

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DISTRIBUIÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA
(SNPs) NOS GENES DA LECTINA LIGADORA DE MANOSE
(*MBL2*) E DA BETA-DEFENSINA HUMANA-1 (*DEFB1*)
ENTRE PACIENTES COM TUBERCULOSE**

HEIDI LACERDA ALVES DA CRUZ

VIRTUS IMPAVIDA

**RECIFE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DISTRIBUIÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPS) NOS
GENES DA LECTINA LIGADORA DE MANOSE (*MBL2*) E DA BETA-
DEFENSINA HUMANA 1 (*DEFB1*) ENTRE PACIENTES COM
TUBERCULOSE**

HEIDI LACERDA ALVES DA CRUZ

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Genética da Universidade
Federal de Pernambuco como
requisito para obtenção do grau
de Mestre em Genética pela
UFPE.

Orientador: Profº Drº Sergio Crovella

Co-orientadora: Profª Drª Haiana Charifker Schindler

**RECIFE
2010**

Cruz, Heidi Lacerda Alves da

Distribuição de polimorfismos de base única (SNPS) nos genes da lectina ligadora de manose (MBL2) e da beta-defensina humana 1 (DEFB1) entre pacientes com tuberculose / Heidi Lacerda Alves da Cruz. – Recife: O Autor, 2010.

98 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Genética, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

**1. Tuberculose – Recife – PE 2. Mycobacterium tuberculosis
3. Genes 4. Polimorfismo – Genética 5. Lectinas I. Título.**

616.995

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 091

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

**Parecer da comissão examinadora da dissertação de:
Heidi Lacerda Alves da Cruz**

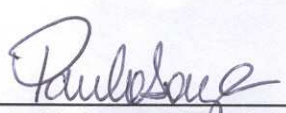
intitulada:

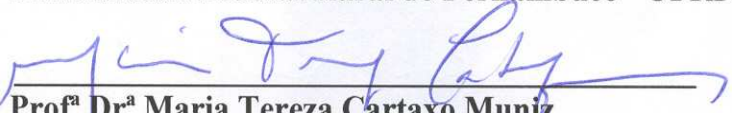
**Distribuição de Polimorfismos de Base Única (SNPs) nos Genes da Lectina Ligadora de
Manose (MBL2) e da Beta-Defensina Humana 1 (DEFB1) entre Pacientes com
Tuberculose**

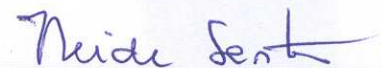
A comissão examinadora considera o presente trabalho

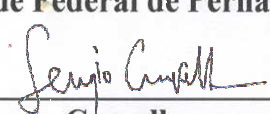
APROVADO

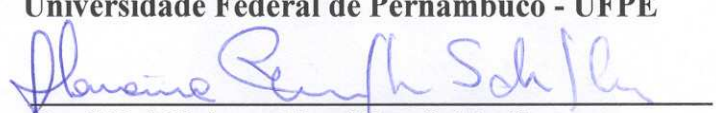
**Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Heidi Lacerda Alves da Cruz faz
jus ao grau de Mestre em Genética pela UFPE. Recife, 25 de março de 2010.**

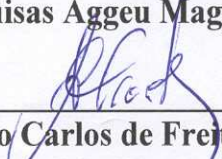

1º Examinador: Profº Drº Paulo Roberto Eleutério de Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE


2º Examinador: Profª Drª Maria Tereza Cartaxo Muniz
Universidade de Pernambuco - UPE


3º Examinador: Profª Drª Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE


Orientador: Profº Drº Sergio Crovella
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE


Co-orientador: Profª Drª Haiana Charifker Schindler
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ


Coordenador: Profº Drº Antônio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

A minha família, que me mostrou que o amor também é agente construtor.

Aos meus amigos, responsáveis incontestáveis por essa concretização.

Aos pacientes, professores da lição da vida.

Com carinho, dedico.

Agradecimentos

Amigos são anjos sem asas que Deus coloca diante de nós diariamente... agradeço a Ele por todos os meus amigos e por todas as oportunidades de crescimento que tive até hoje, sem isso não teria percebido a grandiosidade da vida e de sempre buscar a felicidade.

A minha **família**, meus pilares, minha base. Em especial aos meus pais, Waldete Alves e Caetano Lacerda, e a minha irmã, Hegle Lacerda. Obrigada por sermos uma família e termos a certeza de sempre termos um ao outro.

Ao meu **querido** orientador Prof^o Dr^o Sergio Crovella, com certeza um dos encontros mais importantes que tive na vida. Obrigada pelo voto de confiança, pela oportunidade de trabalhar com uma equipe exemplar e por acreditar nos meus sonhos profissionais.

A minha co-orientadora Prof^a Dr^a Haiana Schindler, responsável pela minha jornada científica na área de tuberculose. Profissional com quem tive a oportunidade de descobrir o amor pelo trabalho durante a graduação.

Aos meus **irmãos-científicos** que compõem o Laboratório de Imunoepidemiologia, a minha segunda família, e mais ainda, a liga da justiça contra a TB, meus super-heróis: André Nascimento, Andrea Lima, Fabiana Fulco, Juliana Falcão, Juliana Figueirêdo, Laís Lira, Lilian Montenegro, Márcia Schneider, Rosana Montenegro. Obrigada por tornarem meus dias mais lindos, sem vocês esse sonho não brilharia tanto!

Ao **irmão** Diego Sotero, um dos grandes amigos, agente atuante e transformador da minha vida. E a sua companheira Nara Diniz, de quem gostar é algo simples e natural. Pessoas de quem sempre terei imenso orgulho.

Aos **amigos** que fiz no Laboratório de Virologia, aqueles com quem pude contar em qualquer momento, na certeza de que encontraria uma mão amiga: Andréia Silva, Antônio Campos (Galego), Anselmo Jiro (Japa), Rafael Guimarães, Ronaldo Celerino (Ronaldinhooooo) e Sergio Santos. Em especial a Lucas Brandão, fundamental durante o aprendizado das técnicas nos primeiros momentos do Mestrado.

Aos **amigos** do Mestrado. Um privilégio conviver com grandes pessoas durante esses dois anos, como Bárbara Simas e Jefferson Santos. Em especial a minha **querida** Jaqueline Azevêdo, pessoa de grande coração, amiga incontestável em todos os sentidos.

Aos **amigos** “agregados” que completam a família Aggeu Magalhães e contribuem com doses exacerbantes de alegria: Bruna Lima (Bubu), Carlos Regis (Tio Carlos), Diogo Poroca, Fabio Lopes, Gabriela Guedes (Pucca), Karla Luna (Kali), Neide Xavier e Romero Henrique.

A todos os meus **amigos** da graduação, pessoas especiais e que apesar da distância fizeram parte dos meus dias, das minhas conquistas – Ana Paula Valença, Bruno Karol (a força de Garanhuns!), Isabella Bandeira e Luciano Rodolfo. Em especial à Bárbara Neves e à Teresa Vital (Tt!), grandes e importantes amigas, cuja amizade será para sempre.

À Dr^a Ludovica Segat pela ajuda absoluta em todos os momentos e pelos conhecimentos repassados sempre que solicitados.

Aos **amigos** de toda hora, Eduardo Gomes (Dudu), Daniella Sotero, Kátia Muniz, Josyélli Cabral, Pollyanna Pessôa, Thiara Carvalho, Thaisa Carvalho, Thiago Gomes, Márcio Filho

(Marcito), Marcelo Galvão, Marcelo Nazário, pelos momentos de descontração e de muitas gargalhadas.

À eterna **família** do Herbário UFP, onde dei meus primeiros passos e encontrei minha base como bióloga, através da Profª Marlene Barbosa, Juliana Cavalcanti e Christianne Farias. Obrigada pelo carinho incondicional.

E finalmente, tão importante e especial quanto, ao meu **querido** Rafael Delgado, responsável pelo impulso que faltava na finalização desta etapa e razão do meu sorriso mais feliz. Obrigada, “brother”!

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Genética, pelo aprendizado proporcionado e as experiências repassadas.

À FACEPE pelo apoio financeiro, fundamental ao desenvolvimento deste trabalho.

A todos do LIKA/UFPE e do CPqAM/FIOCRUZ que colaboraram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho. Em especial à Simone Souza e Mineo Nakazawa, pela ajuda irrestrita.

A todos que contribuíram positivamente e que fazem parte da conclusão de mais esta etapa em minha vida.

Muito Obrigada!

"A melhor parte da vida de uma pessoa está nas suas amizades."
Abraham Lincoln

SUMÁRIO

Item	Página
Lista de Abreviaturas	I
Lista de Figuras	III
Lista de Tabelas	IV
Resumo	V
Abstract	VI
1. Introdução	10
2. Revisão da Literatura	11
2.1. Visão Histórica da Tuberculose	11
2.2. Incidência e Epidemiologia da Tuberculose	13
2.2.1. Tuberculose no Mundo	13
2.2.2. Tuberculose no Brasil	15
2.2.3. Tuberculose em Pernambuco	17
2.3. O Agente Etiológico – <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
2.3.1. Classificação	17
2.4. Mecanismo de Transmissão e Patologia	19
2.5. Visão Geral dos Métodos Diagnósticos e Tratamento	21
2.6. Fatores Genéticos envolvidos na Susceptibilidade ao <i>M. tuberculosis</i>	23
2.6.1. Evidências da Influência Genética na Susceptibilidade Humana ao <i>M. tuberculosis</i>	24
2.7. Imunologia da Tuberculose	26
2.7.1. Imunidade Inata como Fonte de Pesquisa	26
2.7.2. Aspectos do Sistema Imunológico na Tuberculose	27
2.7.3. Proteínas da Imunidade Inata I: Lectina Ligadora de Manose (MBL)	28
2.7.4. Polimorfismos no Gene <i>MBL2</i> e a Deficiência de MBL	31
2.7.5. Proteínas da Imunidade Inata II: β -Defensina Humana 1 (HBD-1)	32
2.7.6. Polimorfismos no Gene <i>DEFB1</i> e a Deficiência de HBD-1	34
2.8. Variações Genéticas no Genoma Humano: Efeitos, Associações e Detecções de SNPs	35

2.8.1. Polimorfismos de Base Única e Infecções	36
2.8.2. Detecção de SNPs por PCR em Tempo Real	37
3. Objetivos	41
4. Materiais e Métodos	42
4.1. Local do Estudo	42
4.2. Aspectos Éticos	42
4.3. Seleção dos Pacientes	42
4.4. Critérios de Inclusão	42
4.5. Critérios de Exclusão	43
4.6. População de Estudo	43
4.7. Coleta de Dados	43
4.8. Amplificação do DNA Genômico do <i>M. tuberculosis</i>	44
4.9. Genotipagem do Gene <i>MBL2</i>	44
4.10. Genotipagem do Gene <i>DEFB1</i>	46
4.11. Análise Estatística	47
5. Resultados	48
5.1. Análise do Banco de Dados	48
5.2. Amplificação do DNA de <i>M. tuberculosis</i> pela NPCR	49
5.3. Genotipagem do <i>MBL2</i>	50
5.3.1. Polimorfismos da Região Promotora	50
5.3.2. Polimorfismos do Éxon 1	52
5.4. Genotipagem do <i>DEFB1</i>	54
5.4.1. Polimorfismos da Região 5'UTR	54
6. Discussão	57
6.1. Polimorfismos do <i>MBL2</i>	59
6.2. Polimorfismos do <i>DEFB1</i>	62
7. Conclusões	65
8. Referências Bibliográficas	66
9. Anexos	77
Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética	77
Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	78
Anexo 3. Manuscrito do Artigo Científico	80
10. Memorial da aluna	98

Lista de abreviaturas

°C - Grau Celsius

μl - Microlitro

a.C. - Antes de Cristo

AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

ATA - American Thoracic Association (Associação Torácica Americana)

BCG - Bacilo Calmette-Guérin

CCL2 – Chemokine (C-C motif) Ligand 2 (Ligante de quimiocina (motivo C-C) 2)

CD - Células dendríticas

CD209 – Molecule CD209 (Molécula CD209)

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

DNA - Desoxirribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato

DOTS – Directly Observed Treatment Short (Tratamento Diretamente Observado Contínuo)

HBD – Human Beta-Defensin (β-Defensina Humana)

HBL - Hospital Barão de Lucena

HC-UFPE - Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco

HIV - Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HLA – Human Leukocyte Antigen (Antígeno de Leucócito Humano)

IFNG – Interferon gamma (Interferon gama)

IMIP - Instituto Materno-Infantil Professor Fernando Figueira

IUATLD - International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases (União Internacional Contra a Tuberculose e Doenças Pulmonares)

KCl - Cloreto de potássio

M - Molar

MASP - MBL-Associated Serine Protease (Serino protease associada à MBL)

MBL – Mannose Binding Protein (Proteína ligadora de manose)

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

Min. - Minutos

mL – Mililitro

NOS2A – Nitric oxide Synthase 2 (Sintetase de Óxido Nítrico 2)

NRAMP1 – Natural-resistance-associated macrophage protein 1 (Proteína de resistência natural associada ao macrófago 1)

NPCR – Nested-PCR

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

RNA - Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)

RNTA - Royal Netherlands Tuberculosis Association

s – segundos

SP110 – Nuclear Body Protein (Proteína do Corpo Nuclear)

TB – Tuberculose

TLR – Toll-like Receptor (Receptor de homologia Toll)

UTR - Untranslated Region (Região não-traduzida)

VDR – Vitamin D Receptor (Receptor de Vitamina D)

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Alinhamento de repetições encontradas em diferentes <i>loci</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e seqüências similares de <i>Mycobacterium africanum</i> e <i>Mycobacterium bovis</i> , demonstrando o baixo nível de variação genética apresentado pelo complexo <i>M. tuberculosis</i> .	12
Figura 2. Incidência global de tuberculose. Número de novos casos de TB por 100.000 habitantes em 2007.	15
Figura 3. Incidência de tuberculose no Brasil. Número de casos por 100.000 habitantes em 2006.	16
Figura 4. Microscopia eletrônica do bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	18
Figura 5. Mecanismo de transmissão e patogênese da tuberculose.	20
Figura 6. Vias de ativação do Sistema Complemento. a) Via Clássica; b) Via das Lectinas; c) Via Alternativas.	29
Figura 7. Esquema da estrutura da MBL.	30
Figura 8. Estrutura gênica e protéica da MBL.	31
Figura 9. Mapa da distribuição das frequências haplotípicas da MBL em diferentes populações.	32
Figura 10. Estrutura gênica e protéica das Beta-Defensinas.	35
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose demonstrando a positividade das amostras biológicas mediante a presença de DNA de <i>M. tuberculosis</i> .	49
Figura 12. Resultados da PCR alelo-específica, realizada através da PCR em tempo real, para a genotipagem dos promotores H/L e X/Y do gene <i>MBL2</i> .	51
Figura 13. Genotipagem do <i>MBL2</i> , demonstrando os três possíveis genótipos para o gene através da curva de dissociação.	52

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1. Iniciadores para amplificação do <i>M. tuberculosis</i> e genotipagem dos genes <i>MBL2</i> e <i>DEFB1</i> .	46
Tabela 2. Características sócio-demográficas dos pacientes incluídos no estudo, com diagnóstico confirmado de tuberculose.	48
Tabela 3. Co-morbididades relacionadas à TB presentes na população estudada.	49
Tabela 4. Resultados obtidos a partir da amplificação de 115 amostras de DNA extraídos do sangue total através da técnica de NPCR e comparação entre os resultados clínicos e da NPCR.	50
Tabela 5. Comparação entre os resultados obtidos através da NPCR entre os pacientes diagnosticados com tuberculose segundo a forma clínica da doença.	50
Tabela 6. Frequências alélicas e genotípicas dos pacientes da pesquisa com tuberculose (TB) e dos controles para o promotor H/L.	51
Tabela 7. Frequências alélicas e genotípicas dos pacientes da pesquisa com tuberculose (TB) e controles para o promotor X/Y.	52
Tabela 8. Frequências alélicas e genotípicas dos pacientes da pesquisa com tuberculose (TB) e dos controles para o éxon 1.	53
Tabela 9. Genótipos combinado dos pacientes da pesquisa com tuberculose (TB) e o grupo controle.	54
Tabela 10. Frequências alélicas e genotípicas dos pacientes da pesquisa com tuberculose (TB) e controles para a região 5'UTR do gene <i>DEFB1</i> .	55
Tabela 11. Principais haplótipos obtidos a partir do cálculo das frequências alélicas entre os grupos de doentes e controles.	56

Resumo

Fatores genéticos podem desempenhar um importante papel na susceptibilidade à tuberculose (TB), uma das doenças com maior índice de mortalidade entre as enfermidades causadas por um único agente etiológico. Esta doença infecto-contagiosa, causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, tem sido responsável pela morte de milhões de pessoas anualmente. Polimorfismos de base única (SNPs) em genes responsáveis pela imunidade inata têm sido alvo de diversos estudos e mostraram-se de grande importância na susceptibilidade a infecções. O presente trabalho teve como objetivo analisar a associação entre SNPs funcionais nos genes *MBL2* e *DEFB1* e a susceptibilidade à infecção promovida pelo *M. tuberculosis*. Foram selecionados 115 pacientes com TB e 180 adultos saudáveis provenientes da cidade do Recife, Brasil. Os SNPs localizados no gene *MBL2* foram genotipados através da PCR em tempo real (qPCR), enquanto que os SNPs presentes no gene *DEFB1* foram genotipados através do sequenciamento de DNA. Para o gene *MBL2*, foram genotipadas as regiões promotoras (H/L e X/Y), através de uma PCR alelo-específica, e o éxon 1 (A/O), através da curva de dissociação. Para o gene *DEFB1*, foram genotipadas as posições -52, -44 e -20 da região 5'UTR. Os SNPs foram agrupados segundo o alelo, as frequências alélicas e genotípicas encontradas foram calculadas e comparadas entre os grupos estudados. As frequências das variantes do *MBL2* nos pacientes foram diferentes das frequências encontradas no grupo controle. Todas as populações encontraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Tanto o alelo L quanto o alelo O apresentaram efeito de risco para o grupo de pacientes com TB em relação aos pacientes controles. Da mesma forma, as frequências genotípicas foram significativamente diferentes em pacientes com TB quando comparadas aos pacientes controles, com os genótipos OO e LL presentes principalmente nos doentes em relação aos indivíduos saudáveis. Para o promotor X/Y, foi observado um efeito protetor do polimorfismo, com frequência tanto do alelo X quanto do genótipo XX para a população controle quando comparadas com o grupo de pacientes. A análise dos haplótipos revelou que os genótipos combinados responsáveis pela alta produção de MBL apresentaram-se significativamente mais frequentes nos controles do que nos pacientes com TB. Os haplótipos para produção deficiente apresentou-se com maior frequência nos pacientes do que nos controles. Em relação aos polimorfismos no gene *DEFB1* não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos estudados. Apesar disso, foi observada uma tendência para que polimorfismos na posição -20 localizados na região 5'UTR estejam relacionadas com a susceptibilidade à tuberculose, principalmente na forma extrapulmonar da doença. Em conclusão, nossos resultados indicam que a presença de SNPs no gene *MBL2*, responsáveis pela diminuição dos níveis da proteína MBL, encontram-se associados a uma maior susceptibilidade ao bacilo da TB, representando uma molécula fundamental durante os primeiros estágios de infecção pelo *M. tuberculosis*. Nossos resultados mostraram que a presença de SNPs tanto na região promotora quanto no éxon 1 do *MBL2* aparece como um fator de risco para a infecção, podendo ser utilizados no desenvolvimento de novos tratamentos individualizados. No entanto, o mesmo não pôde ser afirmado para HBD-1, apesar de ser uma proteína fundamental à imunidade inata, não foram encontradas associações entre polimorfismos do gene *DEFB1* e a tuberculose. Vale ressaltar que este é o primeiro relato descrito na literatura que envolve um estudo de associação entre polimorfismos funcionais do *DEFB1* e o seu papel na infecção e desenvolvimento da tuberculose. O papel das proteínas solúveis da imunidade inata na infecção pelo *M. tuberculosis* está longe de ser compreendido e o conhecimento encontra-se restrito, necessitando-se de mais informações a cerca da interação existente entre o Homem e as micobactérias como um caminho a ser percorrido visando no futuro o controle da doença.

Palavras-chave: tuberculose, imunidade inata, *MBL2*, *DEFB1*, genotipagem, polimorfismo.

Abstract

Genetic factors may play an important role in the susceptibility to tuberculosis (TB), one of the leading causes of death by a single infectious agent. This infectious disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis* bacilli has been responsible for millions of deaths annually. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes related to innate immunity have been investigated in several studies and proved to be involved in susceptibility to infections. Our study aimed to analyze an association between SNPs in *MBL2* and *DEFB1* genes and the susceptibility to the infection by *M. tuberculosis*. We selected 115 patients with TB and 180 healthy adults coming from Recife, Brazil. The SNPs located in the *MBL2* gene were genotyped by real time polymerase chain reaction (qPCR), while the SNPs present in *DEFB1* gene were genotyped by DNA sequencing. For the *MBL2* gene were genotyped the promoter regions (H/L and X/Y), through allele specific PCR revealed by a real time PCR platform using the Sybr Green I chemistry, and exon 1 (A/O) through melting curve. For *DEFB1* gene the positions -20, -44 and -52 in 5'UTR region were genotyped. The SNPs were grouped according to allele and genotypes, the frequencies were calculated and compared between the groups. Allele frequencies and genetic variants of *MBL2* in patients with TB were different from the frequencies found in the control group. All populations were in Hardy-Weinberg equilibrium. Both allele L and allele O had the effect of risk for the group of patients with TB compared to control patients. Similarly, the genotype frequencies were significantly different in patients with TB when compared to control patients with genotype OO and LL present mainly in patients compared to healthy patients. For the promoter X/Y, we observed a protective effect from the polymorphism, with allele and genotype frequency from mutant X in higher frequencies in the control population. Analysis of combined haplotypes showed that the genotype account for high production of MBL was significantly more frequent in controls than in TB patients and the haplotype for deficient production presented higher frequency in TB patients than in controls. In relation to *DEFB1* gene there were no significant differences between the two groups. Nevertheless, there is a tendency for polymorphisms at position -20 located in the 5'UTR associated with susceptibility to tuberculosis, especially in the extrapulmonary form of the disease. In conclusion, our results indicate that the presence of SNPs in the *MBL2* gene, responsible for the decreased levels of MBL protein, are associated with increased susceptibility to TB bacilli, representing a key molecule during the early stages of infection with *M. tuberculosis*. Our results showed that the presence of both SNPs in the promoter region and exon of the *MBL2* is a risk factor for infection and may be used in the development of new individualized treatments. However, the same can not be applied for *DEFB1*, although a protein critical to innate immunity, we found no associations between genetic polymorphisms and tuberculosis. To our knowledge, this is the first report described in the literature involves a study of association between functional polymorphisms of *DEFB1* and its role in the infection and development of tuberculosis. The role of soluble proteins of innate immunity in the infection with *M. tuberculosis* is far from being understood, the knowledge is limited and needs more information about the interaction between humans and mycobacterias, as a way to go for the control of tuberculosis.

Keywords: tuberculosis, innate immunity, *MBL2*, *DEFB1*, genotyping, polymorphisms.

1. Introdução

Dentre todas as enfermidades infecciosas que acometem o ser humano, a tuberculose (TB), causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, permanece como uma das mais letais. Baseados no teste de reatividade à tuberculina, epidemiologistas estimam que cerca de um terço da população mundial (2,2 bilhões de pessoas) esteja infectada com o bacilo. No Brasil, são registrados anualmente 80 mil novos casos e conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o país ocupa o 15º lugar entre as 22 nações responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo, com uma taxa de incidência de 50 a 90 casos por 100.000 habitantes, variando segundo as diferentes regiões do país.

O risco de um indivíduo infectado desenvolver a forma ativa da doença durante sua vida encontra-se entre 5 a 10%. Nesses indivíduos, o risco de adoecimento dependerá da habilidade do seu sistema imunológico em prevenir a multiplicação do *M. tuberculosis*. A resposta imune contra o bacilo depende da ação inicial de certos tipos de proteínas, como a Lectina Ligadora de Manose (MBL) e a β -Defensina Humana 1 (HBD-1), que têm sido bem caracterizadas como moléculas importantes na promoção da resposta imune inata, a primeira barreira contra a entrada de microorganismos. Níveis baixos das proteínas MBL e HBD-1 estão normalmente associados a uma maior susceptibilidade do organismo a infecções. Tal susceptibilidade encontra-se particularmente controlada a nível genético, onde a presença de variações, principalmente polimorfismos de base única (SNPs), nos genes que codificam tais proteínas, possa determinar a resposta imune e o curso do desenvolvimento da doença.

O gene da Lectina Ligadora de Manose (*MBL2*) codifica uma proteína capaz de reconhecer a manose na superfície de patógenos promovendo tanto sua opsonização como a ativação do sistema complemento. Polimorfismos localizados na região promotora e no éxon 1 desse gene têm sido alvo de diversos estudos e revelaram-se de suma importância na susceptibilidade a infecções bacterianas. O gene da β -defensina Humana 1 (*DEFB1*) codifica um peptídeo antimicrobiano capaz de romper a membrana de uma ampla variedade de patógenos, assim como atua ligando o sistema imune inato ao adaptativo. SNPs na região 5'UTR, em especial nas posições -20, -44 e -52, têm sido igualmente associados com a susceptibilidade a diversas infecções.

O presente trabalho tem como objetivo analisar se polimorfismos nos genes *MBL2* e *DEFB-1* estão associados com a ocorrência de tuberculose ativa em pacientes atendidos nas Unidades Hospitalares no Estado de Pernambuco. Investigar o quanto polimorfismos funcionais podem influenciar na susceptibilidade às infecções é de suma importância e deverá contribuir futuramente em estratégias de vacinação e no tratamento personalizado.

2. Revisão da Literatura

2.1. Visão Histórica da Tuberculose

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa que, via de regra, assume evolução crônica e tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*. Acredita-se que esta micobactéria – também conhecida como bacilo de Koch – seja anterior ao próprio Homem, sucedendo formas ainda mais elementares de vida microscópica (Bertolli-Filho, 2001). Traços da doença foram encontrados em esqueletos humanos datados de 8.000 a 5.000 a.C. na França, Itália, Alemanha, Dinamarca e Jordânia, e em múmias egípcias de 3.500 a 4.000 a.C. apresentando deformidades sugestivas de tuberculose vertebral (Coberly e Chaisson, 2001).

O encontro entre o bacilo da tuberculose e a espécie humana levou o agente infeccioso a desenvolver estratégias de adaptação ao novo hospedeiro, evoluindo para uma nova espécie, o *M. tuberculosis*. Há cerca de 8.000 a 4.000 a.C., quando o homem iniciou o processo de domesticação do gado, propiciou sua exposição ao *Mycobacterium bovis*, bacilo similar ao *M. tuberculosis*, e que também pode causar tuberculose, através da ingestão de leite e de carne bovina contaminados com o bacilo. Tal fato justificaria os casos de tuberculose vertebral, intestinal e pulmonar encontrados nos esqueletos e múmias humanas do Neolítico (Hass e Hass, 1996).

Além da perda da capacidade de multiplicação no meio exterior, o bacilo inicialmente sofreu um significativo aumento na virulência para, na continuidade, restringir sua capacidade destrutiva, tornando-se um comensal aceitável para os indivíduos e para os agrupamentos humanos, adotando um nicho intracelular especializado nos macrófagos, células fagocíticas do sistema imunológico (Daniel, 1997; Cole *et al.*, 1998; Bertolli-Filho, 2001).

Entretanto, esse raciocínio evolutivo tem sido afastado desde que Brosch *et al.* (2002) revelaram através de informações genéticas que o processo de evolução do *M. tuberculosis* pode ter sido justamente o contrário. Gutierrez *et al.* (2005) utilizando análises de seqüências gênicas demonstraram que o *M. tuberculosis* parece fazer parte de um grupo relativamente diverso de bacilos. Estudos mais recentes acerca da evolução tem indicado que o *M. tuberculosis* encontra-se mais relacionado a uma linhagem-fundadora do que ao *M. bovis*. Isso implica na possibilidade dos humanos terem infectado o gado com o *M. tuberculosis*, resultando na divergência do *M. bovis* ou que as duas linhagens evoluíram paralelamente de um ancestral em comum, capaz de infectar tanto o Homem quanto o gado (Brosch *et al.*, 2002; Gutierrez *et al.*, 2005).

