



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS COM A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA NA MENINGITE BACTERIANA**

FABRÍCIA LIMA FONTES

**NATAL/RN
2012**

FABRÍCIA LIMA FONTES

MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS COM A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA NA MENINGITE BACTERIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde com habilitação em Biologia Molecular e Imunogenética.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lucymara Fassarella Agnez Lima

NATAL/RN

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE

F682m

Fontes, Fabrícia Lima.

Marcadores genéticos associados com a resposta inflamatória na meningite bacteriana / Fabrícia Lima Fontes. – Natal, 2012.

113f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucymara Fassarella Agnez Lima.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Meningite bacteriana – Dissertação. 2. Polimorfismos – SNP – Dissertação. APEX1 I. Lima, Lucymara Fassarella Agnez. II. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 616.932.9-002(043.3)

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Prof^a. Dr^a. Ivonete Batista de Araújo

FABRÍCIA LIMA FONTES

Marcadores genéticos associados com a resposta inflamatória na Meningite
Bacteriana.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Lucymara Fassarella Agnez Lima – (Orientador e Presidente da Banca)
Departamento de Biologia Celular e Genética - UFRN

Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros – (Membro interno)
Departamento de Biologia Celular e Genética - UFRN

Eduardo Antonio Donadi – (Membro externo)
Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -
USP.

DEDICATÓRIA

À minha família por sempre acreditar e confiar em mim. À Deus por sempre me fazer enxergar que com muito esforço, amor e dedicação tudo é possível.

AGRADECIMENTOS

- À Deus, pela sua presença constante na minha vida, sem que eu precise pedir, pelo auxílio nas minhas escolhas e conforto nas horas difíceis;
- À minha família, pelo incentivo e pela força que sempre me deram, acreditando em tudo que faço e torcendo por mim, e por aceitar e compreender a minha ausência nessa fase tão difícil para todos nós;
- À pessoa que esteve comigo desde o início da idealização deste trabalho, meu namorado Thiago Viana Dantas, que sempre me apoiou e esteve comigo trabalhando nos finais de semana e feriados, pelo amor e paciência nos meus “maus” momentos. Graças a sua presença foi mais fácil transpor os dias de desânimo e cansaço!
- A minha orientadora Professora Lucymara Fassarella, que sempre me atendeu e muito colaborou com sua enorme experiência e dedicação. Meu enorme agradecimento, por acreditar em mim e demonstrar confiança no meu trabalho e pelo conforto nas horas difíceis;
- A todos os meus amigos da graduação, pelo apoio e momentos de alegria! Especialmente, Danúbia, Álamo, Ana Isabel, Carmem, Dária, Juliana Fernandes, Clara, Rodrigo e Marcelo Vitor, pelo apoio, companheirismo e sólida amizade que construímos, a qual tenho certeza que será para sempre!
- Aos meus grandes amigos de laboratório, Daniele Maria, Thayse, Juliane, Juliana Alves, Daniel Chaves e Abinadabe, que sempre estiveram comigo e compartilharam as mesmas dificuldades e alegrias;
- Aos meus colegas do LBMG, Ana Rafaela, Acarízia, Angélica, Fernanda, Jule, Leonam, Ralfo, Jana, Fabão, Déborah, Delane, Rita, Uaska, Rayssa, Marcos Felipe, Tirzah, Keronninn, Amanda, Naldo, André Leonardo, André, Ana Helena, Luiza, Valéria e Fabíola.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a UBS Optimus Foundation pelo suporte financeiro.

**“Acredito que apenas quando toda nossa força
de vontade e determinação está focada em sermos os
melhores, em tudo que fazemos, podemos
realmente transformar a inovação em valor”**

Jean-Paul Clozel

RESUMO

A meningite bacteriana (MB) é uma doença infecto-contagiosa que apresenta altas taxas de mortalidade e morbidade, constituindo-se assim um grave problema de saúde pública. É caracterizada por uma intensa inflamação granulocítica que leva a injúria neuronal e conseqüentemente surgimento de sequelas neurológicas. A resposta inflamatória determina tanto a susceptibilidade à MB como sua conseqüência clínica. Essa resposta depende não só do tipo e da intensidade do estímulo, mas também de fatores genéticos do hospedeiro, tais como polimorfismos localizados em regiões codificantes ou regulatórias de genes importantes durante a infecção, dentre os mais frequentes os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs). O objetivo desse estudo foi investigar a associação entre os polimorfismos em *TNF* -308G/A, *TNF* -857C/T, *IL-8* -251A/T, *AADAT*+401C/T, que codificam proteínas importantes durante a resposta inflamatória e *APEX1* Asn148Glu, *OGG1* Ser326Cys e *PARP-1* Val762Ala, que codificam enzimas de reparo de DNA, com a ocorrência da MB. O estudo foi realizado com um grupo de 54 pacientes, admitidos no Hospital Giselda Trigueiro, Natal-RN, Brasil, o qual é referência para doenças infecciosas no estado, e um grupo controle formado por 110 voluntários saudáveis. Todos os indivíduos incluídos no estudo autorizaram o uso do material biológico para a pesquisa através de termo de consentimento. Os genótipos foram investigados por PIRA-PCR ou PCR-RFLP. As frequências alélicas e genotípicas também foram associados com os níveis de cito/quimiocinas, medidas pelo método xMAP, e com os níveis de imunoglobulinas. Não encontramos diferenças significativas na distribuição individual entre pacientes e controles saudáveis das variantes *TNF* -857C/T e *IL8* -251A/T, no entanto, foi observada uma maior frequência do alelo polimórfico *TNF*-308A ($P= 0,0145$, OR= 0,34) no grupo controle, sugerindo um possível papel protetor contra a doença. Os portadores do SNP em *TNF* -308G/A também apresentaram aumento nos níveis de TNF- α ($P=0,0515$) e IL-6 ($P=0,0135$) no grupo MB e para MCP-1 ($P=0,0381$) e TNF- α ($P=0,0547$ borderline) no grupo controle. Além disso, a análise de combinação entre os genes estudados mostrou associação significativa para as combinações entre *APEX1*148Glu/_ com *OGG1* 326Cys/_ e com *PARP-1* 762Ala/_ ($P= 0,0007$, OR=5,35), e *IL-8* -251T/ com *APEX1*148Glu/_ ($P= 0,0003$, OR= 2,90) que foram mais frequentes em pacientes

com MB, os quais afetaram os níveis de cito/quimiocinas e celularidade em amostras de LCR de pacientes com MB. Esse trabalho foi realizado com a contribuição de uma equipe multidisciplinar que envolveu diversos profissionais das ciências biológicas e da saúde, como biólogos, farmacêuticos e médicos. Os nossos dados indicam que a avaliação extensiva da variabilidade genética pode contribuir para uma melhor compreensão da susceptibilidade à MB como também para outras doenças infecciosas que ativam os mesmos mecanismos de resposta imune.

Palavras chaves: Meningite Bacteriana, Polimorfismos-SNPs, *APEX1*.

LISTA DE ABREVIATURAS

8-oxoG = 8-oxoguanina

AP-1 = Proteína Ativadora 1

APE1 = Endonuclease Apurínica/Apirimidínica 1

BER = Base Excision Repair (Reparo por Excisão de Bases)

BHE = Barreira Hemato-Encefálica

ERNs = Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs = Espécies Reativas de Oxigênio

GPR35 = Receptor Acoplado a Proteína G35

HGT = Hospital Giselda Trigueiro

Hib = Haemophilus Influenzae Tipo B

IDO = Indoleamia 2,3-dioxigenase

Ig = Imunoglobulina

iONS = Óxido Nítrico Sintase Indutível

LCR = Líquido Cefalorraquidiano

LPS = Lipopolissacarídeo

KAT = Quinurenina Aminotransferase

KYNA = Ácido Quinurênico

MB = Meningite Bacteriana

MMP = Metaloproteínas de Matriz

NF-κB = Fator Nuclear kappa B

NO = Óxido Nítrico

OCT1 = Fator 1 de Transcrição de Octâmero

OGG1 = 8-oxoguanina Glicosilase

PARP-1 = Poli-ADP-ribose polimerase-1

PMNs = Polimorfonucleadas

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase

PIRA-PCR = Primer- Introduced Restriction Analysis Polymerase Chain Reaction

QUINA = Quinurenina

RQ = Rota da Quinurenina

SNC = Sistema Nervoso Central

SNP = Single Nucleotide Polymorphisms

TLRs = Receptor Tool Like

TNF- α = Fator de Necrose Tumoral Alfa

TNFR= Receptor de Fator de Necrose Tumoral

TRP = Triptofano

VNTR= Variable Number Tandem Repeat

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa do número de casos de MB no mundo por 100.000 habitantes.	22
Figura 2: Distribuição das Meningites Bacterianas (MB) e Meningites Bacterianas não Especificadas (MBNE) por ano no Brasil	23
Figura 3: Coeficiente de incidência de meningites bacterianas segundo o agente por ano no Brasil por 100000 habitantes. DM.	23
Figura 4: Taxa de mortalidade da MB associado ao advento da antibioticoterapia.	24
Figura 5: Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na progressão da doença durante a MB.	25
Figura 6: Representação esquemática das etapas da fisiopatologia da MB por pneumococo e meningococo.	28
Figura 7: Localização do gene <i>TNF</i> .	35
Figura 8: Visão geral da via BER.	39
Figura 9: Organização esquemática dos domínios funcionais da APE1 e suas várias funções.	42
Figura 10: Rota da quinurenina.	45
Figura 11: Gel de Poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, mostrando perfil de digestão para o <i>SNP TNF-308G/A</i> .	50
Figura 12: Gel de Poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, mostrando perfil de digestão para o <i>SNP TNF -857C/T</i> .	56
Figura 13: Gel de Poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, mostrando perfil de digestão para o <i>SNP IL8- 251A/T</i> .	56
Figura 14: Diferença significativa dos níveis de cito/quimiocinas para o <i>SNP TNF-308G/A</i> .	60

Figura 15: Níveis de cito/quimiocinas para o <i>SNP TNF-857C/T</i> em amostras de LCR do grupo MB	61
Figura 16: Níveis de cito/quimiocinas para o <i>IL8 -251A/T</i> em amostras de LCR do grupo MB;	61
Figura 17: Contagem celular em relação ao <i>SNP IL8 -251A/T</i> em amostra de LCR no grupo MB.	62
Figura 18: Níveis de cito/quimiocinas em relação à combinação dos genótipos em amostras de LCR no grupo MB.	63
Figura 19: Contagem celular em relação as combinações de SNPs no grupo MB	64
Figura 20: Níveis de IgG e IgA em plasma de adultos em relação ao <i>SNP TNF -308G/A</i> .	66
Figura 21: Vias ativadas durante a MB:	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização da amostra:	49
Tabela 2: Polimorfismos estudados.	50
Tabela 3. Sequência dos primers, temperaturas de anelamento e enzima de restrição utilizada.	51
Tabela 4: Frequências alélicas e genótípicas dos SNPs para a MB em comparação com o grupo controle.	57
Tabela 5: Distribuição dos genótipos do <i>SNP</i> combinadas para a BM em comparação com o grupo controle.	50
Tabela 6: Correlação entre os níveis de cito/quimiocinas e a contagem de células em pacientes MB no LCR.	65

SUMÁRIO

RESUMO	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Meningite Bacteriana: A doença	19
2.1.1 Etioepidemiologia	19
2.1.2 Fisiopatologia	25
2.1.3 Diagnóstico e Tratamento	31
2.2 Susceptibilidade genética	32
3. OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos específicos	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 População estudada e coleta de amostras	48
4.2 Processamento de amostras e extração de DNA genômico de leucócitos	48
4.3 Genotipagem - Análise dos polimorfismos	50
4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	50
4.3.2 Revelação por Prata dos Produtos de PCR e da Digestão	52
4.4 Dosagens de Citocinas/ quimiocinas	52
4.5 Dosagens de Imunoglobulinas	53

4.6 Análises estatísticas	53
5. RESULTADOS	55
5.1 Análises das frequências alélicas e genotípicas	55
5.2 Efeito dos SNPs combinados	58
5.3 Associação dos SNPs com moduladores de resposta imune	59
6. DISCUSSÃO	67
7. COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E CONCLUSÕES.	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
9. APÊNDICE	98
9.1 Resumos publicados em Anais de Congressos e Simpósios	98
9.2 Certificados de honra ao mérito por trabalhos premiados em congressos e simpósios	99
10. ANEXOS	100
10.1 Participação como autor em artigo científico submetido	100
10.2 Participação como autor em artigo científico publicado, cujo tema tem correlação com o abordado na dissertação.	103
10.3 Termo de consentimento livre e esclarecido Grupo MB	107
10.4 Termo de consentimento livre e esclarecido Grupo Controle	109
10.5 Termo de aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa	111

1- INTRODUÇÃO

A Meningite Bacteriana (MB) é uma doença infecto-contagiosa que causa inflamação nas membranas leptomeníngeas e no espaço subaracnóideo. É uma doença que acomete as populações de diferentes partes do mundo e corresponde a uma das dez principais causas de infecções relacionadas à morte (Sellner *et al*, 2010; Fauci, 2001). Conhecida desde a antiguidade nos escritos de Hipócrates, somente no início do século XIX foi possível compreender o quadro clínico-patológico dessa doença (Quagliarello *et al*, 1993) e a primeira grande epidemia registrada ocorreu em 1805 na cidade de Genebra (Vieusseux *et al*, 1806). Em 1906 chegou ao Brasil com os imigrantes espanhóis e portugueses, mas a maior epidemia da história do país aconteceu na década de 70 no estado de São Paulo, com focos também no Rio de Janeiro e Salvador (Moraes e Barata, 2005).

A antibioticoterapia e o advento das vacinas contribuíram para a redução da mortalidade e do número de casos de MB, muito embora a ocorrência de sequelas neurológicas permanentes em muitos dos sobreviventes ainda seja frequente (Chávez-Bueno *et al*, 2005; Bottomley *et al*, 2012). Apesar do avanço do conhecimento sobre componentes bacterianos, bem como o desenvolvimento de vacinas e de antibióticos mais potentes, esta enfermidade continua sendo preocupante devido ao elevado número de etiologias não especificadas e principalmente a suas altas taxas de morbidade e mortalidade, permanecendo assim como um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo (Escosteguy *et al*, 2004).

À medida que a fisiopatologia das meningites vem se tornando melhor conhecida, evidências de que uma série complexa e integrada de eventos envolvendo citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas e agentes oxidantes podem ser responsáveis pela ocorrência da doença e disfunção cerebral (Koedel *et al*, 2002a; Emonts *et al*, 2003). Desde então, buscam-se modalidades terapêuticas com objetivo de direcionar a resposta inflamatória. Essa resposta depende não só do tipo e da intensidade do estímulo, mas também de fatores genéticos do hospedeiro (Sanders *et al*, 2011).

Em artigos recentes publicados pelo nosso grupo, descrevemos a associação entre a MB e os polimorfismos genéticos em *AADAT* +401C/T (Souza *et al*, 2011),

que codifica uma enzima importante na cascata de degradação do triptofano durante processos inflamatórios (Zádori *et al*, 2009), e em *APEX1* Asn148Glu, *OGG1* Ser326Cys e *PARP1* Val762Ala (Silva *et al*, 2011) que codificam enzimas de reparo de DNA envolvidas na via de excisão de bases (BER) (Hegde *et al*, 2012). Neste estudo, nós estendemos a análise incluindo os *SNPs* *TNF* -308G/A, *TNF* -857C/T e *IL8* -251A/T que codificam importantes moduladores inflamatórios ativados durante a resposta imune inicial contra os patógenos causadores de MB (Sanders *et al*, 2011; Brouwer *et al*, 2009).

Portanto, frente a essas constatações, nosso estudo tenta apresentar dados de associação genética relativa à MB, que integra rotas importantes que são ativadas durante a fisiopatologia da doença. Levando-nos a analisar os polimorfismos genéticos *TNF* -308G/A, *TNF* -857C/T, *IL-8* -251A/T, *AADAT*+401C/T, *APEX1* Asn148Glu, *OGG1* Ser326Cys e *PARP-1* Val762Ala e suas interações gene-gene.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Meningite Bacteriana

2.1.1 Etioepidemiologia

A meningite bacteriana é uma doença infecto-contagiosa que causa inflamação nas meninges e afeta principalmente as membranas pia-máter, aracnóide e o espaço subaracnóideo que envolvem o encéfalo e a medula espinhal. Apesar dos significantes avanços das terapias antimicrobianas ao longo dos últimos anos, a MB é considerada um sério problema de saúde pública, devido a suas elevadas taxas de mortalidade, com cerca de 50% dos sobreviventes apresentando sequelas neurológicas em longo prazo (Weisfelt *et al*, 2006; Mace, 2008).

Qualquer bactéria pode induzir meningite em um indivíduo susceptível, mas um pequeno número de espécies como *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Escherichia coli*, *Listeria monocytogens*, *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) e *Neisseria meningitidis* (meningococo), são responsáveis pela maioria dos casos de meningite aguda em recém-nascidos e crianças (Kim, 2010; Mace, 2008). Após o período neonatal, os agentes bacterianos mais comuns se restringem apenas a Hib, pneumococo e meningococo, muito embora após a inclusão da vacinação de rotina anti-Hib no esquema básico de imunização para todas as crianças menores de cinco anos de idade, houve um decréscimo significativo da incidência de MB causada por esse agente (Koedel *et al*, 2002a; Swarts *et al*, 2004).

H. influenzae é um cocobacilo gram-negativo que se apresenta sob a forma capsular, com seis tipos antigênicos distintos (a-f), ou não capsulares (Pfeiffer, 1892; Pittman, 1931; Aubrey *et al*, 2003). As cepas do tipo b podem causar graves infecções invasivas como meningite, septicemia, epiglote, bem como, artrite séptica e pneumonia. As cepas não encapsuladas causam otite média, sinusite, conjuntivite e infecções agudas do trato respiratório (Aubrey *et al*, 2003). As meningites promovidas pelo Hib são pouco frequentes em indivíduos maiores de seis anos. Apresenta caráter endêmico, e epidemias não são comuns, no entanto, pequenos surtos são relatados principalmente em creches ou em locais de aglomeração humana (WHO 2011). A primeira vacina anti-Hib foi produzida no início dos anos 70 utilizando um polissacarídeo capsular purificado da cepa, no entanto, esta vacina só foi eficaz em crianças com idade superior a 2 anos, dificultando sua ampla utilização.

Quatro diferentes vacinas conjugadas contra Hib mais imunogênicas foram desenvolvidas apenas no final de 1980 (Resegue *et al*, 1994; Kelly *et al*, 2004). No Brasil, a vacina anti-Hib foi introduzida no calendário rotineiro de imunização em 1999, e no ano seguinte a taxa de incidência de meningite causada por esse patógeno foi dramaticamente reduzida em 67% (Perecin e Bertolozzi, 2010).

S. pneumoniae é uma bactéria gram-positiva, alfa-hemolítico, capsulada, com mais de 90 sorotipos capsulares de importância epidemiológica mundial na distribuição das doenças invasivas como meningite, pneumonia, sepse e artrite ou não invasivas como sinusite, otite média aguda e conjuntivite (Mook-Kanamori *et al*, 2011; WHO, 2007). A meningite bacteriana causada por esse patógeno ainda é um grave problema de saúde pública devido proporcionar altas taxas de mortalidade e morbidade, resultando em uma estimativa de 826.000 mortes a cada ano em crianças de um mês a cinco anos de idade (O'Brien *et al*, 2009). Seu fator chave de virulência é a pneumolisina que induz reações pró-inflamatórias (Hirst *et al*, 2004) e a colonização na nasofaringe é facilitada pela produção de uma protease de imunoglobulina A (IgA) pela bactéria (Reinholdt e Kilian, 1997). Este patógeno assumiu posição de destaque, não só devido ao declínio na incidência de Hib como também, devido ao aparecimento crescente de cepas resistentes à maior parte dos agentes antimicrobianos (Sessegolo *et al*, 1994). As vacinas pneumocócicas são de difícil desenvolvimento devido à limitada imunogenicidade e diversidade do polissacarídeo capsular do patógeno. Antes do ano 2000, a única vacina pneumocócica disponível comercialmente era uma 23-valente, com uma grave desvantagem relativa a curta duração e a memória imunológica não ser bem estabelecida. Com o advento das vacinas conjugadas de polissacarídeo capsular e proteínas transportadoras do pneumococo, a resposta imune mudou de T independente para T dependente, que produz títulos elevados de imunoglobulinas de avidéz elevada e uma forte resposta de memória, resultando em uma maior proteção, muito embora a duração da proteção ainda não seja totalmente estabelecida (Eskola, 2000; Fitzwater *et al*, 2012). Desde março de 2010 o Ministério da Saúde, por meio do Programa Nacional de Imunizações, incluiu no calendário básico de vacinação infantil a vacina pneumocócica 10-valente (conjugada), em praticamente todo o território nacional (Ministério da Saúde, 2010). No estado do Rio

Grande do Norte a vacina 10-valente não foi incluída no calendário de vacinação (comunicação pessoal com a Secretaria de Saúde do RN).

A *N. meningitidis* é um diplococo gram-negativo com múltiplos sorogrupos causadores de doença invasiva, é o causador de aproximadamente um quarto de todas as meningites bacterianas que acometem crianças e adolescentes (Stephens *et al*, 2007). Mesmo em países com assistência médica adequada, a MB por meningococo é uma doença de evolução rápida e com taxas de mortalidade independente dos fatores econômicos e sociais do indivíduo (Castiñeiras *et al*, 2007). É também o principal causador da maioria das epidemias de grande porte em várias partes do mundo e, em particular, na África subsaariana “Cinturão da meningite” (Greenwood, 2006). Por ser um patógeno frequentemente comensal isolado na nasofaringe presente em 35% ou mais de indivíduos saudáveis, pode ser transmitido de uma pessoa para outra através de secreções respiratórias (gotículas de salivas, espirros, tosse) (Bogaert *et al*, 2001). Além de estruturas da superfície da cápsula da bactéria, o seu mais importante fator de virulência é o lipopolissacarídeo (LPS) meningocócico (Emonts *et al*, 2003). Possui 13 sorogrupos imunologicamente ativos baseados em diferentes estruturas de polissacarídeos de superfície, mas apenas os sorogrupos A, B, C, W-135, X e Y são os responsáveis pela maioria dos casos de doença meningocócica relatados no mundo. As vacinas de polissacarídeo contra a *N. meningitidis* existem desde a década de 80, no entanto por serem sorotipo-específica, as proteções induzidas são limitadas para algumas linhagens prevalentes que ocorrem durante as epidemias (Stephens *et al*, 2007). As vacinas não-conjugadas, apenas com polissacarídeos de superfície, apresentam baixa eficácia principalmente em crianças menores de dois anos, uma vez que não geram resposta imune apropriada nessa idade em função da ausência de resposta adequada a antígenos T independentes e mesmo nos pacientes acima de dois anos de idade, a proteção não é capaz de induzir memória imunológica (Danzig, 2004; Bricks, 2002; Ramsay *et al*, 2000). No esquema de rotina de imunização do Brasil, as vacinas antimeningocócicas estão disponíveis apenas em situações de surto, epidemias ou para indivíduos que tenham outras doenças que impliquem em um maior risco de doença meningocócica (Sáfadi *et al*, 2006).

