancet Infect Disease**, v. 9, p. 688–98. Nov. 2009.

WEIR, R.E.; FINE, P.E.M.; FLOYD, S.; STENSON, S., *et al.* Comparison of IFN- $\gamma$  responses to mycobacterial antigens as markers of response to BCG vaccination. **Tuberculosis**, v. 88, p. 31–38, July, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2010**. Geneva, World Health Organization, 294p, 2008.

XUE, Y.; ZHAO, Z.Q.; WANG, H.J.; JIN, L, *et al.* Toll-like receptors 2 and 4 gene polymorphisms in a southeastern Chinese population with tuberculosis. **International Journal of Immunogenetics**, v. 37, p.135–138, November 2009.

YASIR, A.; SKEIKY, W.; SADOFF, J. Advances in tuberculosis vaccine strategies. **Nature**. v. 4, p. 469-476, 2006.

YIM, J.J.; SELVARAJ, P. Genetic susceptibility in tuberculosis. **Respirology**, India, v. 15, p. 241–256. Oct. 2010.

YIM, J.J.; LEE, H.W.; LEE, H.S.; KIM, Y.W, *et al.* The association between microsatellite polymorphisms in intron II of the human Toll-like receptor 2 gene and tuberculosis among Koreans. **Genes and Immunity**, v. 7, p. 150–155, Jan. 2006.

ZHENG, A.R.; ZHOU, A.Y.; LIAQIN, A, RUILIANG, J.A, *et al.* Relationship between polymorphism of *DC-SIGN (CD209)* gene and the susceptibility to pulmonary tuberculosis in an eastern Chinese population. **Human Immunology**. Nov. 2010.

## ANEXOS