O baixo nível de variação genética em geral apresentado pelo *M. tuberculosis* (Figura 1) indica que a população total pode ter resultado de uma expansão clonal seguido de um efeito denominado gargalo de garrafa (*bottleneck*) evolucionário, ocorrido entre 15.000 e 35.000 anos atrás (Brosch *et al.*, 2002; Gutierrez *et al.*, 2005). O ancestral do *M. tuberculosis* descende muito provavelmente do Complexo *M. tuberculosis*, onde as espécies que o compõem são encontradas hoje na África Central, sugerindo que os humanos foram expostos à pressão de seleção mediada pela tuberculose anteriormente ao que era assumido (Russell, 2007).

Figura 1. Alinhamento de repetições encontradas em diferentes *loci* de *Mycobacterium tuberculosis* e seqüências similares de *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium bovis*, demonstrando o baixo nível de variação genética apresentado pelo complexo *M. tuberculosis*. Fonte: Gutierrez *et al.* (2005).

Um dos grandes trabalhos sobre a tuberculose foi realizado em 1882, por Robert Koch, um estimado cientista de seu tempo. Koch isolou e cultivou o *M. tuberculosis* de tubérculos macerados. Seus experimentos identificaram a bactéria como o agente etiológico da doença (Bloom e Murray, 1992). Em 1890, ele anunciou a descoberta de um líquido, um extrato purificado de proteínas do bacilo, nomeado tuberculina, como uma estratégia para a detecção da doença, devido à intensidade da reação desenvolvida por animais doentes quando inoculados com essa droga. Este conceito perpetuou-se por vários anos até a observação de que tanto animais saudáveis quanto doentes poderiam responder ao líquido. Como resultado, ficou estabelecido que animais infectados com o *M. tuberculosis* reagiriam à tuberculina, enquanto que os saudáveis não apresentariam reação. O teste tuberculínico tornou-se então, a principal ferramenta diagnóstica para os casos de infecção ao *M. tuberculosis* (Ducati *et al.*,

2006). No mesmo período, Koch desenvolveu outros métodos de coloração para identificação do bacilo. Estas técnicas foram subsequentemente melhoradas pelo doutor e bacteriologista alemão Paul Ehrlich, cujo método de detecção do bacilo proporcionou a base para o desenvolvimento da coloração de Ziehl-Nielsen, empregada no diagnóstico dos casos de tuberculose ativa (Ducati *et al.*, 2006).

A descoberta de Koch permitiu que outros pesquisadores concentrassem esforços no desenvolvimento de novas terapias mais eficazes para o tratamento de pacientes tuberculosos. Em 1916, os jovens cientistas Albert Calmette e Camille Guérin conseguiram isolar uma linhagem avirulenta do *M. bovis* e a partir de sucessivas repicagens em meio de cultura, desenvolveram a vacina intradérmica, atualmente conhecida como BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), amplamente utilizada para combater a tuberculose de maneira profilática em crianças (Ducati *et al.*, 2006).

A introdução dos antibióticos, como a estreptomicina (1947), a isoniazida (sintetizada em 1912, mas introduzida 40 anos mais tarde) e o ácido p-amino-salicílico, levou a uma considerável revolução na quimioterapia da tuberculose, com significativa redução nas taxas de mortalidade pela doença no mundo (Bloom e Murray, 1992; Daniel, 1997). Posteriormente, outros fármacos anti-tuberculostáticos foram igualmente desenvolvidos, tais como o etambutol e a rifampicina. No entanto, apesar dos medicamentos disponíveis atualmente, existem alguns entraves quanto ao tratamento, como o tempo de duração (seis meses), os efeitos colaterais e a presença de bacilos multirresistentes. Lamenta-se diante de tais fatores que nenhuma nova droga de primeira-linha tenha sido desenvolvida como medicamento de combate à doença desde 1980 (Petrini e Hoffner, 1999).

2.2. Incidência e Epidemiologia da Tuberculose

2.2.1. Tuberculose no Mundo

Em virtude das taxas de incidência e mortalidade ocasionadas pela tuberculose no mundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou, em 1993, a situação da TB como estado de emergência global. Esta própria instituição se deu conta de que, sozinha, não conseguiria controlar a doença. Criou-se, então, o programa "STOP TB" que reúne instituições de alto nível científico e/ou poder econômico, tais como: a própria Organização Mundial da Saúde, o Banco Mundial, o Centers for Disease Control (CDC), a International

Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), a Royal Netherlands Tuberculosis Association (RNTA) e a American Thoracic Association (ATA) (Ruffino-Netto, 2002).

Segundo a OMS, um terço da população mundial encontra-se infectada pelo *M. tuberculosis*, resultando em 8 a 10 milhões de novos casos por ano. Cerca de 10% dos indivíduos infectados (nove milhões) desenvolvem a tuberculose ativa, 5.000 morrem diariamente e 3 milhões anualmente, atingindo principalmente os jovens e adultos produtivos. De acordo com dados estatísticos, a incidência global da doença continua a crescer. Este aumento tem sido atribuído a diversos fatores, como o aumento da multirresistência aos medicamentos anti-tuberculínicos, o aumento do uso de drogas injetáveis, a pandemia do HIV/AIDS no início dos anos 80, a elevada taxa de abandono ao tratamento, a desigualdade social, o aumento de imigrantes de áreas de alta prevalência para nações desenvolvidas, o envelhecimento da população mundial, a transmissão ativa nos ambientes de aglomeração humana (como prisões, asilos, hospitais e abrigos para mendigos) e a degradação dos sistemas de saúde pública (Bloom e Murray, 1992; Fätkenheuer *et al.*, 1999). Dentre todos os fatores citados, a desigualdade social deve ser enfatizada como o aspecto de maior importância uma vez que essa tem sido a responsável pela geração de pobreza e má nutrição, subcondições de moradia e educação, que inevitavelmente terminam por influenciar praticamente todos os outros fatores associados ao desenvolvimento da tuberculose (Ducati *et al.*, 2006).

Aproximadamente, 95% dos casos de tuberculose ocorrem nos países em desenvolvimento, países esses que detêm 98% dos casos de mortes mundiais pela doença (Khan *et al.*, 2006; OMS, 2009). Tais dados referem-se principalmente a países da África, sudeste asiático e algumas regiões do Pacífico (Figura 2), onde a tuberculose tem se transformado em ameaça tanto para a Saúde Pública quanto para a economia. A doença parece, em certo ponto, estar sob controle em países desenvolvidos como o Japão e os Estados Unidos, mas apresenta manifestações violentas nos países subdesenvolvidos, comumente devido aos fatores anteriormente citados (Ducati *et al.*, 2006). Mesmo assim, é consenso internacional que haja uma intervenção a nível global para o controle da tuberculose (OMS, 2009).

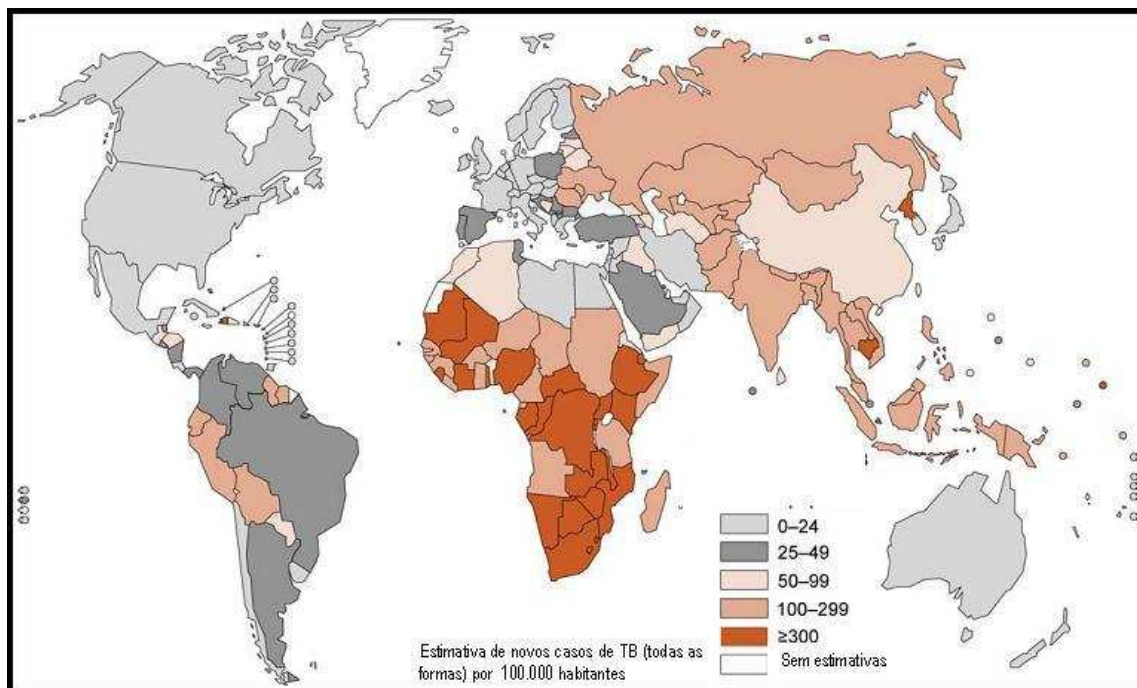


Figura 2. Incidência global de tuberculose. Número de novos casos da doença por 100.000 habitantes em 2007. Fonte: OMS, 2009.

2.2.2. Tuberculose no Brasil

No Brasil, acredita-se que a tuberculose tenha sido introduzida pelos Portugueses e missionários Jesuítas desde 1500 (Ducati *et al.*, 2006), contaminando os índios, tuberculizando-os em massa, na primeira fase da colonização.

Segundo dados da OMS, o País é o único da América Latina incluído entre as 22 nações responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo. Cerca de 80 mil novos casos são diagnosticados anualmente no Brasil. No entanto, estes números estão longe das estimativas da OMS que circulam em torno dos 96 mil casos, evidenciando a deficiência diagnóstica, o perfil de subnotificação dos casos e a ineficiência dos programas de controle da tuberculose (Jamal e Moherdau, 2007; Santo *et al.*, 2009).

Outros 15 mil casos de retratamento, por recidiva ou re-ingresso após abandono, são notificados a cada ano. Este volume de pacientes constitui-se a 9ª causa de internações, o 7º lugar em gastos com internação no Sistema Único de Saúde (SUS), a 2ª causa de mortalidade e a 1ª em pacientes com AIDS devido a doenças infecciosas (Ministério da Saúde, 2009).

No País, inicia-se um novo milênio, mas a tuberculose permanece como um grave problema de saúde pública assim como era no início do século passado. Trata-se de um problema presente e permanente há muito tempo (Ruffino-Netto, 2002; Ministério da Saúde, 2003). Os números do Brasil são extremamente preocupantes, seja considerando a situação do país como um todo ou apenas por regiões. Em 2006, 46,4% dos casos notificados

concentraram-se na região sudeste, 28,5% no nordeste, 10,6% no sul, 9,3% no norte e 4,7% no centro-oeste (SINAN, 2008). Os estados responsáveis pelas maiores taxas de notificação em 2006 foram Amazonas, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Ceará, Acre e Pernambuco, respectivamente, o que corresponde a 63% dos casos do País. Enquanto que os que apresentaram as menores incidências foram Tocantins, Distrito Federal e Goiás (Figura 3).

De 1997 a 2010, o Brasil passou da 10^a para a 19^a posição entre as 22 nações responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo. A constatação é da OMS, que avaliou as ações, em estados e municípios brasileiros, de prevenção e distribuição de medicamentos para o tratamento da doença (Ruffino-Netto, 2002; Cavalcanti *et al.*, 2006; OMS, 2009). Em relação à influência dos fatores responsáveis pelo crescimento dos casos de TB no mundo, o Brasil apresenta uma condição intermediária quando comparado a outros países, e apresenta (ainda) uma prevalência pequena quanto ao problema da multirresistência às drogas, mas lida com grande desigualdade social, apresentando grupos populacionais mais vulneráveis à tuberculose como índios, presidiários e moradores de rua (Ducati *et al.*, 2006; Ministério da Saúde, 2009).

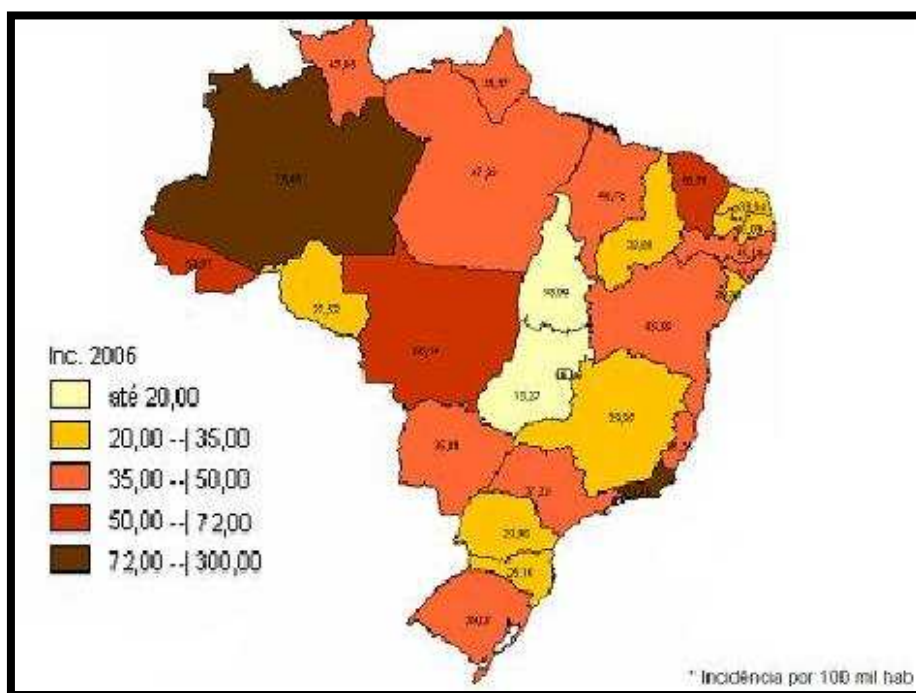


Figura 3. Incidência de tuberculose no Brasil. Número de casos por 100.000 habitantes por unidade federativa em 2006. As cores são indicativas da incidência, quanto mais escuro maiores são as taxas. Fonte: MS, 2009.

2.2.3. Tuberculose em Pernambuco

O Nordeste é a segunda maior região em número de incidência de tuberculose, com 48,7 casos/100.000 habitantes (SINAN, 2008). No estado de Pernambuco, foram notificados, em 2008, 4.200 novos casos de tuberculose, sendo aproximadamente 4% dos casos em crianças e adolescentes (de 0 a 14 anos). Um dos fatores que sinaliza urgência no combate à doença no Estado é a constatação de que Pernambuco encontra-se entre os piores no País em incidência de tuberculose, com uma taxa de 47,79 casos para cada 100 mil habitantes, número este acima da média nacional de 41,7/100 mil habitantes, ficando atrás apenas dos estados do Rio de Janeiro e do Amazonas (SVS, 2009).

Em relação à região Nordeste, Pernambuco permanece em primeiro lugar tanto para as taxas de incidência quanto de mortalidade, uma posição nada animadora para uma doença milenar e que disponibiliza de tratamento. Os esforços para o combate à tuberculose datam desde 1849, quando o médico Joaquim de Aquino Fonseca, dirigente do Conselho Geral de Salubridade da Província de Pernambuco, alertou o governo sobre o aumento dos casos de tuberculose. Em 1894, o médico Octávio de Freitas voltou-se inteiramente para o enfrentamento dessa doença, do qual resultou a criação da Liga Pernambucana contra a Tuberculose, inaugurada em julho de 1900 no Teatro Santa Isabel (Fundo Global, 2008).

Atualmente, o Governo Brasileiro considera Recife uma das cidades brasileiras com maior prioridade para a execução de medidas de controle para a TB. Além disso, a população carcerária é uma das mais afetadas pela doença, tendo sido registrados em 2008, 826 casos nos presídios do Estado (SVS, 2009).

2.3. O Agente Etiológico – *Mycobacterium tuberculosis*

2.3.1. Classificação

São reconhecidas atualmente mais de 120 diferentes espécies de micobactérias (Tortoli, 2006). Estas espécies estão incluídas no gênero *Mycobacterium*, sendo próximo dos Actinomicetos. Esse gênero pertence à família *Mycobacteriaceae* que juntamente com as famílias *Actinomicetaceae*, *Nocardiaceae*, *Streptomyetaceae* e outras famílias bacterianas compõem a ordem Actinomycetales (Frothingham, 1995).

O gênero *Mycobacterium* contém um grande número de espécies, muitas delas saprófitas do solo, e a minoria das espécies são patogênicas ao homem, causando tuberculose (*M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*) e lepra (*Mycobacterium leprae*). Apresenta esta

denominação porque ocasionalmente se observam nas culturas o crescimento das colônias em forma de filamentos semelhante aos fungos. Entretanto, normalmente são vistos ao microscópico como um bacilo típico, sob a forma de bastões (Tortora *et al.*, 2005).

O *M. tuberculosis* é uma forma de transição entre as eubactérias e os actinomicetos. Mede de 1 a 4 µm de comprimento por 0,3 a 0,6 µm de largura, além de apresentar um complexo envelope celular (Figura 4). Trata-se de um bacilo imóvel que não forma esporos, não produz toxinas, aeróbio estrito e cujo único reservatório é o ser humano. É um microorganismo considerado parasita intracelular facultativo, sendo capaz de sobreviver no interior de células fagocitárias, estabelecendo sua infecção, preferencialmente, nos pulmões, onde normalmente condiciona-se a um estado de latência, enquanto o sistema imunológico do hospedeiro prevalece e mantém a infecção sob controle (Kritski *et al.*, 2000).

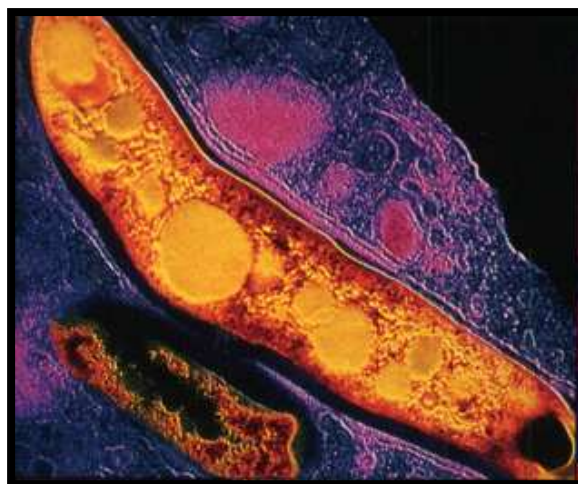


Figura 4. Microscopia eletrônica do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Fonte: <http://www.students.stedwards.edu/arui5/>

É considerada também uma micobactéria álcool-ácido resistente, de crescimento lento, com tempo de geração de 18 a 48 horas, tanto em meio artificial quanto em organismos animais, dependendo da oferta de oxigênio, de nutrientes e do pH do meio, sendo necessárias várias semanas para que as colônias tornem-se visíveis no meio de cultura (Kritski *et al.*, 2000; Ducati *et al.*, 2006). Muitas das características dessas micobactérias, como sua coloração álcool-ácido resistente, a resistência a drogas, sua patogenicidade e a taxa de crescimento lento, estão relacionadas à estrutura lipídica, distinta, de sua parede celular. Essa parede é formada, em sua porção externa, por ácido micólico, que forma uma camada cerosa, resistente à água. Devido à peculiaridade de sua parede celular, as micobactérias conseguem resistir a situações adversas como o ressecamento e algumas drogas antimicrobianas não conseguem penetrar por sua parede (Tortora *et al.*, 2005). O crescimento lento desse gênero de bactérias deve-se à dificuldade em que os nutrientes têm de atravessar sua parede celular. Normalmente

levam-se semanas para que se consiga visualizar uma colônia crescida em meio de cultura específico para as micobactérias (Tortora *et al.*, 2005).

2.4. Mecanismo de Transmissão e Patologia

No decorrer da história, a tendência do homem a reunir-se em grupos populacionais, associada à transmissão do *M. tuberculosis* por aerossóis, possibilitou o estabelecimento da tuberculose como uma epidemia (Coberly e Chaisson, 2001). Em circunstâncias naturais, o *M. tuberculosis* é transmitido pela expulsão de gotas nasais provenientes de um indivíduo infectado para um não-infectado. Pacientes com TB ativa usualmente tosse em decorrência da típica inflamação crônica pulmonar que constitui o principal mecanismo de disseminação do patógeno para novos hospedeiros (Glickman e Jacobs, 2001). Ao tossir, espirrar ou falar, os bacilos presentes na secreção pulmonar são atomizados em gotículas microscópicas (gotículas de Pflügge), e após sofrerem evaporação, permanecem em suspensão no ar, na forma de um núcleo infeccioso composto de um ou dois bacilos (núcleo de Wells). Este núcleo, de dois a dez micra de diâmetro, pode ser aspirado por uma pessoa sadia, ultrapassar os mecanismos de defesa inespecíficos da árvore respiratória e alcançar os alvéolos, iniciando assim o processo patológico (Figura 5), representando uma doença altamente contagiosa (Bloom e Murray, 1992; Clark-Curtiss e Haydel, 2003).

A possibilidade de instalação de uma lesão progressiva é diretamente proporcional ao número de bacilos inalados e à virulência destes; e é inversamente proporcional à resistência natural e adquirida do hospedeiro. Macrófagos alveolares, responsáveis pela defesa da mucosa alveolar, englobam os bacilos da tuberculose, e caso esses macrófagos sejam ativados, os fagossomos contendo o bacilo fusionam-se com os lisossomos e as micobactérias são então mortas. Contudo, se o macrófago não for ativado, dá-se início a um processo de co-existência pacífica entre o bacilo e o hospedeiro humano, como uma forma latente de infecção. O bacilo, então, sobreviverá dentro do fagossomo, alterando este compartimento intracelular de maneira a evitar sua fusão com o lisossomo. Em casos de imunossupressão, o bacilo dará início ao processo de multiplicação; esse processo se estenderá até a lise do macrófago, liberação dos bacilos no tecido pulmonar e subsequente englobamento por novos macrófagos (Clark-Curtiss e Haydel, 2003).

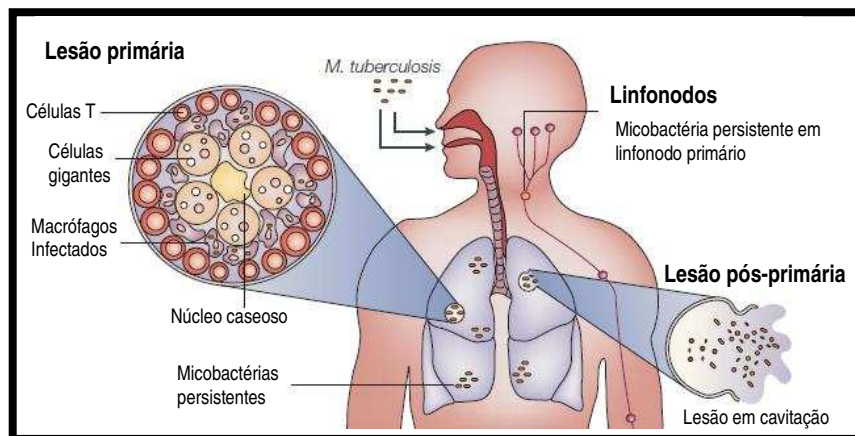


Figura 5. Mecanismo de transmissão e patogênese da tuberculose. A doença pode se apresentar na forma latente (lesão primária e formação do granuloma) ou ativa (lesão pós-primária e disseminação do bacilo).

Fonte: Modificado de Stewart *et al.* (2003).

No entanto, nem todas as pessoas infectadas com o *M. tuberculosis* desenvolvem a doença. Observa-se uma grande variabilidade nas taxas de infecção entre as pessoas expostas a diferentes fontes de infecção, e entre os infectados, cerca de 90% nunca irão desenvolver a doença. A probabilidade de vir a desenvolver a forma ativa da tuberculose é de cerca de 5% no primeiro ano e de 10% durante toda a vida (Clark-Curtiss e Haydel, 2003; Ducati *et al.*, 2006). Além disso, existem diferenças na capacidade de transmissão entre os pacientes, devido à variabilidade da carga bacteriana. Evidências experimentais sugerem igualmente que a variação observada no potencial de transmissão pode ser atribuída a diferenças nas características patogênicas do bacilo. O *M. tuberculosis* pode apresentar variações quanto à virulência de maneira que cepas mais virulentas apresentam maior patogenicidade ou capacidade de desenvolvimento da doença (Bloom e Small, 1998). Da mesma forma, deve-se salientar que variedades de resposta observadas nos indivíduos expostos ao *M. tuberculosis* podem contribuir para padrões de desenvolvimento diferencial da doença, sendo alvo de diversos estudos.

Do mesmo modo, admite-se ainda que diferenças na resposta à infecção ao bacilo encontram-se relacionadas às características genéticas do hospedeiro. Nos indivíduos mais susceptíveis, o risco de adoecer depende da habilidade de seu sistema imunológico em prevenir a multiplicação do *M. tuberculosis* dormente. Fatores genéticos, principalmente polimorfismos de base única em diferentes genes da imunidade, têm sido descritos e associados com a tuberculose, podendo desempenhar um importante papel na susceptibilidade à doença (Oliveira *et al.*, 2004).

2.5. Visão Geral dos Métodos Diagnósticos e Tratamento

A prioridade mais importante para o controle da TB reside em um acurado diagnóstico e em um tratamento dinâmico das pessoas infectadas e doentes, resultando na interrupção da transmissão e na cura dos pacientes (Ferreira *et al.*, 2005). Na falta de um tratamento efetivo, a mortalidade da TB é cerca de 50% ou mais (OMS, 2009). Desde a descoberta da doença, a base para seu diagnóstico definitivo tem sido a detecção do bacilo nas amostras clínicas. A partir do advento da microscopia em 1882, avanços tecnológicos têm permitido que uma carga bem menor de bacilos seja identificada. Contudo, os níveis de sofisticação e custos associados com técnicas mais sensíveis tem tornado sua aplicação impraticável nos países subdesenvolvidos (OMS, 2009).

O diagnóstico inicial da tuberculose é usualmente baseado na sintomatologia e nos achados clínicos, mas o diagnóstico definitivo requer o isolamento e a identificação do agente infeccioso (Khan *et al.*, 2006). Os procedimentos laboratoriais usuais se baseiam no exame microscópico do bacilo álcool-ácido resistente, através da baciloscopia, e da cultura com testes de susceptibilidade às drogas (Hudson *et al.*, 2000; Hargreaves *et al.*, 2001).

A baciloscopia é um dos testes diagnósticos mais comumente utilizados em todo o mundo para detecção do bacilo da tuberculose. Esse teste consiste na visualização microscópica das micobactérias, após coloração específica pelo Ziehl-Neelsen (Mello, 2001). No entanto, a técnica apresenta sensibilidade limitada por necessitar de concentrações elevadas do bacilo para a detecção, cerca de 5.000 a 10.000 micobactérias por mL de espécime clínico, justificando os resultados negativos deste método nas formas paucibacilares da doença (Hudson *et al.*, 2000; Hargreaves *et al.*, 2001).

O isolamento e a identificação do *M. tuberculosis* através da cultura é a metodologia que permite a confirmação da tuberculose, sendo considerada atualmente o padrão-ouro para o diagnóstico da doença, responsável pela identificação do bacilo em mais de 80% dos pacientes doentes e com especificidade acima de 98% (Arnold, 2007; OMS, 2009). Apesar de ser um método mais caro que a baciloscopia, a cultura apresenta inúmeras vantagens como maior sensibilidade, necessitando de uma carga bacilífera menor que a da microscopia. Ao mesmo tempo, permite a identificação das espécies que estão envolvidas na infecção e promoção da TB, além de caracterizar a susceptibilidade das cepas aos medicamentos anti-tuberculínicos. Contudo, devido ao crescimento lento, peculiar das micobactérias, a obtenção dos resultados por meio da cultura pode levar cerca de seis a oito semanas, retardando a confirmação diagnóstica (Huggett *et al.*, 2003; Singh, 2006).