A MB tem uma distribuição mundial importante e é dependente de diferentes fatores, como o agente infeccioso, a existência de aglomerados populacionais, características socioeconômicas dos grupos populacionais e do meio ambiente (clima). Embora seja uma doença de notificação obrigatória em muitos países, como o Brasil, a taxa de incidência exata não é bem determinada, estima-se, anualmente, a ocorrência mundial de 4-6 casos por 100.000 habitantes e pode ser 10 vezes maior em países em desenvolvimento (Figura 1) (van de Beek, 2006; Greenwood, 2006).



Figura 1: Estimativa do número de casos de MB no mundo por 100.000 habitantes (adaptado de WHO, 2002).

No Brasil entre o período de 2007-2011 dos 31.682 casos de MB diagnosticados, quase 15 mil casos não tiveram seus agentes etiológicos confirmados segundo o SINAN/SVS/MS (Sistema Nacional de Agravos Notificáveis da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde) (Figura 2), essa elevada proporção pode refletir problemas, como o processo de assistência e/ou seleção dos casos relacionados ao perfil do hospital, tornando-se objeto de vários

estudos (Escosteguy *et al*, 2004). O coeficiente médio de incidência da MB segundo o agente neste mesmo período mostra que a *N. meningitidis* foi o principal agente etiológico (Figura 3).

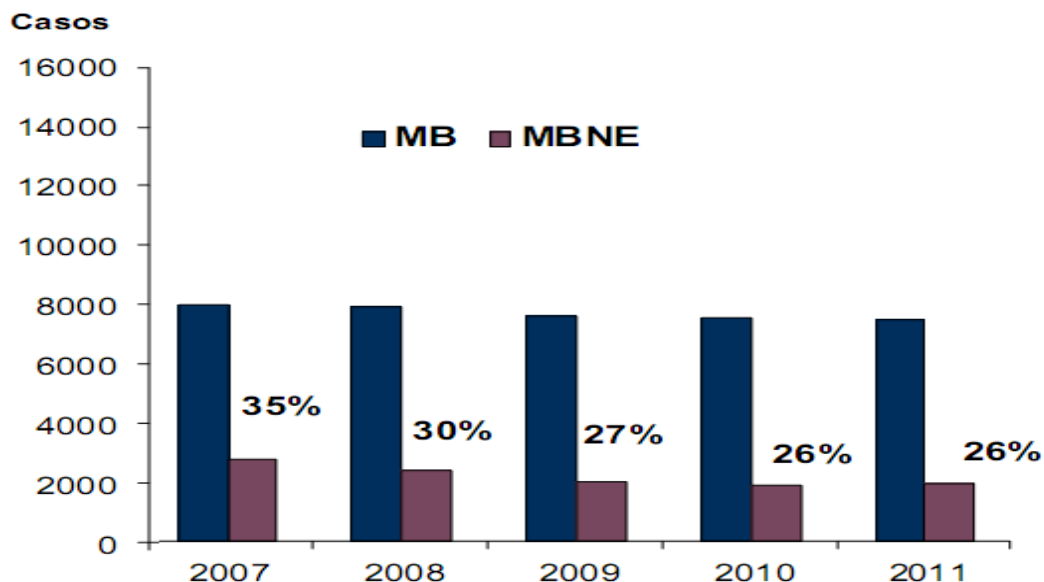


Figura 2: Distribuição das Meningites Bacterianas (MB) e Meningites Bacterianas não Especificadas (MBNE) por ano no Brasil (SINAN/SVS/MS).

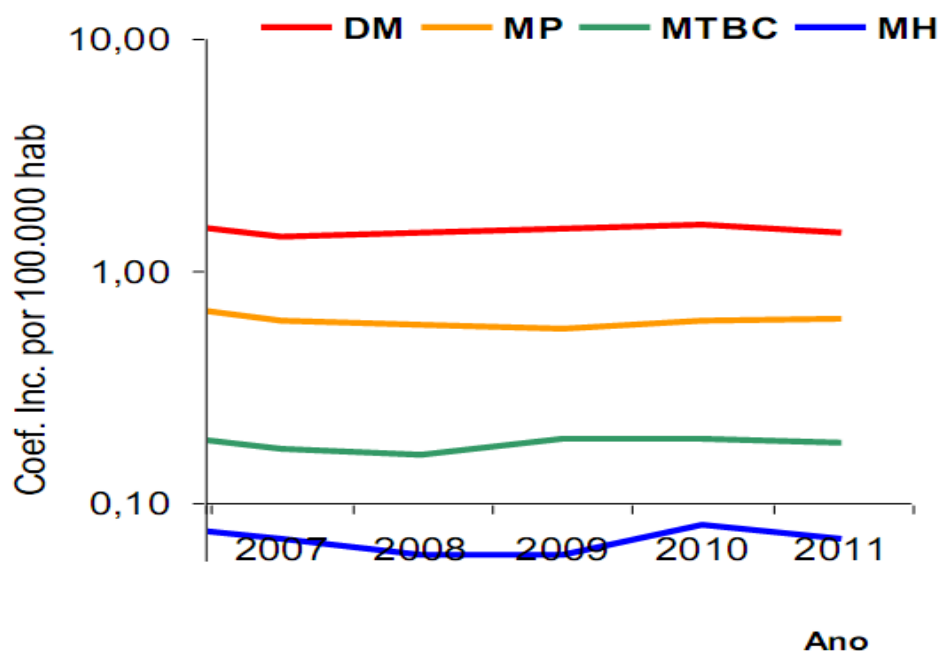


Figura 3: Coeficiente de incidência de meningites bacterianas segundo o agente por ano no Brasil por 100000 habitantes. DM: Doença Meningocócica; MP:

Meningite por Pneumococo; MTBC: Meningite Tuberculósica; MH: Meningite por Hib (SINAN/SVS/MS).

Em levantamento realizado por nosso grupo, entre janeiro de 2005 a dezembro de 2008, 168 casos de MB foram notificados no Hospital Giselda Trigueiro (HGT), hospital de referência para doenças infecto-contagiosas do estado do Rio Grande do Norte, entre os quais 96 (57,1%) amostras não foram identificados de acordo com agente etiológico, 41 (24,4%) foram causadas por *S. pneumoniae*, 18 (10,7%) por *N. meningitidis*, 4 (2,4%) por Hib e 9 (5,4%) por outras bactérias, *Staphylococcus aureus* (dois casos), *Salmonella* (dois casos), o *Streptococcus viridans* (dois casos), *Klebsiella* (dois casos) e *Proteus mirabilis* (um caso) (Silva *et al*, 2010).

Quanto ao impacto do agente etiológico sobre a gravidade da doença, mesmo após a introdução da terapia antibacteriana os índices de morbidade e mortalidade ainda permanecem altos em casos de meningite causada por pneumococo (Figura 4) (Swartz, 2004).

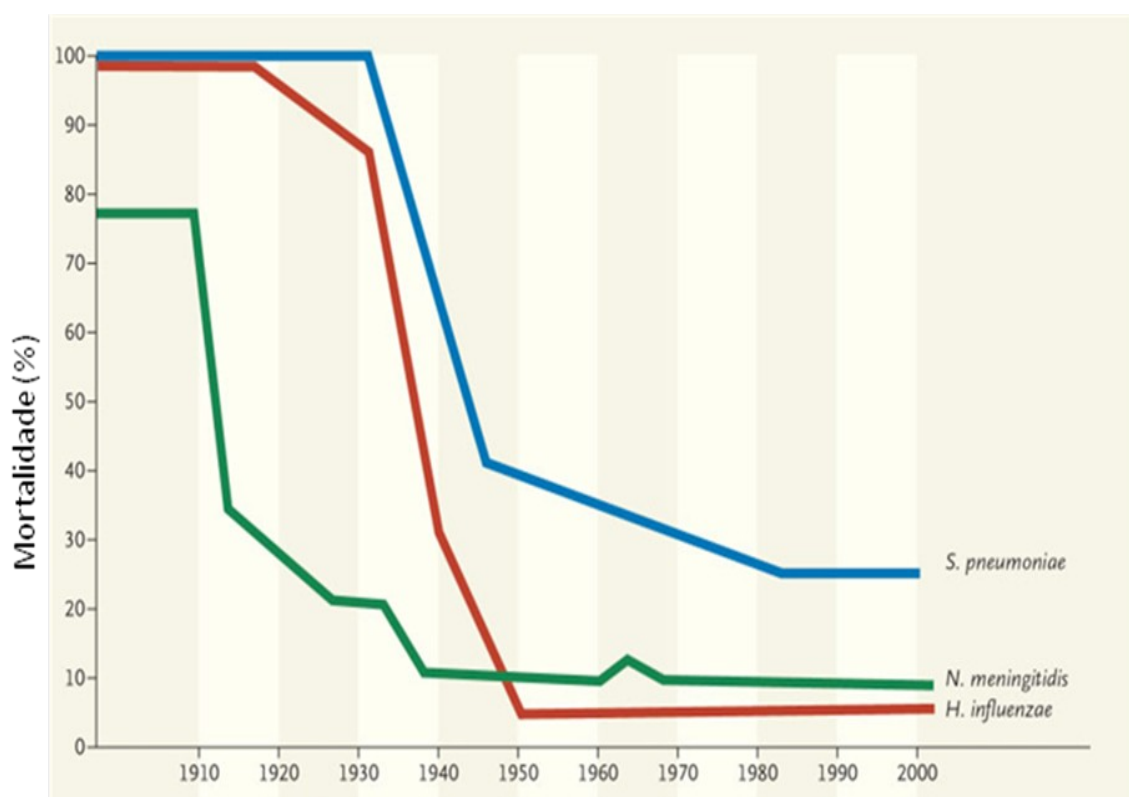


Figura 4: Taxa de mortalidade da MB associado ao advento da antibioticoterapia (modificado de Swartz *et al*, 2004).

2.1.2 Fisiopatologia

As principais características da fisiopatologia da MB são a intensa inflamação no espaço subaracnóideo e ventricular e consequente dano neuronal gerado, que afeta principalmente o córtex e o hipocampo. A resposta inflamatória determina tanto a susceptibilidade à MB como sua consequência clínica. De forma geral, a fisiopatologia da MB pode ser dividida em três etapas principais da progressão da doença: colonização e invasão do sistema nervoso central (SNC), multiplicação bacteriana e inflamação no SNC, e desenvolvimento do dano cerebral (Figura 5) (Grandgirard *et al*, 2010).

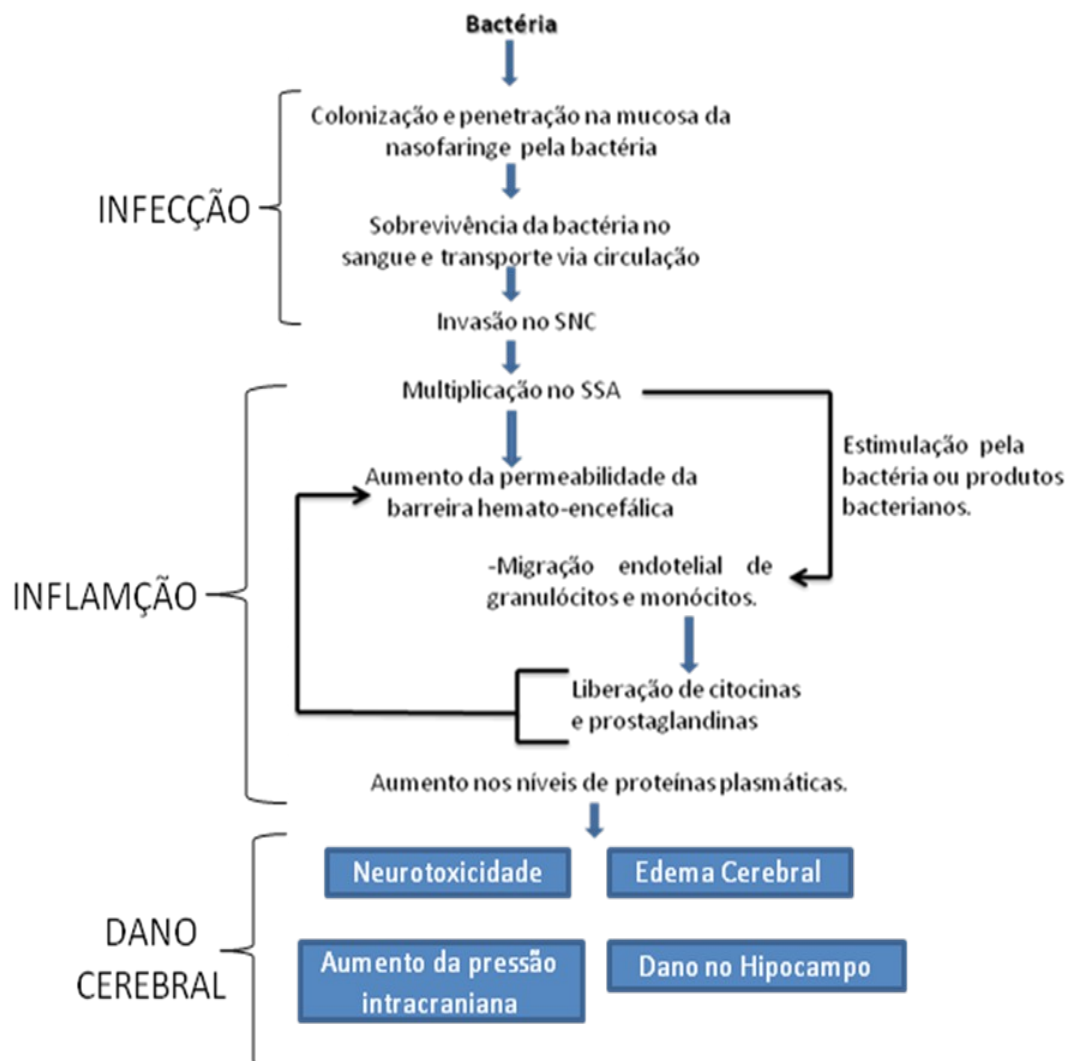


Figura 5: Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na progressão da doença durante a MB (modificado de Grandgirard *et al*, 2010).

A MB no recém-nascido geralmente está relacionada à infecção adquirida dos patógenos da mãe ou o ambiente pós-natal. Após esse período, a doença é determinada pelos patógenos mais comuns (Hib, pneumococo e meningococo) e têm início, em geral, com a colonização da mucosa da nasofaringe (Sáez-Llorens *et al*, 1990; Emonts *et al*, 2003; Koedel *et al*, 2010). Eventualmente, pode ser consequência da invasão bacteriana a partir de um foco de infecção contínuo ao SNC, por exemplo, mastoidite, sinusite, e principalmente otite média recorrente em crianças (García-Rodríguez *et al*, 2002; Lindberg *et al*, 1994).

A resposta imune do hospedeiro tem papel essencial na defesa contra os agentes infecciosos, constituindo-se na principal barreira contra o desenvolvimento das doenças infecciosas. Toda resposta imune inicia-se pelo reconhecimento do patógeno e em seguida pela ativação de uma reação dirigida a este elemento, podendo ser dividida em inata e adaptativa. A resposta inata é nossa primeira linha de defesa contra microrganismos invasores, compõem-se de barreiras físico-químicas, presentes na epiderme e epitélios, além de células, como os fagócitos e *natural killer*, e proteínas que modulam a inflamação, como o sistema complemento e citocinas. Não é uma resposta específica e reage da mesma maneira para uma variedade de agentes infecciosos (Abbas *et al*, 2006). A resposta adquirida protege contra re-exposição ao mesmo patógeno, é específica, pois reage somente contra o antígeno que induziu a resposta, em contrapartida, é uma resposta mais demorada. É classificada em dois tipos: imunidade humoral, mediada pelos anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas, secretados pelos linfócitos B, as quais processam o antígeno, ou imunidade celular, mediada pelos linfócitos T que destroem o antígeno ou imunógeno, e quando sensibilizados, adquirem memória imunológica (Abbas *et al*, 2006; Zheng *et al*, 2010). A resposta imune adquirida é diferente entre adultos e crianças uma vez que, a ativação das células B para a produção de imunoglobulinas é dependente de uma primeira exposição a um antígeno, e o processo de mudança de classe de imunoglobulinas (do inglês, classe switch-recombination –CSR) é induzido em células B durante a sua diferenciação e

maturação (Weksler *et al*, 1985; Kurosaki *et al*, 2010). A produção da memória imunológica é dependente de um segundo estímulo, fazendo com que a produção natural de certos anticorpos para antígenos específicos demore muitos anos para acontecer, caracterizando assim os baixos níveis de IgG e IgA encontrados em crianças (Yachie *et al*, 1995; Frasca *et al*, 2009).

A resposta imunológica contra os patógenos funciona de uma forma que haja a interação entre todas as vias ativadas com funções que se sobrepõem para conter ou controlar a infecção. Assim, a resposta imune adequada é a garantia de resistência do organismo às infecções (Abbas *et al*, 2006).

A resposta contra MB inicia-se com a colonização da mucosa do trato respiratório e aderência de microrganismos que normalmente são comensais nesta região, como é o caso do meningococo e pneumococo (Tunkel *et al*, 2004). Em raras ocasiões, as bactérias invadem a corrente sanguínea após vencerem a primeira barreira do hospedeiro, representada pela atividade do epitélio ciliar, pela liberação de algumas citocinas estimuladas pelo reconhecimento de proteínas de superfície do patógeno e pela presença local de IgA secretória (Bogaert *et al*, 2004; Carbonnelle *et al*, 2009; Lindberg *et al*, 1994). Apesar do reconhecimento dos diversos microrganismos acontecer por diferentes receptores, as etapas da infecção e estimulação imune são semelhantes (Sanders *et al*, 2011). Os componentes bacterianos reconhecidos podem ser citotóxicos, funcionar como quimioatrativos ou induzir a resposta imune pela interação com células imunocompetentes do hospedeiro (Emonts *et al*, 2003; Hirst *et al*, 2004; Bauer *et al*, 2001). Após a invasão da corrente sanguínea, e durante a proliferação bacteriana no espaço intravascular, as células imunes na tentativa de destruir o microrganismo estimulam a ativação do sistema complemento e produção de mediadores pró-inflamatórios, entre eles prostaglandinas, cito/quimiocinas e metaloproteinases de matriz (MMPs), que promovem um aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE) (Nathan e Scheld, 2000; Sellner *et al*, 2010). Os anticorpos presentes no sangue também têm função importante de defesa do hospedeiro, no entanto, como essa resposta depende de uma primeira exposição ao antígeno, não é adequada em crianças, uma vez que geralmente elas não possuem memória imunológica para os

componentes bacterianos, contribuindo assim, para a maior incidência de MB nesse grupo etário (Danzig, 2004; Eskola, 2000).

Alguns patógenos conseguem superar tais mecanismos de defesa e romper a BHE migrando até o espaço subaracnóideo, este último efeito também leva a migração de células polimorfonucleadas (PMNs) na tentativa de eliminar as bactérias. Com a instalação da infecção no SNC, a forte resposta imune desencadeada pelos patógenos pode levar ao dano neural e subsequente desenvolvimento de sequelas, que por muitas vezes são irreversíveis, constituindo o maior problema relacionado à MB (Kim, 2008). A figura 6 resume a fisiopatologia da MB por pneumococo e meningococo.

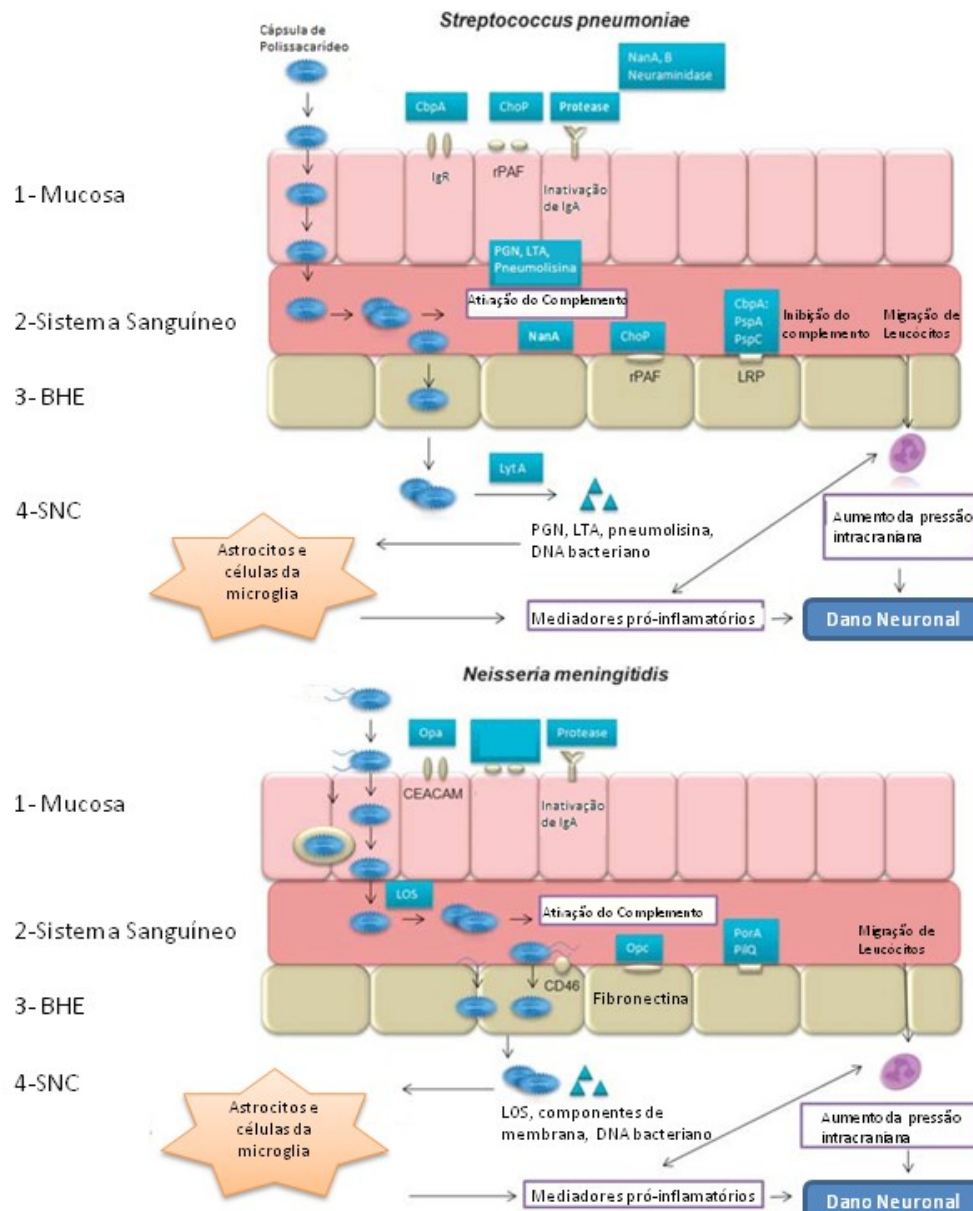


Figura 6: Representação esquemática das etapas da fisiopatologia da MB por pneumococo e meningococo (Adaptado de Sanders *et al*, 2011).

Os principais patógenos que infectam o hospedeiro são reconhecidos inicialmente por receptores de reconhecimento padrão (do inglês, pattern-recognition receptors- PRR) presentes nas células imunes, responsáveis por interagir com os padrões moleculares associados aos patógenos (do inglês, pathogen-associated molecular patterns- PAMP). Várias classes de PRR como os receptores Toll-Like (TLR), proteínas altamente conservadas, desempenham papel importante na resposta imune inata pela detecção dos microrganismos e estimulação da resposta imunológica contra esses agentes patogênicos, bem como possibilitar a adaptação

do sistema imune (Akira *et al*, 2004a). Os diferentes agentes infecciosos envolvidos no desenvolvimento da MB usam conjuntos distintos de TLR, mas que se sobrepõem para desencadear a resposta inflamatória (Mogensen *et al*, 2006; Sjölander *et al*, 2008; Koedel, 2009). Quando algum PAMP é reconhecido por um receptor TLR específico, a proteína adaptadora MyD88 é recrutada promovendo assim o início de uma cascata de sinalização que resulta na translocação do fator de transcrição nuclear (NF- κ B) ao núcleo para induzir a expressão de genes envolvidos na defesa do hospedeiro (Akira *et al*, 2004b; Fitzgerald *et al*, 2001). Existem duas vias descritas para a ativação de NF- κ B: clássica (via canônica) que está associada à expressão de genes relacionados à inflamação, controle da apoptose, progressão do ciclo celular e crescimento celular, e a via alternativa (via não-canônica) que é ativada por membros da família do fator de necrose tumoral, como BAFF (fator ativador de células B), e pelo ligante CD40 e está associada à expressão de genes que atuam no desenvolvimento e manutenção de órgãos linfóides secundários (Israel, 2010; Xiao, 2004; Alcamo *et al*, 2002).

Essa etapa de reconhecimento imune leva a ativação tanto das células PMNs quanto das células cerebrais (astrócitos, microglia e macrófagos residentes) que promovem uma resposta inflamatória inicial pela produção de citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , e IL-6 (Leib *et al*, 2004). Em resposta ao estímulo inflamatório, ocorre à indução da produção de quimiocinas como a CXCL8/IL-8 que possui como papel principal a ativação e o recrutamento das células PMNs para o sítio da inflamação. Essas células migram da corrente sanguínea ao tecido infectado, onde fagocitam e inativam o patógeno (Sherwood *et al*, 2000; Sellener *et al*, 2010). Durante a MB, esses moduladores acumulam-se no SNC e atuam em conjunto na promoção da resposta inflamatória (Kim, 2004).

A eliminação das bactérias pela fagocitose é executada através da explosão respiratória, também conhecido com *burst* oxidativo. Ocorre uma redução abrupta de oxigênio a formas que são menos reduzidas e mais reativas que a água, também conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ERO) e a indução de altos níveis de espécies reativas de nitrogênio (ERN). Essa explosão respiratória gera produtos como superóxido, oxigênio singlete, ozônio entre outros, levando a peroxidação de lipídios da membrana celular, danos mitocondriais, nitração de tirosina, ativação de

MMPs e alterações na atividade dos canais de K^+ (Nathan *et al*, 2006; Kastenbauer *et al*, 2002). Além disso, as moléculas oxidantes geradas podem promover a quebra da cadeia de DNA e subsequente ativação da Poli-ADP-ribose polimerase-1 (PARP-1) iniciando um ciclo intracelular de consumo de energia que pode induzir uma severa depleção energética e consequente necrose, especialmente em células endoteliais do sistema vascular cerebral (Koedel *et al*, 2002b).

A geração das ERO pode ser tanto benéfica à célula, desempenhando funções de sinalização, como também pode ser prejudicial pela modificação de biomoléculas em que sua acumulação está relacionada a inúmeras patologias como Alzheimer, Parkinson, Huntington entre outras (Evans *et al*, 2004). As moléculas oxidantes geradas durante a inflamação são os principais agentes microbicidas contra os patógenos, porém o estresse oxidativo gerado está relacionado ao dano cerebral pela indução dos processos de necrose e apoptose nas células neuronais durante a MB (Scheld, 2002). Em geral, o tipo de dano ao DNA mais comum durante a inflamação é a formação de bases nitrogenadas oxidadas, as quais são principalmente corrigidas por enzimas da via de reparo por excisão de bases (BER) (Klein *et al*, 2006, Hegde *et al*, 2012).

Condições inflamatórias também estão relacionadas com a metabolização do Triptofano (TRP) e com a produção de metabólitos essenciais relacionados com a ativação da resposta imune (Guillemin *et al*, 2003; McGaha *et al*, 2012). Nos últimos anos, grande parte das pesquisas é centrada na Rota da Quinurenina (RQ), a qual constitui a principal rota de degradação do TRP na maioria das células de mamíferos, e também é ativada em estudos experimentais de meningite pneumocócica, levando ao acúmulo de metabólitos da RQ no hipocampo (Stone *et al*, 2001; Bellac *et al*, 2006). O metabolismo do TRP por essa via é mediado pela enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), que está distribuída em diversos tecidos, a qual é induzida por moduladores inflamatórios como IFN- γ , IFN- α , IL-1 β , TNF- α e por produtos bacterianos como o LPS (King *et al*, 2007; Mándi *et al*, 2011; Fujigaki *et al*, 2001). Acredita-se que a ação direta dos metabólitos da degradação do TRP em determinados tipos celulares promove um mecanismo alternativo pelo qual a IDO atuaria no sistema imune, uma vez que durante a resposta infecciosa, altas concentrações de tais metabólitos estão presentes nos locais da inflamação (Moffett

e Namboodiri *et al*, 2003). Como produto final da RQ, há a síntese do ácido nicotínico (niacina), precursor da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) um importante cofator enzimático que também está envolvido com a indução da resposta imune (Moffett e Namboodiri *et al*, 2003; Grahner *et al*, 2011). Além da indução da resposta inflamatória, alguns metabólitos neurotóxicos são gerados pela RQ e podem levar ao desenvolvimento dos danos neuronais durante a MB (Bellac *et al*, 2006).

2.1.3 Diagnóstico e Tratamento

As meningites bacterianas podem ser de difícil diagnóstico quando os sinais e sintomas são inespecíficos, principalmente em crianças mais jovens. Em geral, o quadro clínico caracteriza-se por febre alta, alterações mentais e pelo aparecimento dos “sinais meníngeos”, secundários à compressão dos nervos raquidianos, que são a rigidez de nuca e os clássicos sinais de Kerning e Brundzinski, assim como todas as suas variantes (Attia *et al*, 1999; Tacon *et al*, 2012). Dentre as manifestações sistêmicas associadas às meningites, cita-se atalgias, mialgias, petéquias ou púrpura e choque, que podem ocorrer com qualquer agente infeccioso, sendo significativamente mais frequentes com meningococo. (Cha´vez-Bueno *et al*, 2005; Galiza *et al*, 2009). É imprescindível que haja o diagnóstico precoce e imediato início da terapia antimicrobiana no intuito de reduzir a morbidade e mortalidade determinada pela MB.

Após a identificação dos sinais e sintomas sugestivos de MB, a realização da punção lombar com coleta do líquido cefalorraquidiano (LCR) deve ser imediata, para estabelecer o diagnóstico preciso da doença e utilização da terapia mais adequada. Geralmente o LCR na MB, apresenta uma leucocitose elevada, acima 500 células/mm³ com predomínio de PMNs, as proteínas apresentam valores elevados e a glicorraquia é baixa (Phillips *et al*, 1998). A análise bacteriológica inclui a bacterioscopia pelo método de Gram, cultura e se possível realização de teste para detecção do antígeno. A cultura, ainda que demorada, é considerada o padrão ouro, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, muito embora, algumas vezes o resultado seja negativo devido à utilização prévia de antibióticos (Kim, 2010; Kanegaye *et al*, 2001).

No Brasil ainda existe um grande número de diagnósticos com etiologias não identificadas, devido às deficiências técnicas e humanas dos laboratórios e o uso indiscriminado de antibióticos (Faria *et al*, 1999). Testes mais eficientes como PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) já são largamente utilizados em alguns dos grandes centros de diagnósticos e possuem alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da MB, além de ter mostrado alta eficiência na identificação dos patógenos em pacientes que já estavam em uso de antibióticos (Schuurman *et al*, 2004).

A erradicação do microrganismo infectante na MB é determinada pela seleção do esquema terapêutico mais adequado contra os prováveis patógenos, que tenham boa penetração no SNC, e que atinjam concentrações bactericidas adequadas no LCR, associados com um adjuvante terapêutico que tenha propriedades anti-inflamatórias no intuito de diminuir a geração de sequelas. A terapia contra MB deve ser determinada o mais rápido possível a partir dos achados clínicos, mesmo antes do isolamento da bactéria. A seleção do regime terapêutico mais adequado deve ter um espectro de ação que cubra os prováveis patógenos, com base na idade e nos fatores de risco associados (Tunkel *et al*, 2004).

2.2 Susceptibilidade genética

À medida que a fisiopatologia das meningites vem se tornando melhor conhecida, evidências de que uma série complexa e integrada de eventos envolvendo citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas e agentes oxidativos podem ser responsáveis pela ocorrência e disfunção cerebral na MB (Koedel *et al*, 2002a). Desde então, buscam-se marcadores genéticos que auxiliem no diagnóstico e no entendimento da evolução clínica da MB, bem como modalidades terapêuticas direcionadas a variação entre a resposta inflamatória de cada indivíduo.

A resposta imune e, especialmente, a expressão de citocinas não depende apenas do tipo e da intensidade da estimulação, mas também de fatores genéticos do hospedeiro, tais como polimorfismos localizados em regiões de codificação e regulação de genes importantes durante a infecção (Sanders *et al*, 2011). Isto é particularmente evidente nas infecções crônicas, com microrganismos que podem atingir um estado de resistência à imunidade do hospedeiro. Vários genes

relacionados à resposta imune já foram analisados em diversas populações e modelos de controle imunológico já foram propostos para várias doenças como leishmaniose, tuberculose e infecção por *H pilory* (DebRoy *et al*, 2012; Lamrabet *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2012).

A MB é uma doença complexa, podendo estar associada à susceptibilidade genética, relacionada a um ou poucos genes, sendo dependente dos seus efeitos de penetrância, herdabilidade, além de fatores populacionais como consanguinidade. Esse tipo de herança resulta de interações de vários fatores de predisposição, em que o fenótipo é resultado da ação de alelos em diversos genes que agem em conjunto em um número que na maioria das vezes é desconhecido, com efeitos aditivos ou sinérgicos (Stranger *et al*, 2011; Botstein *et al*, 2003). Com o foco voltado para as análises de DNA, as pesquisas têm se intensificado na identificação dos fatores genéticos associados com a predisposição ao desenvolvimento das doenças complexas (Kilpinen *et al*, 2012).

No processo de sequenciamento do genoma humano, foram identificadas pequenas variações nas sequências de nosso DNA que podem ter o maior impacto na susceptibilidade a desenvolver ou não certas doenças. Variações nessas sequências ocorrem na população geral de forma estável e quando alcançam uma frequência maior que 1% são denominados polimorfismos genéticos (1000 Genomes Project Consortium *et al*, 2010). As formas mais comuns de polimorfismos genéticos são deleções, mutações, substituições de base, envolvendo um nucleotídeo (do inglês: Single Nucleotide Polymorphisms, ou *SNPs*), ou variações no número de sequências repetidas (do inglês: Variable number tandem repeat ou *VNTR*), micro e minissatélites (Schafer e Hawkins, 1998). Após a conclusão do projeto genoma humano, a identificação e inclusão de milhões de *SNPs* em bancos de dados públicos forneceram base para o surgimento de estudos de associação genética. Estes estudos são realizados para determinar se uma variante genética está associada a um determinado fenótipo ou doença (de Bakker *et al*, 2005). Os *SNPs* constituem o tipo de variação mais comum do genoma humano com uma distribuição aleatória, e um número crescente de estudos tem identificado o seu envolvimento nas bases moleculares de várias enfermidades, podendo ser utilizadas como marcadores genéticos (Sachidanandam *et al*, 2001).

O TNF- α é o principal mediador da resposta inflamatória, exerce seus efeitos através da ligação com seus receptores de superfície celular TNFR1 e TNFR2 desempenhando um papel crucial na resposta imune inata e adaptativa (Grivennikov *et al*, 2006; Tsuji *et al*, 2008). O TNFR2 tem uma maior afinidade com o TNF- α e liga-se à citocina de forma muito eficiente mesmo em baixas concentrações. Este receptor é responsável pela sinalização dos estímulos das respostas pró-inflamatória. Em contraste, o receptor TNFR1 requer concentrações mais elevadas de TNF- α e está relacionado com os sinais de morte celular por apoptose ou a citotoxicidade (Tartaglia *et al*, 1991; Suryaprasad *et al*, 2003).

Suas funções biológicas são variadas e complexas, pode tanto conferir proteção contra doenças, como gerar complicações em certas patologias (Hajeer e Hutchinson, 2000). A principal função do TNF- α é promover a resposta imune, por meio do recrutamento e ativação de neutrófilos e monócitos para o local da infecção. Estudos recentes têm mostrado que o TNF- α pode se auto-regular, ativando as proteínas inibidoras da ativação de STAT1 (PIAS1), que são recrutados para o promotor do gene reprimindo assim a sua transcrição (Liu *et al*, 2008). Em situação aguda, a produção local de TNF- α é claramente benéfica, como é o caso de algumas infecções. Ele aumenta a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular para permitir que as células do sistema imunológico, em especial os neutrófilos e macrófagos, migrem até o sítio da infecção (Bradley, 2008). Além disso, está relacionado com a estimulação de uma cascata de mediadores inflamatórios, incluindo outras citocinas e quimiocinas como CXCL8/IL-8 e CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL2/MCP-1, prostaglandinas, MMPS, ERO e ERN para o controle da infecção (Barbara *et al*, 1996; Dinarello, 2000). No entanto, a exposição sistêmica ou prolongada a TNF- α pode ser prejudicial, uma vez que altos níveis de circulantes levam a uma grande resposta inflamatória causando alguns danos ao organismo como choque tóxico induzido por endotoxinas bacterianas e distúrbios do metabolismo (Elahi *et al*, 2009).

O gene *TNF* está localizado no cromossoma 6p21 dentro da classe III da região do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), próximo aos genes que codificam o antígeno leucocitário humano (HLA) de classe II, e encontra-se em uma

região densamente povoada por genes envolvidos na resposta inflamatória (Figura 7) (Tsukamoto *et al* ,1998; Hajeer e Hutchinson, 2000).

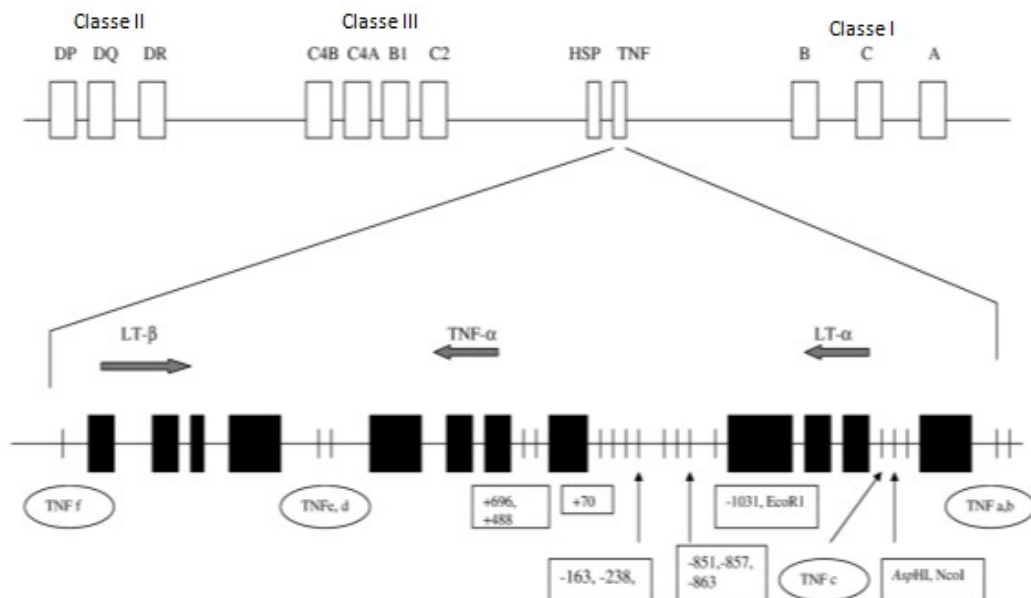


Figura 7: Localização do gene *TNF*: cromossomo 6, mostrando a localização de polimorfismos microssatélites e *SNPs* no gene do *TNF*. Marcadores bialélicos estão apresentados nos retângulos e marcadores microssatélites estão circulos (Adaptado de Tsukamoto *et al* ,1998).

Acredita-se que a variabilidade da resposta dessa citocina seja devido a sua localização uma vez que o seu gene encontra-se no meio de uma região que é inerentemente variável de uma maneira que assegura a diversidade das respostas imunitárias. Como por exemplo, é bastante conhecida a variabilidade da molécula de HLA-DR, que é de fundamental importância para o reconhecimento de antígenos peptídicos e apresentação para os linfócitos T auxiliares (CD4⁺). Desta forma, os polimorfismos de HLA-DR contribuem para a diversidade da resposta imune, e os mesmos mecanismos que atuam para manter essa variabilidade podem fazer o mesmo com as outras moléculas do complexo HLA (Hajeer e Hutchinson, 2000).

Diversos *SNPs* na região promotora de *TNF* já foram bem descritos, os quais podem afetar o nível da expressão do gene tendo impacto sobre a resposta inflamatória. Entre os mais estudados, estão o da região promotora -308G/A

(rs1800629) que tem demonstrado aumento da atividade transcricional do TNF- α (Wilson *et al*, 1997) e a região -857C/T (rs1799724) também aumenta a expressão da citocina de forma indireta (van Heel *et al*, 2002).

O *SNP* em *TNF* -308G/A é caracterizado pela mudança de uma guanina (G) por uma adenina (A), o significado funcional dessa mutação é um aumento da expressão do gene, pois com a alteração a região que se encontra o polimorfismo torna-se homóloga à sequência consenso para ligação do fator de transcrição AP-2 (do inglês, *activator protein 2*) (Kroeger *et al*, 1996; Hajeer e Hutchinson, 2000). Ensaio utilizando construção com gene repórter mostram que esse *SNP* tem um efeito significativo sobre a atividade de transcrição (Wilson *et al*, 1997; Karim *et al*, 2009). O genótipo polimórfico *TNF*-308A/A está associado com uma maior produção de TNF- α *in vitro* e *in vivo*, levando a uma atividade inflamatória mais intensa (Elahi *et al*, 2009). Adicionalmente, Lu *et al* (2008) observaram um aumento significativo dos níveis dessa citocina em cultura de leucócitos de pacientes com esse polimorfismo após estimulação por LPS de meningococos.

Vários estudos mostram uma associação desse *SNP* com inúmeras doenças, como por exemplo portadores do alelo polimórfico *TNF*-308A/A podem apresentar um risco maior de desenvolver a malária cerebral e desenvolverem sequelas neurológicas com a infecção. Está ainda relacionado a um pior desfecho na leishmaniose mucosa e pode aumentar significativamente o risco de rejeição a certos transplantes (Aidoo *et al*, 2001; Ternstrom *et al*, 2005; Wramner *et al*, 2004; Cabrera *et al*, 1995). No entanto, foi observado um papel protetor contra espondilite anquilosante, mostrando que a relação entre o efeito desse *SNP* e a doença depende da sua fisiopatologia (Milicic *et al*, 2000).

O polimorfismo em *TNF*-857C/T também está localizado na região promotora do gene do TNF- α (Ugliolara *et al*, 1998). As primeiras evidências sobre o aumento da atividade transcricional do alelo raro T foi observado em células mononucleares de sangue de doadores japoneses (Higuchi *et al*, 1998). O polimorfismo em *TNF*-857C/T está relacionado com o aumento dos estímulos inflamatórios através de interações entre o fator 1 de transcrição de octâmero (OCT-1) e NF- κ B. OCT-1 é um fator de transcrição amplamente expresso em muitos tecidos humanos, que ativa propriedades específicas de algumas células através da interação com outros

fatores de transcrição (Hohjoh e Tokunaga, 2001). Quando ocorre o estímulo inflamatório, o NF- κ B é translocado do citoplasma para o núcleo e liga-se a um sítio no promotor do gene do TNF- α que é próximo ao sítio de ligação do OCT-1, localizado na região de -858 a -851 pb, ocorrendo então uma interação entre esses dois fatores de transcrição. O OCT-1 se liga apenas com a variante rara, uma vez que o alelo TNF-857C elimina o sítio de ligação dessa proteína, e interage *in vitro* e *in vivo* com a NF- κ B, aumentando a expressão do TNF- α (van Heel *et al*, 2002).