A partir de 1950, com a descoberta da estrutura do DNA (ácido desoxirribonucléico), a biologia molecular se revelou uma ferramenta útil no diagnóstico de doenças infecciosas, através da identificação de seqüências gênicas específicas de um agente causador de doença. A partir do seqüenciamento do genoma do *M. tuberculosis*, foram identificadas inúmeras regiões, como o elemento de inserção IS6110, permitindo a identificação específica do bacilo (Cole *et al.*, 1998).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é atualmente considerada um método rápido e sensível para a detecção do *M. tuberculosis*, sendo capaz de detectar menos que 10 bacilos por mL em diferentes espécimes biológicos (Honoré-Bouakline *et al.*, 2003; Assis *et al.*, 2007). Esta técnica vem sendo utilizada como uma alternativa de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico rápido de doenças infecciosas. Entretanto, a sua aplicação na detecção do *M. tuberculosis* tem apresentado resultados variáveis, principalmente em relação à sensibilidade do teste. Por essa razão, alguns autores têm buscado avaliar o desempenho de várias seqüências-alvo e o seu potencial diagnóstico (Ogusku e Salem, 2004).

Embora a tuberculose seja uma doença grave, ela apresenta cura na maioria dos casos, desde que, uma vez diagnosticada, a quimioterapia adequada seja empregada. O tratamento atualmente recomendado pela OMS consiste na administração de drogas como a isoniazida, rifampicina, pirazinamida e estreptomicina (ou etambutol) durante os primeiros 2 meses, seguido pela combinação de isoniazida e rifampicina por pelo menos 4 meses adicionais. Contudo, o longo tratamento envolve efeitos secundários indesejáveis, levando o paciente ao abandono da quimioterapia e ao surgimento de cepas resistentes aos tuberculostáticos. O não-cumprimento do tratamento tem levado a OMS a investir em uma estratégia global, através de um processo conhecido atualmente como tratamento diretamente observado de curso breve (DOTS), em que trabalhadores de saúde aconselham os doentes, realizam vigilância progressiva e certificam-se de que cada medicamento seja tomado na dose correta (Ducati *et al.*, 2006).

A resistência bacteriana às drogas é uma ameaça aos programas de controle da tuberculose em todo o mundo, uma vez que, pacientes infectados com cepas resistentes e multirresistentes têm menor probabilidade de se curarem, especialmente, se estão infectados pelo HIV ou estão acometidos por outras patologias. Acrescenta-se ainda, que o tratamento é mais tóxico e 700 vezes mais dispendioso que o de pacientes com organismos sensíveis (Barroso *et al.*, 2004).

A resistência bacteriana não se constitui em fenômeno novo e tampouco se refere a uma nova forma de doença. Desde o aparecimento de drogas antituberculose se observa a presença de bacilos naturalmente resistentes em populações selvagens de *M. tuberculosis*.

Hoje, praticamente todos os fármacos conhecidos têm um ou mais genes relacionados ao surgimento da resistência já descritos (Barroso *et al.*, 2004). No Brasil, a questão da tuberculose multidroga-resistente (TB-MDR) concentra-se menos em seu tamanho e mais no seu potencial de disseminação. Ainda que em baixas prevalências, o surgimento de novos casos de TB-MDR está diretamente relacionado à ineficiência dos serviços de saúde, pela incapacidade de detectar casos novos da doença, bem como pela ocorrência de tratamentos com desfechos desfavoráveis, como abandono e falência (Vieira *et al.*, 2007).

Nesta perspectiva parte-se do pressuposto que os esforços para o diagnóstico e tratamento da doença devem considerar não apenas a regularidade no tratamento, mas também o perfil sócio-demográfico/clínico-epidemiológico dos pacientes acometidos. Ampliar os conhecimentos relacionados ao indivíduo pode vir a contribuir para melhor desempenho nas questões referentes ao processo saúde-doença e consequentemente na qualidade de vida do paciente (Siqueira *et al.*, 2006).

2.6. Fatores Genéticos envolvidos na Susceptibilidade ao *M. tuberculosis*

Embora a infecção pelo *M. tuberculosis* seja necessária, ela por si só não é suficiente para ocasionar a tuberculose na maioria das pessoas. Tal fato encontra-se fundamentado na variedade de respostas observadas nos indivíduos expostos ao bacilo. Algumas pessoas apesar de expostas nunca são infectadas, outras são infectadas, mas nunca desenvolvem a doença, e, no entanto apenas 10% dos infectados desenvolvem a tuberculose ativa (Möller *et al.*, 2009). Fatores genéticos humanos que governam se o indivíduo infectado irá progredir para a tuberculose ativa ou não encontram-se diretamente relacionados com o estado imunológico do organismo, geralmente determinado pela constituição genética do mesmo (Ferguson *et al.*, 2007; Möller *et al.*, 2009).

Admitia-se inicialmente que outras doenças como as cardiovasculares, o câncer e a diabetes encontravam-se sob a influência de fatores genéticos, e que as mortes causadas por doenças infecciosas eram devido a condições sócio-econômicas desfavoráveis ou simplesmente infortúnio (Bellamy, 1998). Contudo, inúmeros estudos têm comprovado a importância da contribuição dos fatores genéticos no desenvolvimento da tuberculose, com uma herdabilidade variando de 36% a 80% (Jepson *et al.*, 2001; Kimman *et al.*, 2006).

2.6.1. Evidências da Influência Genética na Susceptibilidade Humana ao *M. tuberculosis*

A idéia de que fatores genéticos exercem influência na susceptibilidade ou resistência à tuberculose tem sido admitida há pelo menos 100 anos, sendo reconhecidas diferenças na vulnerabilidade à doença entre diferentes populações (Bellamy, 1998). Antes da descoberta do *M. tuberculosis* como agente etiológico, observava-se que a tuberculose ocorria frequentemente em vários membros de uma mesma família, sugerindo um caráter possivelmente hereditário. No entanto, a descoberta e identificação do bacilo de Koch chamaram a atenção para o patógeno, enquanto que os aspectos referentes ao hospedeiro, como seu genoma, foram simplesmente ignorados (Möller *et al.*, 2009).

Um dos exemplos que chamaram a atenção para a importância dos aspectos do hospedeiro, confirmando a existência da variabilidade na susceptibilidade ao *M. tuberculosis*, aconteceu na cidade de Lübeck, na Alemanha, em 1926, onde 251 crianças foram acidentalmente vacinadas com cepas virulentas de *M. tuberculosis*. Destas, 77 morreram, 127 apresentaram sinais radiológicos da doença e 47 não demonstraram nenhuma evidência de tuberculose (Alcaïs e Abel, 2004).

Provas mais convincentes de que fatores genéticos do hospedeiro são importantes na susceptibilidade à tuberculose foram demonstradas através de estudos com gêmeos. Gêmeos mono e dizigóticos foram comparados em relação à concordância no desenvolvimento da doença. Observou-se que gêmeos monozigóticos, idênticos essencialmente em sua composição genética, demonstraram concordância em relação ao aparecimento da tuberculose quando comparados aos gêmeos dizigóticos. Segundo Comstock (1978), tais evidências indicam que fatores genéticos são os principais contribuintes para a progressão da doença, uma vez que gêmeos normalmente compartilham um ambiente similar (Bellamy, 1998).

As evidências obtidas através desses estudos alavancaram as pesquisas no cenário da resposta do hospedeiro à infecção pelo *M. tuberculosis*. A partir daí, estudos com modelos-animais auxiliaram a desvendar algumas das questões relacionadas a esta problemática. Inúmeros modelos foram utilizados para estudos de tuberculose, incluindo primatas não-humanos, ratos, coelhos, porquinhos da Guiné e peixes (Flynn, 2006), no entanto, ratos e coelhos são empregados mais frequentemente em estudos de avaliação do componente genético na susceptibilidade à tuberculose. A utilização destes modelos permitiu a identificação dos primeiros genes-candidatos, envolvidos nos padrões de vulnerabilidade ao *M. tuberculosis* (Möller *et al.*, 2009).

Os estudos desenvolvidos na área de identificação de marcadores de susceptibilidade a doenças apresentam abordagens alternativas, principalmente para doenças complexas e multifatoriais, como no caso da tuberculose. Tais abordagens incluem análises de ligação do genoma e estudos de associação de possíveis genes-candidatos, utilizados na maioria das pesquisas de susceptibilidade (Möller *et al.*, 2009).

Estudos de ligação ou “linkage” têm sido empregados para detecção de regiões cromossômicas contendo possíveis genes envolvidos na susceptibilidade, através de uma ampla inspeção do genoma, o que garante que todas as principais regiões genômicas envolvidas na susceptibilidade à doença sejam identificadas. Isso proporciona a oportunidade de encontrar novos genes ou vias que inicialmente não se suspeitavam que estivessem envolvidas na doença em questão. Os estudos de ligação presumem que estas regiões cromossômicas segregam de maneira não-aleatória e tem como objetivo identificar tais regiões. Esta abordagem é bastante eficiente para doenças monogênicas, uma vez que permite o fino mapeamento dos genes de interesse, entretanto, este tipo de estudo não é indicado para doenças complexas, onde, em geral, várias regiões cromossômicas que abarcam muitos genes podem estar associadas aos padrões de susceptibilidade (Alcaïs e Abel, 2004). De acordo com Möller *et al.* (2009) existem atualmente seis grandes mapas de ligação do genoma realizados na área de genética da tuberculose humana. O primeiro destes estudos de ligação foi realizado utilizando pacientes da Gâmbia e África do Sul (Bellamy *et al.*, 2000), identificando possíveis genes de susceptibilidade nos cromossomos 15q e Xq. Estudos realizados com brasileiros por Miller e colaboradores (2004) em pacientes com tuberculose e hanseníase sugeriram a presença de genes candidatos em três regiões cromossômicas 10q26.13, 11q12.3 e 20p12.1.

No caso dos estudos de associação, a frequência de um alelo específico é comparada entre a população de indivíduos afetados (casos) e a de não-afetados (controle), quando estas populações encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Lander e Schork, 1994). Estudos de associação baseados em populações caso-controle podem detectar pequenos efeitos de determinados genes e muitos destes estudos foram capazes de validar a associação entre genes com padrões de susceptibilidade/resistência ou de detectar caminhos novos, envolvidos na patogênese de inúmeras doenças (Maartens e Wilkinson, 2007). Os resultados encontrados para a investigação de susceptibilidade do organismo à tuberculose têm sido obtidos através de estudos de associação, devido ao poder de detecção de pequenos efeitos gênicos quando comparado aos estudos de ligação, desde que o tamanho da amostra analisada seja adequado (Risch e Merikangas, 1996).

Os componentes genéticos de susceptibilidade a tuberculose parecem encontrar-se espalhados entre inúmeros genes, tendo sido estudados extensivamente nos últimos anos,

resultando em uma grande quantidade de informação. Vários genes, como o *HLA* (Antígenos de Leucócitos Humanos), *NRAMP1* (2q35), *IFNG* (12q14), *NOS2A* (17q11.2-12), *SP110* (2q37.1), *CCL2* (17q11.2-q12), *MBL2* (10q11.2-q21), *CD209* (19q13), *VDR* (12q13.11) e *TLR* (Receptores de homologia-Toll), têm sido associados com a tuberculose, alguns repetidamente, enquanto outros apresentam padrões de susceptibilidade diferenciada de acordo com a população étnica examinada (Burgner *et al.*, 2006), enfatizando a complexidade que caracteriza a susceptibilidade do hospedeiro segundo a origem da população (Ardlie *et al.*, 2002).

2.7. Imunologia da Tuberculose

2.7.1. Imunidade Inata como Fonte de Pesquisa

O corpo humano está permanentemente exposto a milhares de microrganismos potencialmente patogênicos, incluindo bactérias, vírus e fungos. Portanto, não é surpreendente que o nosso organismo tenha desenvolvido, durante milênios de evolução, um sistema de reconhecimento e combate a uma variedade de agentes infecciosos: o sistema imunológico (Medzhitov e Janeway, 2002). O papel do sistema imunológico está longe de ser simples quando se considera que diversos patógenos podem apresentar-se com uma grande variedade de formas. Além disso, os microrganismos, devido ao seu curto ciclo de vida, evoluem mais rapidamente do que o sistema imunológico em si. Muitos microrganismos se comportam como patógenos oportunistas, o que significa que eles estão constantemente presentes na epiderme, mucosas ou trato intestinal e só desencadeiam alguma patologia quando a homeostase do organismo é prejudicada, como é o caso da *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (Rook e Hernandez-Pando, 1996; Hernandez-Pando *et al.*, 2009).

Muitos livros de Imunologia classificam o sistema imunológico em duas classes: a imunidade inata e a imunidade adquirida, a primeira responsável por uma atuação precoce de defesa contra agentes patogênicos e a segunda responsável por uma resposta tardia, mas precisa e direcionada. Avanços no campo da Imunologia têm demonstrado claramente que esta classificação tem se tornado apenas didática, e tem-se aceitado que a imunidade inata e a imunidade adquirida apresentam na verdade uma forte interação entre elas (Hernandez-Pando *et al.*, 2009).

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa contra a infecção por microrganismos, muitas vezes fornecendo uma proteção adequada ao corpo, sem a

necessidade de qualquer resposta imune adquirida. A principal vantagem da imunidade inata quando confrontada com a adquirida é o fato de que as proteínas e peptídeos deste sistema, em geral, encontram-se disponíveis no local da infecção, enquanto que a maturação da imunidade adquirida exige um tempo maior (Medzhitov e Janeway, 2002).

Proteínas pertencentes ao sistema imune inato apresentam um grande potencial como alvos moleculares para o estudo da susceptibilidade do hospedeiro a diversos tipos de infecções, por se tratarem da primeira parte do sistema imunológico a entrar em contato com os patógenos. As proteínas da imunidade inata são expressas em uma grande variedade de tecidos, principalmente nas áreas mais vulneráveis do corpo humano, como a cavidade oral ou trato reprodutivo. É plausível supor que as diferenças interindividuais na infecção do *M. tuberculosis* e na progressão à tuberculose são parcialmente explicadas pelas variações existentes no perfil genético da imunidade inata. Como o sistema imunológico inato mantém um controle rígido sobre o processo de inflamação, tal sistema tem sido apontado como um mecanismo potencial de controle durante a infecção do *M. tuberculosis* (Hernandez-Pando *et al.*, 2009).

2.7.2. Aspectos do Sistema Imunológico na Tuberculose

Por tratar-se de uma doença crônica que essencialmente afeta os pulmões, a tuberculose em seu curso produz profundas alterações no sistema imunológico (Rook e Hernandez-Pando, 1996). Dessa forma, o papel que a resposta imunológica possui contra a TB é de fundamental importância no controle da infecção do *M. tuberculosis* (Hernandez-Pando *et al.*, 2009).

O *M. tuberculosis* é um organismo intracelular facultativo que via de regra atinge os pulmões através da rota aerogênica. Assim, tanto macrófagos alveolares como o epitélio das vias aéreas são as primeiras células a confrontarem com as micobactérias (Hernandez-Pando *et al.*, 2009). Os macrófagos alveolares apresentam um papel essencial na eliminação de partículas que entram no organismo através das vias aéreas, sendo considerados a primeira população de células a interagirem com os bacilos da tuberculose. Inúmeros monócitos, maturados e diferenciados em macrófagos teciduais, são recrutados da corrente sanguínea e encarregados de controlar a infecção no hospedeiro. As interações iniciais entre os bacilos e os macrófagos ocorrem através de receptores para fatores do sistema complemento, proteínas surfactantes, CD14, CD43 e resíduos de manose. Neste ponto, a interação entre os resíduos de lipoarabinomanose presentes na superfície das micobactérias e a lectina ligadora de manose

(MBL) podem iniciar a ativação do Sistema Complemento e a fagocitose pelos macrófagos bem como a indução de respostas de citocinas inflamatórias (Alagarasu *et al.*, 2007).

Além dos macrófagos alveolares, as células epiteliais das vias aéreas são outra população celular a interagir com o *M. tuberculosis*. De fato, o número de células epiteliais nos alvéolos é 30 vezes maior que o número de macrófagos e da mesma forma a probabilidade de serem as primeiras células expostas ao bacilo infectante é maior. As células epiteliais são capazes de estabelecer um ambiente pró-inflamatório nos primeiros estágios da infecção, secretando um grupo de pequenos peptídeos endógenos, conhecidos como defensinas. Estes peptídeos catiônicos, consistindo de aproximadamente 30 a 50 aminoácidos, encontram-se presentes nas células mielóides e epiteliais de todas as espécies animais, apresentando atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral (Hernandez-Pando *et al.*, 2009).

Sendo assim, é possível perceber que inúmeras moléculas destacam-se como importantes componentes da resposta inata contra os primeiros estágios da infecção do *M. tuberculosis*, sugerindo especialmente que tanto a MBL quanto as defensinas representam componentes importantes no mecanismo de resposta ao bacilo, podendo se tornar novos alvos de pesquisa e em longo prazo novas ferramentas terapêuticas.

2.7.3. Proteínas da Imunidade Inata I: Lectina Ligadora de Manose (MBL)

A existência de proteínas capazes de se ligarem a carboidratos foi inicialmente descrita em 1975, por Robinson e colaboradores, no soro de mamíferos. Tais proteínas humanas, denominadas de lectinas, foram isoladas pela primeira vez em 1978 por Kawasaki e colaboradores a partir de frações citosólicas do fígado de coelhos. Posteriormente, Wild e sua equipe foram capazes de isolar a chamada lectina ligadora de manose (MBL) em humanos e em fígado de ratos. Mais recentemente, a transcrição extra-hepática da MBL foi reportada, apresentando inúmeras implicações sobre o seu papel na defesa localizada do hospedeiro (Dommett *et al.*, 2006; Seyfarth *et al.*, 2006). A MBL é um importante componente do sistema imune inato, pertence a uma família de proteínas designada colectinas, devido à presença de uma região de colágeno e um domínio de lectina. Trata-se de uma proteína secretada pelo fígado, capaz de reconhecer e se ligar a carboidratos de uma ampla gama de agentes patogênicos, incluindo bactérias, fungos e parasitas celulares, ativando o Sistema Complemento (Turner, 2004).

O Sistema Complemento foi descrito pela primeira vez em 1890 e consiste atualmente em um complexo com mais de 30 proteínas do plasma e de superfície celular. É reconhecido pelo alto e sofisticado papel que desempenha na defesa do organismo, eliminando da

circulação os complexos antígeno-anticorpo e alguns de seus elementos atuam como mediadores inflamatórios, auxiliando no combate à infecção (Fujita, 2002). Para que o Sistema Complemento expresse a sua atividade é necessária a sua ativação prévia. Até o momento, existem descritos três tipos diferentes de ativação: a via clássica, a via das lectinas e a via alternativa (Figura 6). A via clássica é ativada por complexos antígeno-anticorpo, enquanto que as outras duas - a lectina e a alternativa – funcionam na defesa da imunidade inata. A via da lectina envolve o reconhecimento de carboidratos presentes na superfície dos patógenos através de receptores de reconhecimento padrão como os existentes na MBL, e a subsequente ativação de enzimas associadas, conhecidas como serino-proteases associadas à MBL (MASPs). A via alternativa é iniciada pela ligação covalente de uma pequena quantidade do terceiro componente do Complemento (C3) aos grupos hidroxila ou amina presentes da mesma forma na superfície de microorganismos, o que não implica nesse caso no reconhecimento específico de moléculas (Fujita, 2002).

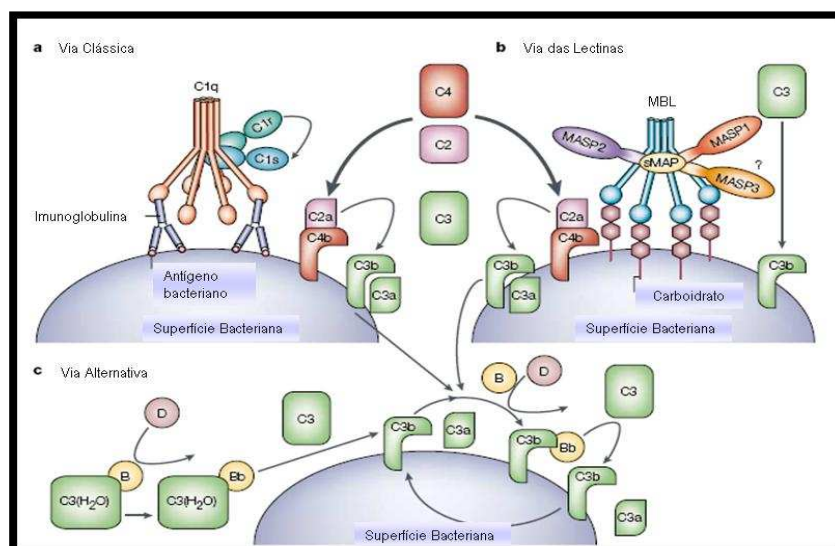


Figura 6. Vias de ativação do Sistema Complemento. a) Via Clássica, iniciada pela ligação do complexo C1 aos anticorpos ligados aos antígenos bacterianos; b) Via das Lectinas, iniciada pela ligação do complexo MBL-MASP à manose presente na superfície bacteriana; c) Via Alternativa, iniciada pela ativação de C3 mediante a hidrólise de C3(H₂O) e fator Bb. Fonte: modificado de Fujita (2002).

A estrutura protéica da MBL tem sido estudada extensivamente e consiste em múltiplos de cadeias polipeptídicas idênticas de 25 kDa. Cada cadeia é composta por quatro regiões distintas codificadas por éxons diferentes presentes no gene *MBL2*. Cada cadeia apresenta uma região C-terminal com um domínio de reconhecimento de carboidrato dependente de cálcio (CRD), uma curta região α -helicoidal hidrofóbica, seguida de uma região de homologia com o colágeno e uma região N-terminal, rica em cisteína (Dommett *et*

al., 2006). Três cadeias polipeptídicas formam uma tripla hélice na região de colágeno, que se estabilizam por interações hidrofóbicas e pontes de dissulfeto na região N-terminal. No soro humano, a MBL consiste de oligômeros que variam de dímeros a hexâmeros, e estudos cristalográficos com raios-X demonstraram que os oligômeros de MBL originam uma estrutura em forma de “bouquet”, devido a uma interrupção na região colagenosa, dando origem a uma ligeira curvatura na estrutura de tripla-hélice (Figura 7).

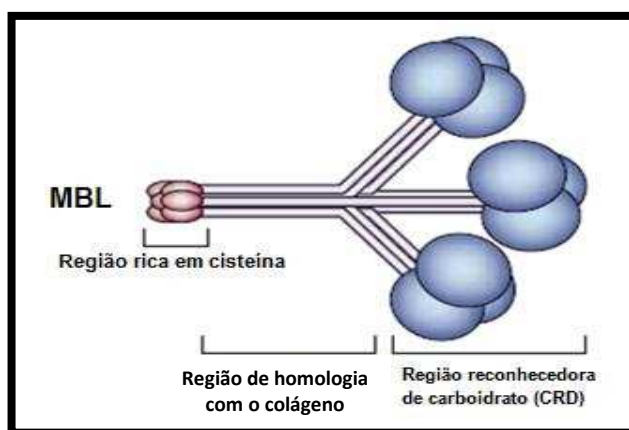


Figura 7. Esquema da estrutura protéica da MBL. A MBL é um oligômero de subunidades estruturais. Cada subunidade é formada por quatro regiões distintas, uma rica em cisteína, uma região de homologia com o colágeno, a região do pescoço e a região reconhecedora de carboidrato. Fonte: modificado de Fujita (2002).

A MBL apresenta papel fundamental no sistema imune inato humano ligando-o ao sistema imune adaptativo. No momento em que suas múltiplas cabeças reconhecedoras de carboidratos se ligam na superfície dos microrganismos, uma cascata de reações é gerada, ativando o Sistema Complemento (Ip *et al.*, 2005). A compreensão a cerca da função da MBL cresceu rapidamente nas últimas três décadas. Reconhece-se agora seu importante papel em diferentes processos, além da ativação do Complemento, como a promoção da opsonofagocitose, modulação do processo de inflamação, reconhecimento de estruturas alteradas e depuração de células apoptóticas (Ip *et al.*, 2005).

Os complexos de início da ativação do Complemento, através da via da lectina, incluem o reconhecimento das células patogênicas pelo domínio CRD e a ativação do componente enzimático MASP. A ligação da MASP à MBL ocorre no domínio rico em cisteína de modo que ambas as proteínas circulem como um complexo (Wallis, 2003). A MBL ao reconhecer os carboidratos dos patógenos, principalmente a manose, a N-acetilglucosamina e a fucose, realiza a auto-clivagem da MASP, de forma que a porção que permanece associada à MBL possa ativar o sistema complemento através da clivagem de seu componente C4 e dar início ao processo de eliminação das partículas patogênicas (Wallis, 2003).

2.7.4. Polimorfismos no gene *MBL2* e a deficiência de MBL

No genoma humano, existem dois genes para MBL, mas apenas o *MBL2* codifica uma proteína funcional, visto que o *MBL1* trata-se de um pseudogene. O gene codificador da MBL é formado por quatro éxons e encontra-se localizado no cromossomo 10 (10q11.2-q21). O primeiro éxon codifica toda a porção rica em cisteína e uma parte do domínio de colágeno. A outra porção do domínio de colágeno é codificada pelo éxon 2. Os éxons 3 e 4 codificam a região do pescoço e o domínio reconhecedor de carboidrato, respectivamente (Figura 8) (Wallis, 2003).

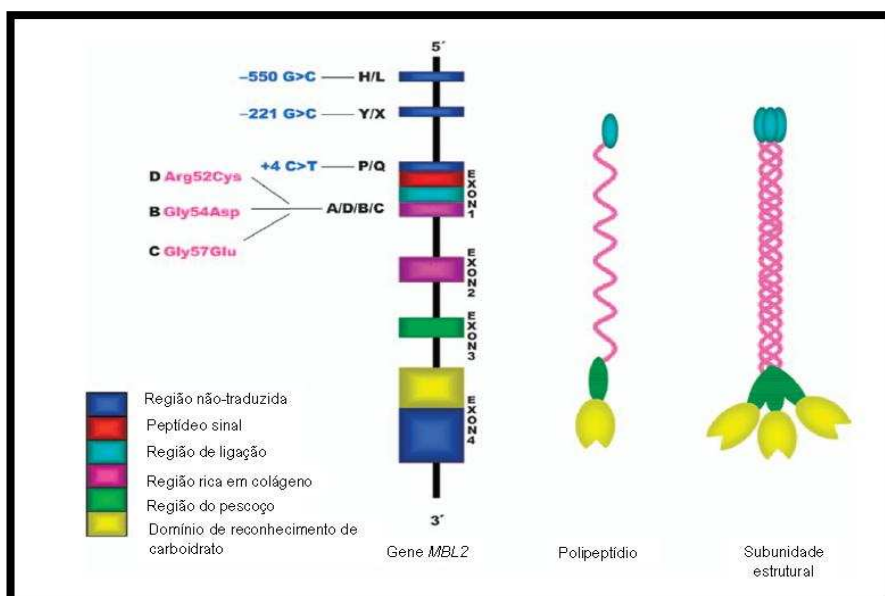


Figura 8. Estrutura gênica e proteica da MBL, mostrando as posições dos polimorfismos do éxon 1 e do promotor. Diferentes regiões do polipeptídeo são codificados por éxons diferentes do gene *MBL2*. Três polipeptídeos idênticos de 32 kDa formam uma subunidade estrutural, baseado na formação de uma hélice de colágeno triplo. Fonte: modificado de Dommett *et al.*, 2006.

Deficiências na produção de MBL têm sido associadas em grande parte pela presença de três polimorfismos de base única (SNPs) nos códons 52, 54 e 57 do éxon 1 do *MBL2* (Turner, 2004). Estas mutações são freqüentemente referidas como variantes D, B e C, respectivamente, em comparação com o tipo selvagem. A variante B ocorre em 22-28% das populações da Eurásia, enquanto que a variante C é característica de populações sub-Saarianas, atingindo freqüências de 50-60%. A variante D atinge freqüências de 14% em populações européias, podendo ser menos freqüente em outros lugares (Dommett *et al.*, 2006).