Estudos têm documentado a associação do *SNP TNF-857C/T* com o desenvolvimento de carcinoma gástrico após infecção com *H. pylori*, susceptibilidade à colite ulcerativa e doença de Crohn (Goto, 2003; Sashio *et al*, 2002). Grutters *et al* (2002), observaram que o alelo raro foi mais frequente em pacientes com sarcoidose em comparação com indivíduos saudáveis independentemente da sua origem étnica.

As quimiocinas são proteínas cuja função primordial é direcionar as células do sistema imune, principalmente os leucócitos, para os sítios de inflamação no organismo, além disso, podem induzir o desenvolvimento de células T auxiliares e cicatrização (Lahertz *et al*, 1998). A CXCL8/IL-8 é uma importante quimiocina que desempenha duas respostas principais nos neutrófilos: alterações citomorfológicas, que são refletidas a partir da ativação do sistema contrátil da célula, para posterior adesão às células endoteliais e subsequente migração para o local de infecção; exocitose gerada a partir do remodelamento da membrana plasmática do neutrófilo para fusão com organelas de armazenamento, levando à liberação de proteínas solúveis; e o acionamento da explosão respiratória (Baggiolini e Clark-Lewis, 1992; Sallusto *et al*, 2008). Na MB, baixos níveis de CXCL8/IL-8 no LCR estão associados à pleocitose neutrofílica diminuída, indicando associação da quimiocina a esse evento biológico (Ostergaard *et al*, 1996).

O gene do CXCL8/IL-8 está localizado no cromossomo 4q13-q21, e a sua expressão gênica é regulada pela ativação do promotor pela transativação do gene por meio do NF- κ B, AP-1 e proteína estimuladora de ligação CCAAT (C/EBP), dependendo do tipo de célula e estímulo. O polimorfismo em *IL-8 -251A/T* (rs4073) é bem descrito por afetar a expressão dessa quimiocina. Em cultura de células sanguíneas de indivíduos estimuladas por LPS, o alelo polimórfico *IL-8 -251 T* foi

associado com uma diminuição dos níveis de CXCL8/IL-8 quando comparado a portadores do alelo selvagem (Hull *et al*, 2000). Dados recentes revelaram que o alelo *IL-8 -251 A* está associado com infiltração neutrofílica aguda e aumento no risco de câncer gástrico, além de estar relacionado à maior risco de desenvolver carcinoma de mama e próstata (Snoussi *et al*, 2006; Vairaktaris *et al*, 2007).

Durante o processo de infecção do organismo, ocorre uma intensa estimulação inflamatória gerando um *burst* oxidativo tanto nas células imunes quanto nas células do SNC. Como já mencionado, esse *burst* oxidativo leva a indução de danos oxidados no DNA gerando quebras de fita simples (do inglês, *single strand break* -SSBs), os quais são principalmente corrigidos por enzimas da via BER (Klein *et al*, 2006, Hegde *et al*, 2012). Esse mecanismo de reparo, de maneira geral, é dividido em quatro passos básicos (Figura 8): a) Detecção do dano, b) Processamento das extremidades danificadas, c) síntese de reparo e d) Ligação (Hegde *et al*, 2012). A etapa inicial do BER que consiste no reconhecimento e excisão das bases danificadas é realizada pelas glicosilases que são específicas para um limitado número de bases modificadas, algumas glicosilases conhecidas por serem bifuncionais também possuem a atividade AP-liase. Após a remoção da base, forma-se um sítio abásico (AP) sem ou com incisão 3', que é reconhecido por outro grupo de enzimas, as AP-endonucleases, capazes de produzir quebras na ligação fosfodiéster a 5' ou 3' do sítio AP, gerando uma lacuna. A lacuna é preenchida por ação de uma polimerase de reparo de DNA, e em seguida, ocorre à ação da ligase, concluindo o reparo (Slupphaun *et al*, 2003). Com isso, algumas enzimas da via BER como a PARP-1, 8-oxoG DNA glicosilase (OGG1) e endonuclease apurínica/apirimidínica 1 (APE1), possuem grande importância na MB devido tanto ao seu papel protetor contra o estresse oxidativo quanto na regulação da inflamação (Aguilar-Quesada *et al*, 2007; Mabley *et al*, 2005; Xanthoudakis *et al*, 1992;).

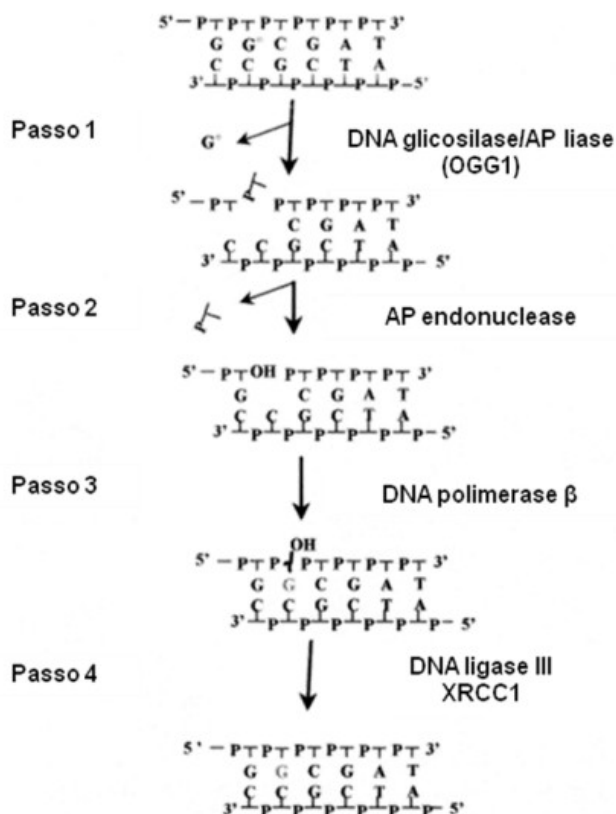


Figura 8: Visão geral da via BER: Passo1: Uma DNA glicosilase específica reconhece a base danificada; Segundo passo: Processamento das extremidades danificadas por uma enzima com atividade AP-endonuclease; Terceiro passo: Reparo propriamente dito pela incorporação de um nucleotídeo. Quarto passo: A fita de DNA é selada por uma ligase, restaurando sua conformação inicial (Adaptado de Slupphaun *et al*, 2003)

Em um trabalho recente de nosso laboratório, sobre susceptibilidade a MB, identificamos uma maior frequência dos *SNPs APEX1 Asn148Glu* (rs1130409), *OGG1 Ser326Cys* (rs1052133) e *PARP-1 Val762Ala* (rs1136410) em pacientes com meningite bacteriana aguda em relação ao grupo controle (indivíduos saudáveis), indicando que variações nos genes *APEX1*, *OGG1* e *PARP-1* podem afetar a ocorrência do desenvolvimento da doença. Nesses mesmos pacientes, variações nos níveis de citocinas e anticorpos estão relacionados com os genótipos (Silva *et al*, 2011). Além disso, a via BER é essencial para a manutenção da estabilidade genômica, e variações em enzimas importantes dessa via são relacionados ao maior risco de alguns tipos de câncer e envelhecimento precoce (Karahalil *et al*, 2012).

A OGG1 é uma glicosilase bifuncional, com atividade na remoção de bases modificadas do DNA como a 8-oxoguanina (8-oxoG), geradas pela exposição a ERO, e AP-liase, clivando sítios AP no DNA (Slupphaug *et al*, 2003; David *et al*, 2007). Durante a replicação 8-oxoG pode formar um emparelhamento com a adenina (8-oxoG/A), que subseqüentemente produz mutações de tipo transversão G:C-> T:A (Kuznetsov *et al*, 2010). Já foi bem relatado a importância da OGG1 na prevenção do acúmulo de lesões oxidadas no DNA, e células derivadas de roedores *knockout* para OGG1 (OGG^{-/-}) não demonstraram nenhuma atividade glicosilase 8-oxoG, indicando que a proteína OGG1 dos mamíferos é requerida para o início da via BER (Klungland, 1999; Youn, *et al*, 2007).

Em um trabalho realizado por Guoping *et al* (2012), foi observado que camundongos OGG^{-/-} exibiram uma menor infiltração de células imunes e redução do estresse oxidativo em pulmão após a estimulação com um antígeno que promove alergia quando comparados com os camundongos normais. Adicionalmente, esses camundongos apresentaram redução dos níveis das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, e IL-17 nas secreções pulmonares, e diminuição da expressão e fosforilação de fatores transcricionais como STAT6 e NF-κB. A deficiência em OGG1 também foi relacionado com a proteção da mucosa gástrica contra lesões inflamatórias após a infecção por *H. pylori* (Touati *et al*, 2006). Em modelos de inflamação como choque endotóxico, diabetes e hipersensibilidade de contato em camundongos OGG^{-/-}, observou-se reações inflamatórias mais brandas, o que ressalta a importância desta enzima na resposta inflamatória (Mabley *et al*, 2005).

O gene *OGG1* está localizado no cromossomo 3p25, uma região que frequentemente apresenta perda de heterozigosidade em tumores de rim (Chevallard, 1998). Alguns trabalhos associam o polimorfismo *OGG1 Ser326Cys* e um aumento no risco de câncer de esôfago, pulmão e próstata (Goode *et al*, 2002). Esse *SNP* é caracterizado por uma alteração não sinônima de uma citosina (C) para uma guanina (G) dentro de uma região codante na posição 1245 pb do gene. O impacto funcional do *OGG1 Ser326Cys* tem sido descrito em vários estudos, em que tal variação está relacionada ao acúmulo de 8-oxoG em pacientes que fazem hemodiálise e com a menor capacidade de prevenir a mutagênese induzida por 8-oxoG (Tarng *et al*, 2001; Yamane *et al*, 2004). Hill *et al* (2006) demonstraram que a

variante *OGG1 326Cys* por assumir uma conformação dimérica, retira 8-oxoG e cliva o sítio AP de uma forma menos eficiente que a proteína selvagem pela diminuição da afinidade ao dano de DNA, e após indução do estresse oxidativo o pico de atividade da proteína codificada pelo alelo *OGG1 326Ser* ocorreu 12 horas antes do que a proteína polimórfica (Kershaw *et al*, 2012).

A APE1 é uma proteína multifuncional fundamental para a sobrevivência celular que age como reguladora essencial das respostas celulares ao estresse oxidativo, contribuindo para a estabilidade genômica (Hegde *et al*, 2012). Possui 318 aminoácidos organizados em três domínios funcionalmente independentes, os quais são: de localização nuclear, redox e de reparo de DNA (Tell *et al*, 2010). O seu envolvimento nas respostas de sobrevivência celular inclui papéis chave no reparo de sítios AP no DNA, regulação redox-dependente ou redox-independente de inúmeros fatores de transcrição e proteínas, tais como NF- κ B, Egr-1, e AP-1, cuja atividade é referida como Ref-1; repressor da transcrição através de ligação com as sequências N-CARE, e metabolismo de RNA (Figura 9) (Hegde *et al*, 2012; Kelley *et al*, 2012; Tell *et al*, 2010). A proteína APE1 pode ser ativada pelo estresse oxidativo gerado a partir de algumas condições fisiológicas e patológicas (Tell *et al*, 2000; Englander *et al*, 2008). A atividade dessa proteína pode ser determinada pela ocorrência de modificações pós-traducionais, como fosforilação e acetilação (Tell *et al*, 2010). Vários estudos experimentais sugerem a redução dos níveis de APE1 geralmente ocorre antes do início do processo apoptótico (Fujimura *et al*, 1999; Englander *et al*, 2008); e outros estudos mostraram que o silenciamento do gene de *APEX1* induz apoptose (Guan *et al*, 2005).

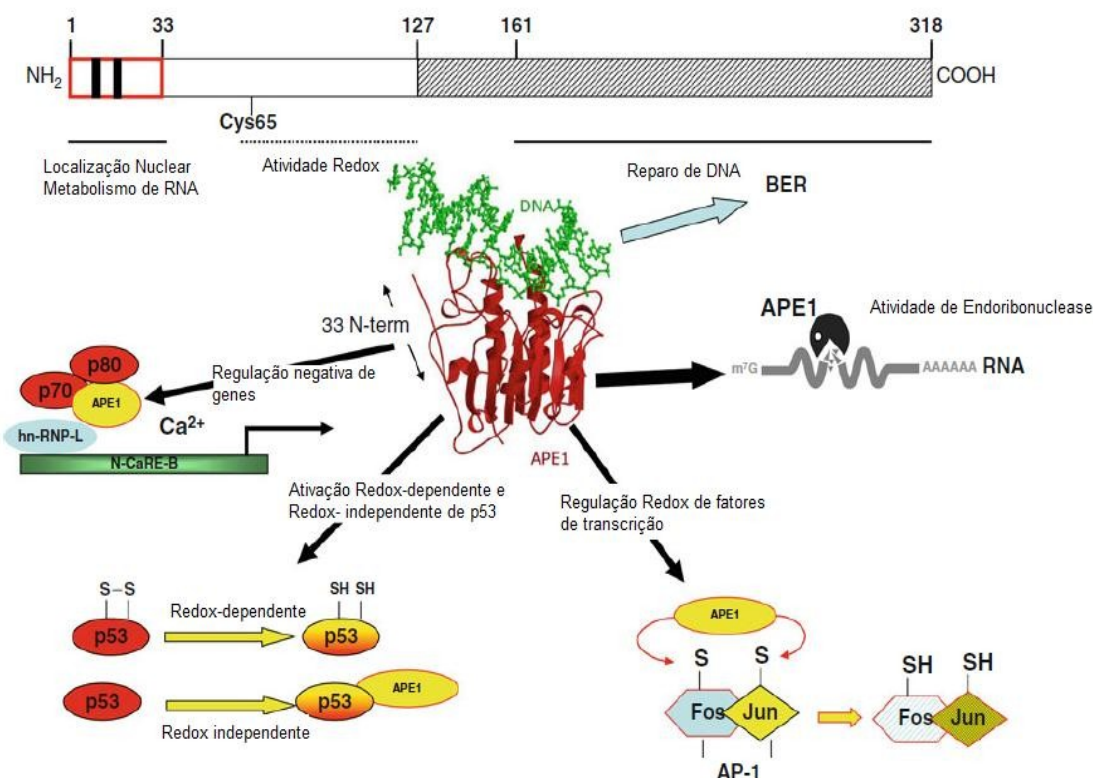


Figura 9: Organização esquemática dos domínios funcionais da APE1 e suas várias funções relacionadas ao reparo de DNA pela via BER, regulação redox-dependente ou redox-independente de inúmeros fatores de transcrição e proteínas, repressor da transcriçional, e metabolismo de RNA.

A atividade redox-dependente de APE1 já é bastante descrita por afetar a regulação da inflamação, como por exemplo, pela indução da produção de CXCL8/IL-8 durante a infecção por *H. pylori*, da síntese de NO mediado por LPS, modulação da ativação de NF- κ B e HIF-1 α , resultando na expressão de TNF- α e CXCL8/IL-8 (O'Hara *et al*, 2006; Song *et al*, 2008; Lee *et al* 2009). Além disso, a inibição farmacológica da APE1 pelo composto E3330, inibidor da porção redox, suprime a resposta inflamatória em macrófagos ativado por LPS (Jedinak *et al*, 2012).

O gene da APE1 (*APEX1*) está localizado no cromossomo 14q11.2-q12, e variações na sua sequência podem modular a capacidade de reparo do DNA aumentando o risco para alguns tipos de câncer (Karahalil *et al*, 2012). O polimorfismo *APEX1 Asn148Glu* localizado no exon 5 do gene, apresenta uma alteração de uma guanina (G) para uma timina (T), e já foi relacionado com a

hipersensibilidade à radiação ionizante, risco de câncer colorretal e de pulmão (Lo *et al*, 2009; Au *et al*, 2006). O polimorfismo está localizado em uma região entre as necessárias para a atividade redox e AP-endonuclease, muito embora não se saiba ao certo qual o papel desse polimorfismo, já que o mesmo não altera a sua capacidade de endonuclease em um ensaio *in vitro* usando ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (do inglês, electroforetic mobility shift assay- *EMSA*), mas não se descarta a possibilidade desse *SNP* dificultar a capacidade de interação com outras proteínas (Hadi *et al*, 2000).

PARP-1 é uma importante proteína nuclear ativada por quebras na fita do DNA, catalisa a transferência de unidades de ADP-ribose utilizando NAD^+ como substrato, para as proteínas nucleares, levando à formação de polímeros ADP-ribose, processo-chave no reparo dos danos no DNA e manutenção da integridade do genoma (Dantzer *et al*, 1999; Koh *et al*, 2005). É uma enzima multifuncional altamente conservada, participa dos processos de reparo de DNA e controle da maquinaria do ciclo celular (Bouchard *et al*, 2003). Quando há danos no DNA, PARP-1 é rapidamente recrutada e, em seguida, ADPribosila outras proteínas que regulam a estrutura da cromatina e o metabolismo celular, como as histonas, facilitando o acesso das outras enzimas de reparo ao sítio do dano (Schreiber *et al*, 2006). Sob condições de dano excessivo ao DNA, PARP-1 é sintetizada após a ativação do mecanismo de morte celular e a sua degradação é geralmente considerada como um marcador para a apoptose (Rosenthal *et al*, 1997; Soldani *et al*, 2001).

Além do seu envolvimento no reparo de quebras simples fita do DNA, vários estudos revelaram um papel na regulação do sistema imunológico para PARP-1. Ela regula a transcrição de genes em vários tipos de células imunes, através de sua atuação como cofator de NF- κ B, com papel essencial na expressão de genes dependentes de NF- κ B (Hassa *et al*, 2002; Nakajima *et al*, 2004). PARP-1 afeta a capacidade estimulatória de células dendríticas, a ativação das células T e sua inibição reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Laudisi *et al*, 2011). Existem vários estudos que demonstram a atuação de PARP-1 na regulação da imunidade adaptativa, através da participação na CSR ou através de co-ativação de NF- κ B (Shockett *et al*, 1993; Ambrose *et al*, 2008).

O gene da PARP-1 está localizado na região 1q41-q42 e já foram relatados mais de 300 SNPs no seu gene, incluindo 11 não sinônimos SNPs na região codante. Um dos polimorfismos mais estudados é o *PARP-1* Val762Ala, caracterizado por uma troca de timina (T) para citosina (C) na região + 2446 (Shen *et al*, 1996; Wang *et al*, 2007). Esse SNP reduz a capacidade enzimática da PARP-1, uma vez que o substrato NAD⁺ se liga na posição 762, e este polimorfismo aumenta o valor da constante de Michaelis-Menten (Km), um parâmetro cinético que traz informações sobre a afinidade que a enzima tem pelo substrato, e quanto maior o Km, menor é a afinidade pelo substrato (Iwashita *et al*, 2005; Lehninger *et al*, 2007; Wang *et al*, 2007). Essa variante já foi associada a diversas doenças, mostrando ser fator de risco para câncer colorretal, carcinoma cervical e glioma (Brevik *et al*, 2010; Ye *et al* 2012; Yosunkaya *et al*, 2010). Entretanto, ele também foi associado com uma redução no risco de linfomas não-Hodgkin e asma (Jin *et al*, 2010; Tezcan *et al*, 2010).

Durante as infecções bacterianas, a intensa resposta inflamatória induz o metabolismo do TRP, e como já mencionado sua principal via de degradação é a RQ. A primeira etapa é a produção de quinurenina (QUIN) pelaIDO, e subsequente formação dos outros metabólitos dessa via (Figura 10) (Stone *et al*, 2001; Moffett e Nambodiri *et al*, 2003). Entre eles, destacam-se o ácido quinurênico (KYNA), a 3-hidroxiquinurenina (3-HK) e o ácido quinolínico (QUINA) (Mackay *et al*, 2006). A RQ está bastante relacionada à resposta inflamatória, sendo que os seus intermediários são capazes de induzir a expressão de várias citocinas, quimiocinas e seus receptores, promovendo a inflamação, como por exemplo, a QUINA que é capaz de induzir a produção por astrócitos de quimiocinas pró-inflamatórias como MCP-1 e CXCL8/IL-8 (King *et al*, 2007; Guillemin *et al*, 2003).

A RQ no SNC leva à formação de QUINA e ocorre principalmente nas células da microglia, e os astrócitos não expressam a enzima quinurenina-3-hidroxilase, o que direciona a rota para formação de KYNA (Guillemin *et al*, 2003). A QUINA pode ser metabolizada pelas quinureninas aminotransferases (do inglês, kynurenine amino transferases-KATs) em KYNA, que é um antagonista do receptor de NMDA e possui papel protetor contra a ação excitotóxica de QUINA (Perkins e Stone, 1982; Stone e Darlington, 2002). Em pacientes com depressão grave, foi demonstrado um

desequilíbrio entre as vias neuroprotetoras e neurotóxicas dessa rota (Myint *et al*, 2007). Níveis anormais de KYNA em cérebros humanos estão associados com fisiopatologia de doenças neurodegenerativas e desordens neurológicas como esquizofrenia e doença de Alzheimer (Han *et al*, 2010).

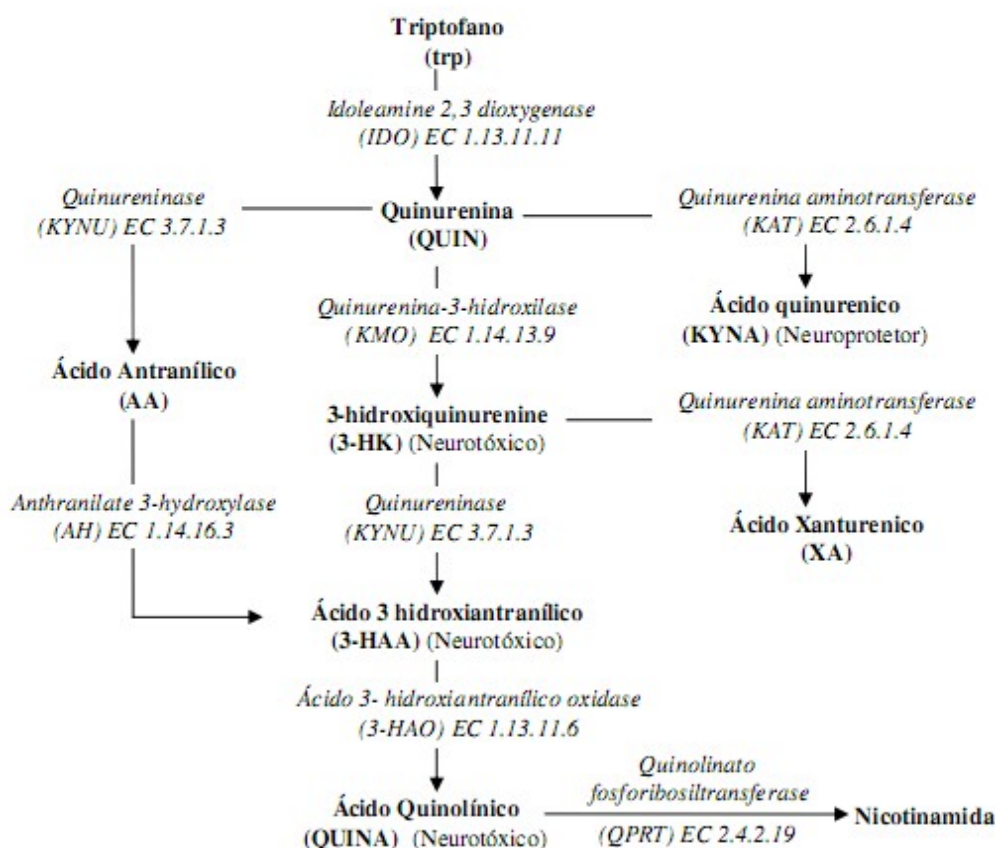


Figura 10: Rota da quinurenina (Adaptado de Mackay *et al*, 2006)

Existem evidências que o metabólito KYNA pode estar relacionado com os processos inflamatórios, uma vez que é conhecido por ser um ligante endógeno do receptor acoplado à proteína G-35 (GPR35) que é predominantemente expresso em células do sistema imune (Wang, 2006). A ativação do metabolismo do TRP durante a infecção bacteriana causa um aumento das concentrações de KYNA, que possui um efeito anti-inflamatório e fornece uma mecanismo de *feedback* diminuindo a resposta imune, mediada pela ativação do receptor GPR35 (Stone *et al*, 2002; Wang, 2006)

Já foram identificados quatro tipos diferentes de KATs humanas, e embora a KATII seja a principal enzima que forma KYNA no cérebro, camundongos *knockout* para KATII não mostraram alteração nos níveis desse metabólito no cérebro, sugerindo que a KATIII pode assumir tal função (Yu *et al*, 2006).

O gene que codifica a KATII, *AADAT* (aminoadipate aminotransferase), está localizado no cromossomo 4q33, e existem poucos estudos de epidemiologia genética e de caracterização funcional com polimorfismos no gene *AADAT*. Em um recente estudo de nosso laboratório, mostramos que o *SNP AADAT +401 T/C* (rs1480544), está relacionado com a maior prevalência do genótipo polimórfico em indivíduos com MB (Souza *et al*, 2011). Esse *SNP* está localizado em um sítio de *splicing* sendo caracterizado pela alteração de uma timina (T) por uma citosina (C) (Královicová *et al*, 2007). Não existe nenhum estudo da caracterização funcional deste *SNP*, porém, nesse mesmo trabalho publicado por nosso grupo, foi observado que os níveis de algumas citocinas e anticorpos dos indivíduos portadores do genótipo polimórfico foram menores quando comparados com os indivíduos que possuíam a proteína normal (Souza *et al*, 2011).

Apesar de vários marcadores moleculares serem alvos de pesquisa, poucos estudos têm considerado a sua interação. Os perfis de *SNPs* estão sendo estudados como alternativas para investigar a base genética de várias doenças, assim será possível melhorar a compreensão de vários aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos, tais como a avaliação de determinada área de risco com os principais patógenos associados, viabilizar o tratamento focando no perfil genético do paciente, diminuindo assim possibilidades de geração de sequelas. (Brand *et al*, 2008; Feero *et al*, 2010).

Neste trabalho buscamos analisar a associação entre *SNPs TNF, IL-8, AADAT, APEX1, OGG1* e *PARP-1*, de forma isolada, assim como suas combinações, com a MB.

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a possível associação entre as variantes alélicas dos genes *TNF*, *IL-8*, *AADAT*, *APEX1*, *OGG1* e *PARP-1* com a ocorrência de meningite bacteriana.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Determinar a frequência dos *SNPs* *TNF* -308G/A, *TNF* -857C/T, *IL-8* -251A/T e comparar as frequências genotípicas e alélicas do grupo de pacientes com o grupo controle;

3.2.2 Avaliar as interações gene-gene entre os *SNPs* *TNF* -308G/A, *TNF* -857C/T, *IL-8* -251A/T *AADAT*+401C/T, *APEX1* Asn148Glu, *OGG1* Ser326Cys e *PARP-1* Val762Ala e determinar a associação com a meningite bacteriana;

3.2.3 Correlacionar os genótipos encontrados com os níveis de moduladores inflamatórios;

3.2.4 Avaliar possíveis efeitos sinérgicos entre os alelos estudados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População estudada e coleta de amostras

O estudo foi realizado com um grupo de 54 pacientes, admitidos no Hospital Giselda Trigueiro (HGT), Natal-RN, Brasil, o qual é referência para doenças infecciosas no estado. O diagnóstico clínico foi baseado na análise de amostras sanguíneas e líquido de acordo com os critérios: 1) cultura bacteriana do LCR; 2) bacterioscopia por coloração de Gram no LCR; 3) cultura bacteriana ou bacterioscopia por coloração de Gram no sangue; 4) detecção de antígenos por aglutinação em látex; e 5), pleocitose neutrofílica com altos níveis de proteína e baixos níveis de glicose no LCR. Quando não houve confirmação do patógeno, o diagnóstico foi baseado nos achados clínicos e bioquímicos da análise do líquido. Pacientes submetidos a tratamento com antibióticos ou com outras doenças que possam afetar o sistema imune e a expressão dos moduladores inflamatórios, como AIDS, foram excluídos do estudo. Em relação ao grupo controle, foram incluídos 110 indivíduos dos quais eram pacientes atendidos no HGT com diagnóstico negativo para doença infecciosa ou eram voluntários saudáveis cuja contagem diferencial de leucócitos estava dentro da normalidade e não estavam com febre no momento da coleta. A caracterização da amostra está presente na tabela 1.

Para as análises genéticas foram utilizadas uma parte das amostras sanguíneas coletadas para o diagnóstico, não sendo necessário nenhum procedimento adicional junto aos pacientes, no período de 2006 até 2008. Os pacientes e o grupo controle autorizaram o uso do material biológico para a pesquisa através de termo de consentimento (Anexos 9.1). Este trabalho faz parte do projeto “Novos parâmetros para estudo de danos cerebrais induzidos por meningite: identificação de novos alvos terapêuticos”, realizada em parceria com o HGT e o instituto de Doenças infecciosas da Universidade de Berna, Suíça. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética Médica do Hospital e pelo Conselho Nacional de Ética, com registro de número CONEP, CAAE 0052.1.051.000-05 (Anexos 9.2).

Tabela 1. Caracterização da amostra.

<i>Características</i>	<i>Nº de casos</i>
MB	54
Idade	
0-18	20
19-60	30
>60	3
Não especificado	1
Sexo	
Masculino	32
Feminino	22
Patógeno	
<i>S. pneumoniae</i>	17
<i>N. meningitidis</i>	7
<i>H. influenza</i>	3
Outros	3
Não identificado	24
Controle	110
Idade	
0-18	11
19-60	94
>60	2
Não especificado	3
Sexo	
Masculino	56
Feminino	54

4.2 Processamento de amostras e extração de DNA genômico de leucócitos

As amostras sanguíneas coletadas foram transportadas assim que os resultados de sangue confirmaram a ausência de HIV e o termo de consentimento foi obtido, armazenadas em 4°C durante esse período. Posteriormente, foram processadas por centrifugação a 720 g, por 3 minutos, a 4 °C para separar o plasma. Após centrifugação, o plasma foi separado do *pellet* de células e armazenado para posterior utilização. Foi realizada a lise das hemácias utilizando 5 volumes de tampão de lise (Cloreto de amônio 0,1 M, Bicarbonato de amônio 0,01 M, água destilada) em relação ao *pellet* de células. Após a adição do tampão de lise, a amostra foi agitada vigorosamente por 30 segundos, e incubada em gelo por 15 minutos, com agitação a cada 5 minutos. A amostra foi centrifugada a 720 g, por 15 minutos a 4 °C e foi descartado o sobrenadante. O procedimento de lise foi repetido, obtendo-se apenas o precipitado de leucócitos. O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Miller *et al* (1988). O *pellet* de leucócitos foi

ressuspendido em 3 mL de tampão de lise para leucócitos (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM Na₂EDTA pH 8.2). O lisado foi digerido por 16 horas com 0,2 mL de SDS 10% e 0,5 mL de solução de proteinase K (1 mg proteinase K, 1 % SDS, 2 mM Na₂EDTA) a 37°C. Após este período, foi adicionada uma solução saturada de NaCl, aproximadamente 6 M, agitando vigorosamente por 15 segundos. Em seguida, o material foi centrifugado a 780 g por 15 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante contendo DNA foi transferido para outro *falcon* de 15 ml e o *pellet* de proteínas foi descartado. Ao sobrenadante foram adicionados 2 volumes de etanol 100% a temperatura ambiente para precipitação completa do DNA. As fitas de DNA foram removidas com auxílio de microponteiras e transferidas para microtubos contendo 100-200 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 0,2 mM Na₂EDTA pH 7.5) para eluição a 37 °C antes de serem quantificadas e utilizadas.

4.3 Genotipagem - Análise dos polimorfismos

4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Os SNPs investigados nesse estudo são detalhados na tabela 2. A sequência de primer para *TNF* -308G/A, *TNF* -857C/T e *IL8* -251A/T foram descritos previamente (Czerski *et al*, 2008; Tan *et al*, 2003; Heinzmann *et al*, 2004) (tabela 3). Os detalhes da genotipagem para *AADAT* +401C/T, *APEX1* Asn148Glu, *OGG1* Ser326Cys e *PARP-1* Val762Ala foram relatados em outros dois trabalhos recentemente publicados por nosso grupo (Souza *et al*, 2011; Silva *et al*, 2011).

Tabela 2: Polimorfismos estudados.

A amplificação da extração de DNA de cada indivíduo foi realizada por PCR ou sequenciada

SNP	Cromossomo	Posição	Alélos comum/raro	Frequência de Heterozigose (NCBI)
<i>TNF</i> -308G/A (rs1800629)	6	5' UTR	G/A	0.201
<i>TNF</i> -857C/T (rs1799724)	6	5' UTR	C/T	N.D*
<i>IL8</i> -251A/T (rs4073)	4	5' UTR	A/T	0.500
<i>APEX1</i> Asn148Glu (rs1130409)	14	EXON	G/T	0.480
<i>OGG1</i> Ser326Cys (rs1052133)	3	EXON	C/G	0.411
<i>PARP-1</i> Val762Ala (rs1136410)	1	EXON	T/C	0.332
<i>AADAT</i> +401C/T (rs1480544)	4	Sítio de <i>splicing</i>	C/T	0.351

Tabela 3. Sequência dos primers, temperaturas de anelamento e enzima de restrição utilizada.

SNP	Sequência do Primer (5'→3')	T de Anelamento	Amplicon	Enzima de Restrição
<i>TNF</i> -308G/A	F 5'AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT3' R 5'TCCTCCCTGCTCCGATTCCG3'	55°C	107pb	<i>NcoI</i>
<i>TNF</i> -857C/T	F 5'GGCTCTGAGGAATGGGTTAC3' R 5'CCTCTACATGGCCCTGTCTAC3'	58°C	120pb	<i>Tail</i>
<i>IL8</i> -251A/T	F 5'CCATCATGATAGCATCTGTA3' R 5'CCACAATTTGGTGAATTATTA3'	53°C	174pb	<i>AseI</i>

Para a visualização e quantificação dos fragmentos amplificados (amplicons) alíquotas de 5 µl foram adicionados a 2 µl de tampão de amostras (30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol), aplicados em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio e submetidos a uma corrida eletroforética a 100 V e 100 mA por 1 hora. Os fragmentos amplificados foram digeridos com endonucleases de restrição (Tabela 3), utilizando para cada reação 5 unidades de enzima e tampão específico de acordo com o fabricante, num volume final de 20 µL.

4.3.2. Revelação por Prata dos Produtos de PCR e da Digestão

Os produtos da digestão foram analisados em gel de poliacrilamida 8%, os quais foram revelados com prata de acordo com o protocolo descrito por Sanguinetti *et al* (1994). Alíquotas dos produtos digeridos foram homogeneizadas com tampão de amostra e submetidas à corrida eletroforética. Em seguida, os géis foram imersos em 50 mL de solução fixadora (etanol 10%, ácido acético 0,8%) e colocados sob agitação orbital por 5 minutos. Após este período, foram adicionados 0,3 g de nitrato de prata dissolvidos em 10 mL de solução fixadora, tendo-se o cuidado de não jogar a solução diretamente sobre o gel. Após a adição do nitrato de prata, o recipiente contendo o gel foi colocado sob agitação orbital por 15 minutos. Em seguida, a solução fixadora foi desprezada, o gel foi lavado com água destilada 2 a 3 vezes e então foi adicionada a solução reveladora (NaOH 3%, formol 0,0033%). Posteriormente, o recipiente foi novamente colocado em agitação orbital por 15 minutos. Após a revelação, a solução reveladora foi desprezada e então adicionada solução fixadora suficiente para cobrir o gel e parar a reação de revelação.

O controle de qualidade foi realizado a partir da repetição de 20% de toda a amostra para cada *SNP* estudado e avaliado a reprodutibilidade dos dados.

4.4 Dosagens de Citocinas/ quimiocinas

As dosagens foram realizadas utilizando o líquor e plasma dos indivíduos analisados neste estudo. Os níveis foram medidos pela metodologia xMAP (Bio-Plex 200) *suspension array system* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizando o Human cytokine Lincoplex Kit (HCYTO-60k, Lincoplex®, Linco Research Inc., St Charles, MA, USA) que utiliza ensaios múltiplos baseado na tecnologia de microesferas. As cito/quimiocinas analisadas foram TNF- α , IL-6, IL-1 β , INF- γ , IL-10, IL-1 Ra, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL2/MCP-1, G-CSF, IL-8/CXCL8 e GM-CSF. As amostras foram dosadas em duplicata como descrito por Gehre *et al* (2008).

Resumidamente, uma mistura do padrão foi reconstituída em 0.25 mL de água deionizada, gerando uma concentração estoque de 10.000 pg/mL para cada marcador. O estoque padrão foi serialmente diluído no tampão de ensaio disponibilizado pelo KIT HCYTO-60k gerando 6 pontos para a curva padrão, disponibilizando uma faixa de concentração para o ensaio entre 3.2–10.000 pg/mL. As amostras de LCR e plasma foram incubados com o anticorpo acoplado as microesferas por 16 horas, a 4 °C, com agitação contínua. As microesferas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem para a remoção de proteínas, e então, incubado com anticorpo específico ligado a biotina para detecção de cada cito/quimiocina por 1 hora, em agitação contínua. Em seguida, foi adicionada estreptavidina-ficoeritrina e incubado por 30 minutos. Após a incubação, as microesferas foram lavadas e ressuspendidas em sheath fluid, líquido de circulação do equipamento. Todas as amostras foram submetidas ao Bio-Plex suspension array system, que identificou cada diferente microesfera e quantificou cada proteína marcada baseada na fluorescência da ficoeritrina. As concentrações de citocinas foram calculadas automaticamente pelo software Bio-Plex Manager usando uma curva padrão derivada de citocinas recombinantes humana. Foram avaliadas as amostras diluídas e não diluídas para evitar a quantificação de cito/quimiocinas fora da faixa. Devido à baixa quantidade de material biológico, não foi possível fazer a determinação em todos os indivíduos.

4.5 Dosagens de Imunoglobulinas

Os níveis totais de IgG e IgA foram medidos a partir do plasma dos indivíduos, utilizando placas de imunodifusão radial simples quantitativa (Diffu-placa, Biocientífica SA), de acordo com as instruções do fabricante. A técnica de imunodifusão é realizada em meio semi-sólido, geralmente o ágar ou agarose. A imunodifusão radial simples, além de ser uma técnica de fácil realização e de baixo custo, é quantitativa. Resumidamente, é realizada em placas revestidas de agarose, no qual é incorporado um anti-soro específico para a imunoglobulina a ser quantificada. No gel são feitos furos onde são pipetadas pelo menos três concentrações conhecidas da imunoglobulina que se quer determinar (solução padrão) e as amostras de concentração desconhecida. Forma-se um halo ao redor do orifício onde foi pipetada a amostra corresponde à concentração das imunoglobulinas a serem determinadas. Para a obtenção da curva padrão são utilizadas concentrações conhecidas da solução padrão e após reação com os anticorpos presentes na agarose, os halos são medidos (Mancini *et al*, 1965). Devido à baixa quantidade de material biológico, não foi possível fazer a determinação em todos os indivíduos.

4.6 Análises estatísticas

A frequência alélica e genotípica dos pacientes e do grupo controle foi calculada por contagem direta. As distribuições genotípicas foram avaliadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo método clássico qui-quadrado (X^2) de Pearson (bicaudal) usando o programa Helix SVS. Para analisar a associação entre a variante polimórfica dos genes estudados e a MB foram comparadas as frequências genotípicas e alélicas entre os casos e controles, através de análise de tabelas de contingência 2x2 para se obter o valor de P . Como essas variáveis são categóricas, o valor de P foi obtido realizando os testes de X^2 de Pearson ou o teste exato de Fisher (para valores menores que 5). A combinação entre os genótipos polimórficos em relação aos genótipos normais também foi avaliada pelo teste de X^2 . As análises de poder de estudo foram realizadas baseando-se no tamanho da amostra e no seu nível de significância. Os efeitos das variáveis independentes foram avaliados a

partir do cálculo de *Odds Ratio* (OR) no intuito de definir a probabilidade de risco, para determinar o nível de influência de cada genótipo.

A análise estatística das variáveis contínuas não paramétricas foi realizada pelo teste de Mann-Whitney U, que avaliou as diferenças nos níveis dos moduladores inflamatórios em relação tanto aos genótipos individuais como para os combinados. O teste de Spearman foi realizado para avaliar a correlação entre a contagem celular e os níveis de moduladores inflamatórios em relação aos genótipos combinados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares *GraphPad- Prism5* e WINPEPI versão 5.4 (2008). Valores de $P \leq 0,05$ (bicaudal) foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Análise das frequências alélicas e genotípicas:

Os *primers* desenhados resultaram em ampliações claras e específicas para a maioria das amostras, muito embora, mesmo após repetição, algumas amostras continuaram sem amplificar para determinados polimorfismos, gerando diferenças nas quantidades de amostras genotipadas entre os *SNPs*. O produto de PCR do *SNP TNF-308G/A* digerido com a enzima de restrição *NcoI* gera dois fragmentos de aproximadamente 87pb e 20pb quando o indivíduo possui o genótipo selvagem, a variante adenina não é digerida permanecendo com 107 pb, e o genótipo heterozigoto para esse *SNP* apresenta os fragmentos de 107 pb, 87 pb e 20 pb. O produto de PCR do *SNP TNF-857C/T* digerido com a enzima de restrição *TaiI* gera dois fragmentos de aproximadamente 100 pb e 20 pb quando o indivíduo possui o genótipo selvagem, a variante timina não é digerida permanecendo com 120 pb, e o genótipo heterozigoto para esse *SNP* apresenta os fragmentos de 120 pb, 100 pb e 20 pb. E o produto de PCR de 174 pb do *SNP IL8- 251A/T* digerido com a enzima *AseI* gera fragmentos de 154 pb e 20 pb para os indivíduos com o genótipo polimórfico, e o genótipo heterozigoto para esse *SNP* gera os fragmentos de 174 pb, 154 pb e 20 pb, a enzima não digere o alelo normal permanecendo com 174 pb. Para todos os *SNPs* a banda de 20 pb não é possível ser visualizada no gel de poliacrilamida a 8% por ser muito pequena. As figuras 11, 12, 13 mostram os geis de poliacrilamida com RFLP de amostras para os 3 polimorfismos.

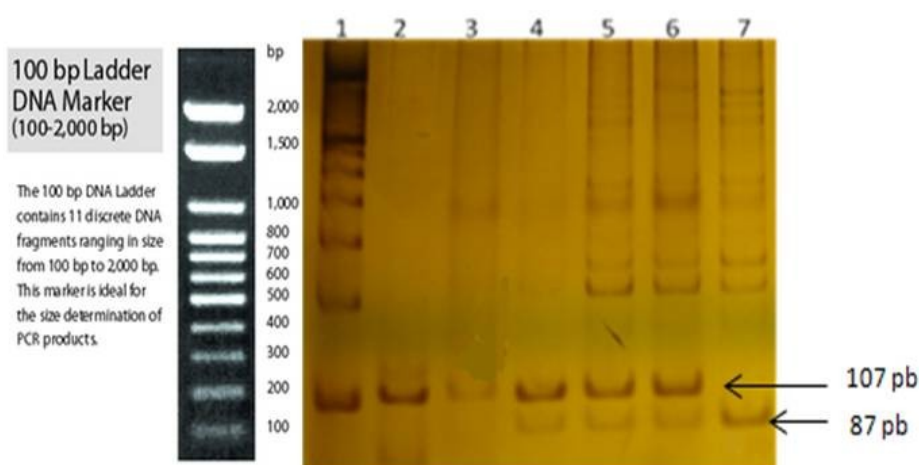


Figura 11: Gel de Poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, mostrando perfil de digestão para o *SNP TNF-308G/A*. 1: marcador de DNA 100bp; 2: DNA não digerido; 3: homozigoto polimórfico; 4,5 e 6: heterozigoto; 7: homozigoto normal.