As mutações localizadas no éxon 1 do *MBL2* comprometem a oligomerização da proteína final, em virtude da troca de aminoácidos que tais mutações acarretam, levando a uma deficiência funcional da MBL. No caso das variantes B e C, a substituição de glicinas

axiais da tripla hélice de colágeno por ácidos dicarboxílicos, resulta na distorção da hélice e desestabilização do polipeptídeo. Enquanto que na variante D, o efeito da mutação implica na substituição de um resíduo de arginina por um de cisteína (Madsen *et al.*, 1994). A presença de resíduos extra de cisteína provoca a formação de pontes de dissulfeto adicionais, reduzindo dramaticamente a formação de oligômeros mais complexos (Dommett *et al.*, 2006).

A região promotora do gene *MBL2* contém uma série de elementos regulatórios, que afetam a transcrição da proteína. Além das mutações citadas para o éxon 1, vários polimorfismos têm sido descritos para a região promotora (Madsen *et al.*, 1994). As variantes são denominadas de H/L, X/Y e P/Q, localizadas nas posições -550, -221 e +4, respectivamente. Estes polimorfismos se combinam para formar haplótipos que apresentam-se em forte desequilíbrio de ligação com as mutações do éxon 1, resultando em sete haplótipos comuns, HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, HYPD, LYPB e LYQC. A figura 9 ilustra as diferenças na frequência destes haplótipos em determinadas populações e destaca o grau de variação étnica. Outros haplótipos raros também foram descritos (Boldt e Petzl-Erler, 2002).

A combinação entre os polimorfismos das regiões estruturais e promotoras podem ocasionar uma variação dramática na concentração de MBL em indivíduos aparentemente saudáveis, de até 1.000 vezes no soro humano. Os indivíduos heterozigotos ou homozigotos para as mutações da MBL parecem ser incapazes de alcançar os níveis de proteína daqueles que possuem um genótipo selvagem, servindo de base para a maioria dos estudos que tem explorado a questão em relação do papel da MBL e a aquisição de um organismo infeccioso (susceptibilidade) ou a natureza do curso clínico de uma doença (gravidade) (Dommett *et al.*, 2006).

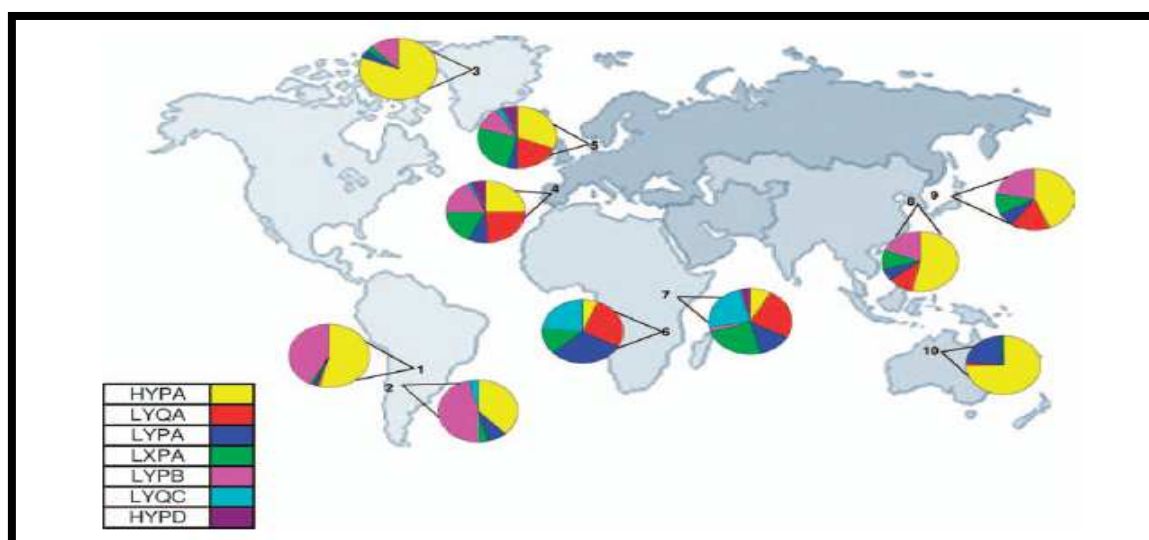


Figura 9. Mapa da distribuição das dos haplótipos da MBL em diferentes populações. As frequências dos haplótipos do MBL2 variam em diferentes populações. A variante A (tipo selvagem) é encontrada em associação com quatro diferentes haplótipos do promotor, HYPA, LYQA, LYPA e LXPA. Fonte: Dommett *et al.*, 2006.

2.7.5. Proteínas da Imunidade Inata II: β -Defensina Humana 1 (HBD-1)

Uma parte relevante da imunidade inata é constituída por peptídeos antimicrobianos, capazes de eliminar diretamente agentes patogênicos ou interferir em suas atividades. Os primeiros indícios de peptídeos com atividade antibacteriana ou com propriedades antifúngicas datam da década de 1970. Nos últimos 30 anos, centenas de peptídeos antimicrobianos em animais e plantas foram descobertos. A maior parte dos avanços realizados na área de identificação desses tipos de peptídeos deve-se à problemática da resistência das bactérias e fungos aos antibióticos comumente utilizados, gerando grande interesse neste campo (Auvynet e Rosenstein, 2009). Os peptídeos antimicrobianos apresentam este nome e classificação devido a sua principal característica: a atividade antibacteriana e antifúngica. No entanto, deve-se notar que muitos destes peptídeos têm um amplo leque de propriedades biológicas: alguns deles, por exemplo, possuem atividade antiviral, bem como propriedades anticancerígenas, além disso, podem influenciar no processo de inflamação, proliferação celular, liberação de citocinas, homeostase celular, quimiotaxia e equilíbrio entre proteases e inibidores de protease (Bals, 2000).

As defensinas representam uma das classes mais importantes de peptídeos antimicrobianos. Elas apresentam tamanho típico com cerca de 30 a 40 resíduos de aminoácidos, com peso molecular que varia de 3 a 4 kDa e são encontradas em diversos organismos (Lai e Gallo, 2009). No Homem, as defensinas estão divididas em duas subfamílias: as α - e as β - defensinas (Bals, 2000; Hoover *et al.*, 2000). As β -defensinas (HBD, do inglês “human beta defensin”) são peptídeos não-glicosilados ricos em arginina com cerca de 30 a 48 aminoácidos em que seis resíduos de cisteína formam três pontes dissulfetos gerando uma estrutura com duas folhas betas antiparalelas (Boman, 1998).

As HBDs apresentam um importante papel na proteção contra a invasão dos microorganismos patogênicos, pois possuem um amplo espectro contra bactérias, fungos e vírus envelopados (Boman, 1998). Tal proteção deve-se ao fato da interação eletrostática das HBDs com a membrana aniônica do patógeno, alterando sua permeabilidade e formando poros iônicos. Dessa forma, as HBDs atuam como uma das primeiras linhas de defesa do sistema imune inato, ligando-o ao sistema imune adaptativo através da quimioatração de células T de memória e células dendríticas (CD) mediadas pelos receptores CCR6, bem como atuando na maturação das CD (Raj *et al.*, 2002). Estes peptídeos são responsáveis pelo rompimento da membrana de inúmeros microorganismos, e alguns deles são capazes que atravessar a membrana citoplasmática e entrar nas células infectadas (Ganz, 2003; Rivas-Santiago *et al.*, 2005).

Atualmente, existem cerca de 90 HBDs descritas (Lai e Gallo, 2009). Entre elas, está a β -defensina humana-1 (HBD-1), codificada por um gene localizado no cromossomo 8 (8p22-p23), composto por dois éxons (Vankeerberghen *et al.*, 2005). A HBD-1 é expressa constitutivamente pelas células epiteliais e pelos queratinócitos, podendo ser induzida pela presença de microorganismos e fatores inflamatórios, visto que na região 5' UTR do referido gene existem sítios de ligação consenso para fatores nucleares de interleucina-6 e interferon- γ (Raj *et al.*, 2002).

Em experimentos realizados com ratos infectados com *M. tuberculosis* observou-se a expressão de β -defensina murina-3 (mBD-3) e mBD-4. Nos primeiros estágios da infecção, as células epiteliais do trato respiratório expressaram ambas as defensinas, correlacionadas com o controle inicial da proliferação bacteriana, no entanto notou-se que a expressão desses genes diminuiu com a progressão da doença. Em modelos de infecção latente, mBD-3 e mBD-4 são continuamente expressos, mas suas expressões encontram-se suprimidas caso a infecção seja reativada. A β -defensina humana-2 (HBD-2) tem sido identificada em células epiteliais do pulmão e da traquéia. Esta defensina foi igualmente detectada no lavado brônquico de células de pacientes infectados com *M. avium-intracellulare* (Rivas-Santiago *et al.*, 2005).

Monócitos de sangue periférico transfectados com HBD-2 apresentou melhor controle do crescimento do *M. tuberculosis* quando comparado a monócitos não-transfectados. Além disso, percebe-se a produção de HBD-2 em células humanas do epitélio alveolar quando infectadas com *M. tuberculosis* (Rivas-Santiago *et al.*, 2005), evidenciando nesses casos a importância das HBDs no controle do *M. tuberculosis*, principalmente nos estágios iniciais de infecção.

2.7.6. Polimorfismos no gene *DEFB1* e a deficiência de HBD-1

O gene da β -defensina humana-1 (*DEFB1*) encontra-se localizado no cromossomo 8 (8p22-p23) e compreende cerca de 7,3 kb. É composto por dois éxons e codifica um peptídeo antimicrobiano capaz de romper a membrana de uma ampla variedade de patógenos (Figura 10) (Vankeerberghen *et al.*, 2005). Três polimorfismos presentes no gene *DEFB1*, localizados nas posições +52 (G/A), +44 (C/G) e +20 (G/A) do éxon 1, situados na região 5' UTR, estão relacionados com a variação na expressão gênica de HBD-1 devido à instabilidade do RNAm e à ineficiência da tradução que estes polimorfismos acarretam (Selsted e Ouellette, 2005; Hughes, 2006).

Polimorfismos nos genes das defensinas humanas influenciam claramente a susceptibilidade a infecções virais e à progressão de doenças, como demonstrado em

inúmeros estudos de infecção do HIV-1 (Braida *et al.*, 2004; Segat *et al.*, 2006). Polimorfismos no gene *DEFB1* têm sido associados à susceptibilidade a inúmeras doenças, incluindo a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e a asma, e estão associados com a gravidade dos casos de fibrose cística associados à doença pulmonar (Bals, 2000; Hoover *et al.*, 2000). Embora as infecções virais sejam foco de inúmeros estudos de associação, a relação entre polimorfismos em *DEFB1* com a susceptibilidade à infecção promovida pelo *M. tuberculosis* permanece desconhecida e necessita ser explorada.

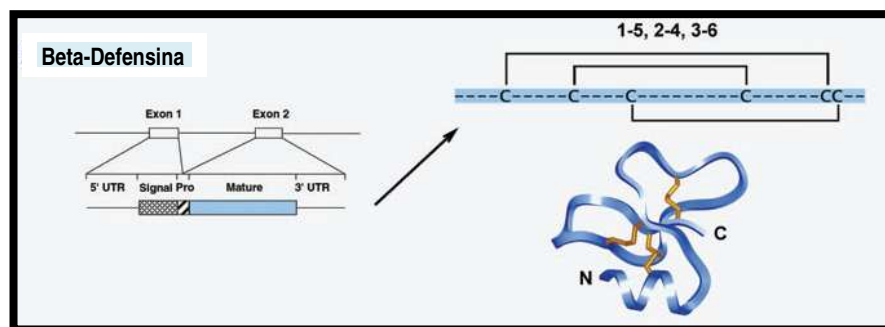


Figura 10. Estrutura gênica e proteica das Beta-Defensinas. Fonte: modificado de Selsted e Ouellette, 2005.

2.8. Variações Genéticas no Genoma Humano: Efeitos, Associações e Detecções dos SNPs

Em dois genomas humanos sorteados ao acaso, 99,9% das seqüências de DNA que encontrarmos serão idênticas. Os 0,1% restantes do DNA apresentarão variações nas seqüências gênicas. O tipo mais comum de tal variação é denominado de polimorfismo de base única, ou SNP (do inglês “*single nucleotide polymorphism*”). SNPs são variações abundantes, estáveis e distribuídas por todo o genoma. Estas variações estão normalmente associadas à diversidade populacional, individualidade, susceptibilidade a doenças e resposta individual a medicamentos. Recentemente, tem sido sugerido que os SNPs podem ser empregados em estudos de farmacogenética e para identificação de doenças comuns, como a hipertensão arterial, a diabetes e doenças cardíacas (Shastry, 2002).

Existem mais de 10 milhões de SNPs descritos e depositados em bancos de dados públicos. A definição para SNP consiste na alteração de um único par de bases (substituição/supressão/inserção) de um nucleotídeo em um *locus* específico, normalmente consistindo de dois alelos. Dentro de uma população, a freqüência de um alelo pode ser atribuída à relação entre os SNPs que a população carrega, sendo a variante mais comum presente em maior freqüência do que as variantes raras. É importante notar que existem

diferenças acentuadas entre as populações humanas em termos de distribuição das variantes. Por esta razão, um alelo comum em um grupo geográfico ou étnico pode ser raro em outros grupos (Kubistova *et al.*, 2009).

Polimorfismos funcionais é um termo reservado para os polimorfismos que ocasionam a mudança de qualquer forma, expressão e/ou estrutura do produto gênico (proteínas ou RNAs especializados). Em geral, polimorfismos localizados dentro de seqüências codificantes do gene podem alterar o aminoácido da estrutura primária da proteína, produzindo uma seqüência polipeptídica diferente da esperada (SNPs não-sinônimos) ou ainda causar falhas funcionais na proteína. No entanto, em alguns casos, devido à degeneração do código genético, alguns polimorfismos (SNPs sinônimos) presentes nas seqüências codificantes não necessariamente alteram os aminoácidos da proteína final (Kubistova *et al.*, 2009).

Por outro lado, SNPs que não estão em regiões codificadoras podem apresentar consequências na transcrição, processamento dos transcritos (“splicing”), instabilidade dos fatores de transcrição e instabilidade dos RNAs não-codificantes, afetando significativamente a expressão gênica (Kubistova *et al.*, 2009).

2.8.1. Polimorfismos de Base Única e Infecções

O envolvimento dos SNPs nas infecções por patógenos vem sendo amplamente analisado nos últimos anos. Nesses estudos, os genes relacionados à codificação de proteínas do sistema imune inato e adaptativo ganharam posição de destaque por apresentarem importante papel na proteção contra diversas enfermidades virais, fúngicas e bacterianas (Klotman e Chang, 2006). Os experimentos que analisam e comparam o perfil genético de uma população saudável e outra doente são realizados no intuito de revelar os principais marcadores genéticos associados à susceptibilidade.

Em uma linha de pesquisa que avaliou a susceptibilidade na transmissão vertical do HIV-1, permitiu-se descrever diversos marcadores de risco ao vírus da AIDS. SNPs nos genes da β -defensina-1, MBL, interleucina-18 (IL-18), CCR5, CCR2, SDF-1 entre outros, foram associados com a susceptibilidade à infecção e à progressão da AIDS (Braidia *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2005; Arraes *et al.*, 2006; Segat *et al.*, 2006; Milanese *et al.*, 2009).

O gene da MBL apresenta cinco sítios polimórficos bem conhecidos. Três deles localizados no éxon 1, nos códons +52 (CGT>TGT), +54 (GGC>GAC) e +57 (GGA>GAA) (MADSEN *et al.*, 1994), resultando na substituição dos aminoácidos por Arg > Cys, Gly > Asp e Gly > Glu, respectivamente. Tais SNPs provocam uma drástica redução nos níveis

funcionais de MBL no soro, podendo em determinadas circunstâncias não apresentar concentrações séricas detectáveis (Madsen *et al.*, 1994; Wallis, 2003). Com frequências gênicas distintas nos diferentes grupos étnicos, a hipótese defendida pela linha de pesquisa é que a população infectada pelo HIV-1 apresenta uma frequência maior dos SNPs no éxon 1 quando comparado ao grupo controle, devido ao papel fundamental da MBL no reconhecimento e opsonização do HIV-1, bem como na ativação do Sistema Complemento (Ji *et al.*, 2005).

Além dos alelos variantes apresentados, três SNPs localizados na região promotora do gene *MBL2*, nas posições -550 (H/L), -221 (Y/X) e +4 (P/Q), influenciam a taxa de transcrição e consequentemente a concentração de MBL sérica. SNPs no éxon 1 encontram-se em forte desequilíbrio de ligação com os promotores, o que mostra uma variação considerável em suas frequências entre os grupos étnicos (Steffensen *et al.*, 2000). Ressalta-se que o SNP na posição +4 não foi analisado no presente trabalho por ser menos relevante no contexto da modificação da concentração sérica de MBL, sendo suficiente a apreciação dos SNPs dos outros promotores e do éxon 1.

O gene *DEFB1* trata-se de um gene altamente polimórfico, apresentando SNPs nas posições +52(G/A), +44(C/G) e +20(G/A) da região 5'UTR. Os SNPs estudados foram descritos primeiramente por Dörk e Stuhmann (1998) e têm sido sucessivamente relacionado com o aumento da susceptibilidade à infecções (Segat, 2006). SNPs na posição -44 (C>G) da região 5'UTR são fortemente conservados em outros primatas e apresenta importante papel na modulação na expressão da HBD-1. A hipótese consiste na premissa de que a barreira protetora existente na pele e na mucosa é proporcionada pela expressão constitutiva da HBD-1, de forma que a molécula interaja com os patógenos e com as células da resposta imune (Braidia *et al.*, 2004).

2.8.2. Detecção de SNPs por PCR em Tempo Real

Nos últimos anos, um grande número de tecnologias diferentes de genotipagem de SNPs tem sido desenvolvido. Como resultado, uma grande variedade de diferentes tipos de protocolos tem sido disponibilizada para a pesquisa (Sobrinho *et al.*, 2004). Os SNPs, desde a década de 80, passaram a ser detectados inicialmente pelo uso de enzimas de restrição que identificam a presença ou ausência dos sítios cortantes da enzima permitindo a análise dos SNPs pelas variações dos tamanhos dos fragmentos produzidos (Gray *et al.*, 2000). Até o momento, protocolos que permitem a detecção da presença ou ausência de SNPs incluem

ensaios de: PCR-SSP, PCR-SSO (hibridização alelo específica), PCR-RFLP, “5’-nuclease assay” (TaqMan), Piroseqüenciamento, seqüenciamento direto e “Melting Temperature Curve Assay” (Gray *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2006; Arraes *et al.*, 2006).

A tecnologia da PCR, desenvolvida por Kary Mullis nos anos 80, tornou-se um dos principais adventos da Biologia Molecular. A síntese enzimática *in vitro* de seqüências específicas de DNA através do uso de dois iniciadores (oligonucleotídeos) que hibridizam fitas opostas de DNA permitiu o enorme avanço da área, como o seqüenciamento do genoma humano, a expressão de genes recombinantes, a determinação rápida e eficiente nos testes de paternidade e de doenças genéticas e infecciosas (Novais *et al.*, 2004). A PCR é composta de três etapas básicas: desnaturação, anelamento e extensão, o que torna possível a amplificação de seqüências específicas de DNA de tamanhos que variam de 50 a 2000 pares de bases (pb) sem a necessidade do uso de células vivas.

Com o aparecimento da PCR em Tempo Real (qPCR), em 1992, por Higuchi e colaboradores, o monitoramento da amplificação de fragmentos de DNA e RNA em tempo real foi possível (Novais *et al.*, 2004; Kubista *et al.*, 2006; Dussault *et al.*, 2006). De fato, a qPCR realiza a quantificação dos ácidos nucléicos de maneira precisa e altamente reproduzível, pois determina seus valores durante a fase exponencial da reação (Novais *et al.*, 2004).

A técnica da qPCR baseia-se na detecção de moléculas fluorescentes que aumentam a emissão de fluorescência quando o produto de amplificação acumula-se em cada ciclo da reação (Dussault *et al.*, 2006), de forma que tal emissão é gravada durante cada ciclo e representa a quantidade do produto amplificado (Novais *et al.*, 2004). A plataforma da qPCR requer um sistema óptico para excitação da fluorescência e outro para a captação da emissão. As informações adquiridas são transmitidas para softwares que analisam e calculam os dados finais da reação.

Existem dois tipos principais de químicas fluorescentes utilizados na PCR em tempo real: o TaqMan® e o SYBR® Green. O SYBR® Green, com excitação e emissão máxima de 494nm e 521nm (Dussault *et al.*, 2006), se intercala na dupla fita de DNA e após a excitação pela luz emite uma fluorescência verde que é detectada pelo sistema de recepção do equipamento (Novais *et al.*, 2004). Outra forma de gerar fluorescência é através do uso de uma sonda, dirigida especificamente a uma região interna da seqüência que se deseja amplificar, sendo um exemplo destas a TaqMan®. Esta possui um marcador fluorescente *reporter* na extremidade 5’, capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original. Entretanto,

na sua posição nativa, toda a luz emitida por esse fluoróforo é absorvida por outro marcador, o *quencher*, presente na extremidade 3' da sonda (Novais *et al.*, 2004).

Dessa forma, o sistema óptico do equipamento não é capaz de detectar fluorescência no tubo de reação, mas, durante a amplificação, a sonda que se hibridizou ao produto-alvo será clivada pela atividade da exonuclease da enzima Taq DNA polimerase. Como consequência, essa sonda será degradada e o fluoróforo ficará distante do *quencher* que agora não mais será capaz de absorver a luz emitida. Assim, ocorrerá um aumento na intensidade de fluorescência, permitindo a quantificação do alvo (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001).

A curva de quantificação dos ácidos nucléicos através da PCR em tempo real é um dos dados gerados durante a amplificação do material genético, e consiste de três fases distintas: 1) uma fase lag inicial, no qual os produtos ainda não podem ser mensurados, 2) uma fase exponencial, onde a detecção da fluorescência é alcançada e 3) uma fase platô (Wilhelm *et al.*, 2003). O ponto na curva, dentro da fase exponencial, no qual a quantidade de fluorescência ultrapassa o sinal da linha basal é chamado de valor do ciclo “threshold” (C_t) (Dussault *et al.*, 2006). Este ponto é de crucial importância, pois, determina a concentração de ácidos nucléicos com maior acurácia e pode ser utilizado para detecção de cargas virais, expressão gênica e genotipagem (Gray *et al.*, 2000; Wilhelm *et al.*, 2003).

Polimorfismos alélicos podem ser identificados através da combinação da amplificação de alelos-específicos e da detecção pelo SYBR® Green. A amplificação alelo-específica é realizada em alíquotas iguais e dividida em duas reações de PCR, cada uma das quais contendo um par de oligonucleotídeos específicos, um para o genótipo selvagem e o outro para a variante alélica. A especificidade na amplificação da PCR é conferida pela inabilidade da enzima Taq polimerase em estender *primers* mal-pareados em seu alvo na posição 3'. Dessa forma, apenas os *primers* que apresentarem o pareamento correto serão estendidos e o fragmento correspondente amplificado. Na prática, porém, haverá amplificação do alelo incompatível, mas isso ocorrerá menos eficientemente, de tal forma que um número maior de ciclos de amplificação serão necessários para gerar níveis de produto detectáveis (Bustin, 2005).

Como um protocolo adicional, pós-PCR, da PCR em tempo real, a curva de dissociação ou “melting” pode ser realizada a fim de que as seqüências amplificadas sejam caracterizadas (Wilhelm *et al.*, 2003), devido a especificidade de temperatura que cada produto de amplificação apresenta. A curva de “melting” é realizada pelo aquecimento lento e gradual do “amplicon” na presença de fluoróforo, de maneira que à medida que a amostra aquece, a fluorescência decresce rapidamente (Akey *et al.*, 2001). Esta curva baseia-se no

princípio de que cada fita dupla de DNA apresenta sua temperatura de “melting” (T_m) específica, definida como a temperatura em que 50% do DNA fita dupla torna-se fita simples, coincidindo com o mais acentuado decréscimo do sinal do fluoróforo. Esta fase pode ser identificada mais simples e convenientemente como um pico gerado pela derivação negativa da curva de melting (Wilhelm *et al.*, 2003).

A curva de dissociação é determinada inicialmente pelo comprimento e grau do conteúdo de guanina-citosina do DNA fita dupla (Wittwer *et al.*, 2001) de maneira que a diferença entre diferentes “amplicons” geram diferentes curvas, o que vem sendo empregado nas diversas análises de genotipagem de SNPs (Arraes *et al.*, 2006). Tal curva também permite identificar a formação de produtos não específicos, bem como, de dímeros de “primers” (Gray *et al.*, 2000).

O número de métodos para genotipagem de SNPs tem crescido nos últimos anos e muitos destes já se encontram atualmente disponíveis, revolucionando a área da genética molecular humana e contribuindo nos estudos de investigação de fenótipos complexos, medicina legal e testes diagnósticos (Twymant e Primrose, 2003). Diante deste cenário, o presente estudo tem por finalidade explorar a relação entre variações genéticas presentes em importantes genes da imunidade inata, através de tecnologias específicas, em pacientes acometidos pela tuberculose como uma ferramenta diagnóstica a cerca do papel que polimorfismos funcionais possam desempenhar na susceptibilidade do organismo às infecções.

Investigações futuras a cerca da susceptibilidade à tuberculose é quase certo que incluirá estudos amplos do genoma humano, estudos de associação, mapeamento gênicos, a busca de variantes raras e mecanismos epigenéticos. A identificação genética de indivíduos vulneráveis a uma doença milenar e que continua a fazer milhões de vítimas a cada ano deverá contribuir em estratégias de vacinação e no tratamento personalizado.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Verificar se existe associação dos polimorfismos dos genes codificadores das proteínas lectina ligadora da manose (*MBL2*) e da β -defensina humana 1 (*DEFB1*) na susceptibilidade à infecção promovida pelo *Mycobacterium tuberculosis* e a ocorrência de tuberculose.

3.2. Objetivos Específicos

1. Criar um Banco de Dados e a indexação das informações epidemiológicas e moleculares dos pacientes envolvidos na pesquisa, utilizando o programa SPSS 10.0 for Windows;
2. Avaliar o desempenho da técnica de PCR na detecção do *M. tuberculosis* em amostras provenientes de pacientes com tuberculose.
3. Genotipar os polimorfismos localizados no éxon 1 nos códons 52, 54, 57, e os dois principais na região promotora localizados nas posições -550 e -221 do gene *MBL2* em pacientes TB-positivos e em um grupo controle, utilizando a técnica de PCR em tempo real;
4. Genotipar os polimorfismos na região 5'UTR nas posições -20, -44 e -52 do gene *DEFB1* em pacientes TB-positivos e em um grupo controle, utilizando a técnica de sequenciamento de DNA;
5. Calcular as frequências alélicas e gênicas de cada polimorfismo, comparando-as entre o grupo de pacientes e o grupo controle com o intuito de relacionar os polimorfismos encontrados com a susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis*.
6. Relacionar os genótipos do *MBL2* e do *DEFB1* com as formas de tuberculose em pacientes com TB ativa.
7. Relacionar os principais haplótipos de risco referentes aos genes *MBL2* e *DEFB1* com a susceptibilidade à tuberculose.

4. Materiais e Métodos

4.1. Local do Estudo

A pesquisa desenvolvida foi realizada através da colaboração entre o Laboratório de Virologia do LIKA/UFPE e o Laboratório de Imunoepidemiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ.

4.2. Aspectos Éticos

O estudo é parte integrante de um projeto maior intitulado “Desenvolvimento e Validação de Abordagens Moleculares e Imunológicas para o Diagnóstico de Tuberculose Infantil”, aprovado pelo Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ (Anexo I - Registro CEP – 55/05), observando-se os cuidados necessários para preservar a liberdade de consentimento e a privacidade das informações dos pacientes envolvidos.