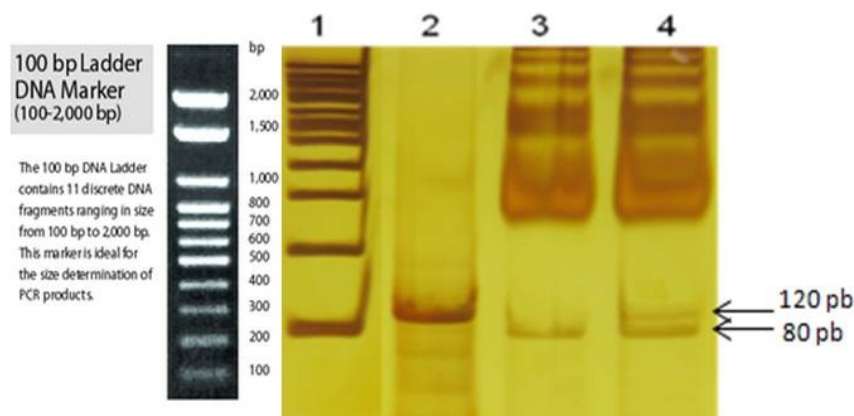


Figura 12: Gel de Poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, mostrando perfil de digestão para o *SNP TNF -857C/T*. 1: marcador de DNA 100bp; 2: DNA não digerido; 3: homozigoto selvagem; 4: heterozigoto.

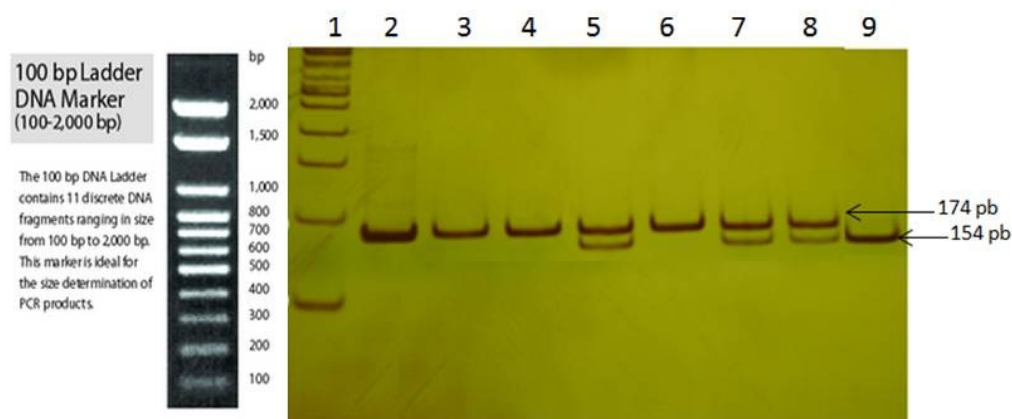


Figura 13: Gel de Poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, mostrando perfil de digestão para o *SNP IL8- 251A/T*. 1: marcador de DNA 100bp; 2: DNA não digerido; 3,4 e 6: homozigoto selvagem; 5,7 e 8: heterozigoto; 9: homozigoto polimórfico.

As distribuições genóticas dos SNPs estudados individualmente não apresentaram desvios para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A distribuição das frequências alélicas e genóticas de *TNF -308G/A*, *TNF -857C/T* e *IL8- 251A/T* dos pacientes com MB comparado ao grupo controle são apresentados na tabela 4. Para testar se a distribuição de cada variável independente (genótipo) entre os casos e os

controles era ao acaso ou obedecia alguma tendência, foi usado o teste estatístico χ^2 ou o teste exato de Fisher, quando necessário, e calculada a OR para determinar o nível de influência de cada genótipo (Lewis, 2002).

Não houve diferenças entre os grupos, analisando-se as frequências genotípicas e alélicas para as variações em *TNF -857C/T* e *IL8 -251A/T*. Já o polimorfismo em *TNF -308G/A* demonstrou um possível papel protetor, uma vez que apresentou aumento da frequência no grupo controle tanto para o genótipo heterozigoto GA ($P= 0,0008$, $OR= 0,30$) como para o alelo variante A de 0,20 ($P= 0,0145$, $OR= 0,34$) quando comparado com o grupo MB. O nível de proteção gerado por esse genótipo foi de 3,3 vezes maior do que em indivíduos que não possuíam o genótipo heterozigoto.

Dos 163 indivíduos genotipados para *TNF -308G/A*, 70% foram homozigotos selvagens, 26% foram heterozigotos e 3% foram homozigotos polimórficos, essas frequências foram similar a de outras populações (Karplus *et al*, 2002; Cambrera *et al*, 1995, Gaudet *et al*, 2007).

Tabela 4: Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs para a MB em comparação com o grupo controle.

Genótipo	Casos (%)	Controles (%)	P value*	OR (95% IC)	Poder de estudo (%)
<i>TNF -308(cases= 54; controles = 109)</i>					
GG	46(85)	69(63)	0.0004*	3.32 (1.68 a 6.58)	86.10
GA	7(13)	36(33)	0.0008*	0.30 (0.14 a 0.62)	82.04
AA	1(2)	4(4)	0.682	0.48 (0.08 a 2.73)	2.45
Frequência alélica de A	0.08	0.20	0.0145*	0.34 (0.14 a 0.83)	53.43
<i>TNF -857 (cases= 52; controles = 110)</i>					
CC	39(75)	84(76)	0.8694	0.94 (0.49 a 1.80)	4.33
CT	13(25)	26(24)	0.8694	1.05 (0.55 a 2.01)	3.20
TT	0(0)	0(0)	-	-	
Frequência alélica de T	0.12	0.11	0.8246	1.10 (0.46 a 2.63)	3.22
<i>IL8 -251 (cases= 52; controles = 106)</i>					
AA	12(23)	31(29)	0.3334	0.73 (0.38 a 1.38)	12.05
AT	25(48)	43(41)	0.3193	1.32 (0.75 a 2.32)	12.74
TT	15(29)	32(30)	0.8768	0.95 (0.51 a 1.75)	3.26
Frequência alélica de T	0.53	0.50	0.6712	1.12 (0.64 a 1.96)	5.20

*Estatisticamente significante ($p < 0.05$), qui-quadrado de Pearson ou teste de Fisher (bicaudal).

Modelo de Herança: Dominante (AB+BB/AA)

O SNP *TNF -308G/A* mostrou um modelo de herança dominante (AB+BB/AA), apenas uma cópia variante é necessário para um indivíduo expressar o fenótipo, uma vez que o genótipo heterozigoto já foi suficiente para determinar a possível proteção à MB. O genótipo homozigoto polimórfico não apresentou associação significativa por ser muito raro, um aumento amostral seria necessário para garantir se o alelo variante é de fato o dominante.

5.2. Efeito dos SNPs combinados:

Foi realizada análise de interação gene-gene para cada polimorfismo, analisando a prevalência de possíveis combinações de interação entre os genótipos que poderiam afetar o desenvolvimento da doença, com o objetivo de avaliar o efeito global da presença dos alelos variantes. A Tabela 5 mostra as combinações obtidas com significância estatística quando se comparou as frequências entre os pacientes com MB e o grupo controle. É notável que as combinações entre o genótipo selvagem *TNF -308GG* tanto com as variantes *IL8 -251T/_*, *AADAT +401T/_* ou pelo menos um alelo polimórfico nas enzimas de reparo de DNA foi mais frequente em pacientes com MB ($P < 0,05$). Os polimorfismos em *APEX1 +148Glu/_* combinado com *AADAT +401T/_* ou *IL8 -251T/_*, e em *OGG1 +326Cys/_* com *IL8 -251T/_* também obtiveram valores estatisticamente significantes com maior frequência no grupo de doentes. Quando se associou as variantes nas enzimas de reparo do DNA observou-se uma maior prevalência de heterozigotos e/ou homozigotos polimórficos triplos no grupo MB em relação aos controles ($P = 0,0007$, $OR = 5,35$). Todas as combinações obtiveram um alto poder de estudo mesmo com uma amostra pequena. Estes resultados revelam possíveis associações entre genes diferentes que podem interagir entre si levando à ocorrência de MB.

Em contraste, mesmo com o efeito isolado de *TNF -857C/T* não ter obtido diferença significativa quando comparado entre os grupos, a combinação dos genótipos polimórficos entre as variantes estudadas para o gene do *TNF* apresentou um aumento significativo no grupo controle ($P = 0,0008$, $OR = 0,10$) quando comparado ao com MB, com uma chance de proteção 9,3 vezes maior do que os indivíduos que não possuem tal combinação, enfatizando o possível papel protetor desses polimorfismos (tabela 5). Não foi possível validar as frequências encontradas

pelas combinações com outros estudos de populações heterogêneas devido a esse ser o primeiro trabalho que associa tal variantes genéticas.

Tabela 5: Distribuição dos genótipos do SNP combinadas para a BM em comparação com o grupo controle.

Combinação				Casos (%)	Controles (%)	P value*	OR (95% IC)	Poder de estudo (%)
<i>(casos= 50; controles = 100)</i>								
TNF -308G/ G	APEX1 Glu/_	OGG1 Cys/_	PARP1 Ala/_	16	3	0.0028*	6.15 (1.73 a 21.88)	79.16
	APEX1 Glu/_	OGG1 Cys/_	PARP1 Ala/_	22	5	0.0007*	5.35 (1.93 a 14.81)	84.99
TNF -308G/ G	APEX1 Glu/_	AADAT T/_		44	17	P<0.0001 *	3.83 (1.99 a 7.38)	93.43
	TNF -308G/ G	AADAT T/_		66	33	P<0.0001 *	4.52 (2.53 a 8.09)	97.13
	TNF -308G/ G	APEX1 Glu/_		60	28	P<0.0001 *	3.85 (2.13 a 6.97)	96.70
	TNF -308G/ G	OGG1 Cys/_		46	22	0.0003*	3.02 (1.63 a 5.58)	84.18
	APEX1 Glu/_	OGG1 Cys/_		34	13	0.0005*	3.44 (1.68 a 7.04)	83.89
	TNF -308G/ G	IL8 A/_		70	47	0.0010*	2.63 (1.47 a 4.70)	76.66
	IL8 A/_	APEX1 Glu/_		50	28	0.0014*	2.57 (1.43 a 4.62)	74.68
	IL8 A/_	OGG1 Cys/_		42	18	0.0002*	3.29 (1.72 a 6.29)	86.93
	APEX1 Glu/_	AADAT T/_		52	27	0.0003*	2.90 (1.62 a 5.28)	84.75
	TNF -308A/	TNF -857T/		2	16	0.0008*	0.10 (0.23 a 0.47)	83.65

*Estatisticamente significativa ($p < 0.05$), qui-quadrado de Pearson ou teste de Fisher (bicaudal).

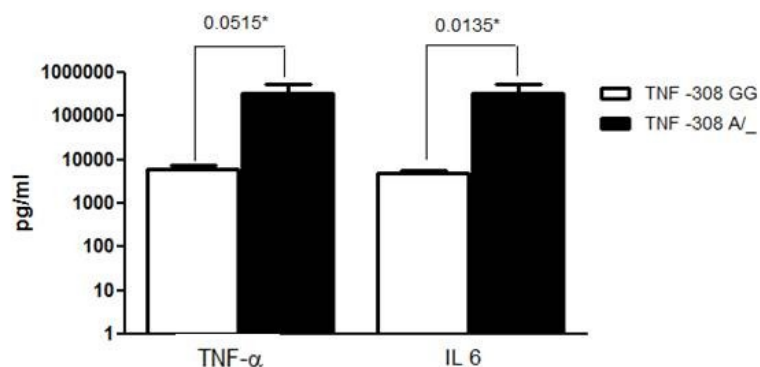
Modelo de Herança: Dominante (AB+BB/AA)

5.3. Associação dos SNPs com moduladores de resposta imune

A análise de cito/quimiocinas em relação aos genótipos individuais foi realizada para avaliar o efeito biológico dos polimorfismos. Para o *SNP TNF-308G/A* foi observado uma associação significativa tanto quando foram comparados os indivíduos que possuíam pelo menos um alelo polimórfico com os indivíduos com genótipo selvagem no grupo MB nas amostras de LCR como no grupo controle em

amostras de plasma. No grupo MB observou-se uma associação significativa para TNF- α ($P=0,0515$) e IL-6 ($P=0,0135$) e no grupo controle para MCP-1 ($P=0,0381$) e TNF- α ($P=0,0547$ *borderline*) (Figura 14).

14 a)



14 b)

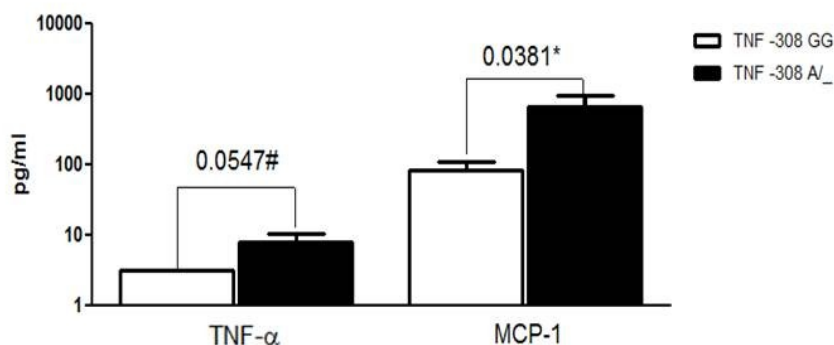


Figura 14: Diferença significativa dos níveis de cito/quimiocinas para o *SNP* *TNF-308G/A*. a) Amostras de LCR do grupo MB; b) Amostras de plasma dos controles. ($P < 0.05$) pelo teste de Mann-Whitney U.

Para os *SNPs* *TNF-857C/T* e *IL8 -251A/T* só foi possível fazer as análises no grupo MB, uma vez que esses polimorfismos não foram suficientes para modificar os níveis de cito/quimiocinas sem um estímulo, que é o caso do grupo controle. Embora não se tenha observado modificações significativas nos níveis de cito/quimiocinas para o polimorfismo em *TNF-857T*, foi observado uma tendência em elevar os níveis de alguns dos moduladores em indivíduos que possuíam o polimorfismo (Figura 15).

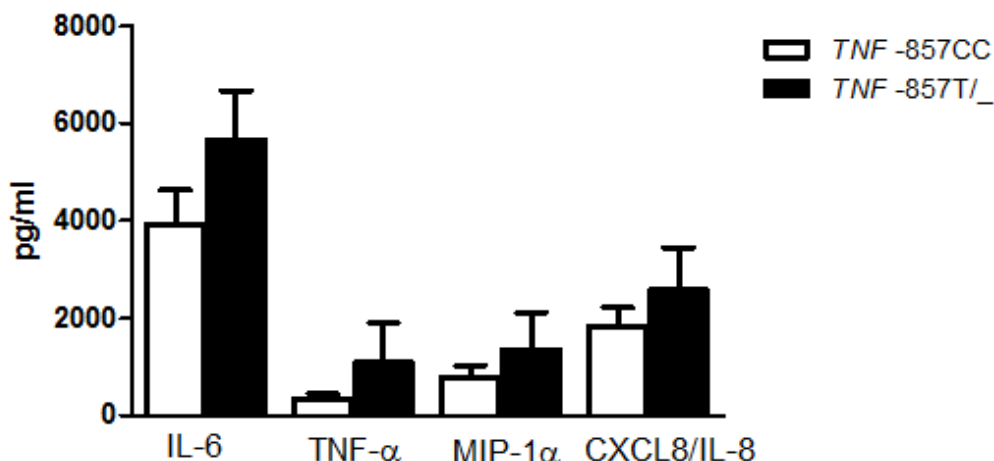


Figura 15: Níveis de cito/quimiocinas para o *SNP TNF-857C/T* em amostras de LCR do grupo MB; mostrando um discreto aumento para os portadores do *SNP TNF-857T/_*. ($P < 0.05$) pelo teste de Mann-Whitney U.

O *SNP IL8 -251A/T* só mostrou influência significativa em relação aos níveis da própria quimiocina a CXCL8/IL-8 ($P = 0.004$), muito embora os portadores do polimorfismo *IL8 -251T* mostraram uma tendência em diminuir os níveis dos outros moduladores inflamatórios avaliados (Figura 16).

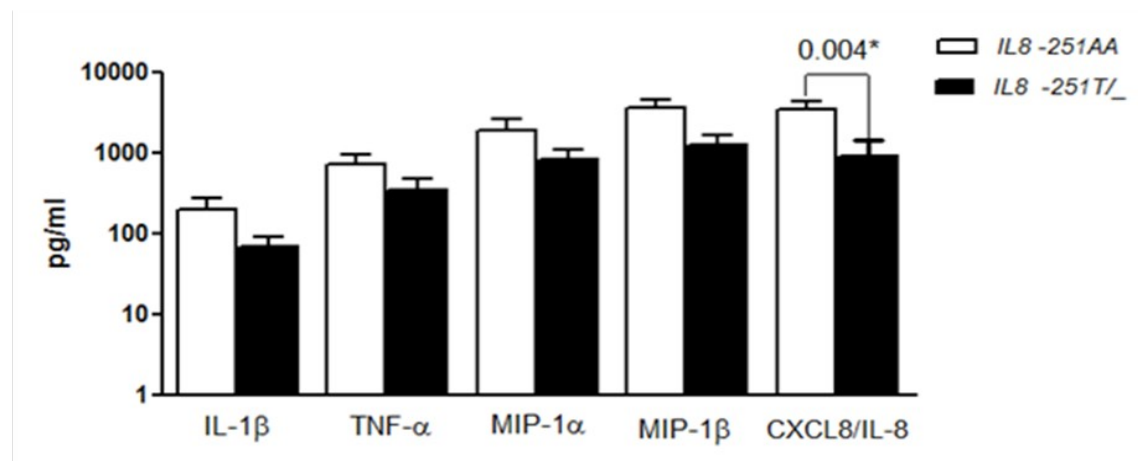


Figura 16: Níveis de cito/quimiocinas para o *IL8 -251A/T* em amostras de LCR do grupo MB; mostrando uma diferença significativa apenas para os níveis de CXCL8/IL-8 e uma tendência em diminuir os níveis dos outros moduladores para os portadores do *SNP IL8 -251T/_*. ($P < 0.05$) pelo teste de Mann-Whitney U.

Só foi possível avaliar a diferença da contagem de células no LCR entre os genótipos para o *SNP IL8 -251A/T*, devido à baixa quantidade de amostra biológica, das quais poucos indivíduos possuíam os alelos polimórficos para *TNF -308G/A* e *TNF -857C/T*, impossibilitando a análise estatística. Os portadores do *SNP IL8 -251T/_* apresentaram uma quantidade menor de células do que os indivíduos com o alelo selvagem ($P=0.003$) (Figura 17), sugerindo um efeito do polimorfismo sobre o recrutamento celular, possivelmente associado aos níveis reduzidos de CXCL8/IL-8.

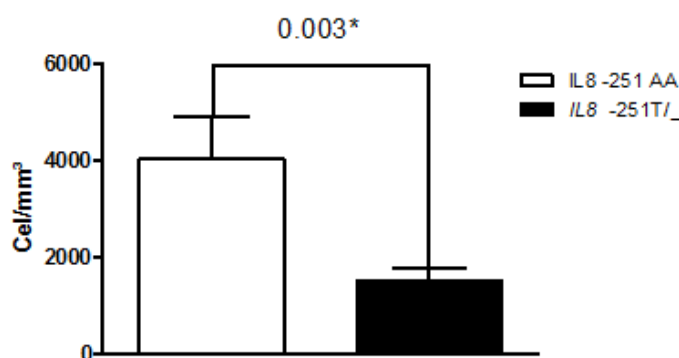
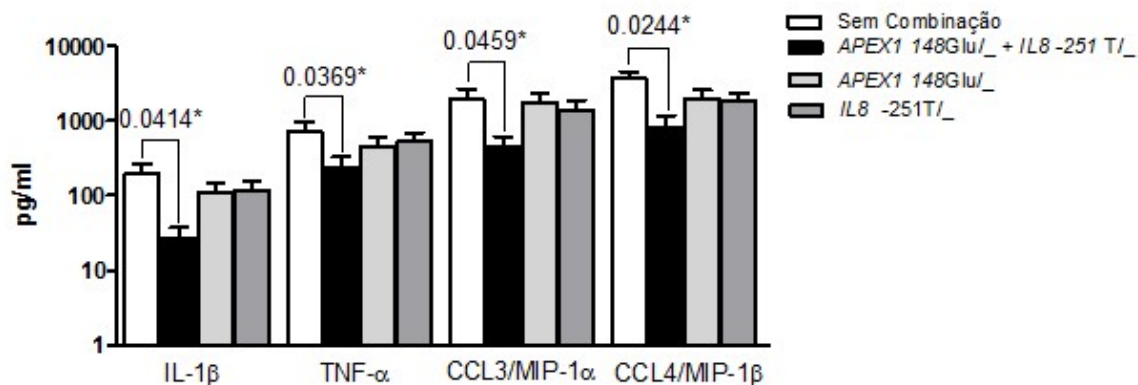


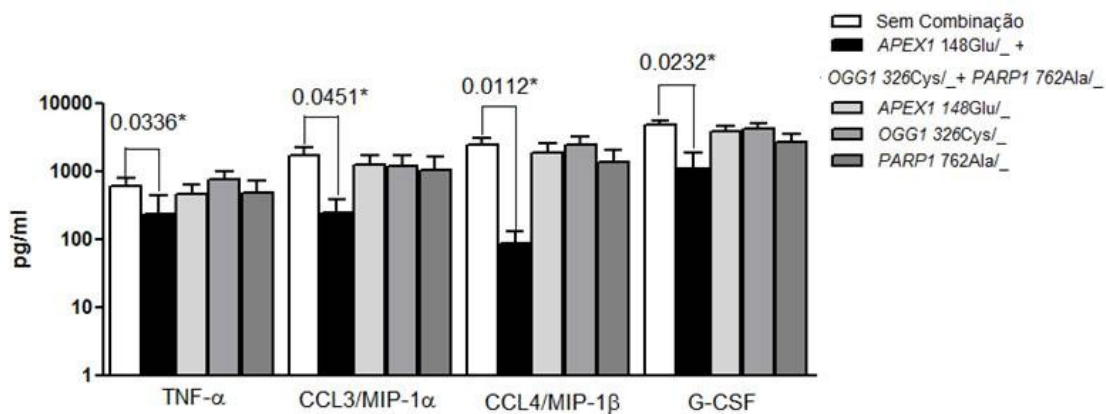
Figura 17: Contagem celular em relação ao *SNP IL8 -251A/T* em amostra de LCR no grupo MB. ($P<0.05$) pelo teste de Mann-Whitney U.

O efeito combinado entre os marcadores estudados foi também observado a partir da análise dos níveis de cito/quimiocinas. Foram realizadas algumas combinações entre os indivíduos que possuíam pelo menos um alelo polimórfico nos marcadores estudados com os indivíduos que não portavam tais combinações. Pacientes portadores da combinação *APEX1 +148 Glu/_* com *IL8 -251T/_* mostraram níveis reduzidos ($P < 0,05$) de IL-1 β , TNF- α , CCL3/ MIP-1 α e CCL4/ MIP-1 β (Figura 18 a). Na combinação dos triplos polimórficos para as enzimas do BER foi observada uma diminuição ($P < 0,05$) dos níveis de TNF- α , CCL3/ MIP-1 α , CCL4/ MIP-1 β , e G-CSF no LCR (Figura 18b). Além disso, observou-se a redução ($P < 0,05$) dos níveis de CCL4/ MIP-1 β para a combinação entre *APEX1 +148 Glu/_* com *AADAT +401T/_* (Figura 18c).

18 a)



18 b)



18 c)

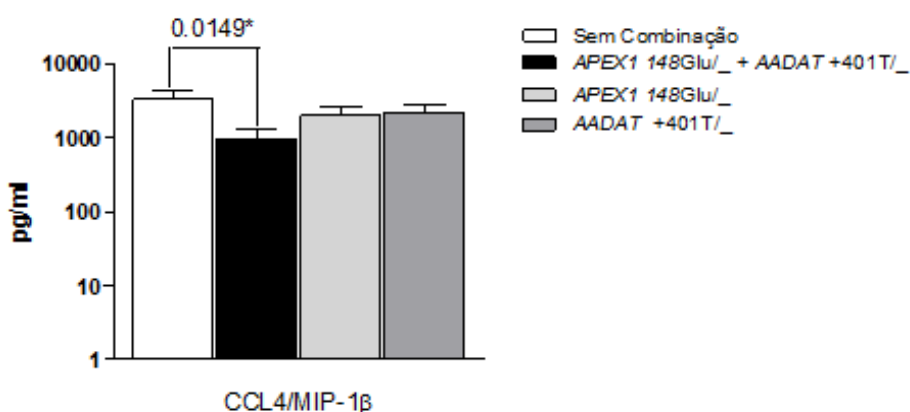
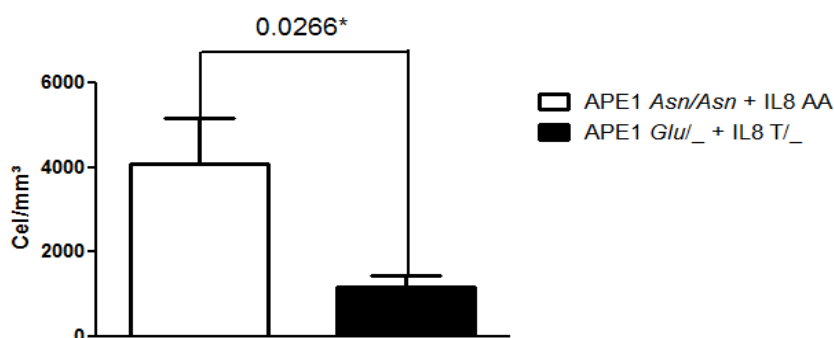


Figura 18: Níveis de cito/quimiocinas em relação à combinação dos genótipos em amostras de LCR no grupo MB. a) *APEX1* +148 *Glu*/₋ com *IL8* -251T/₋; b) *APEX1* +148 *Glu*/₋ com *OGG1* +326 *Cys* / ₋ e *PARP-1* +762Ala/₋. c) *APEX1* +148 *Glu*/₋ com *AADAT* +401T/₋. (* p<0.05) pelo teste de Mann-Whitney U.

As outras combinações não mostram alterações estatisticamente significativas nas concentrações de cito/quimiocinas (dados não mostrados). Não foi possível realizar a combinação para os *SNPs* estudados para o gene do *TNF* porque poucos indivíduos possuíam a combinação no material biológico que foi dosado esses moduladores, impossibilitando qualquer análise estatística.

Foi avaliada ainda, a relação entre os níveis desses moduladores inflamatórios com a contagem celular no LCR para pacientes que portavam algumas combinações. Houve uma redução na contagem de células em doentes com genótipo combinado *APEX1 +148 Glu/_* com *IL8 -251 T/_* e *APEX1 +148 Glu/_* com *AADAT +401T/_* (Figura 19 a-b). As análises destas combinações mostraram correlação estatisticamente significativa entre a contagem de células e os moduladores IL-1 β , IL-6, TNF α , CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e G-CSF em todos os pacientes (Tabela 6).

19 a)



19 b)

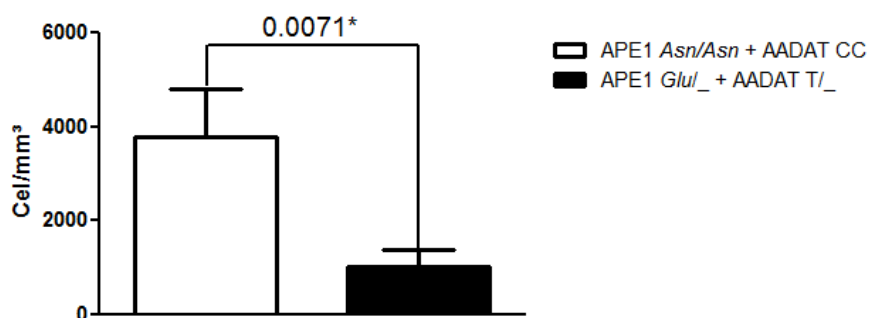


Figura 19: Contagem celular em relação às combinações de *SNPs* no grupo MB. a) *APEX1 +148 Glu/_* com *IL8 -251 T/_*; b) *APEX1 +148 Glu/_* com *AADAT +401T/_*.

Tabela 6: Correlação entre os níveis de cito/quimiocinas e a contagem de células em pacientes MB no LCR.

APEX1 +148 Asn/Asn + IL8 -251 AA	IL-1β	IL-6	TNFα	MIP1-α	MIP1-β	MCP-1	G-CSF
<i>Spearman r</i>	0.428	0.305	0.391	0.204	0.422	-0.155	-0.037
<i>P value</i>	0.047*	0.168	0.072	0.363	0.050*	0.490	0.870
APEX1 +48Glu/_ + IL8 -251T/_	IL-1β	IL-6	TNFα	MIP1-α	MIP1-β	MCP-1	G-CSF
<i>Spearman r</i>	0.830	0.547	0.781	0.735	0.791	0.346	0.788
<i>P value</i>	<0.001*	0.019*	0.0013*	<0.001*	<0.001*	0.159	<0.001*
APEX1 +148 Asn/Asn + AADAT+401 CC	IL-1β	IL-6	TNFα	MIP1-α	MIP1-β	MCP-1	G-CSF
<i>Spearman r</i>	0.111	0.506	0.311	-0.100	0.032	-0.007	-0.104
<i>P value</i>	0.673	0.038*	0.224	0.701	0.903	0.978	0.691
APEX1+148 Glu/_ + AADAT +401 T/_	IL-1β	IL-6	TNFα	MIP1-α	MIP1-β	MCP-1	G-CSF
<i>Spearman r</i>	0.783	0.623	0.579	0.507	0.645	0.060	0.625
<i>P value</i>	<0.001*	0.007*	0.005*	0.012*	0.005*	0.818	0.007*

*Estatisticamente significativa ($P < 0.05$), correlação de Spearman bicaudal (contagem de células vs nível de cito/quimiocina).

Os níveis de imunoglobulinas no plasma também foram dosados para avaliação do efeito dos SNPs estudados em relação a esse modulador da resposta imune. Devido às diferenças na resposta adquirida em crianças (até 18 anos de idade) e adultos (superior a 18 anos de idade), cada grupo foi submetido a uma avaliação distinta dos níveis de IgA e IgG. Porém, só foi possível a análise para o SNP *TNF -308G/A* em adultos devido a baixa quantidade de amostra biológica, das quais poucos indivíduos possuíam os alelos polimórficos para *TNF -857C/T* e *IL8 -251A/T*, impossibilitando a análise estatística. Na presença do genótipo *TNF -308GA/_* não foi observado nenhuma alteração significativa quanto aos níveis de imunoglobulinas e comparação com o genótipo selvagem (Figura 20).

A associação entre a imunoglobulina e as combinações de genótipos não foi possível porque não havia amostra suficiente para este tipo de análise.

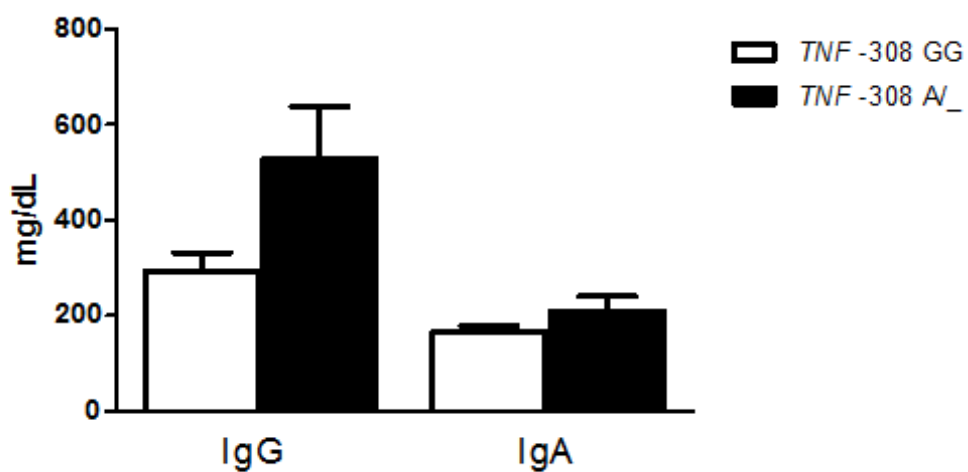


Figura 20: Níveis de IgG e IgA em plasma de adultos em relação ao *SNP TNF -308G/A*. ($P < 0.05$) pelo teste de Mann-Whitney U.

6. DISCUSSÃO

A MB é uma infecção bacteriana comum e grave principalmente devido à alta prevalência de morbidade e mortalidade, com evolução variável em diferentes indivíduos (Sellner *et al*, 2010). Algumas dessas diferenças são devido a fatores de risco como idade, predisposições a doença ou tratamento inadequado (Kalin *et al*, 2000).

Um novo e importante foco da pesquisa médica é a identificação de genes que interagem entre si e promovem uma possível susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento de certas doenças complexas como é o caso da MB (Stranger *et al*, 2011). Estudos de polimorfismos de vários moduladores inflamatórios e suas subvias de ativação têm sido bastante descritos por alterarem a produção das respectivas proteínas (Bidwell *et al*, 2001; Sanders *et al*, 2011). Esses polimorfismos alteram os níveis da produção do determinado modulador, causando diferenças interindividuais na resposta imune dos indivíduos (Mccarron *et al*, 2002).

Há um considerável número de polimorfismos em genes que influenciam a expressão de moduladores inflamatórios e moléculas relacionadas. Apesar disso, este é o primeiro estudo que avalia a potencial associação entre os polimorfismos genéticos em *TNF -308G/A*, *TNF -857C/T*, *IL8 -251A/T*, *APEX1 Asn148Glu*, *OGG1 Ser326Cys*, *PARP-1 Val762Ala* e *AADAT +401C/T* com a resposta inflamatória contra infecções utilizando como modelo a meningite bacteriana. A baixa frequência da doença e a deficiência do sistema de saúde pública em nosso estado, não permitiu o recrutamento de um grande grupo para o estudo, muito embora algumas de nossas associações tenham uma representação coerente do espectro epidemiológico da MB em nosso país e as análises têm um elevado poder de estudo, teste estatístico que é definido como a probabilidade de identificar uma diferença entre os tratamentos ou efeito quando este é de fato verdadeiro (Cohen, 1992).

Como modelo de estudo, para avaliar se as variantes selecionadas possuíam influência em relação ao desenvolvimento da MB, nós usamos a estratégia de associação entre casos e controles, que utiliza indivíduos que possuem uma determinada doença ou fenótipo (casos) e os compara com indivíduos que não o possuem (controles), investigando uma possível diferença na frequência alélica e

genotípica entre eles. Uma vez encontrada uma diferença nas frequências da variante entre os grupos, é possível que a variável aumente ou diminua o risco de desenvolver certa doença ou expressar determinado fenótipo (Bhangale *et al*, 2008).

Diferenças sistemáticas na ancestralidade entre casos e controles podem determinar a diferença nas frequências da variante entre os grupos, resultando em uma interpretação errônea dos dados (Hinds *et al*, 2004). Quando a heterogeneidade é equivalente em casos e controles, os dois grupos possuem o mesmo grau de miscigenação, a estratificação não ocorre, tais como populações miscigenadas (Ardlie *et al*, 2002). Os níveis de influência sobre a ancestralidade da população brasileira atual deve ser um produto resultante dos efeitos de migração e miscigenação principalmente das populações europeias, africanas e indígenas nativas, possuindo assim frações de ancestralidade que determinam um padrão de desequilíbrio de ligação e diversidade haplotípica diferente das populações de base (Parra *et al*, 2003; Moraes *et al*, 2005). Com isso, não é possível a extrapolação dos dados encontrados em grupos étnicos fechados para a maioria das pesquisas realizadas no país, e em nossa população específica, a amostra é de pessoas no nordeste do Brasil, que não tem etnia específica, ao contrário, é a população com maior grau de mistura (Pena *et al*, 2011).

Nenhum dos marcadores estudados estava fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg, confirmando que as frequências genotípicas e alélicas estão associadas ao fenótipo e não dos possíveis efeitos da mistura de diferentes populações ou fluxos migratórios (Jianfeng *et al*, 2002).

A comparação das frequências genotípicas entre os casos e controles não revelou diferenças significativas na distribuição individual entre pacientes e controles saudáveis para as variantes *TNF -857C/T* e *IL8 -251A/T*. Como foi discutido anteriormente em outras publicações de nosso grupo, os polimorfismos em *AADAT +401C/T* e *APEX1 Asn148Glu* foram associados com a ocorrência da doença, uma vez que os alelos polimórficos são mais prevalentes no grupo MB. Para os outros *SNPs* nas enzimas do BER, a relação também foi encontrada para o genótipo polimórfico *OGG1 Cys/Cys* com maior frequência ($P < 0,05$) no grupo com MB, e o genótipo normal *PARP-1 Val/Val* com maior frequência no grupo controle ($P < 0,05$).

Estes SNPs também apresentaram influência sobre a resposta imune inata e adaptativa (Sousa *et al*, 2011; Silva *et al*, 2011).

A análise dos genótipos individuais sugere ainda um possível papel protetor do SNP *TNF -308G/A* contra a doença, já que existe uma maior prevalência do genótipo heterozigoto no grupo saudável, e homozigoto normal no grupo MB. As frequências encontradas em nosso estudo para essa variante foram validadas a partir da comparação com outros trabalhos com populações heterogêneas, em especial um estudo realizado com uma amostra do estado do Rio Grande do Norte realizado por Karplus *et al* (2002), comprovando que as diferenças entre as frequências alélicas e genotípicas encontradas não se deve ao tamanho amostral e muito menos aos efeitos de ancestralidade (Cambrera *et al*, 1995, Gaudet *et al*, 2007).

Alterações dos níveis de cito/quimiocinas foram observados na presença do alelo variante. Observou-se um aumento significativo no nível de TNF- α ($P= 0,0515$) e IL6 ($P= 0,0135$) em amostras de LCR no grupo MB e TNF- α ($P= 0,0547$) e MCP-1 ($P= 0,0381$) em amostras de plasma no grupo controle. É importante notar que mesmo os resultados de valor de P para o TNF- α assumirem valores *borderline*, os mesmos já possuem relevância biológica (Paes, 1998). Estes resultados confirmam o possível papel protetor da presença do alelo variante, uma vez que este gene codifica uma das principais citocinas pró-inflamatórias e desempenha um papel central na iniciação e regulação da resposta inflamatória (Suryaprasad *et al*, 2003; Sellner *et al*, 2010).

O TNF- α , está relacionado com muitas das mudanças características na MB, incluindo geração de inflamação neutrofílica, aumento do metabolismo cerebral, consumo de oxigênio e fluxo de sangue cerebral, age como um mediador de resistência a agentes infecciosos, e, portanto, é importante na defesa do hospedeiro (Bradley, 2008; Scheld *et al*, 2002). TNF- α está envolvido ainda nas vias de transdução de sinal que ativam o NF- κ B, auxiliando assim na regulação da expressão de muitos genes pró-inflamatórios (Falvo *et al*, 2010; Hayden *et al*, 2012). Está relacionado também com a produção de imunoglobulinas por indução do TGF- β 1 (Tsuji *et al*, 2008), embora não tenha sido visto em nosso trabalho diferença nos

níveis de imunoglobulina em presença do alelo A, provavelmente devido a pouca quantidade de amostras que foram dosadas.

Já é bem descrito que as citocinas desempenham um papel importante no controle de infecções, mas a presença em excesso ou em tecidos errados pode causar complicações graves (Cox *et al*, 1992; Gullestad *et al*, 2012; Lukens *et al*, 2012). Na defesa inicial à MB, quando o microrganismo ainda não invadiu o SNC, altos níveis de TNF- α são necessários para desencadear o processo de eliminação dos patógenos, impedindo que haja o rompimento da BHE e passagem do microrganismo para SNC, no entanto, após instalação da infecção, e por se tratar de células neuronais, a morte celular gerada pela ação dessa citocina e de outros mediadores estimulados por ela leva ao aparecimento de sequelas neurológicas.

Apesar dos efeitos individuais dos genes serem relativamente pequenos, as interações gene-gene e o meio ambiente podem contribuir significativamente para o entendimento do desenvolvimento de muitas doenças complexas (Stranger *et al*, 2011). Como a fisiopatologia das doenças infecciosas envolvem a interação de várias vias e proteínas, analisamos também a forma com que os marcadores interagem entre si (Tabela 5). Algumas combinações sugerem que os produtos de expressão podem funcionar em conjunto para proporcionar um fator de risco genético importante para a ocorrência da MB, uma vez que obtiveram alta prevalência no grupo infectado quando comparadas com o grupo saudável. Em particular, é interessante notar que as combinações *TNF* -308 G/G com *APEX1*+148 Glu/_ e *AADAT* +401 T/_, foram expressivamente mais frequentes no grupo MB, com um risco de adquirir a doença de até quatro vezes a mais que um indivíduo que não porta tal combinação.

A combinação entre os dois polimorfismos estudados no gene do *TNF* mostrou um efeito aditivo interessante. Foi visto que isoladamente *SNP* em *TNF* -857C/T não sugere associação com a MB, já que não houve diferença na comparação entre as frequências dos grupos, e tanto o genótipo heterozigoto para *TNF* -308G/A quanto à frequência alélica de A, mesmo com valores estatisticamente significantes, obtiveram uma chance de proteção contra a doença menor quando comparada com a combinação entre os dois polimorfismos. Já é bem descrito na literatura que o gene do *TNF* é encontrado em uma região de grande variação gênica e seus

polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação com os do complexo HLA humano (Hajeer e Hutchinson, 2000). Assim, a frequência da combinação entre os *SNPs* *TNF -308G/A* e *TNF -857C/T* deve estar possivelmente relacionada a um desequilíbrio de ligação entre as variantes, em que ocorre na população uma frequência maior de uma determinada combinação entre genes ou polimorfismos do que a esperada pelo produto de suas frequências individuais (Jianfeng *et al*, 2002).

Quando os efeitos combinados dos *SNPs* foram explorados em relação aos níveis de moduladores inflamatórios, os dados encontrados mostraram associação significativa com risco de ocorrência da doença. Análise combinada de interação gene-gene demonstrou um efeito sinérgico, uma vez que houve uma maior redução no nível de citocinas e quimiocinas para as combinações do que para os genótipos isolados. Em diversos modelos de infecção, uma resposta imune ineficiente por moduladores imunes está associada a uma diminuição na eliminação dos agentes infecciosos, desenvolvimento de doença invasiva, e alta mortalidade (Lindell *et al*, 2001; MacLennan *et al*, 1994). Os baixos níveis de IL-1 β , TNF- α ou IL-6 na secreção nasofaríngea foram observados em crianças com episódios recorrentes de otite média aguda, uma das principais causas que leva ao desenvolvimento de MB (Lindberg, 1994). Estas citocinas são importantes para a ativação de outros moduladores inflamatórios como quimiocinas (CCL3/MIP-1 α e CCL4/MIP-1 β) envolvidos no recrutamento de leucócitos para o local da infecção e erradicação efetiva do patógeno (Zwijnenburg *et al*, 2006).

Após a análise da combinação dos *SNPs* nas enzimas do BER, conseguimos identificar possível sinergismo na regulação dos moduladores inflamatórios, uma vez que a combinação dos genótipos sobrepôs o efeito isolado dos mesmos. Foi observado uma redução nos níveis de TNF- α , CCL3/MIP-1 α e CCL4/MIP-1 β e G-CSF (Figura 18b), mostrando uma resposta inflamatória menos ativa em pacientes que possuem essa combinação, reforçando a hipótese de associação com a susceptibilidade a MB. PARP-1 e APE1 são proteínas multifuncionais com funções importantes durante o reparo de DNA e na ativação de fatores transcricionais como NF- κ B e AP-1, os quais são necessários para modulação da resposta inflamatória (Xanthoudakis *et al*, 1992; Aguilar-Quesada *et al*, 2007; Hassa *et al*, 2002). Além disso, essas duas enzimas podem contribuir na regulação da imunidade humoral

através da participação nos processos de mudança de classe de imunoglobulinas (Ambrose *et al*, 2008; Guikema *et al*, 2007). OGG1 desempenha importante papel na prevenção do acúmulo de danos oxidados ao DNA (Youn, *et al* 2007), e deficiência nessa proteína está associada com a diminuição da inflamação durante a infecção bacteriana (Wu *et al*, 2011; Mabley *et al*, 2005). Gouping *et al* (2012) observaram que a deficiência em OGG1 atenua drasticamente a inflamação das vias aéreas, reduzindo a produção de TNF α , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, e IL-17 pela diminuição da fosforilação de NF- κ B.