4.3. Seleção dos Pacientes

O presente trabalho trata-se de um estudo retrospectivo, utilizando-se de um banco de DNA genômico mantido no Laboratório de Imunoepidemiologia. Foram selecionados para a pesquisa, os materiais genéticos de pacientes previamente diagnosticados como portadores de TB, segundo os critérios adotados pelo médico assistente, baseados nos achados radiológicos, exames laboratoriais e provas terapêuticas. As amostras de DNA foram obtidas a partir de sangue periférico anticoagulado com EDTA. A extração do DNA genômico foi realizada mediante as instruções do fabricante (QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen).

4.4. Critérios de Inclusão

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, com diagnóstico de tuberculose comprovado através de cultura, baciloscopia ou achados clínicos, provenientes de diversas unidades de saúde do estado de Pernambuco. Os indivíduos da pesquisa foram classificados segundo os grupos a seguir:

Grupo 1: pacientes com evidência clínica e/ou radiológica de TB, história de contato com adulto portador de tuberculose confirmada laboratorialmente, teste tuberculínico positivo e diagnóstico de tuberculose ativa confirmada através da baciloscopia e cultura ou que iniciaram o tratamento para TB.

Grupo 2: indivíduos saudáveis, com patologia de tuberculose descartada através dos dados clínicos, radiológicos e baciloscopia negativa para micobactérias.

4.5. Critérios de Exclusão

Foram excluídos os pacientes que:

- a) Não preencheram os critérios acima definidos;
- b) Não apresentaram condições clínicas que permitissem a realização da coleta de amostra clínica;
- c) Pacientes portadores de doenças imunossupressoras ou fazendo uso de drogas que interferissem no sistema imunológico;

4.6. População de Estudo

Foram incluídos no estudo 72 casos de pacientes com tuberculose pulmonar (40 do sexo masculino e 32 do sexo feminino, com idade média de 14 anos) e 43 casos de tuberculose extrapulmonar (25 do sexo masculino e 18 do sexo feminino, com idade média de 23 anos), perfazendo um total de 115 pacientes, além de 180 indivíduos controle, com idade média de 25 anos (variando entre 18 a 39 anos). O grupo controle constituiu-se de indivíduos saudáveis, sem parentesco com os pacientes doentes e que não apresentaram sintomas de tuberculose ou história prévia da doença. Todos os casos de pacientes e os indivíduos controles eram brasileiros, provenientes de Pernambuco, Brasil, HIV-negativos e não se encontravam sob medicação imunossupressora.

Os pacientes foram provenientes do ambulatório e enfermaria do Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), Instituto Materno Infantil de Pernambuco/Instituto Professor Fernando Figueira (IMIP), Hospital Barão de Lucena (HBL/SUS), Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), Hospital Geral Otávio de Freitas e outros hospitais de referência para TB na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil.

4.7. Coleta de Dados

Os pacientes envolvidos na pesquisa foram submetidos a um questionário clínico-epidemiológico padronizado e elaborado pela equipe de pesquisadores. Os dados foram registrados e, posteriormente, processados através do programa Statistical Package for Social Science (SPSS – versão 10.0 for Windows).

4.8. Amplificação do DNA Genômico de *M. tuberculosis*

A detecção do DNA do *M. tuberculosis* foi realizada através da técnica de nested-PCR, uma variante da PCR convencional que associa duas PCRs, utilizada para aumentar a especificidade e principalmente a sensibilidade da reação (Rodrigues *et al.*, 2006). A metodologia em questão baseou-se na amplificação do elemento de inserção IS6110 específico do complexo *M. tuberculosis*. Este alvo é o mais intensamente estudado, presente de 1 a 25 cópias virtualmente idênticas em diversas localizações genômicas de cepas do complexo *M. tuberculosis* (Hellyer *et al.*, 1996; Kivi *et al.*, 2002). Foram utilizados um par de “primers” externos denominados de TJ3 e TJ5 (Tabela 1) na primeira reação e um par de “primers” internos denominados de OLI5 e STAN3 na segunda reação, todos descritos por Ritis *et al.* (2000). Na primeira reação um fragmento de DNA de 409 pb foi amplificado e o produto da primeira PCR serviu como molde para a segunda amplificação, gerando um fragmento de 316 pb, em um total de 60 ciclos.

O DNA genômico purificado foi submetido à amplificação em um termociclador automático (Mastercycler Gradient, Eppendorf). A 1ª reação de amplificação consistiu de KCl 50mM, Tris-HCl 10mM, pH 8,3, MgCl₂ 2,5mM, dNTP (200 µM cada), 30 pmoles de cada oligonucleotídeo e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Gibco BRL) em um volume final de 50 µl. A fase de desnaturação realizou-se a 94 °C por 30s, a de anelamento a 68 °C por 1 min. e a de extensão a 72 °C por 1 min., em um total de 30 ciclos. Na segunda reação, foram adicionados 2µl do produto da 1ª reação, nas mesmas concentrações que a anterior e nas condições de amplificação de 94 °C a 30s, 57°C a 30s e 72 °C a 30s. Dez microlitros do produto de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio, visualizados em transluminador ultravioleta e fotografados por um sistema de documentação polaróide (Kodak MP4+ System).

Como controle positivo em cada reação de amplificação, foi utilizado o DNA extraído da cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv. Como controle negativo, amostras livres de DNA foram utilizadas para avaliar a contaminação da reação.

4.9. Genotipagem do Gene *MBL2*

Foram avaliados dois dos polimorfismos mais importantes na região promotora do gene *MBL2*, as variantes H/L -550 (G/C) e X/Y -221 (G/C). As reações de genotipagem para cada promotor foram realizadas através de uma PCR alelo-específica, utilizando-se dois “master mix”, um contendo o “primer reverse” selvagem e o outro contendo o “primer reverse” mutante, ambos compartilhando do mesmo “primer forward” (Tabela 1). Ambas as

reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 12,5 µl, conduzidas com SYBR Green PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems), 0.2 µM de cada “primer” e cerca de 200ng do DNA genômico molde. As condições termais da reação iniciaram-se com uma pré-ciclagem de 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos compostos de 30s a 95 °C, 30s a 57 °C e extensão a 72 °C por 30s.

A detecção dos polimorfismos do éxon 1 foi realizada segundo o protocolo descrito por Arraes *et al.* (2006) e baseado na análise da curva de dissociação, utilizando-se o Rotor GeneTM RG 3000 (Uniscience-Cobert Research) como plataforma.

Os SNPs do éxon 1 foram agrupados no alelo “O” quando alguma mutação ocorresse nos códons de origem. No caso do genótipo selvagem, os genótipos foram agrupados no alelo “A”. A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 25µl, utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems), 1,25µM de cada “primer” (Tabela 1) e cerca de 200ng do DNA genômico molde. As condições termais da reação iniciaram-se com uma desnaturação a 95°C por 2 min, seguido por desnaturação a 95 °C durante 15s, anelamento e extensão a 60°C por 1 min, durante 35 ciclos.

Após a amplificação do éxon 1, o produto resultante foi submetido ao protocolo da curva de dissociação utilizando-se o Rotor GeneTM RG 3000 (Uniscience-Cobert Research). O protocolo iniciou-se com um lento e progressivo aquecimento de 60 °C a 95 °C. Os cálculos referentes à variação da emissão do fluoróforo foram automaticamente realizados pelo software do programa Rotor GeneTM RG 3000 (Uniscience-Cobert Research) versão 6.0 (build 41) gerando as curvas de dissociação e a detecção dos SNPs.

Os controles da PCR em tempo real foram desenhados a partir de amostras previamente seqüenciadas e cedidas pela equipe liderada pelo professor Sergio Crovella do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco. Dessa forma conhecendo-se os genótipos das amostras controles, foi possível a genotipagem das amostras desconhecidas. Um controle interno da reação, livre de DNA, foi incluído para avaliar a qualidade e contaminação da reação.

Os haplótipos e os genótipos combinados foram computados através do programa Arlequin versão 3.01 (disponível em <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>) e identificados através de nomenclatura específica onde as primeiras duas letras indicariam as variantes da região promotora (alelos H/L e X/Y) e a terceira letra indicaria a combinação para os três polimorfismos no éxon 1 (alelo A/O).

Todos os dados foram confirmados adicionalmente através do seqüenciamento de DNA, utilizando “primers” específicos para a região que compreendia os promotores H/L, X/Y e o éxon 1 (Tabela 1). O seqüenciamento foi realizado em colaboração com a

Universidade de Triste, Itália, utilizando-se o kit Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems) e o sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4.10. Genotipagem do Gene *DEFB1*

A identificação dos polimorfismos da região 5'UTR do gene *DEFB1*, localizados nas posições -20 (G/A), -44 (C/G) e -52 (G/A), foi realizado através da técnica de seqüenciamento do DNA, permitindo a formulação dos principais haplótipos de risco à infecção pelo *M. tuberculosis*.

O seqüenciamento foi realizado a partir do produto de amplificação de uma PCR convencional, realizada para um volume final de 25 µl, conduzida com 10X Buffer (Applied Biosystems), 50 mM de MgCl₂, 2,5 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada “primer” e 0,5 U de AmpliTaq Gold Polymerase (Applied Biosystems). As condições termais da reação iniciaram-se com uma pré-ciclagem de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos compostos de 30s a 95 °C, 30s a 55 °C e extensão a 72 °C por 30s, gerando um fragmento de 456pb.

Da mesma forma, o seqüenciamento para o gene *DEFB1* foi realizado em colaboração com a Universidade de Triste, Itália, utilizando-se o kit Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems) e o sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Tabela 1. Iniciadores para amplificação do *M. tuberculosis* e genotipagem dos genes *MBL2* e *DEFB1*.

Gene	Iniciadores	Seqüência	Tamanho esperado do fragmento
<i>IS6110</i>	TJ3/TJ5	Forward: ATCCCCTATCCGTATGGTG Reverse: CCGCAAAGTGTGGCTAAC	409 pb
	OLI5/STAN3	Forward: AACGGCTGATGACCAAAC Reverse: CCAGCACCTAACCGGCTGT	316 pb
<i>MBL2</i>	Éxon 1	Forward: AGGCATCAACGGCTTCCCA Reverse: CAGAACAGCCCAACACGTACCT	90 pb
	H/L	Forward-C: TGCTTCCCCTTGGTGTTTTAC Forward-G: TGCTTCCCCTTGGTGTTTTAG Reverse: GCCAGGGCCAACGTAGTAAG	78 pb
	X/Y	Forward-C: TGGAAGACTATAAACATGCTTTCC Forward-G: TGGAAGACTATAAACATGCTTTCCG Reverse: CCGAAGAGGACATGGAGAGA	151 pb
	<i>MBLAI</i>	Forward: GCCAGTGGTTTTTGACTCAC Reverse: CCTCATATCCCCAGGCAGT	1000 pb
<i>DEFB1</i>	Região 5'UTR	Forward: GCTCCAGGCTGAAAGCTAAA Reverse: ATGCTTTCCTGCTGCTTGT	456 pb

4.11. Análise Estatística

As frequências alélicas e genótípicas foram calculadas a partir da contagem direta e comparadas entre os pacientes com TB e o grupo controle. As frequências entre pacientes e controles foram determinadas para a conformidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg através do software Arlequin versão 3.01. A análise estatística foi calculada pelo teste de Qui-quadrado e teste exato de Fisher utilizando-se o programa EPI INFO, versão 6.04 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta). A avaliação do risco relativo para os alelos e genótipos foi realizada calculando-se a Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança (CI) de 95%. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

5. Resultados

5.1. Análise do Banco de Dados

Todas as informações referentes à população de estudo foram submetidas ao banco de dados criado com o programa SPSS 10.0 for Windows para análise detalhada da população. A utilização do programa SPSS permitiu os cálculos das frequências e médias dos dados obtidos. Desta maneira, todos os resultados encontrados foram gerados diretamente do SPSS.

Através da análise dos dados, observou-se que dos 115 pacientes incluídos no estudo, 65 eram do sexo masculino (56,5%) e 50 eram do sexo feminino (43,5%). A idade dos pacientes variou de 1 a 69 anos, com média de idade de 19 anos. A faixa etária de pacientes menores que 15 anos foi a mais afetada pela tuberculose. Em relação à prevenção através da vacinação pela BCG, 70,4% (81) dos pacientes apresentaram a cicatriz referente à vacina. O contato prévio com indivíduo tuberculoso ou caso(s) de tuberculose na família foi registrado em 53% (61) dos casos. Os dados foram compilados na tabela 2.

Tabela 2. Perfil clínico dos pacientes com diagnóstico confirmado de tuberculose incluído no estudo.

Características	N	Frequência
Sexo		
Masculino	65	56,5%
Feminino	50	43,5%
Idade		
Criança (≤15 anos)	63	54,8%
Adulto (16-45 anos)	45	39,1%
Acima de 45 anos	7	6,1%
Vacinação com BCG		
Positivo	81	70,4%
Negativo	34	29,6%
Contato prévio com TB		
Positivo	61	53%
Negativo	54	47%

Os fatores de risco relacionados à TB identificados nesse estudo foram principalmente alcoolismo (14%), bronquite (11,3%), pneumonia (10,4%), asma (6,9%) e diabetes (6,1%). Além disso, 8,7% dos pacientes compreendidos na faixa entre 16 e 69 anos possuíam o hábito

de fumar (Tabela 3). Os casos de pacientes infectados pelo vírus HIV (5,9%) foram excluídos da pesquisa para evitar interferências na análise do papel dos polimorfismos como fatores de predisposição à tuberculose.

Tabela 3. Co-morbididades relacionadas à TB presentes na população estudada.

Co-morbidades	Positivos	%	Negativos	%
Asma	8	6,9	11	93,1
Pneumonia	12	10,4	10	89,6
Bronquite	13	11,3	9	88,7
Diabetes	7	6,1	7	93,9
Alcoolismo	16	14	6	86
Tabagismo	10	8,7	6	91,3

5.2. Amplificação do DNA de *M. tuberculosis* pela NPCR

Foram selecionados para a pesquisa amostras de DNA extraído de 115 pacientes com tuberculose. Para confirmação da presença do material genético do bacilo realizou-se através da técnica de NPCR a amplificação de um fragmento de 316pb referente ao elemento de inserção IS6110, específico do complexo *M. tuberculosis* (Figura 11).



Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 2% demonstrando a positividade das amostras biológicas mediante a presença de DNA de *M. tuberculosis*. Faixas 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11 e 12- amostra de sangue; Faixa 6 e 13 – outras amostras biológicas; Faixas 3, 7, 10 e 14 - controle negativo da extração; Faixa 15, Controle negativo da PCR; Faixa 16, 1ng de DNA de H37Rv; Faixa 17, 50 fg de DNA de H37Rv; M, Marcador de peso molecular 100pb.

Os resultados obtidos pela NPCR encontram-se compilados na Tabela 4 e correspondem ao primeiro artigo submetido à publicação (CRUZ *et al.*, 2010 – Anexo II). Dentre os 115 pacientes diagnosticados clinicamente como doentes, a NPCR foi capaz de detectar o DNA do *M. tuberculosis* em 63 (54,8%) dos casos. Em relação ao grupo controle, todas as NPCR realizadas apresentaram-se negativas, demonstrando 100% de especificidade para a reação. Comparando-se os resultados da NPCR com o padrão-ouro adotado, o

diagnóstico clínico, a técnica demonstrou sensibilidade de 54,8% ($p < 0,001$; CI: 40,0-66,5). Em verdade, a NPCR apresentou resultados falso-negativos em aproximadamente 45,2% das amostras, referente ao restante dos pacientes clinicamente diagnosticados com tuberculose.

Tabela 4. Resultados obtidos a partir da amplificação de 115 amostras de DNA extraídos do sangue total através da técnica de NPCR e comparação entre os resultados clínicos e da NPCR.

Resultado da NPCR	Diagnóstico Clínico Final	
	Tuberculose	Controles
Positivo	63 (54,8%)	0 (0%)
Negativo	52 (45,2%)	180 (100%)
Total	115 (100%)	180 (100%)

$p < 0,001$. (Cruz *et al.*, 2010).

Analisando-se a relação entre a forma clínica de TB e os resultados da NPCR compilados na Tabela 5 pode-se observar que nos pacientes que apresentaram a forma pulmonar da doença, a NPCR foi positiva em 48,6 % dos casos ($p < 0,001$), enquanto que nos pacientes que apresentaram a forma extrapulmonar (43), a técnica foi positiva em 63% dos casos ($p < 0,001$).

Tabela 5. Comparação entre os resultados obtidos através da NPCR entre os pacientes diagnosticados com tuberculose segundo a forma clínica da doença.

Resultado da NPCR	Tuberculose Pulmonar		Tuberculose Extrapulmonar	
	Pulmonar	Controles	Extrapulmonar	Controles
Positivo	35 (48,6%)	0 (0%)	27 (63,0%)	0 (0%)
Negativo	37 (51,4%)	180 (100%)	16 (37,0%)	180 (100%)
Total	72 (100%)	180 (100%)	43 (100%)	180 (100%)

$p < 0,001$. (Cruz *et al.*, 2010).

5.3. Genotipagem do *MBL2*

5.3.1. Polimorfismos da Região Promotora

Através da análise dos resultados da PCR alelo-específica foi possível detectar os três genótipos possíveis, G/G, G/C e C/C, na posição -550 da região promotora do gene *MBL2*, denominado de promotor H/L (Figura 12). A genotipagem dos pacientes foi possível através da comparação dos ciclos “threshold” (C_t) das duas PCR corridas em paralelo. A amostra que obteve o maior C_t com o oligonucleotídeo mutante foi genotipada como **homozigota selvagem** (G/G) (Figura 12a). Por outro lado a curva de quantificação que apresentou maior

C_t com o oligonucleotídeo selvagem foi genotipada como **homozigata mutante** (C/C) (Figura 12c). Enquanto que as amostras **heterozigotas** G/C apresentaram C_t similares em ambas as PCRs corridas em paralelo com os oligonucleotídeos selvagem e mutante (Figura 12b). Vale salientar que o heterozigoto apresenta uma diferença mínima importante de C_t, de pelo menos 1 C_t ou menos para se considerar uma amostra heterozigota.

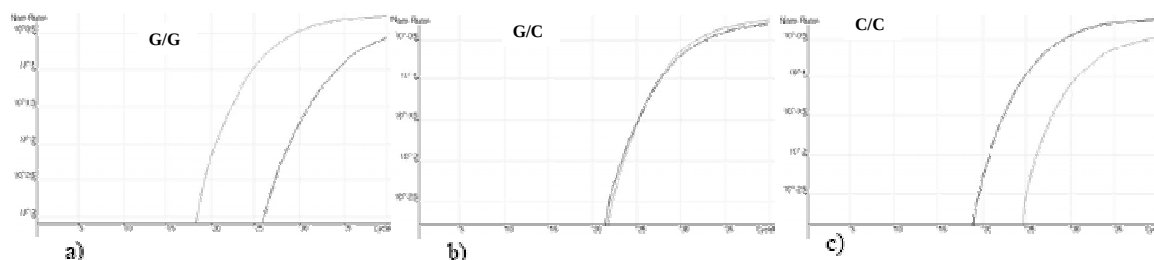


Figura 12. Resultados da PCR alelo-específica, realizada através da PCR em tempo real, para a genotipagem dos promotores H/L e X/Y do gene *MBL2*.

A variante H/L apresentou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 1,94$; $p=0,163$). A análise dos resultados obtidos permitiu observar que a frequência do alelo mutante L é significativamente maior no grupo dos pacientes com TB quando comparada à frequência no grupo controle (73% vs. 29%) independente da forma de tuberculose ($p < 0,0001$; odds ratio [OR] 6,91; 95% intervalo de confiança [4,69 – 10,20]). Além disso, o genótipo LL encontra-se igualmente em maior frequência no grupo dos doentes do que no grupo controle (56% vs. 10%; $p < 0,0001$). Os resultados obtidos encontram-se sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6. Frequências alélicas e genotípicas dos pacientes da pesquisa com tuberculose (TB) e dos controles para o promotor H/L.

Variante	Pacientes com TB n=115 (%)			Controle n=180 (%)	OR	95%IC	p
	Geral	TB	TB				
		Pulmonar	Extrapulmonar				
Alelo							
H	61 (27)	42 (29)	31 (36)	257 (71)	1	Referência	NA
L	169 (73)	102 (71)	55 (64)	103 (29)	6,91	4,69 – 10,20	0,0001
Genótipo							
HH	10 (9)	11 (15)	10 (23)	94 (52)	1	Referência	NA
HL	40 (35)	20 (28)	11 (26)	69 (38)	5,40	2,45 – 13,00	<0,0001
LL	65 (56)	41 (57)	22 (51)	17 (10)	34,81	14,48 – 92,30	<0,0001
HL/LL	105 (91)	61 (85)	33 (77)	86 (48)	11,38	5,49 – 26,04	<0,0001

OR – Odds Ratio; IC – Intervalo de confiança;

Da mesma forma que na variante H/L, foi possível a detecção dos três genótipos do promotor X/Y, G/G, G/C e C/C, na posição -221. A genotipagem dos pacientes seguiu-se com o mesmo raciocínio previamente descrito, através da análise da curva de quantificação da

PCR alelo-específica. As frequências alélicas e genotípicas do promotor X/Y encontraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,592$; $p=0,441$). Foi observada uma maior frequência do alelo mutante X na população saudável quando comparado aos pacientes com tuberculose (38% vs. 29%, $p<0,001$; [OR] 0,25; 95% intervalo de confiança [0,17 – 0,36]), apresentando efeito protetor para o polimorfismo. No entanto, não houve diferença entre as frequências genotípicas entre os grupos estudados. Os resultados referentes à genotipagem do promotor X/Y encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Frequências alélicas e genotípicas dos pacientes da pesquisa com tuberculose (TB) e controles para o promotor X/Y.

Variante	Pacientes com TB n=115 (%)			Controle n=180 (%)	OR	95%IC	p
	Geral	TB	TB				
		Pulmonar	Extrapulmonar				
Alelo							
Y	163 (71)	93 (65)	55 (64)	225 (62)	1	Referência	NA
X	67 (29)	51 (35)	31 (36)	135 (38)	0,25	0,17 – 0,36	0,0001
Genótipo							
YY	62 (54)	36 (50)	20 (47)	76 (42)	1	Referência	NA
YX	39 (34)	21 (30)	15 (35)	73 (41)	0,65	0,37 – 1,12	0,120
XX	14 (12)	15 (20)	8 (19)	31 (17)	0,55	0,25 – 1,18	0,118
YX/XX	53 (46)	36 (50)	23 (53)	104 (58)	0,62	0,38 – 1,03	0,06

OR – Odds Ratio; IC – Intervalo de confiança;

5.3.2. Polimorfismos do Éxon 1

A análise dos resultados da PCR permitiu a identificação dos três genótipos possíveis, A/A, A/O e O/O, no éxon 1 do *MBL2*. A genotipagem dos pacientes foi possível através da comparação entre as curvas de dissociação das amostras e a curva dos controles de reação previamente genotipados (Figura 13).

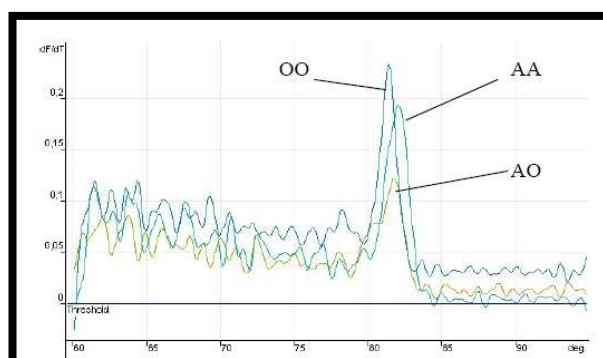


Figura 13. Genotipagem do *MBL2*, demonstrando os três possíveis genótipos para o gene através da curva de dissociação.

As curvas de dissociação foram calculadas diretamente pelo software do Roto Gene-3000, onde os genótipos A/A obtiveram um pico de “melting” igual a 83,1 °C ($\pm 0,1$), enquanto que as amostras A/O mostraram dois picos com 82,6 °C ($\pm 0,1$) e 80,7 °C ($\pm 0,1$) e um pico para os genótipos O/O de 81,7 °C ($\pm 0,1$). A partir desses dados, foi possível calcular e determinar se as frequências alélicas e genotípicas na população infectada com o *M. tuberculosis* encontravam-se em desacordo com as do grupo controle. Os resultados obtidos através da genotipagem das variantes A/O do gene *MBL2* encontram-se sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8. Frequências alélicas e genotípicas dos pacientes da pesquisa com tuberculose (TB) e dos controles para o éxon 1.

Variante	Pacientes com TB			Controle n=180 (%)	OR	95%IC	p
	n=115 (%)						
	Geral	TB Pulmonar	TB Extrapulmonar				
Alelo							
A	167 (73)	76 (53)	49 (57)	293 (81)	1	Referência	NA
O	63 (27)	68 (47)	37 (43)	67 (12)	1,65	1,09 – 2,49	0,0001
Genótipo							
AA	63 (55)	20 (29)	15 (35)	117 (65)	1	Referência	NA
AO	41 (36)	36 (49)	19 (44)	59 (33)	1,28	0,75 – 2,19	0,366
OO	11 (9)	16 (22)	9 (21)	4 (2)	5,06	1,42 – 22,7	0,005
AO/OO	52 (45)	52 (71)	28 (65)	63 (35)	1,53	0,92 – 2,54	0,08

OR – Odds Ratio; IC – Intervalo de confiança;

As frequências para o éxon 1 encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,565$; $p=0,452$). O alelo A foi mais predominante entre os indivíduos do grupo controle. O genótipo AA demonstrou efeito protetor contra a tuberculose. O alelo mutante O encontrou-se significativamente mais frequentes nos pacientes com TB (27% vs. 12%) ($p < 0,012$; odds ratio [OR] 1,65; 95% intervalo de confiança [1,09 – 2,49]). No entanto, não houve diferença significativa em relação aos genótipos e as formas de tuberculose. O genótipo OO encontrou-se significativamente mais frequentemente nos pacientes com TB quando comparado aos controles (9% vs. 2%; $p < 0,005$).

Os polimorfismos estudados na região promotora e no éxon 1 apresentaram desequilíbrio em “linkage”. A obtenção desses resultados permitiu-nos a construção e análise das frequências dos genótipos combinados entre os grupos de estudo, classificando-os em três classes de acordo com a produção de MBL, designadas como altos produtores (HP), baixos produtores (LP), e produtores deficientes (DP), observados na Tabela 9.

Tabela 9. Genótipos combinados dos pacientes da pesquisa com tuberculose (TB) e o grupo controle.

Genótipos Combinados	Pacientes com TB			Controles n=180 (%)	OR	95%IC	p
	Geral n = 115 (%)	TB Pulmonar n = 72 (%)	TB Extrapulmonar n = 43 (%)				
Produção Alta (HP)							
HYA/HYA							
HYA/LYA							
HYA/LXA	32 (28)	18 (25)	14 (32)	87 (48)	1	Referência	NA
LYA/LYA							
LYA/LXA							
Produção Defeituosa (LP)							
Produção Baixa							
LXA/LXA							
HYA/O	43 (37)	26 (36)	17 (40)	76 (42)	1,53	0,85 – 2,77	0,162
LYA/O							
Produção Deficiente (PD)							
LXA/O	40 (35)	28 (39)	12 (28)	17 (10)	6,32	3,02 – 13,71	<0,0001
O/O							

OR – Odds Ratio; IC – Intervalo de confiança;

Os genótipos da classe HP apresentou-se significativamente mais freqüentes nos controles do que nos pacientes com TB (48% vs. 28%) e o genótipo DP apresentou-se com maior freqüência nos doentes que nos controles (35% vs. 10%) ($p < 0,001$). A combinação entre LP e DP também foi mais comum entre os pacientes do que controles ($p = 0,0006$; [OR] 2,41; 95% intervalo de confiança [1,43 – 4,15]).

5.4. Genotipagem do *DEFB1*

5.4.1. Polimorfismos da Região 5' UTR

A genotipagem da região 5' UTR do gene *DEFB1* através do seqüenciamento permitiu a identificação dos polimorfismos nas posições -20, -44 e -52. A tabela 10 sumariza as freqüências alélicas e genotípicas encontradas nas populações de doentes e controles. Foram genotipados 92 pacientes com tuberculose e 98 controles. O teste do X^2 mostrou que as freqüências dos SNPs em cada população encontraram-se de acordo com as leis do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2 = 2,644$), para cada polimorfismo estudado.

Analisando-se as freqüências alélicas e genotípicas dos polimorfismos não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes com tuberculose e o grupo controle ($p = 0,103$). No entanto, apesar dos dados não serem estatisticamente

significantes, pode-se observar uma maior frequência do genótipo mutante A/A na posição -20 entre pacientes com tuberculose extrapulmonar (32%) quando comparado aos pacientes com tuberculose pulmonar (17%).

Tabela 10. Frequências alélicas e genotípicas dos pacientes da pesquisa com tuberculose (TB) e controles para a região 5'UTR do gene *DEFB1*.

Variante	Pacientes com TB n=92 (%)			Controle n=98 (%)	OR	95%IC	p
	Geral	TB Pulmonar	TB Extrapulmonar				
Alelo -20							
G	117 (64)	76 (60)	28 (50)	121 (62)	1	Referência	NA
A	67 (36)	52 (40)	28 (50)	75 (38)	0,924	0,59 – 1,43	0,750
Genótipo -20							
GG	38 (41)	23 (36)	9 (32)	41 (42)	1	Referência	NA
GA	41 (45)	30 (47)	10 (36)	39 (40)	1,13	0,58 – 2,21	0,752
AA	13 (14)	11 (17)	9 (32)	18 (18)	0,78	0,30 – 1,95	0,671
GA/AA	54 (59)	41 (64)	19 (68)	57 (58)	1,02	0,55 – 1,89	1
Alelo -44							
C	150 (82)	101 (79)	40 (71)	160 (82)	1	Referência	NA
G	34 (18)	27 (21)	16 (29)	36 (18)	1	0,58 – 1,75	1
Genótipo -44							
CC	63 (68)	41 (64)	17 (61)	66 (67)	1	Referência	NA
CG	24 (26)	19 (30)	6 (21)	28 (29)	0,89	0,44 – 1,79	0,869
GG	5 (5)	4 (16)	5 (18)	4 (4)	1,30	0,27 -6,89	0,742
CG/GG	29 (32)	23 (46)	11 (39)	32 (33)	0,94	0,49 – 1,82	0,877
Alelo -52							
G	101 (55)	71 (55)	30 (54)	111 (57)	1	Referência	NA
A	83 (45)	57 (45)	26 (46)	83 (43)	1,07	0,70 -1,64	0,757
Genótipo -52							
GG	31 (34)	22 (34)	10 (36)	33 (34)	1	Referência	NA
GA	39 (42)	27 (43)	10 (36)	45 (46)	0,92	0,46 – 1,86	0,868
AA	22 (24)	15 (23)	8 (28)	20 (20)	1,16	0,50 – 2,74	0,842
GA/AA	61 (76)	42 (66)	18 (64)	65 (66)	0,99	0,52 – 1,90	1

OR – Odds Ratio; IC – Intervalo de confiança;

A partir dos resultados obtidos através das frequências alélicas, foi possível a construção dos haplótipos e a comparação entre os grupos analisados. Foram compilados os resultados dos haplótipos que apresentaram maiores frequências entre os grupos, a ausência de outros se deve à raridade dos mesmos, e por isso não foram colocados. Não foram observadas diferenças significativas entre as populações doentes e saudáveis (Tabela 11).

Tabela 11. Principais haplótipos obtidos a partir do cálculo das frequências alélicas entre os grupos de doentes e controles.

Haplótipos (-52/-44/-20)	Pacientes com TB n=92	Controles n = 98	
ACG	0,45	0,43	p = 0,97
GCA	0,36	0,38	
GGG	0,18	0,18	p = 0,92
GCG	0,01	0,005	

Foram analisadas subsequente, a distribuição dos polimorfismos em relação a alguns aspectos clínicos dos pacientes acometidos pela tuberculose. Os SNPs das posições -40 e -20 não apresentaram diferença significativa para o exame de Raio-X, apesar de para a posição -52, o genótipo heterozigoto G/A apresentar-se mais freqüente nos pacientes com raio-X normal (57%) quando comparado aos pacientes com raio-X alterado (29%), no entanto o *p* não foi estatisticamente significativo (*p*=0,06).

Para a posição -44, o genótipo heterozigoto C/G apresentou-se mais freqüente nos pacientes com cultura para o bacilo *M. tuberculosis* positiva (33%) quando comparado aos pacientes com cultura negativa (0%), com *p*=0,036, enquanto que os polimorfismos para as posições -20 e -52 não apresentaram diferenças significativas.

Em relação ao teste de sensibilidade à tuberculina, ou teste de Mantoux, não foram encontradas diferenças significativas entre as frequências dos polimorfismos entre os grupos de pacientes estudados.

Em relação à forma clínica de tuberculose, se pulmonar ou extrapulmonar, não foram observadas diferenças significativas para o SNP na posição -52. Contudo, para a posição -44 foi observada uma diferença (*p*=0,06) para o genótipo heterozigoto C/G, sendo este polimorfismo mais freqüente nos pacientes com tuberculose pulmonar (28%) do que nos pacientes com tuberculose extrapulmonar (10%). O genótipo C/C apresentou-se mais freqüente entre os pacientes com tuberculose extrapulmonar (86%) do que nos pacientes com tuberculose pulmonar (67%), com *p*=0,08. Para a posição -20, houve uma maior frequência do genótipo A/A entre os pacientes com TB extrapulmonar (29%) do que nos pacientes com TB pulmonar (12%), com *p*=0,083.

6. Discussão

A tuberculose é um grave e persistente problema, responsável por milhões de mortes todos os anos. Atualmente, com o aumento no número da co-infecção TB/AIDS e de cepas multirresistentes, além de apresentações atípicas da doença, nos deparamos com números alarmantes que evidenciam a necessidade de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas (Khan *et al.*, 2006).

O banco de dados criado através do programa SSPS 10.0 permitiu a indexação bem como o manuseio e a análise dos dados de forma rápida, fácil e dinâmica. O banco de dados possibilitou a apreciação detalhada da população de estudo realizando diversas análises individualizadas dos múltiplos fatores de interesse da pesquisa, tornando-se um elemento chave em um estudo de associação epidemiológica.

Em nosso estudo, não houve diferença significativa entre os casos de tuberculose e o sexo dos pacientes, apesar de haver uma tendência maior da doença, segundo dados da literatura, para a população masculina. De acordo com Caliri e Figueiredo (2007) tal fato é justificado em virtude de ser este o grupo mais exposto à doença quando comparada à população feminina. Em relação à faixa etária, os dados acompanham o padrão nacional, com a prevalência da doença na faixa entre os 20-49 anos. No entanto, foi observada uma elevada incidência da doença entre pacientes menores de 15 anos. Alves *et al.* (2003) afirmam que a presença de tuberculose em crianças deve ser encarada como um evento-sentinel na Saúde Pública, visto que se refere à infecção recente promovida por contato com adulto bacilífero. Estudos apontam que nos últimos 20 anos houve uma elevação da incidência da tuberculose nas faixas etárias de 39-49 anos e de mais de 60 anos, fazendo com que a mediana de idade permanecesse em torno de 41 anos. Contudo, este grupo não teve expressão considerada em nosso estudo.

Em relação à efetividade da vacinação pela BCG, alguns estudos relevam-se discordantes quanto ao efeito profilático da vacina. Nossos resultados mostraram baixa efetividade da vacinação uma vez que 70,4% dos pacientes haviam sido vacinados, mesmo assim desenvolveram a doença. No entanto, a maioria dos países no mundo tem adotado a aplicação de uma dose única de BCG ao nascer, conforme recomendação da OMS, pois considera uma estratégia adequada principalmente em regiões com alta incidência de TB, protegendo contra a ocorrência de formas graves da doença e que atinge principalmente as crianças, como a meningite tuberculosa e a tuberculose miliar (Pereira *et al.*, 2007). Porém, há evidências de que a segunda dose da BCG não aumenta o seu efeito protetor. No Brasil, segundo recomendação do Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde,

a aplicação da segunda dose da vacina foi suspensa em crianças entre 6 e 10 anos de idade, devido à avaliação de estudos nacionais e internacionais que indicam baixa efetividade da segunda dose, uma vez que a vacina não aumentaria a imunidade já adquirida com a primeira. Apesar de suas limitações e da expectativa futura de novas vacinas para a tuberculose, a vacina BCG mantém-se como importante instrumento no controle dos efeitos danosos da doença, sobretudo em países com taxas de incidência médias e elevadas (Pereira *et al.*, 2007).

Diante das co-morbidades identificadas no presente estudo, o alcoolismo, assim como encontrado na literatura, apresentou importante significância com a TB (Vendramini *et al.*, 2005). No presente trabalho, o alcoolismo apareceu como a principal causa associada à doença em 14% dos casos. O que é explicado pelo fato de que a caquexia decorrente do etilismo predispõe o indivíduo a um quadro de baixa imunidade (Nogueira, 2001).

Em vistas das limitações encontradas em um dos pilares responsáveis pelo controle da tuberculose, o diagnóstico precoce, rápido e sensível, a necessidade de novas metodologias diagnósticas nos conduziu a considerar a importância do desenvolvimento de uma ferramenta auxiliar capaz de detectar o bacilo e que pudesse contribuir no avanço do diagnóstico de formas paucibacilares e extrapulmonares da tuberculose. A PCR e suas variações, como a nested-PCR, têm sido destacada como uma técnica molecular promissora para o diagnóstico rápido da TB (Folgueira, 1996; Rodriguez e Royo, 1997; Ahmed *et al.*, 1998; Honoré-Bouakline *et al.*, 2003). Em nosso estudo, foi possível otimizar e validar um protocolo rápido e específico, desenvolvido no Laboratório de Imunoepidemiologia do CPqAM/FIOCRUZ, para a detecção específica do *M. tuberculosis* em amostras de sangue. No entanto, apesar da baixa sensibilidade apresentada para um método diagnóstico (54,8%), faz-se importante ressaltar que estes resultados, apesar de preliminares, representam o início do desenvolvimento de uma área pioneira em Pernambuco no campo do diagnóstico molecular para a tuberculose. Uma extensão da presente pesquisa vem sendo desenvolvida abrangendo um número maior de indivíduos, com diferentes formas clínicas da doença, analisando-se a eficiência de diversos tipos de amostras biológicas, a fim de avaliar da melhor forma a magnitude das técnicas moleculares como ferramenta auxiliar no diagnóstico da tuberculose.

Seguindo a área da susceptibilidade genética na tuberculose, foco principal do trabalho, têm-se observado que inúmeros estudos epidemiológicos têm demonstrado evidências fortes a cerca da influência genética na tuberculose (Marquet e Schurr, 2001).

Diversos outros protocolos desenvolvidos para a detecção de polimorfismos de única base existentes, como a PCR convencional requerem um processamento de dados, e uma manipulação pós-PCR do produto de amplificação, o que aumenta tempo de trabalho e o risco de contaminação (Crosdale *et al.*, 2000).

A plataforma da PCR em tempo real permitiu aumentar a sensibilidade e robustez de uma PCR, sendo um importante advento na biologia molecular e uma extraordinária ferramenta na detecção de SNPs (Novais *et al.*, 2004). A utilização do corante Sybr, ao invés da utilização de sondas marcadas, permitiu também a diminuição dos custos por análise de polimorfismo (Novais *et al.*, 2004). Através da padronização de um protocolo rápido, prático e eficiente para a genotipagem do gene da MBL, desenvolvido no Laboratório de Virologia do LIKA/UFPE, foi possível identificar os SNPs entre os pacientes com tuberculose e o grupo de controles, através da plataforma da PCR em tempo real do Rotor Gene 3000. Além disso, o sequenciamento de DNA foi a técnica utilizada para confirmação dos genótipos encontrados através da PCR em tempo real para o gene *MBL2*, assim como para a genotipagem do gene *DEFB1*.

6.1. Polimorfismos do *MBL2*

O presente estudo mostrou, em relação aos polimorfismos presentes na estrutura gênica do *MBL2*, evidências sugestivas de que dependendo do par de haplótipo herdado pelo organismo, a concentração sérica de MBL poderá apresentar atuação protetora contra a tuberculose ou predispor o organismo à doença. Indivíduos portadores dos haplótipos que promovem maior produção de MBL, principalmente o haplótipo HYA/HYA, foram encontrados em maior frequência entre o grupo de pessoas saudáveis, com *p* estatisticamente significativa. Nossos resultados apresentaram-se de acordo com o proposto por Capparelli e colaboradores (2009), que relatam que indivíduos HYA/HYA, expostos ao contato com o patógeno por pelo menos 8 meses, permaneceram clinicamente saudáveis, uma vez que o soro dos participantes com HYA/HYA exibiu uma atividade antibacteriana da MBL significativamente maior, representando um fator de proteção aos indivíduos em questão.

Além disso, uma combinação de haplótipos para a MBL que contrasta com o discutido acima foi encontrada, conferindo susceptibilidade à tuberculose.

Vários pares de haplótipo foram encontrados entre os pacientes com TB. No entanto, as combinações que promoveram produção deficiente (PD), principalmente o haplótipo O/O, apresentaram-se mais frequentes, aumentando significativamente o risco de desenvolver a tuberculose ($p < 0,0004$; [OR] 6,32 [3,02 – 13,71]) (Tabela 9). Semelhante a esses resultados, foram os encontrados por Alagarasu *et al.* (2007) e Selvaraj *et al.* (2006), onde analisando os polimorfismos do *MBL2* observaram um aumento significativo da frequência do genótipo O/O entre o grupo de doentes (10,9%) quando comparado ao grupo controle (1,8%).

Mutações no gene *MBL2* têm sido associadas a níveis baixos de MBL sérico. Indivíduos normais apresentam níveis séricos de cerca de 1.600 ng/ml de MBL, em heterozigotos para a mutação os níveis chegam a 350 ng/ml, enquanto que em indivíduos homozigotos para a mutação apresentam níveis indetectáveis (≤ 10 ng/ml) (Davies *et al.*, 2001). Esta diminuição na concentração da MBL circulante tem sido correlacionada a infecções recorrentes na infância e, possivelmente, em adultos. Em nosso estudo, apesar de não termos quantificado os níveis séricos da MBL em ambos os pacientes e controles, devido ao caráter retrospectivo do projeto, pudemos observar uma maior frequência do alelo O e dos genótipos que conferem baixa produção de MBL entre os pacientes doentes quando comparado com os controles saudáveis ($p < 0,0001$).

Foi demonstrado que a MBL se liga a resíduos de manose encontrada na parede celular do *M. tuberculosis*, na forma de lipoarabinomanose, ativando a fagocitose pelos macrófagos (Selvaraj *et al.*, 2006). Dessa forma, o baixo nível sérico de MBL encontrado nos indivíduos doentes devido às mutações funcionais pode ser um dos possíveis fatores associados à susceptibilidade à TB.

Contudo, trabalhos a cerca do genótipo da MBL, concentração da proteína e sua relação com o desenvolvimento da tuberculose ainda são conflitantes. Trabalhos como os de Garred *et al.* (1997) e Søbørg *et al.* (2003), que compararam igualmente as frequências alélicas do promotor e do éxon 1 da MBL, demonstraram que níveis mais baixos da MBL estão associados à proteção contra a tuberculose. Os trabalhos supracitados explicam o fato através da hipótese de que a ligação da MBL a determinados microrganismos pode, sob certas circunstâncias, conduzir a ativação descontrolada do sistema complemento, tornando-se prejudicial para o organismo. O receptor de manose (RM), juntamente com os receptores do sistema complemento (RC), mediam a fagocitose do *M. tuberculosis*. A membrana rica em lipoarabinomanose na superfície do *M. tuberculosis* liga-se tanto ao RC quanto à MBL. Patógenos intracelulares, como o *M. tuberculosis*, exploram a deposição de moléculas do sistema complemento em sua superfície como uma forma de amplificar o processo de fagocitose, o que pode permitir ao *M. tuberculosis* estabelecer a infecção no sistema e o desenvolvimento de TB. Isto sugere que níveis maiores de MBL podem desempenhar um papel importante na primeira linha da defesa do hospedeiro, e que níveis intermediários da proteína possam facilitar a infecção do bacilo.

Uma explicação para resultados tão divergentes não é algo simples. Atualmente, acredita-se que a discrepância nos resultados encontra-se refletida nas diferenças existentes entre as cepas de *M. tuberculosis*. Há indícios crescentes de que cepas do bacilo são geneticamente heterogêneas e estão associadas a diferentes regiões geográficas. Durante a

evolução, tanto os hospedeiros quanto o bacilo da TB co-evoluíram de maneira que diferentes cepas encontram-se adaptadas a sua própria população, tornando a interação entre os genótipos do organismo e do bacilo muitas vezes algo extremamente íntimo (Gagneux *et al.*, 2006; Houben *et al.*, 2006).

O *pool* genético pode afetar fortemente os resultados de um estudo de associação, de maneira que investigações em populações homogêneas são preferidas. Em estudo realizado por Alves-Silva *et al.* (2000) na população do Nordeste brasileiro foram encontradas uma mistura combinada do genoma de Africanos (44%), Caucasianos (34%) e Indígenas americanos (22%). Na população do nordeste brasileiro as contribuições genéticas africana, caucasiana e indígena americana podem ter resultado em uma diferente distribuição dos polimorfismos do *MBL2* quando comparada com outras populações. Faz-se importante considerar também que a tuberculose é uma doença multifatorial e que a suscetibilidade à doença depende não apenas do aspecto genético, mas também de uma interação com fatores ambientais.

Todas estas informações levantam a questão acerca do porque de combinações entre determinados haplótipos, que conferem susceptibilidade à tuberculose, não terem sido retiradas da população através da seleção natural. Apesar de não haver respostas definitivas, algumas explicações são plausíveis. O papel desempenhado pela MBL não está limitada à proteção da tuberculose (Jack *et al.*, 2001). A MBL é capaz de reconhecer uma variedade ampla de patógenos e a partir daí acionar as vias de sinalização do sistema imune adaptativo, culminando na ativação de vias pró-inflamatórias. Contudo, o processo de inflamação quando excessivo pode-se tornar danoso ao organismo (Takashi *et al.*, 2005).

A presença de inúmeros sítios polimórficos tanto no promotor quanto na região codificadora da MBL e a influência hormonal sobre a sua síntese são capazes de manter o gene *MBL2* sob um controle adequado. Assim, a combinação entre alguns haplótipos podem ser mantidas na população com o objetivo de proteção contra outros tipos de patógenos, além de proteger o organismo contra respostas inflamatórias excessivas (Capparelli *et al.*, 2009).

O presente estudo sugere que a MBL é uma proteína de grande importância dentro da resposta imunológica contra o bacilo da tuberculose, principalmente no processo de ativação do sistema complemento e fagocitose. Nossos resultados apontam para o aspecto protetor do genótipo HYA/HYA contra a TB e do caráter suscetível para o genótipo O/O e para os haplótipos de baixa produção de MBL (PD) para a doença, indicando que o sistema genético da MBL pode desempenhar um papel duplo na defesa do organismo, considerando-se a mesma doença.

6.2. Polimorfismos do *DEFB1*

O ambiente habitado pelo ser humano encontra-se inevitavelmente contaminado por um número elevado de microorganismos, tornando-se imprescindível o desenvolvimento de mecanismos de defesa do hospedeiro contra invasores. Os revestimentos epiteliais da nossa pele, trato digestório e geniturinário, além da árvore traqueobrônquica produzem um número infindável de peptídeos com atividade antimicrobiana (Méndez-Samperio, 2008).

Algumas destas moléculas antimicrobianas apresentam caráter de sinalização para células envolvidas na defesa tanto inata quanto adquirida da resposta imune. Dentro deste contexto a proteína HBD-1 aparece como um dos peptídeos antimicrobianos mais importantes na defesa do epitélio humano contra infecções. Estudos de regulação da expressão da HBD-1 têm contribuído não só para uma maior compreensão a cerca dos mecanismos de defesa da mucosa humana, como também apresenta um potencial de aplicação na prevenção e no tratamento de infecções respiratórias, genito-urinárias e trato digestório (Horne *et al.*, 2008; Schenk e Mueller, 2008).

A expressão da proteína HBD-1 é ampla nas glândulas de secreção e em células epiteliais, incluindo o epitélio pulmonar das glândulas submucosas (Bals, 2000). O comprometimento da atividade antimicrobiana da HBD-1 tem sido associado a uma maior susceptibilidade a infecções das vias aéreas nos casos de fibrose cística, sugerindo o papel crucial desta proteína na defesa contra a invasão de patógenos (Bals, 2000).

A associação entre as variantes da HBD-1 e a susceptibilidade a diversas doenças tem sido reportada em vários trabalhos. Polimorfismos no gene *DEFB1* têm sido associados com a susceptibilidade à asma, à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e a doenças pulmonares associadas à fibrose cística (Klotman e Chang, 2006). Além disso, polimorfismos presentes na região 5'UTR do gene foram recentemente associados à transmissão perinatal do HIV-1 em crianças italianas (Braidia *et al.*, 2004). No entanto, verificou-se em nosso trabalho que os polimorfismos estudados, presentes na região 5' UTR do gene *DEFB1* não aumentaram, como esperado, a susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis* ($p>0,05$). Não foi observado nenhum tipo de associação entre os três polimorfismos estudados e a susceptibilidade ao bacilo, mesmo quando analisada a forma clínica de tuberculose, apesar de existir uma tendência da frequência do genótipo AA entre os pacientes com tuberculose extrapulmonar. Esta é a primeira descrição a cerca do papel dos polimorfismos do gene da HBD-1 com a infecção promovida pelo *M. tuberculosis*. A escassez de trabalhos deste tipo, a cerca da presença ou ausência de associação de polimorfismos em *DEFB1* entre pacientes com tuberculose revela a importância do trabalho, e principalmente a necessidade de novos

estudos na área, com o intuito de gerar novas informações a cerca do papel que polimorfismos funcionais nos genes das β -defensinas causam durante o controle da infecção do *M. tuberculosis*, principalmente em Pernambuco, área de elevado endemismo para a doença.

Em relação aos ensaios experimentais a cerca da atividade anti-micobacteriana das β -defensinas, tem sido relatado que níveis significativos de HBD-2 têm sido detectados em lavados broncoalveolares de pacientes infectados por *M. avium-intracellulare* (Ashitani *et al.*, 2001), demonstrando em vários casos que a HBD-2 está associada com a lise de bacilos intracelulares (Rivas-Santiago *et al.*, 2005). Curiosamente, Sharma *et al.* (1999) mostraram que os peptídeos antimicrobianos apresentam forte atividade bactericida contra o *M. tuberculosis*, através do aumento da permeabilidade da membrana celular das micobactérias, e que a morte intracelular do *M. tuberculosis* por peptídeos antimicrobianos deve-se à sua interação direta com o bacilo.

Em um estudo conduzido por Rivas-Santiago *et al.* (2006), utilizando um modelo murino de infecção com *M. tuberculosis*, foi observada elevada produção de mRNA de vários tipos de defensinas durante os primeiros estágios da infecção, predominantemente mBD-3 e mBD-4, onde tais moléculas participariam da eliminação inicial do bacilo uma vez que entrasse em contato com o mesmo.

Apesar de não ter sido observada associações diretas entre os polimorfismos e os grupos de pacientes e indivíduos estudados, pode-se sugerir mediante a análise dos dados clínicos que existe certa influência dos genótipos em relação ao perfil clínico do paciente com tuberculose, indicando um efeito indireto dos polimorfismos, principalmente em relação à forma de tuberculose. Além disso, embora o gene *DEFB1* seja considerado expresso constitutivamente (Ganz, 2003), existem relatos de expressão diferencial inter-indivíduos (Cagliani *et al.*, 2008) e inter-tecidos (Jia *et al.*, 2001). Até a atualidade, nenhum experimento foi realizado para demonstrar a associação entre polimorfismos no gene *DEFB1* e o padrão de susceptibilidade e/ou resistência à tuberculose.

Um dos trabalhos que mais se aproxima a cerca da relação entre susceptibilidade a infecções causadas por micobactérias e polimorfismos no gene *DEFB1* é o apresentado por Prado-Gomes de Oca *et al.* (2009), que demonstraram a importância da presença de polimorfismos no gene *DEFB1* entre pacientes infectados pelo *Mycobacterium leprae*, agente etiológico da hanseníase. A maior susceptibilidade desses pacientes referiu-se à presença de polimorfismos na posição -44 do gene, indicando claramente o papel importante da HBD-1 na prevenção contra micobactérias.

Em relação aos haplótipos, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos de estudo analisados. Dois estudos indicaram que o haplótipo GCA (-52/-44/-20)

encontra-se associado à asma e desempenha um papel protetor contra a sepse, enquanto que o haplótipo GGG é um fator de risco na progressão da sepse (Leung *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007). Cagliani *et al.* (2008) indicam que a região promotora do *DEFB1* apresenta haplogrupos com um baixo nível de recombinação, devido à distância muito curta entre as posições -52, -44 e -20. Estudos anteriores relataram que os alelos -52, -44 e -20 podem contribuir tanto para a proteção quanto para a susceptibilidade a diferentes doenças, indicando a ação sinérgica que tais SNPs podem desempenhar no fenótipo (Naslavsky *et al.*, 2009).

Zhu *et al.* (2003) ao investigar os efeitos estimulatórios da parede celular do bacilo Calmette-Guérin (BCG) na expressão do gene *DEFB1*, observaram um aumento na expressão de mRNA do gene *DEFB1* em células epiteliais do pulmão, sendo o bacilo um potente adjuvante na ativação da resposta imunológica. Além disso, ao analisar os elementos de resposta na região 5' flanqueadora do gene, os pesquisadores concluíram que as seqüências compreendidas entre as posições -314/+54 apresentam sítios de ligação CEBP, AP-1 e CP2, seqüências estas envolvidas na indução da expressão gênica uma vez estimuladas pela presença do *M. tuberculosis*.

Estudos a cerca do papel dos polimorfismos no gene *DEFB1* e de outras defensinas, assim como a regulação da expressão gênica contribuirão no entendimento a cerca dos mecanismos de defesa presentes nas mucosas, além de representar uma área de grande potencial para a prevenção e tratamento de infecções respiratórias.

7. Conclusões

1. Nossos resultados indicam que a presença de SNPs no gene *MBL2* encontram-se associados a uma maior susceptibilidade ao bacilo da TB, representando uma molécula fundamental durante os primeiros estágios de infecção pelo *M. tuberculosis*.
2. A presença dos alelos mutantes L e O é um fator de risco para a infecção, conferindo maior susceptibilidade para TB.
3. A presença do alelo mutante X apresentou-se em maior frequência na população controle, sugerindo um fator de proteção contra a tuberculose.
4. A susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis* também é influenciada pelos níveis funcionais de MBL, principalmente por genótipos deficientes de produção (DP), associados com uma considerável ausência de MBL sérica.
5. Apesar de ser uma molécula importante no mecanismo de defesa da imunidade inata, polimorfismos no gene da HBD-1 não apresentaram diferenças entre os grupos estudados, não revelando associação entre a presença de polimorfismos no gene *DEFB1* e a susceptibilidade à tuberculose.

8. Referências Bibliográficas

- Ahmed N, Mohanty AK, Mukhopadhyay U, Batish VK and Grover S (1998) PCR-based rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in blood from immunocompetent patients with pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiomol.* 36:3094-3095.
- Akey JM, Sosnoski D, Parra E, Dios S, Hiester K, Su B, Bonilla C, Jin L and Shriver MD (2001) Melting curve analysis of SNPs (McSNP): a gel-free and inexpensive approach for SNP genotyping. *Biotechniques.* 30(2):358-62.
- Alagarasu K, Selvaraj P, Swaminathan S, Raghavan S, Narendran G and Narayanan, PR (2007) Mannose binding lectin gene variants and susceptibility to tuberculosis in HIV-1 infected patients of South India. *Tuberculosis.* 87(6):535-43.
- Alcaïs A and Abel L (2004). Application of genetic epidemiology to dissecting host susceptibility/resistance to infection illustrated with the study of common mycobacterial infections. *Susceptibility to Infectious Diseases: The Importance of Host Genetics* (Bellamy R, ed), pp. 7–33. Cambridge University Press, Cambridge.
- Alves R, Sant’Anna CC and Cunha AJLA da (2000) Epidemiologia da tuberculose infantil na cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Rev. Saúde Pública,* 34(4): 409-410.
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. (2000). The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 67:444-61.
- Ardlie K, Kruglyak L and Seielstad M (2002) Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet.* 3: 299–309.
- Arnold C (2007) Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology and Infection.* 13: 120–128p.
- Arraes LC, Souza PRE, Bruneska D, Castelo Filho A, de Souza Cavada B, de Lima Filho JL, Crovella S (2006) A cost-effective melting temperature assay for the detection of single-nucleotide polymorphism in the MBL2 gene of HIV-1-infected children. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 39.
- Ashitani J, Mukae H, Hiratsuka T, Nakazato M, Kumamoto K, Matsukura S (2001) Plasma and BAL fluid concentrations of antimicrobial peptides in patients with *Mycobacterium avium-intracellulare* infection, *Chest.* 119: 1131–1137.
- Assis NCS, Lopes ML, Cardoso NC, Costa MM, Sousa CO and Lima KVB (2007) Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. *J Bras Patol Med Lab.* 43(1), 1-7.
- Bals R (2000) Epithelial peptides in host defense against infection, *Respir Res.* 1, 141–150.

- Barroso EC, Mota RMS, Oliveira ACM, Cordeiro JIR, Barroso JB, Rodrigues JLN (2004) Papel da tuberculose domiciliar no surgimento da tuberculose multirresistente. J. Bras. Pneumol. 30(1):46-52.
- Bellamy R (1998) Genetics and pulmonary medicine. 3. Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations. Thorax. 53: 588–593.
- Bellamy R, Beyers N, McAdam K et al. (2000) Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. P Natl Acad Sci. 97: 8005–8009.
- Bertolli-Filho C (2001) História Social da Tuberculose e do Tuberculoso: 1900-1950. Coleção Antropologia e Saúde. 248p.
- Bloom BR, Murray CJL (1992) Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. Science. 257: 1055-1064.
- Bloom BR, Small PM (1998) The evolving relation between humans and *Mycobacterium tuberculosis*. N Engl J Me. 338: 677-678.
- Boldt AB and Petzl-Erler ML (2002) A new strategy for mannosebinding lectin gene haplotyping. Hum. Mutat. 19:296–306.
- Boman GH (1998) Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of immunity: an update review. Sacand. J. Immunol. 48:15-25.
- Braida L, Boniotto M, Pontilho A, Tovo PA, Amoroso A, Crovella S (2004) A single nucleotide polymorphism in the human beta-defensin 1 gene is associated with HIV-1 infection in Italian children. 18, 1598-1600.
- Brosch R, Gordon S, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, et al. (2002) A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci USA. 99: 3684–3689.
- Burgner D, Jamieson S, Blackwell J (2006) Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? Lancet Infect Dis. 6: 653–663.
- Bustin, SA. (2005) Real-Time PCR. Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics. DOI:10.1081/E-EDGP 120020684.
- Cagliani, R., M. Fumagalli, S. Riva, U. Pozzoli, G.P. Comi, G. Menozzi, N. Bresolin and M. Sironi (2008) The signature of long-standing balancing selection at the human defensin beta-1 promoter, Genome Biol. 9: R143.
- Caliari SJ and Figueiredo MR (2007) Perfil dos pacientes com tuberculose internados em hospital especializado no Brasil. Rev Panam Infectol. 9(4):34-5.

- Capparelli R, Iannaccone M, Palumbo D, Medaglia C, Moscariello E, Russo A, and Iannelli D (2009) Role played by human mannose-binding lectin polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *The Journal of infectious diseases* 199(5):666-72.
- Cavalcanti ZR, Albuquerque MFPM, Campello ARL, *et al.* (2006) Characteristics of elderly tuberculosis patients in Recife, Brazil: a contribution to the tuberculosis control program. *J. Bras. Pneumol.* 32:535-543.
- Chen, Q.X., C. Lv, L.X. Huang, B.L. Cheng, G.H. Xie, S.J. Wu and Fanh XM (2007) Genomic variations within DEFB1 are associated with the susceptibility to and the fatal outcome of severe sepsis in Chinese Han population, *Genes Immun.* 8:439–443.
- Clark-Curtiss JE and Haydel SE (2003) Molecular Genetics of *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:517–549p.
- Coberly JS and Chaisson RE (2001) Tuberculosis. In: Nelson KE, Williams CM and Graham NMH (eds) *Infectious Disease Epidemiology – Theory and Practice*. Maryland, Aspen, pp 411-437.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry III CE, *et al.* (1998) Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the Complete Genome Sequence. *Nature.* 393: 537-544.
- Crosdale DJ, Ollier WE, Thomson W, Dyer PA, Jensenius J, Johnson RWG and Poulton KV (2000) Mannose binding lectin (MBL) genotype distributions with relation to serum levels in UK Caucasoids. *European Journal of Immunogenetics* 27:111–7.
- Daniel TM (1997) *Captain of Death: the Story of Tuberculosis*, University of Rochester Press, New York. p 296.
- Davies J, Turner M and Klein N (2001) The role of the collectin system in pulmonary defence. *Paediatr Respir Rev.* 2:70–75.
- Dommett RM, Klein N and Turner MW (2006) Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 68: 193–209.
- Dörk T and Stuhmann M (1998) Polymorphisms of the human betadefensin-1 gene. *Mol Cell Probes* 1998, 12:171-173.
- Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA and Santos DS (2006) The resumption of consumption: a review on tuberculosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101: 697-714.
- Dussault AA and Pouliot M (2006) Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol. Proced. Online.* 8(1): 1-10.
- Fätkenheuer G, Taelman H, Lepage P, Schwenk A and Wenzel R (1999) The return of tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34: 139-146p.

- Ferguson LR, Shelling AN, Browning BL, Huebner C and Petermann I (2007) Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutat Res* 622: 70–83.
- Ferreira AAA, Queiroz KCS, Torres KP, Ferreira MÂF, Accioly H and Alves MSCF (2005) Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. *Rev Bras Epidemiol.*, 8(2): 142-149p.
- Flynn J (2006) Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbes Infect* 8: 1179–1188.
- Folgueira L, Delgado R, Palenque E and Noriega AR (1996) Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculous meningitis in AIDS patients. *Neurology* 44:1336-1338. 34:512-515.
- Frothingham R and Wilson KH (1995) Sequence-based strain differentiation in the *Mycobacterium avium* complex. *J Bacteriol* 175: 2818–2825p.
- Fujita T (2002) Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 346-353.
- Fundo Global. Tuberculose – Brasil (2009) PE – O combate à tuberculose. Disponível em: http://www.fundoglobaltb.org.br/site/noticias/mostraNoticia.php?Section=5&id_content=920. Acessado em 25 de fevereiro de 2010.
- Gagneux S and Small PS (2007) Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* 7:328 –37.
- Ganz T (2003) The Role of Antimicrobial Peptides in Innate Immunity. *Integr. Comp. Biol.* 43:300–304.
- Glickman MS and Jacobs JR WR (2001) Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* 104: 477-485.
- Gray IC, Campbell DA *et al.* (2000) Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum Mol Genet*, 9(16):2403-8.
- Gutierrez M, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, Supplys P and Vicent V (2005) Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*, 1: 55–61p.
- Hargreaves NJ, Kadzakuanja O, Phiri S, Nyangulu DS, Salaniponi FML, Harries AD and Squire SB (2001) What causes smearnegative pulmonary tuberculosis in Malawi, an area of high HIV seroprevalence? *Int J Tuberc Lung Dis*, 5: 113-22p.
- Hass F and Hass SS (1996) The origins of *Mycobacterium tuberculosis* and the notion of its contagiousness. In Rom WN and Garay S. *Tuberculosis*. Little, Brown and Co., Boston, Mass, 3-19p.

- Hellyer TJ, Desjardin LE, Assaf MK, Bates JH, Cave MD and Eisenach KD (1996) Specificity of IS6110 – based ampçification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol. 34: 2843-2846.
- Hernandez–Pando R, Orozco H and Aguilar D (2009) Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. Arch. Immunol. Ther. Exp. 57:355–367.
- Honoré-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, Lagrange PH and Hermann JL (2003) Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. J. Clin. Microbiol. 41:2323–2329p.
- Horne AW, Stock SJ and King AE (2008) Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. Reproduction. 135(6):739-49.
- Houben EN, Nguyen L and Pieters, J. (2006) Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. Curr. Opin. Microbiol. 9:76–85.
- Hudson CP, Wood R and Maartens G (2000) Diagnosing HIV-associated tuberculosis: reducing costs and diagnostic delay. Int J Tuberc Lung Dis, 4: 240-5.
- Huggett JF, Mchugh TD and Zumla A (2003) Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. Int. J. Biochem. Cell Biol. 35:1407–1412.
- Hughes TA (2006) Regulation of gene expression by alternative untranslated regions, Trends Genet. 22:119–122.
- Ip WK, Chan KH, Law HK *et al.* (2005) Mannose-binding lectin in severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. J Infect Dis. 191: 1697–704.
- Jack D, Klein NJ and Turner MW (2001) Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. Immunol Ver 180:86 –99.
- Jamal LF and Moherdaui F (2007) Tuberculose e infecção pelo HIV no Brasil: magnitude do problema e estratégias para o controle. Rev Saude Publica. 41:104-10.
- Jepson A, Fowler A, Banya W, Singh M, Bennett S, Whittle H and Hill A (2001) Genetic regulation of acquired immune responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: a study of twins in West Africa. Infect Immun 69: 3989–3994.
- Ji X, Gewurz H *et al.* (2005) Mannose binding lectin (MBL) and HIV. Mol Immunol, 42(2):145-52.
- Jia, HP, Starner T, Ackermann M, Kirby P, Tack BF and McCray Jr PB (2001) Abundant human beta-defensin-1 expression in milk and mammary gland epithelium, J. Pediatr. 138:109–112.
- Khan MA, Mirza SH, Abbasi SA, Butt T, Anwar M (2006) Peripheral Blood-Based Polymerase Chain Reaction in Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. J Ayub Med Coll Abbottabad. 18(2): 25-28.

- Kimman T, Janssen R and Hoebee B (2006) Future prospects in respiratory syncytial virus genetics. *Future Virol* 1: 483–492.
- Kivi M, Liu X, Raychaudhuri S, Altman RB and Small PM (2002) Determining the genomic locations of repetitive DNA sequences with a whole-genome microarray: IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40:2192-2198.
- Klotman ME and Chang TTL (2006) Defensins in innate antiviral immunity. *Nature Review Immunology* (6): 447-456.
- Kritski AL, Conde MB and Muzzy de Souza GR (2000) Tuberculose. Do ambulatório à enfermagem. Rio de Janeiro: Atheneu, 303p.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonaćk J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Andersson AS and Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27:95–125.
- Kubistova Z, Mrazek F and Petrek M (2009) Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 153(2):93-102.
- Lai Y and Gallo RL (2009) AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30(3):131-41.
- Lander E and Schork N (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037–2048.
- Leung TF, Li CY, Liu EK, Tang NL, Chan IH, Yung E, Wong GW and Lam CW (2006) Asthma and atopy are associated with DEFB1 polymorphisms in Chinese children, *Genes Immun.* 7:59–64.
- Maartens G and Wilkinson RJ (2007) Tuberculosis. *Lancet* 370: 2030–2043.
- Madsen HO, Garred P *et al.* (1994) A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics*, 40(1):37-44.
- Marquet S and Schurr E (2001) Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. *Drug Metab. Dispos.* 29:479-483.
- Medzhitov R and Janeway CA Jr (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 296(5566):298-300.
- Mello FCQ (2001) Modelos Preditivos para o Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar Paucibacilar. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina.
- Méndez-Samperio P (2008) Role of antimicrobial peptides in host defense against mycobacterial infections, *Peptides* 29:1836–1841.

- Milanese M, Segat L, Arraes LC, Garzino-Demo A and Crovella S (2009) Copy number variation of defensin genes and HIV infection in Brazilian children. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 50(3):331-3.
- Miller E, Jamieson S, Joberty C et al. (2004) Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun* 5: 63–67.
- Ministério da Saúde (2003) Sistema de Informações sobre Mortalidade. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Plano Nacional de Controle da Tuberculose. Brasília, DF.
- Ministério da Saúde (2009) Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose – PNCT. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/tb/eventos/forum/04TB09_Brasil_DBarreira.pdf. Brasília, DF.
- Möller M, de Wit E, Hoal EG (2009) Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.*
- Naslavsky MS, Rocha CRC, Lima Filho JL and Crovella S (2009) Predicting alternative candidates as binding sites to DEFB1 668 (–44) SNP: A long way from statistical association with multifactorial diseases. *Infection, Genetics and Evolution.* 9(6): 1129-1131.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2001) Quantitative molecular methods for infectious diseases: proposed guidelines. 23(28): 6-8.
- Nogueira PA (2001) Motivos e tempo de internação e o tipo de saída em hospitais de tuberculose do Estado de São Paulo, Brasil 1981 a 1995. *J Pneumol.* 27(3):123-129.
- Novais CM and Pires-Alves M (2005) PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. *Biotecnologia Ciência & desenvolvimento.* 33:10-3.
- Ogusku MM and Salem JI (2004) Análise de diferentes primers utilizados na PCR visando o diagnóstico da tuberculose no estado do Amazonas. *J Bras Pneumol;* 30:433-9.
- Oliveira MM, Silva JCS, Costa JF, Amim LH, Loredó CCS, Melo H *et al.*, (2004) Distribuição de Polimorfismos de Base única (SNPs) no gene de TNF-alfa (-238/-308) entre pacientes com TB e outras pneumopatias: marcadores genéticos de susceptibilidade a ocorrência de TB? *J. Bras. Pneumol;* 30(4): 371-377.
- Pereira SM, Dantas OMS, Ximenes R, Barreto M (2007) Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação. *Rev Saúde Pública.* 4:59-66.
- Petrini B and Hoffner S (1999) Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. *Int J Antimicrob Agents* 13: 93-97.
- Prado-Montes de Oca E, Garcia-Vargas A, Lozano-Inocencio R, Gallegos-Arreola MP, Sandoval-Ramirez L, Davalos-Rodriguez NO and Figueroa LE (2007) Association of

- beta-defensin 1 single nucleotide polymorphisms with atopic dermatitis, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 142:211–218.
- Raj PA and Dentino AR (2002) Current status of Defensin and their role in innate and adaptative immunity. *Microbiology Letters.* 206:9-18. 2002.
- Risch N and Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516–1517.
- Rivas-Santiago B, *et al.* (2006) β -Defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. *J. Infect. Dis.* 194:697–701.
- Rivas-Santiago B, Schwander SK, Sarabia C, Diamond G, Klein-Patel ME and Hernandez-Pando R *et al.*, (2005) Human β -defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells, *Infect Immun* 73:4505–4511.
- Ritis K, Tzoanopoulos D, Speletas M, Papadopoulos E, Arvanitidis K, Kartali S and Sideras P (2000) Amplification of IS6110 sequence of *M. tuberculosis* complex in HIV negative patients with Fever of Unknown Origin (FUO) and evidence of extrapulmonary disease. *J Intern Med.* 248(5):415-24.
- Rodrigues JJS, Silva RC and Siqueira MM (2006) *in*: Rossetti ML, Silva CMD and Rodrigues JJS. Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular. Guanabara Koogan, 1^a ed. Rio de Janeiro.
- Rodriguez JC, Fuentes E and Royo G (1997) Comparison of two different PCR detection methods. Application to the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *APMIS* 104: 612-616p.
- Rook GA and Hernandez-Pando R (1996) The pathogenesis of tuberculosis. *Ann Rev Microbiol* 50:259–284.
- Ruffino-Netto A (2002) Tuberculosis: The Neglected Calamity. *Rev Soc Bras Med Trop.* 35: 51-58P.
- Russell DG (2007) Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol.* 5(1):39-47.
- Santo LALA, Santos PCH and Moreira ME (2009) Perfil clínico, epidemiológico e laboratorial dos pacientes com tuberculose em hospital universitário da região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. *Bepa.* 6(68): 14-21.
- Schenk M and Mueller C (2008) The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 22(3):391-40.
- Segat L, Bevilacqua D, Boniotto M, Arraes LC, Souza PR, Lima Filho JL and Crovella S (2006) IL-18 gene promoter polymorphism is involved in HIV-1 infection in a Brazilian pediatric population. *Immunogenetics* 7.

- Selsted ME and Ouellette AJ (2005) Mammalian defensins in the antimicrobial immune response, *Nat Immunol.* 6: 551–557.
- Selvaraj P, Jawahar MS, Rajeswari DN, Alagarasu K, Vidyarani M and Narayanan PR (2006) Role of mannose binding lectin gene variants on its protein levels and macrophage phagocytosis with live *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary tuberculosis, *FEMS Immunol Med Microbiol* 46:433–437.
- Seyfarth J, Garred P and Madsen HO (2006) The involution of mannose-binding lectin. *Hum Mol Genet.* 14:2859–69.
- Sharma S, Verma I and Khuller GK (1999) Biochemical interaction of human neutrophil peptide-1 with *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra. *Arch Microbiol* 171:338–342.
- Shastri BS (2002). SNP alleles in human disease and evolution. *J. Hum. Genet.* 47: 561–566.
- SINAN (2008) Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação: Pernambuco/ Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde.
- Singh V (2006) TB in developing countries: Diagnosis and treatment. *Paediatric Respiratory Reviews.* 7: S132-S135.
- Siqueira KM, Barbosa MA, Brasil VV, Oliveira LMC, Andraus LMS (2006) Crenças populares referentes à saúde: apropriação de saberes sócio-culturais. *Texto contexto - enferm.* 15(1):68-73.
- Søborg C, Madsen HO, Madsen ÅB, Lillebaek T, Kok-Jensen A and Garred P (2003) Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 188:777–782.
- Sobrino B, Brión M and Carracedo A (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International* 154:181–194.
- Souza PR, Arraes LC, de Lima Filho JL, Bruneska D, Milanese M and Crovella S (2006) CCR5 promoter polymorphisms and HIV-1 perinatal transmission in Brazilian children. *J Reprod Immunol.* 69(1):77-84.
- Steffensen R, Thiel S, Varming K, Jersild C and Jensenius JC (2000) Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *J. Immunol. Methods* 241:33-42.
- Stewart GR, Robertson BD and Young DB (2003) Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol.* 1(2):97-105.
- SVS/Secretaria de Vigilância Em Saúde – SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Tuberculose - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação

- de Agravos de Notificação. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def> . Acessado em: 20 de Agosto de 2009.
- Takashi K and Ezekowitz AB (2005) The role of the mannose-binding lectin in innate immunity. *Clin Infect Dis*. 41:S440–4.
- Tortoli E (2006) The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48:159–178.
- Tortora GJ, Funke BR and Case CL (2005) *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- Turner MW (2004) The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol. Immunol.* 40: 423–429.
- Twyman RM and Primrose SB (2003) Techniques patents for SNP genotyping. *Pharmacogenomics*. 4:67-79.
- Vankeerberghen A, Scudiero O, De Boeck K, Macek M, Jr Pignatti PF, Van Hul N, Nuytten H, Salvatore F, Castaldo G, Zemkova D *et al* (2005) Distribution of human β -defensin polymorphisms in various control and cystic fibrosis populations. *Genomics*. 85: 574-581.
- Vendramini SFH, Gazetta CE, Netto FC, Cury MR, Meirelles EB, Kuyumjian FG, *et al.*(2005) Tuberculose em município de porte médio do sudeste do Brasil: indicadores de morbidade e mortalidade, de 1985 a 2003. *J Bras Pneumol*. 31:237-243.
- Vieira RCA, Fregona G, Palaci M, Dietze R, Maciel ELN (2007) Perfil epidemiológico dos casos de tuberculose multirresistente do Espírito Santo. *Rev. bras. epidemiol.* 10(1):56-5.
- Wallis R (2003) Structural Basis for Mannose-Binding Protein Function in Innate Immunity. *Immunobiology of Carbohydrates*. 1-12.
- Wilhelm J and Pingoud A (2003) Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*. 4(11):1120-8. 2003.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KSJ (2001) Real-Time Multiplex PCR Assays. *Methods* 25:430–442p.
- World Health Organization (2009) *Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing*. Geneva, Switzerland: WHO.
- Yu A, Geng H and Zhou X (2006) Quantify single nucleotide polymorphism (SNP) ratio in pooled DNA based on normalized fluorescence real-time PCR. *BMC Genomics*. 9(7):143p.

Zhu BD, Feng Y, Huang N, Wu Q, Wang BY (2003) *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) enhances human beta-defensin-1 gene transcription in human pulmonary gland epithelial cells. *Acta Pharmacol Sin.* 24:907–12.

9. Anexos

9.1. Aprovação do Comitê de Ética



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

COMISSÃO DE ÉTICA DO CPqAM/FIOCRUZ

Projeto

“Desenvolvimento e validação de abordagens moleculares e imunológicas para o diagnóstico de tuberculose infantil”

Coordenador: Haiana Charifker Schindler

Departamento de Imunologia/CPqAM

PARECER

A Comissão considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, resolução CNS 196/96, e complementares.

Recife, 05 de março de 2005.

Nilma Cintra Leal
Coordenador

9. 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PACIENTE:_____	IDADE:_____
HOSPITAL:_____	Prontuário:_____
ENDEREÇO DO PACIENTE:_____	Nº:_____
BAIRRO:_____	CIDADE:_____ ESTADO:_____

TERMO DE CONSENTIMENTO

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a), da pesquisa - “DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ABORDAGENS MOLECULARES E IMUNOLÓGICAS PARA O DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE INFANTIL”, após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:

Título do Projeto: Desenvolvimento e Validação de Abordagens Moleculares e Imunológicas para o Diagnóstico de Tuberculose Infantil.

Título dos Subprojetos:

- Avaliação da quantificação do RNA mensageiro (RNAm) do *Mycobacterium tuberculosis* por PCR em tempo real como marcador de cura de pacientes com tuberculose pulmonar.
- Distribuição de polimorfismos de base única (SNPs) nos genes *MBL2* e *DEFB1* entre Pacientes com tuberculose ativa.
- Avaliação do desempenho e aplicabilidade da Nested-PCR em único tubo para a detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em sangue e urina.

Pesquisador (a) Responsável: Dra Haiana Charifker Schindler

Telefones para contato: (81) 2101-2560 ou 2101-2569

Pesquisadores Participantes: Lílían Maria Lapa Montenegro, Rosana de Albuquerque Montenegro, Juliana Figueirêdo da Costa Lima, Heidi Lacerda Alves da Cruz.

Objetivos: O objetivo da nossa pesquisa é desenvolver um método molecular para o diagnóstico de tuberculose pulmonar, extrapulmonar e monitoramento terapêutico.

Procedimentos do estudo: Quando o Sr(a) for atendido pelo médico(a) assistente do hospital, você responderá a um questionário onde irão constar: nome, endereço, telefone para contato, característica do domicílio, escolaridade, queixas principais e tempo de duração, se está tomando algum remédio, exames físico, laboratoriais e tratamento atual. O preenchimento do questionário será feito por um estudante de medicina.

O Sr(a) será acompanhado por uma equipe multidisciplinar envolvendo os médico responsáveis pela Instituição com experiência reconhecida no manejo da tuberculose em adultos, enfermeiras e técnicos que coletarão outros exames necessários e seguirão os procedimentos adequados e de rotina do hospital para cada caso. O acompanhamento e tratamento serão feitos pelo médico assistente do serviço que é responsável por todos os leitos, cujos pacientes estão sendo investigados quanto à existência ou não de Tuberculose. Caso for diagnosticada a doença será utilizado como terapia de primeira escolha o esquema com rifampicina, isoniazida e pirazinamida para o tratamento e se necessário, um esquema de segunda escolha será oferecido em casos selecionados. Todo o medicamento será fornecido pela rede SUS (seja pelo fornecido pelo Hospital ou pelo Posto de Saúde).

Para a nossa pesquisa coletaremos 10ml de sangue, 30ml de urina e 1-5ml de escarro serão encaminhadas ao laboratório de Imunoepidemiologia do departamento de Imunologia do CPqAM para ser submetida a técnica de PCR por profissionais capacitados. Os resultados de todos os exames serão encaminhados ao médico responsável pelo atendimento. As amostras serão congeladas e armazenadas para uso futuro caso seja necessário.

Riscos e Benefícios: O Sr(a) não será submetido a qualquer risco ou desconforto adicional e seguiremos a rotina estabelecida pelo profissional de saúde, seja a nível ambulatorial ou enfermária. O benefício deste estudo será contribuir para o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, específicas, rápidas e menos dolorosas que possam ser adequadas à realidade do nosso sistema público de saúde, e a padronização de critérios mais eficazes que irão beneficiar o diagnóstico precoce da tuberculose pleural.

Custo/Reembolso para o paciente: Não haverá nenhum gasto com sua participação. As consultas, exames, tratamentos serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

Serão guardadas no laboratório de imunoepidemiologia do CPqAM amostras dos líquidos coletados para que possamos repetir o exame de PCR, caso seja necessário. O Sr (a) poderá entrar em contato com o responsável pela amostra no endereço abaixo:

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia

Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária.

Campus da UFPE.

Fone: (81) 2101-2569

Contato: Lílían Maria Lapa Montenegro, Dra. Haiana Charifker Schindler.

CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG/CPF _____ declaro que entendi os objetivos da pesquisa e sem ter sido pressionado ou constrangido concordo participar da pesquisa. Tenho consciência do meu direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento e de que as informações colhidas serão mantidas em sigilo. Os resultados da pesquisa podem ser apresentados em congressos ou publicados em revistas de cunho técnico, sem que seja divulgado o nome do paciente.

Nome do Paciente: _____

Assinatura do paciente ou do responsável

Assinatura do médico/pesquisador

_____, ____/____/____.

9.3. Manuscrito do Artigo Científico

Manuscrito encaminhado à revista

Brazilian Journal of Microbiology
São Paulo, Brasil

**Evaluation of Nested-PCR for *Mycobacterium tuberculosis* detection in Blood and Urine
Samples from Patients Suspected of Tuberculosis.**

Heidi Lacerda Alves da Cruz¹, Rosana de Albuquerque Montenegro¹, Juliana Falcão de
Araújo Lima¹, Diogo da Rocha Poroca², Juliana Figueirêdo da Costa Lima¹, LÍlian Maria
Lapa Montenegro¹, Sergio Crovella^{2:3}, Haiana Charifker Schindler¹

(1) Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center-CPqAM/FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brazil.

Av. Prof. Moraes rego, s/nº, CEP 50.670-420 Recife – PE. Email: heidi.alves@gmail.com

(2) Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

(3) Genetic Service IRCCS Burlo Garofolo, University of Trieste, Italy

Corresponding Author:

Sergio Crovella
Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife,
(PE), Brazil
e-mail: crovelser@gmail.com

Abstract

The polymerase chain reaction (PCR) and its variations, such as the nested-PCR, have been described as promising techniques for rapid diagnosis of tuberculosis. With the aim of evaluating the usefulness of nested-PCR method on samples of blood and urine of patients suspected of Tuberculosis (TB) we analyzed 171 clinical samples of patients suspected of TB, using as a molecular marker the insertion element IS6110 specific of *M. tuberculosis* genome. Nested-PCR method showed higher sensitivity in patients with extrapulmonary tuberculosis (47.8% and 52% in blood and urine) when compared to patients with the pulmonary form of the disease (sensitivity of 29% and 26.9% in blood and urine), regardless of the type of biological sample used. The nested-PCR is a rapid technique that even if it has not shown a good sensitivity in samples of blood and urine in patients with difficulties to expectorate or with smear negative, should be considered as a tool that can help especially in the extrapulmonary cases or in cases where confirmatory diagnosis is quite difficult to be achieved by routine methods. The performance of PCR-based techniques should be considered and tested in future works on other types of biological specimens besides sputum, like blood and urine, readily obtainable in most cases. The improving of *M. tuberculosis* Nested-PCR detection in TB affected patients will give the possibility of more early detection of bacilli and the interruption of the chain of transmission of the disease.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Nested-PCR, blood, urine, molecular diagnosis, IS6110 insertion sequence.

Introduction

Among all the infectious diseases affecting humans, tuberculosis (TB) remains the most lethal (29). In Brazil, 85.000 cases are registered annually with incidence rate of 47/100.000 inhabitants, according to data from Information System Diseases Notification

(<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>). The country occupies the 15th place among the 22 nations responsible for 80% of all cases of TB worldwide, with a mortality rate of 3.07 per 100.000 inhabitants. In 2005, 9.7% of reported cases occurred in children and adolescents. The incidence rate varies from 50 to 90 cases per 100.000 inhabitants, according to the different national regions. In 2004 4.583 new cases of TB were registered in the State of Pernambuco, Northeast Brazil, representing 94.8% of expected events, with an incidence of 55.6 cases for all forms of TB and 28.7 per 100.000 habitants for bacillary forms, leading to occupy the third place in number of cases in the country (25).

One of the priorities for the control of the disease consists of early diagnosis and appropriate treatment (5), resulting in the cure of patients and intervention in the chain of transmission (8). The usual laboratory procedures for diagnosing the disease, based on microscopic examination of acid-fast bacilli, have low sensitivity, and mycobacterial culture requires about eight weeks to release the results (9, 11).

Molecular tests based on amplification of fragments of genomic sequences of *M. tuberculosis* have been shown to be a useful tool, able to detect the bacillus in biological samples. The Polymerase Chain Reaction (PCR) is currently considered a rapid and sensitive method for detection of *M. tuberculosis*, and can detect less than 10 bacilli *per* mL in different biological specimens (1, 2, 10, 21). Although PCR is very useful for simple detection of *M. tuberculosis*, a procedure that associates two PCRs (nested-PCR) combines the greater sensitivity and specificity test (16).

The cost of PCR in tuberculosis diagnostic routine is reasonable, considering that the rapid diagnosis in paucibacillary patients can establish specific treatment early, thereby reducing the bacilli sources and, with them, the infection by *M. tuberculosis*. The development and standardization of the test make the cost more affordable, considering that this technology should be reserved for reference centers in the investigation of cases that

demand difficult diagnoses (forms with paucibacillary smear negative) and the severity of the patient quickly (7, 12).

The purpose of this study was to evaluate the applicability of nested-PCR technique as a tool to assist diagnosis of TB, using simple clinical samples to collect, such as blood and urine of patients with difficulty to expectorate or whose sputum smear was negative with the aim of determining the level of sensitivity and specificity of the technique, and assessing its importance in the context of clinical and laboratory criteria used in routine diagnostic elucidation of the disease.

Materials and Methods

Population of Study

We analyzed blood and urine samples from 96 patients suspected of TB (median age 32.2 years $\pm$ 30.03, with 53 males and 43 females) from the outpatient clinic or public institutions of reference for diagnosis of tuberculosis located at Recife, capital of Pernambuco State, Brazil: Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP, Hospital of the Universidade Federal de Pernambuco - HC / UFPE; Hospital Barão de Lucena, and other general hospitals of the Unified Health System (SUS) which sought the Research Center Aggeu Magalhães - CPqAM / FIOCRUZ, in the period from October 2006 to May 2008 .

We also enrolled 60 healthy subjects (median age of 20.4 years $\pm$ 14.0, with 37 female and 23 males), without symptoms of tuberculosis and used them as controls. The criteria for patients selection were based on the suspected presence of clinical symptoms suggestive of TB, such as prolonged cough, fever without apparent cause, weight loss and night sweat. To evaluate the results obtained by Nested-PCR we used as gold standard the criteria employed by the health services in the diagnostic definition such as the combination of epidemiological, clinical and laboratory (chest X-ray, tuberculin test and sputum smear or culture is there) data

and patient history, . Patients who started anti-TB treatment, immuno-compromised and were under corticosteroids-based medication were excluded from the study.

Of the 96 TB patients, 58 (58.3%) had TB according to the criteria described above, while 38 were discarded for the disease. Among the TB patients, 31 were pulmonary TB and 27 were extra-pulmonary TB. The extra-pulmonary forms included 13 cases of pleural TB, 3 ganglionic, 2 renal, 2 osteoarticular, 2 miliary, 2 cutaneous, 1 meningoencephalic, 1 tuberculous peritonitis and 1 pericardial.

Collection of Clinical Samples and Processing Laboratory

We collected 4.0 mL of peripheral blood using tubes with EDTA and three consecutive morning samples of urine from each patient. The biological specimens were kept under refrigeration at 4 °C until the time of extracting the DNA. Urine samples were first decontaminated according to the protocol of Sechi et al. (24) for the possible elimination of other bacteria present in the sample.

DNA Extraction

DNA extraction followed the protocol proposed by Rossetti et al. (22), modified with the addition of resin, followed by 2 times the final volume of 6M sodium iodide, stirred manually for 5 minutes and incubated at room temperature for 5 more minutes. At the end of extraction, the tubes were stored at -20 °C until the samples were processed.

Amplification of genomic DNA of *M. tuberculosis*

The IS6110 insertion sequence of *M. tuberculosis* was the target used for nested-PCR (GenBank NP_215310.1). We also added two primers pairs in two sequential PCR reactions with a total number of 60 cycles (20). In the first reaction a DNA fragment of 409 bp was amplified using a pair of external primers: TJ5 (5' - GCC CAA AGT GCT GTG AAC 3') and

TJ3 (5 'ATC CCC TAT GCC TAT GGT G 3'; in the second reaction, the product of the first PCR served as template for the nested amplification of a 316 bp fragment using a pair of internal primers: OLI5 (5 'AAC GGC TGA TGA CCA AAC 3') and STAN3 (5 'CCA GCA CCT AAC CGG CTG T 3 '), all described by Ritis et al. (20).

Amplification reactions have been run on a Perkin Elmer (model 480) thermal-cycler. The first amplification reaction consisted of 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP (200 µM each), 30 pmol of each oligonucleotide TJ5 and TJ3 and 2.5 unit of Taq DNA polymerase (Gibco BRL) in a final volume of 50 µL. Denaturation process was carried out at 94 °C for 30s, annealing at 68 °C for 1 minute and extension to 72 °C for 1 minute, for 30 cycles. In the second reaction 2 µL of amplicon from the 1s PCR were added in the reaction mix as template. Conditions for Nested-PCR amplification were 94 °C for 30s, 57 °C for 30s and 30s to 72 °C for 30 cycles using the primers OLI5 and STAN3. One positive and one negative controls containing *M. tuberculosis* DNA and water respectively were added for each PCR run. PCR products were analyzed by gel electrophoresis of a 2% agarose and stained with ethidium bromide. The bands of DNA, separated by electrophoresis, were visualized in ultraviolet transillumination and photographed by polaroid a documentation system (Kodak MP4 + System).

Ethical Considerations

All patients signed a written informed consent, agreeing to participate to the study, approved by the Ethics Committee in Research of the Center for Aggeu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ, Recife (CEP – N° 55/05, approved on March 05, 2005). We observed the necessary precautions to preserve the freedom of consent of the patients.

Statistical Analysis

Each patient underwent a clinical-epidemiological questionnaire developed and standardized by the team of researchers. Epi-Info (Version 6.02) epidemiology software was used for data record and statistical analysis with confidence interval (CI) of 95%. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

The results obtained by Nested-PCR (NPCR) are shown in Table 1. Among the 58 TB patients, 31 (53.4%) were NPCR positive ($p < 0.001$) and 27 (46.6%) negative. Of the 38 patients considered clinically without TB, 10 (26%) were identified as positive by NPCR. Comparing the results of NPCR TB clinical diagnosis, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were respectively 53.4% (CI: 40,0-66,5), 89.8% (CI: 81,6-94,7), 75.6% (CI: 59,4-87,1) and 76.5% (CI: 67,5-83,7). All the statistical data were obtained from Epi-Info software. The NPCR was negative in all samples of control group, demonstrating specificity of 100%.

Table 1. Comparison between clinical diagnosis and NPCR.

NPCR	Clinical Diagnosis	
	Tuberculosis	No-Tuberculosis + Controls
Positive	31 (53,4%)	10 (10,2%)
Negative	27 (46,6%)	88 (89,8%)
Total	58 (100%)	98 (100%)

Table 2 shows the correlation between the form of TB and the results of NPCR: in patients with the pulmonary form, NPCR was positive in 45.2% of cases ($p < 0.001$), while in patients with the extra-pulmonary form, NPCR was positive in 68% of cases ($p < 0.001$).

Table 2. Comparison between the results of NPCR and form of TB.

NPCR	Tuberculosis			
	Pulmonary	Controls	Extra-pulmonary	Controls
Positive	14 (45,2%)	0	17 (68,0%)	0
Negative	17 (54,8)	60 (100%)	8 (32,0%)	60 (100%)
Total	31 (100%)	60 (100%)	25 (100%)	60 (100%)

One hundred seventy one biological samples (91 whole blood and 80 urine) were collected from 96 patients suspected. In this group, NPCR was positive in 53.4% (31/58) of cases regardless of the type of biological sample analyzed. However when considering the sensitivity and specificity of NPCR according to the type of biological sample analyzed, considering as gold standard the final clinical diagnosis, the blood and urine alone showed a sensitivity of 35.1% (20/57) ($p < 0.046$) and 37.5% (18/48) ($p < 0.028$) respectively, and specificity of 93.6% (88/94) and 94.6% (88/93), respectively (Table 3).

Table 3. Comparison between the results of NPCR and type of clinical sample analyzed.

NPCR	Blood		Urine	
	Tuberculosis	No-Tuberculosis + Controls	Tuberculosis	No-Tuberculosis + Controls
Positive	20 (35,1%)	6 (6.4%)	18 (37,5%)	5 (15,2%)
Negative	37 (64,9%)	88 (93.6%)	30 (62,5%)	88 (84,8%)
Total	57 (100%)	94 (100%)	48 (100%)	93 (100%)

Comparing the results of NPCR for detection of *M. Tuberculosis* in blood and urine in the different form of tuberculosis, we observed in the group of patients with pulmonary TB, the NPCR was positive in 29% (9/21) ($p < 0.204$) of blood samples and 26.9% (7/26) ($p < 0.265$) in samples of urine. In the group of extra-pulmonary TB, the NPCR showed higher positivity in both blood 47.8% (11/23) ($p < 0.001$) and urine 52.4% (11/21) ($p < 0.003$) when

compared to the previous group. However, no significant differences between the samples and within the groups were observed (Table 4).

Table 4. Comparison between the results of NPCR by type of sample and form of TB.

NPCR	Blood		Urine	
	Extra-pulmonary	Pulmonary	Extra-pulmonary	Pulmonary
Positive	11 (47,8%)	9 (29,0%)	11 (52,4%)	7 (26,9%)
Negative	12 (52,2%)	22 (71,0%)	10 (47,6%)	19 (73,1%)
Total	23 (100%)	31 (100%)	21 (100%)	26 (100%)

Discussion

Tuberculosis is a serious and persistent problem of public health, especially in developing countries, and is responsible for high rate of morbidity and mortality (14). Since the need to obtain an early diagnosis, rapid and sensitive is significantly increasing, in our study we considered diagnostic methods that may assist in advancing the diagnosis of paucibacillary forms of tuberculosis. The PCR and its variations, such as the nested-PCR, have been indicated as a promising molecular technique for a rapid diagnosis of tuberculosis (1, 10, 21). Miyazaki et al. (16) examined the potentiality of nested-PCR for tuberculosis diagnosis. The sensitivity of their nested-PCR was evaluated by using 10-fold bacterial dilutions. The bacterial count detection limit for the first PCR was 10^2 Colony Formation Unit (CFU) for *M. tuberculosis*, but the sensitivity increased approximately 1,000-fold to 0.1 CFU, following the second PCR.

The results of NPCR coincided with the final clinical diagnosis in 61.5% (59/96) of cases (Table 1). From the 27 NPCRs false-negatives, in the group of TB patients, 41% of them were from patients under 15 years of age. Considering that children and adolescents in

general have paucibacillary form, probably the negative result of the technique could be associated with a number of bacilli circulating insufficient to be detected by NPCR (Table 1).

According to Bach (3), clinical samples often contain inhibitory substances that could interfere with the PCR reaction, making it necessary the adoption of procedures able to remove all inhibitors simultaneously. However, according to Böddinghaus et al. (4), until now, no single procedure is ideal for blocking these inhibitors, among them the hemoglobin, polysaccharides present in sputum, some reagents and components of swabs. According to the authors, false-negative results can be supported through the inclusion of a control-positive reaction, co-amplifying the sample tested as we did. In our study, was possible to detect 10 patients with NPCR positive TB in the group of individuals not considered as TB by using the clinical and epidemiological criteria. In terms of age, 4 were less than 5 years and 6 above 30 years, one of them (52 years) died without issue elucidated. These 9 patients, despite the diagnosis of TB have been discarded, they presented contact with tuberculosis or individual cases of tuberculosis or previous clinical symptoms that led to suspicion of disease. In addition they presented as a final diagnosis immunosuppressive diseases such as 1 rheumatoid arthritis, 2 lung carcinoma, 1 nonspecific pneumonia, 1 meningococcal meningitis, 2 chronic osteomyelitis and 2 uremic pleuritis. Moreover the NPCR can detect the presence of DNA of *M. tuberculosis* but not the viability of the bacillus since it amplify genetic material derived from dead or dormant organisms, generating false-positive results. In addition PCR might present a high rate of contamination, as described by Kox et al. (15), in fact, for the NPCR, where two amplifications are carried out, there is a greater possibility of contamination at the opening of the tubes between the first and second reaction. In our study we added negative controls in all extractions of DNA and the reactions of NPCR with the aim of reducing the risk of false-positive results.

When considering a new diagnostic method, the performance of the gold standard is a crucial parameter. Due to the difficulty of isolating the *M. tuberculosis* in paucibacillary

samples, the use of routine diagnosis is based on indirect indications, such as epidemiological criteria, clinical, laboratory (in the Mantoux tuberculin test and chest X-ray) data, evolution and response to the treatment. In pediatric patients, although there are few studies in the literature regarding the evaluation of molecular tests for the identification of TB in children, most of them used the above mentioned “indirect” criteria as the gold standard, and this may lead to cases with diagnostic inaccuracy (18, 26). Thus, the interpretation of the results of NPCR may be impaired since the gold standard used is based on the combination of criteria, most subjective and inadequate, for the confirmation of cases of TB.

An extension of this research is being developed with larger number of subjects with smear and/or positive culture in different biological specimens, to better assess the magnitude of the above limitations.

In relation to the clinical form of TB, the highest rate of NPCR detection and correlation with clinical diagnosis were observed in the TB extra-pulmonary form, including patients younger than 15 years of age, probably due to increased circulation of the bacillus in the body fluids and tissues. Although our findings are preliminary and obtained on a low number of individuals, also in case of paucibacillary form, the positivity of the NPCR was found both in blood and in urine even in subjects with the pulmonary form of the disease.

The application of PCR in biological samples has been developed and tested over many years. However, the standardization of PCR as a diagnostic tool to be implemented in routine laboratories requires careful processing of samples to avoid complications, such as contamination and production of aspecific or false positive/negative, that may interfere with the test results (5). In the literature, only sputum, blood and cerebrospinal fluid (CSF) have been shown to represent good substrates for PCR analysis (17). Although the low number of patients analyzed and the use of multiple parameters (as indicated above) as gold standard it can be observed that the sensitivity and specificity of NPCR for *M. tuberculosis* detection in blood and urine samples, considered together, showed a trend for better performance, when

compared with the results obtained on blood or urine for samples analyzed separately (Table 1).

The NPCR in the blood successfully detected TB in 35.1% (20/57) of patients with a confirmed clinical diagnosis of tuberculosis, giving an accuracy of 71,5% (108/151). The results disagreed with those of Khan et al. (14) who found a sensitivity of 14.5%, lower than that of culture and smear with 62.5% and 35.5% respectively. However, the sensitivity of PCR varies widely when compared to other studies, where results can vary between 13% and 97.4% (22, 23, 27).

Regarding the use of NPCR in urine samples to our knowledge little information is available in the literature. In our study, we found a sensitivity of 37.5% (18/48) and specificity of 84.8% (88/93). The variation in sensitivity of the test has been already shown in several studies. Kafwabolula et al. (13) found 55% sensitivity when evaluating patients with pulmonary TB, but Sechi et al. (24) and Torres et al. (28) showed that the sensitivity of the NPCR in TB patients with pulmonary TB ranged from 23% to 40%.

Kafwabolula et al. (13) reported that variation in sensitivity in urine may be due to different factors. Patients with pulmonary tuberculosis usually do not present in circulation mycobacterial DNA since it can be removed in large quantities. *M. tuberculosis* or their fragments can be continuously excreted so, it is prudent to collect urine in at least three consecutive days or more samples over 24 hours. The process of decontamination performed before extraction reduces NPCR inhibitors. The DNA present in urine can be from dormant mycobacteria existing in the kidneys, which become active after the onset of the disease in the lungs. However, false-negative results can occur due to the collection of a few samples from each patient or the non-homogeneous distribution of mycobacteria in the urine (30).

Rebollo et al. (19) showed that the percentage of positive PCR in urine samples is more sensitive in HIV-positive patients than in immunocompetent patients with tuberculosis,

since the mycobacterial burden is greater in these cases and more fragments of DNA are available. However, the authors found sensitivity lower than our study (16%).

The variation in sensitivity is one of the obstacles that prevent the full deployment and standardization of this technique in the laboratory of clinical analysis centers. This variation is directly related to many factors such as different protocols employed, procedures for decontamination of samples and variations in the formation of lysis buffer (19). PCR has been used with different biological samples as a mean of diagnosing TB. However, the collection of some of these specimens requires invasive and laborious process (broncho-alveolar fluid, gastric lavage, biopsy). The use of blood samples and urine is a simple, convenient and not invasive, avoiding the use of aggressive techniques (6). It should be noted that other biological specimens, especially in children, adolescents and paucibacillary forms of the disease should be considered in the standardization of PCR-based systems as auxiliary tools in confirming the clinical diagnosis.

The NPCR protocol presented in this study is suitable for TB diagnosis in underdeveloped countries because is simple, has limited costs and needs few equipments available in a basic molecular biology laboratory.

Acknowledgments

The authors thank the doctors and health professionals from HC-UFPE that collaborated with the research. We thank the staff of Laboratory Imunoepidemiologia of CPqAM/FIOCRUZ that assisted in carrying out the techniques. This work was supported by FACEPE and PDTIS.

References

1. Ahmed, N.; Mohanty, A.K.; Mukhopadhyay, U.; Batish, V.K.; Grover, S. (1998). PCR-based rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in blood from immunocompetent patients with pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiomol.* 36 (10): 3094-3095.

2. Assis, N.C.S.; Lopes, M.L.; Cardoso, N.C.; Costa, M.M.; Sousa, C.O.; Lima, K.V.B. (2007). Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. *J Bras Patol Med Lab.* 43(1):1-7.
3. Bach, A.H. (2003). *Application of molecular techniques in the development of test for diagnosis of tuberculosis in paucibacillary and genotypic characterization of Mycobacterium tuberculosis*. Recife, Brazil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco. UFPE).
4. Böddinghaus, B.; Wichelhaus, T.A.; Brade, V.; Bittner, T. (2001). Removal of PCR inhibitors by silica membranes: evaluating the Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* kit. *J. Clin. Microbiol.* 39 (10): 3750–3752.
5. Bollela, V.R.; Sato, D.B.; Fonseca, B.A.L. (1999). Problems in the standardization of polymerase chain reaction for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Rev. Saúde Pública.* 33(3): 281-286.
6. Butcher, P.D.; Hutchinson, N.A.; Doran, T.J.; Dale, J.W. (1996). The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial diseases in: *Mycobacterial disease - old problems, new solutions.* *J Appl Bacteriol.* 81: 53S-71S.
7. Coberly, J.S.; Chaisson, R.E. (2001). Tuberculosis. In: Nelson, K.E.; Williams, C.M.; Graham, M.H. *Infectious Disease Epidemiology – Theory and Practice*. Marylan, Aspen. 411-437p.
8. Ferreira, A.A.A.; Queiroz, K.C.S.; Torres, K.P.; Ferreira, M.Â.F.; Accioly, H.; Alves, M.S.C.F. (2005). Factors associated with pulmonary tuberculosis and smear: a contribution to diagnosis in public health services. *Rev Bras Epidemiol.* 8(2):142-149.
9. Hargreaves, N.J.; Kadzakuanja, O.; Phiri, S.; Nyangulu, D.S.; Salaniponi, F.M.L.; Harries, A.D.; Squire, S.B. (2001). What causes smearnegative pulmonary tuberculosis in Malawi, an area of high HIV seroprevalence? *Int J Tuberc Lung Dis.* 5(2): 113-22.
10. Honoré-Bouakline, S.; Vincensini, J.P.; Giacuzzo, V.; Lagrange, P.H.; Hermann, J.L. (2003). Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J. Clin. Microbiol.* 41(6): 2323–2329.
11. Hudson, C.P.; Wood, R.; Maartens, G. (2000). Diagnosing HIV-associated tuberculosis: reducing costs and diagnostic delay. *Int J Tuberc Lung Dis.* 4(3): 240-5.

12. Huggett, J.F.; Mchugh, T.D.; Zumla, A. (2003). Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 35(10): 1407–1412.
13. Kafwabulula, M.; Ahmed, K.; Nagatake, T.; Gotoh, J.; Mitarai, S.; Oizumi, K.; Zumla, A. (2002). Evaluation of PCR-based methods for the diagnosis of tuberculosis by identification of mycobacterial DNA in urine samples. *Int J Tuberc Lung Dis.* 6(8): 732–737.
14. Khan, M.A.; Mirza, S.H.; Abbasi, S.A.; Butt, T.; Anwar, M. (2006). Peripheral blood-based polymerase chain reaction in diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 18(2): 25-28.
15. Kox, L.F.F.; Rhienthong, D.; Medo-Miranda, A.; Udomsantisuk, N.; Ellis, K.; Leeuwen, J.; Van Heusden, S.; Van Kujper, S.; Kolk, H.J. (1994). A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 32(3): 672–678.
16. Miyazaki, Y.; Koga, H.; Kohno, S.; Kaku, M. (1993). Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J. Clin. Microbiomol.* 31(8): 2228-2232.
17. Ogusku, M.M.; Salem, J.I. (2004). Análise de diferentes primers utilizados na PCR visando o diagnóstico da tuberculose no estado do Amazonas. *J Bras Pneumol.* 30 (4): 433-9.
18. Portillo-Gómez, L.; Morris, S.L.; Panduro, A. (2000). Rapid and efficient detection of extrapulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 4(4): 361-370.
19. Rebollo, M.J.; Garrido, R.S.J.; Folgueira, D.; Palenque, E.; Díaz-Pedroch, C.; Lumbreras, C.; Aguado, J.M. (2006). Blood and urine samples as useful sources for direct detection of tuberculosis by polymerase chain reaction. *Gnostic and infectious Disease.* 56(2): 141-146.
20. Ritis, K.; Tzoanopoulos, D.; Speletas, M.; Papadopoulos, E.; Arvanitidis, K.; Kartali, S.; Sideras, P. (2000). Amplification of IS6110 sequence of *M. tuberculosis* complex in HIV negative patients with Fever of Unknown Origin (FUO) and evidence of extrapulmonary disease. *J Intern Med.* 248(5):415-24.

21. Rodriguez, J.C.; Fuentes, E.; Royo, G. (1997). Comparison of two different PCR detection methods. Application to the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *APMIS*. 105(8): 612-616.
22. Rossetti, M.L.R.B.; Jardim, S.; Rodrigues, V.D.F.S.; Moura, A.R.; Oliveira, H.; Zaha, A. (1997). Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *Journal of Microbiological Methods*. 28(2): 139-146.
23. Schuger, N.W.; Condos, R.; Lewis, S.; Rom, W.N. (1995). Amplification of DNA of *Mycobacterium tuberculosis* from peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. *Lancet*. 344 (8917): 232-23.
24. Sechi, L.A.; Pinna, M.P.; Sanna, A.; Pirina, P.; Ginesu, F.; Saba, F.; Aceti, A.; Turrini, F.; Zanetti, S.; Fadda, G. (1997). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis of urine and other clinical samples from AIDS and non-HIV-infected patients. *Mol Cell Probes*. 11(4): 281-285.
25. SINAN. (2006). National System of Health Surveillance: progress report: California/ Ministry of Health Secretariat of Health Surveillance - 2. ed. - Brasília: Ministry of Health.
26. Smith, K.C.; Starke, J.R.; Eisenach, K.; Ong, L.T.; Denby, M. (1996). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens from children using a polymerase chain reaction. *Pediatrics*. 97(2): 155-60.
27. Taci, N.; Yurdakul, A.S.; Ceyhan, I.; Berktaş, M.B.; Ögretensöy, Y.M. (2003). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from peripheral blood in patients with HIV-seronegative and new cases of smear-positive pulmonary tuberculosis by polymerase chain reaction. *Respiratory Medicine*. 97(6): 676-681.
28. Torrea, G.; Van De Perre, P.; Ouedraogo, M.; Zougba, A.; Sawadogo, A.; Dingtoumda, B.; Diallo, B.; Defer, M.C.; Sombié, I.; Zanetti, S.; Sechi, L.A. (2005). PCR-based detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in urine of HIV-infected and uninfected pulmonary and extrapulmonary tuberculosis patients in Burkina Faso. *J Med Microbiol*. 54(Pt 1): 39- 44.
29. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2007). Global Tuberculosis Control. Brazil. WHO Report.

30. Zambardi, G.; Druetta, A.; Roure, C.; Fouqué, B.; Girardo, P.; Chypre, C.; Marchand, J.; Freney, J.; Fleurette, J. (1995). Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infections by ELISA-like detection of the polymerase chain reaction products. *Mol Cell Probes*. 9(2): 91–99.

10. Memorial da aluna

Nome: Heidi Lacerda Alves da Cruz

Data de nascimento: 25 de janeiro de 1984

E-mail: heidi.alves@gmail.com

Curso de graduação: Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) no período de 2003 a 2007.

Heidi Lacerda nasceu na cidade do Recife. Desde pequena sempre demonstrou, de um modo geral, grande afeição por animais. Durante os anos da escola conheceu então o nome que corresponderia à futura profissão, Bióloga. Ingressou na Universidade Federal de Pernambuco em 2003 para cursar o tão ansiado curso de bacharelado em Ciências Biológicas. Desde o primeiro período, teve a oportunidade de estagiar em diversas áreas, incluindo trabalhos com zooplâncton, coleção de herbário, biologia de peixes voadores e elasmobrânquios, citogenética vegetal e finalmente, após vivenciar a experiência de extração de DNA, percebeu que tinha encontrado sua área de atuação dentro da Biologia, a Genética. Dá-se o início do período em que trabalhou com técnicas de Biologia Molecular destinadas ao diagnóstico da tuberculose infantil, sob a orientação da Dr^a Haiana Schindler, no consagrado Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, unidade recifense da Fundação Oswaldo Cruz. Concluiu a graduação em 2007, apresentando a monografia intitulada **Avaliação da Nested-PCR na Detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em Amostras Biológicas**, recebendo nota máxima de todos os componentes da banca.

Durante a graduação, conheceu o prof^o Sergio Crovella e devido ao grande interesse pela pesquisa em genética decidiu dar continuidade ao trabalho na área da tuberculose, mas agora com o enfoque na genética humana. Ingressou na Pós-graduação em Genética da UFPE, como mestranda, orientada então pelo Dr. Sergio Crovella e co-orientada pela Dr^a. Haiana Schindler.

Dentre as divulgações científicas realizadas ainda na graduação, destaca-se a participação em vários congressos, como apresentação de trabalho no 53º Congresso Brasileiro de Genética. Durante o mestrado, que compreendeu 2008-2010, participou do 54º Congresso Brasileiro de Genética, do III Encontro da Rede de Tuberculose e do XVI Congresso Brasileiro de Infectologia, apresentando trabalhos nos dois anos.

No momento, conclui esta etapa de sua trajetória acadêmica, com profundo interesse em ampliar seus conhecimentos na área de genética humana, visando a continuidade do trabalho através do Doutorado na área de Biotecnologia.