A transcrição gênica no núcleo é comandada pela estrutura da cromatina nas regiões promotoras de regulação e do sítio de início da transcrição (Li *et al*, 2007). Vários tipos de danos ao DNA induzem alterações locais na estrutura da cromatina, e já foi descrito que algumas mudanças conformacionais causam uma expressão gênica alterada (Polo *et al*, 2006; Ayoub *et al* 2008). Recentemente Khobta *et al* (2010) demonstraram que bases oxidadas induzem silenciamento de alguns genes por desencadear a degradação do DNA danificado, mas principalmente através de um estado persistente de repressão transcricional. Adicionalmente, a estimulação da transcrição pelas proteínas da via BER APE1 e OGG1 foram observadas após desmetilação transiente da histona H3 por LSD1. Esse processo leva a produção de H₂O₂ que promove a produção de 8-oxoG e induz o recrutamento de APE1 e OGG1, levando a mudanças na conformação da cromatina e modulando a montagem do complexo de iniciação da transcrição (Perillo *et al* 2008; Amente *et al*, 2010). Com base nestes estudos, os polimorfismos nas enzimas de reparo do DNA podem gerar uma expressão alterada em genes importantes para a resposta inflamatória.

O polimorfismo em *PARP-1 Val762Ala* influencia a atividade de poli (ADP-ribosilação) da PARP-1, diminuindo sua atividade enzimática (Wang *et al*, 2007). Uma vez que esta enzima tem sido descrita com função na regulação transcricional devido à sua habilidade em modificar proteínas associadas à cromatina, tal variação pode diminuir a intensidade da resposta inflamatória (Aguilar-Quesada *et al*, 2007). Estudos mostram que o polimorfismo em *OGG1 Ser326Cys* compromete a atividade de OGG1, pois a proteína polimórfica tende a assumir uma forma dimérica (Hill *et al*, 2006), diminuindo o reparo principalmente de dano do tipo 8-oxoG. Alguns estudos relatam que a substituição da base normal G pelo dano 8-oxoG em regiões

promotoras, altera as propriedades de ligação de AP-1 e NF- κ B (Evans *et al*, 2004), ou ainda, danos oxidados em bases podem interferir na metilação das ilhas CpG, um evento que comumente suprime a transcrição gênica (Valinluck *et al*, 2004). A caracterização funcional do *SNP APEX1 Asn148Glu* ainda não é muito clara, uma vez que ensaios *in vitro* mostram que esse polimorfismo não altera a capacidade de AP-endonuclease da proteína, mas não se descarta a possibilidade de interferir com a interação com outras proteínas (Hadi *et al*, 2000). Essa variante quando combinada com a variante *OGG1 Ser326Cys* mostrou diminuição na capacidade de reparar os danos oxidativos do DNA (Vodicka *et al*, 2007), e em trabalho recente do nosso grupo observamos níveis aumentados de sítios sensíveis a FPG (enzima bacteriana análoga a OGG1) em portadores do alelo *APE1 148Glu* e/ou *OGG1 326Cys* (Silva *et al*, 2011). Foi descrito que APE1 exerce atividade estimulatória sobre OGG1, sendo responsável pela retirada de OGG1 do sítio abásico, permitindo assim que a enzima se torne disponível para agir em outro sítio 8-oxoG (Hill *et al*, 2001; Sidorenko *et al*, 2007). Portanto, esse *SNP* pode ter seu efeito em relação à capacidade de APE1 recrutar e interagir com outras proteínas importantes para o reparo de DNA, ou ainda a algum efeito na sua função de regulação redox que permanece desconhecido (Vascotto *et al* 2009; Tell *et al* 2010; Yu *et al*, 2010).

CXCL8/IL8 é um forte mediador da inflamação e tem sido implicada ampla gama de doenças inflamatórias, incluindo a aterosclerose, lesões de pele e câncer de cólon (Goverdhan *et al*, 2008; Dolcino *et al*, 2012; Kargi *et al*, 2012). Na MB os baixos níveis de CXCL8/IL-8 no LCR, estão associados à pleocitose neutrofílica diminuída (Ostergaard *et al*, 1999). Embora a frequência individual do polimorfismo *IL8 -251A/T* não tenha sido relacionada com a ocorrência de MB, em nosso modelo experimental os portadores do alelo *IL8 -251T*, apresentaram menores níveis de CXCL8/IL-8 quando comparados com os portadores dos alelos selvagem (Figura 16), e conseqüentemente, diminuição no número total de células no LCR (Figura 17) o que ocasionou a discreta diminuição dos outros moduladores inflamatórios.

O'Hara *et al* (2006) demonstraram que a ativação de CXCL8/IL8 em células epiteliais gástricas infectadas por *H. pylori* depende diretamente da ativação por AP-1 regulada por APE1, desta forma, foi analisada a combinação entre os SNPs *IL8 -251A/T* e *APEX1 Asn148Glu* para avaliar se existia interação entre os mesmos e

alguma relação com a MB. Encontramos uma maior frequência da combinação entre *IL8 -251T/_* com *APEX1 +148Glu/* no grupo doente, e observou-se que esta combinação pode ter sinergismo em relação à estimulação dos moduladores inflamatórios, já que níveis reduzidos de cito/quimiocinas e número de células no LCR foram observados (Figura 18a).

Em modelo animal utilizando ratos infantis com meningite pneumocócica, foi observado um aumento da atividade de algumas enzimas da RQ durante a fase aguda da MB (Bellac *et al*, 2006). O metabolismo do TRP pela RQ é controlado pela enzima IDO, que é induzida pela IL-1 β e TNF- α , o que leva a um aumento substancial da concentração de KYNA e de outros metabólitos dessa via durante os processos inflamatórios (O'Connor *et al*, 2009). Outra combinação importante foi observada entre os polimorfismos *APEX1 Asn148Glu* e *AADAT +401C/T* que além apresentar maior frequência no grupo com MB, também mostrou influência sobre a regulação da quimiocina CCL4/MIP-1 β (Figura 17c) e em outro trabalho desenvolvido por nosso grupo, verificou-se que o polimorfismo em *AADAT +401C/T* pode aumentar a produção de KYNA (Coutinho *et al*, dados ainda não publicados). Do ponto de vista funcional, KYNA inibe a secreção de TNF- α através da ativação do receptor GPR35 pelas células PMNs após tratamento com LPS (Wang *et al*, 2009). Além disso, Barth *et al* (2009) mostraram que altas concentrações de KYNA induz a adesão de monócitos e neutrófilos no endotélio vascular facilitando a migração dessas células até o sítio da inflamação, e no caso da MB esse aumento da adesão no endotélio da BHE pode estar aumentando a sua permeabilização, facilitando a entrada do patógeno no SNC.

A correlação de cito/quimiocinas com contagem de células no LCR durante a MB também é considerada fator chave para o desenvolvimento da doença (Zwijnenburg *et al*, 2006; Lapinet *et al*, 2000). Observou-se uma redução significativa ($P < 0,05$) da contagem de células com o nível de IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL3/MIP1- α , CCL4/MIP1- β e G-CSF em pacientes que tiveram as combinações *APEX1 48 Glu / _* com *IL8-251T / _* e *APEX1 148 Glu / _* com *AADAT +401 T / _* (Figura 18), sugerindo uma diminuição da capacidade de recrutar células PMNs nestes pacientes. Estes dados indicam um possível efeito combinado entre os polimorfismos, uma vez que promovem um maior efeito na redução dos níveis de moduladores inflamatórios.

Este é o primeiro estudo que associa SNPs entre vias importantes que são ativadas durante o processo inflamatório de doenças infecciosas tais como a MB (Figura 21), comprovando assim, a importância do conhecimento sobre a interação entre polimorfismos genéticos. Os nossos dados indicam que a avaliação extensiva da variabilidade genética pode contribuir para uma melhor compreensão da susceptibilidade à MB como também para outras doenças infecciosas que ativam os mesmos mecanismos de resposta imune. Este conhecimento não só irá permitir intervenções clínicas mais adequadas, mas também programas de promoção de saúde e prevenção de doenças direcionados com base no perfil genômico de cada indivíduo, diminuindo assim as taxas morbidade e mortalidade relacionadas à doença, através de uma melhor avaliação de risco e administração de terapias direcionadas.

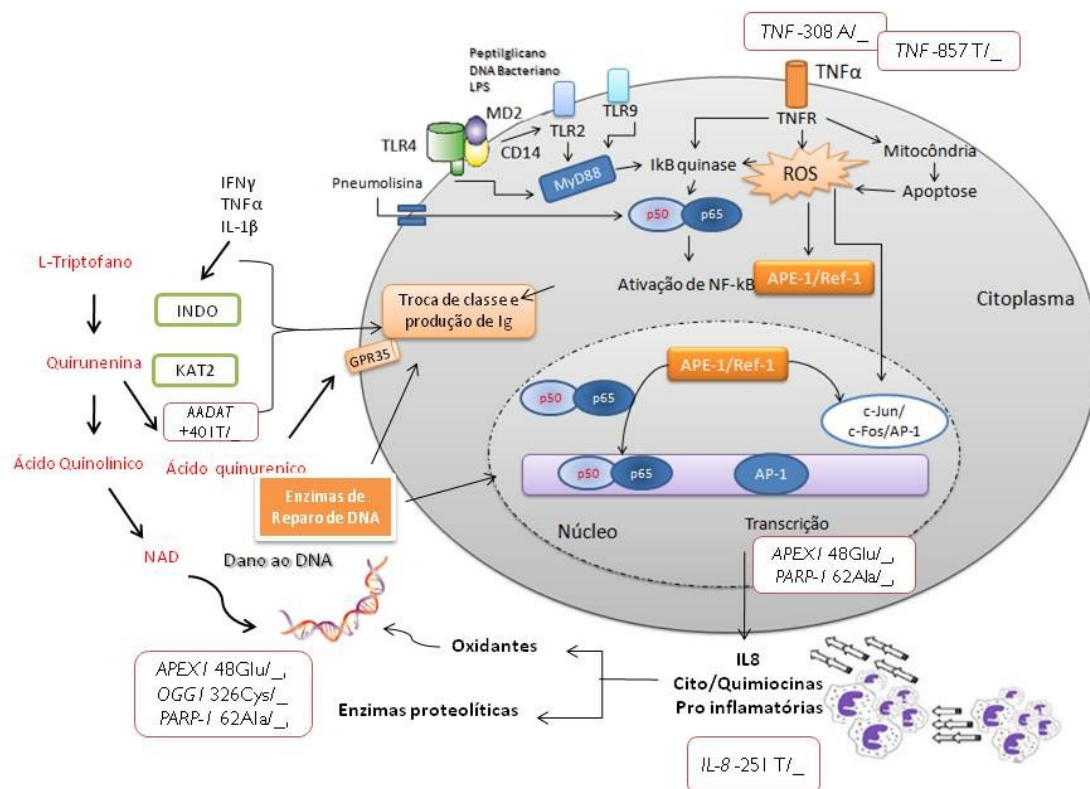


Figura 21: Vias ativadas durante a MB e influência dos SNPs estudados: A variante *TNF -308A/_* pode estar relacionado com um possível papel protetor contra a MB, uma vez esteve mais frequente no grupo controle e mostrou influência no aumento dos níveis de outras citocinas e quimiocinas, já a variante *TNF -857T/_* só mostrou relação de proteção quando combinado com a variante *TNF -308A/_* sugerindo um desequilíbrio de ligação entre essas variantes. Os danos oxidativos durante a MB são reparados principalmente pelas enzimas da via BER, e em nosso modelo observamos que indivíduos portadores dos SNPs em *APEX1 148Glu/_*, *OGG1 326Cys/_* e *PARP1 762Ala/_* e suas diferentes combinações podem aumentar o risco de desenvolver a doença já que foram mais frequentes no grupo doente e tais variações determinam a regulação alterada de alguns moduladores inflamatórios. Além disso, o SNP em *IL8 -251T/_* que isoladamente não tinha correlação com a doença, quando combinado com *APEX1 148Glu/_*, houve um grande risco na chance de desenvolver a doença. Ocorre ainda a metabolização do TRP pela Rota da Quinurenina, levando a estimulação da resposta imune, e o em SNP *AADAT +401 T/C* e algumas combinações com as outras variantes estudadas foi relacionado com a maior prevalência do genótipo polimórfico em indivíduos com MB.

COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E CONCLUSÕES.

- Este é o primeiro estudo que avalia a interação entre polimorfismos genéticos em vias importantes que são ativadas durante a resposta inflamatória a agentes infecciosos, utilizado a meningite bacteriana como modelo;
- A presença do polimorfismo em *TNF* -308G/A, mostrou um possível papel protetor contra a MB;
- O polimorfismo em *TNF* -857C/T individualmente não mostrou influência na resposta contra a MB, porém quando combinado com *TNF* -308G/A, mostrou um provável aumento na taxa de proteção contra a doença;
- As diversas combinações entre os SNPs *IL-8* -251A/T, *AADAT*+401C/T, *APEX1* Asn148Glu, *OGG1* Ser326Cys e *PARP-1* Val762Ala e o alelo ancestral para *TNF* -308, parecem exercer função importante na resposta inflamatória e indivíduos portadores de algumas dessas combinações apresentam níveis reduzidos de citocinas e celularidade, o que pode estar associado a suscetibilidade a doença.
- Considerando a MB uma patologia que compartilha uma resposta imunológica semelhante a outras doenças infecciosas, é importante ampliar o número das amostras e avaliar a possibilidade de analisar esses mesmos marcadores em outros modelos de infecção, visando a identificação e caracterização de novos alvos terapêuticos.

7. REFERÊNCIAS

1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010; 467(7319):1061-73.

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 6^a ed. W.B Saunders Company (Philadelphia); 2006.

Aguilar-Quesada R, Munoz-Gamez JA, Martin-Oliva D, Peralta-Leal A, Quiles-Perez R, Rodriguez-Vargas JM, et al. Modulation of transcription by PARP-1: consequences in carcinogenesis and inflammation. *Current Medicinal Chemistry* 2007; 14:1179-1187.

Aidoo M, McElroy PD, M.S. Kolczak, Terlouw DJ, ter Kuile FO, Nahlen B, Lal AA, Udhayakumar U. Tumor necrosis factor-alpha promoter variant 2 (TNF2) is associated with pre-term delivery, infant mortality, and malaria morbidity in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project IX, *Genet. Epidemiol.* 2001; 201–211.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(7):499-511.

Alcamo E, Hacohen N, Schulte LC, Rennert PD, Hynes RO, Baltimore D. Requirement for the NF- κ B family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 195, 233–244.

Ambrose HE, Willimott S, Beswick RW, Dantzer F, de Murcia JM, Yelamos J, and Wagner SD. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1)-deficient mice demonstrate abnormal antibody responses. *Immunology* 2009, 27(2):178-86.

Amente S, Bertoni A, Morano A, Lania L, Avvedimento EV, et al. LSD1-mediated demethylation of histone H3 lysine 4 triggers Myc-induced transcription. *Oncogene* 2010; 29: 3691-3702.

Ardlie KG, Lunetta KL, Seielstad M. Testing for population subdivision and association in four case-control studies. *Am J Hum Genet.* 2002;71(2):304-11.

Attia J, Hatala R, Cook DJ, Wong JG. The rational clinical examination. Does this **adult patient** have **acute meningitis**? *JAMA* 1999, 282(2):175-81.

Au WW. Heritable susceptibility factors for the development of cancer. *J Radiat Res (Tokyo)* 2006; 47B: 13–17.

Aubrey R, Tang C. The pathogenesis of disease due to type b *Haemophilus influenzae*. *Methods Mol Med.* 2003;71:29-50. Review.

- Ayoub N, Jeyasekharan AD, Bernal JA, Venkitaraman AR. HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* 2008; 453, 682–686.
- Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 1992 Jul 27;307(1):97-101. Review.
- Barbara JA, Van ostade X, Lopez A. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective, *Immunol. Cell Biol* 1996; 74:434–443.
- Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, *et al.* Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9237–42.
- Bellac CL, Coimbra RS, Christen S, *et al.* Pneumococcal meningitis causes accumulation of neurotoxic kynurenine metabolites in brain regions prone to injury. *Neurobiol Dis* 2006;24:395-402
- Bhangale TR, Rieder MJ e Nickerson DA. Estimating coverage and power for genetic association studies using near-complete variation data. *Nature Genetics* 2008; 40(7):841-3.
- Bidwell J, Keen L, Gallagher G, *et al.* Cytokine gene polymorphism in Human disease: on-line databases. *Genes Immun.*v. 2, p. 61–70, 2001.
- Bogaert D, Engelen MB, Timmers-Reker AJM, *et al.* Pneumococcal carriage in children in The Netherlands: a molecular epidemiological study. *J. Clin. Microbiol* 2001. 39:3316–3320.
- Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet.* 2003; 33 Suppl:228-37. Review.
- Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp Hematol.* 2003; 31(6):446-54. Review.
- Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008;214(2):149–60.
- Brevik A, Joshi AD, Corral R, Onland-Moret NC, Siegmund KD, Le Marchand L, Baron JA, Martinez ME, Haile RW, Ahnen DJ, Sandler RS, Lance P, Stern MC. Polymorphisms in base excision repair genes as colorectal cancer risk factors and modifiers of the effect of diets high in red meat. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(12):3167-73.

Bricks LF. Doenças meningocócicas-morbidade e epidemiologia nos últimos 20 anos: revisão. *Pediatria* 2002; 24:122-131.

Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 1995;182(5):1259-64.

Castiñeiras TMPP, Pedro LGF, Martins FSV. Universidade Federal do Rio de Janeiro – CIVES (Centro de Informação em Saúde para Viajantes), 2007.

Chávez-Bueno S, Mccracken GH Jr. Bacterial Meningitis in children. *Pediatr clin north* 2005; 52: 795-810.

[Chevillard S, Radicella JP, Levalois C, Lebeau J, Poupon MF, Oudard S, Dutrillaux B, Boiteux S.](#) Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene* 1998; 11;16(23):3083-6.

Cohen J. A power primer. *Psychological Bulletin* 1992; 112: 155–159.

Cox FE, Liew FY. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol Today* 1992;13(11):445-8.

Czerski PM, Rybakowski F, Kapelski P, *et al.* Association of tumor necrosis factor -308G/A promoter polymorphism with schizophrenia and bipolar affective disorder in a Polish population. *Neuropsychobiology* 2008, 57(1-2):88-94.

Dantzer F, Schreiber V, Niedergang C *et al.* Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair. *Biochimie*. 1999 Jan-Feb;81(1-2):69-75. Review.

Danzig L.. Meningococcal vaccines. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23(12 Suppl):S285-92.

David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*. 2007; 21;447(7147):941-50. Review.

de Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. Efficiency and power in genetic association studies. *Nature Genetics* 2005; 37(11):1217-23.

DebRoy S, Keenan AB, Ueno N, Jeronimo SM, Donelson JE, Wilson ME. *Leishmania infantum chagasi*: a genome-based approach to identification of excreted/secreted proteins. *Exp Parasitol*. 2010; 126(4):582-91. Epub 2010 Jun 11.

Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000, 118(2):503-8.

- Dolcino M, Cozzani E, Riva S, *et al.* Gene expression profiling in dermatitis herpetiformis skin lesions. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012:198956
- Emonts M, Hazelzet JA, De Groot R, Hermans PW. Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections. *Lancet Infect Dis* 2003; 3(9):565-77.
- Englander EW. Brain capacity for repair of oxidatively damaged DNA and preservation of neuronal function. *Mech Ageing Dev* 2008; 129(7-8):475-82.
- Escosteguy CM, Medronho RA, Madruga R. Vigilância epidemiológica e avaliação da assistência às meningites. *Rev. Saúde Pública* 2004; 38 (5):657-663.
- Eskola J. Immunogenicity of pneumococcal conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:388–393.]
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease:induction, repair and significance. *Mutation research* 2004; 567:1-61.
- Falvo JV, Tsytsykova AV, Goldfeld AE. Transcriptional control of the TNF gene. *Curr Dir Autoimmun* 2010; 11: 27-60.
- [Faria SM](#), [Farhat CK](#). Bacterial meningitis - diagnosis and treatment. *J Pediatr* 1999; 75 Suppl 1:S46-56.
- Fauci AS. Infectious diseases: considerations for the 21st century, *Clin Infect Dis* 2001; 32(5):675-85.
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, *et al.* Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor- 4 signal transduction. *Nature*2001; 413, 78–83.
- Fitzwater SP, Chandran A, Santosham M, Johnson HL. The worldwide impact of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2012; 31(5):501-8.
- Frasca D, B.B. Blomberg, Effects of aging on B cell function, *Curr. Opin. Immunol* 2009; 425–430.
- [Fujigaki S](#), [Saito K](#), [Sekikawa K](#), [Tone S](#), [Takikawa O](#), [Fujii H](#), [Wada H](#), [Noma A](#), [Seishima M](#). Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism. *Eur J Immunol.* 2001; 31(8):2313-8.
- Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Chan PH. Early decrease of apurinic/aprimidinic endonuclease expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19:495–501.

Galiza EP, Heath PT. Improving the outcome of neonatal meningitis. *Curr Opin Infect Dis* 2009;22: 229–34.

García-Rodríguez JA, Fresnadillo Martínez MJ. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50 Suppl S2:59-73. Review.

Gaudet MM, Egan KM, Lissowska J, Newcomb PA, Brinton LA, Titus-Ernstoff L, et al. Genetic variation in tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha (TNF-LTA) and breast cancer risk. *Hum Genet* 2007; 121(3-4):483-90.

Gehre F, Leib SL, Grandgirard D, Kummer J, Bühlmann A, Simon F, Gäumann R, Kharat As, Täuber MG, Tomasz A. Essential role of choline for pneumococcal virulence in an experimental model of meningitis. *J Intern Med*. 2008; 264:143-54.

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002; 11(12):1513-30. Review.

Goverdhan SV, Ennis S, Hannan SR, Madhusudhana KC, Cree AJ, Luff AJ, et al. Interleukin-8 promoter polymorphism -251A/T is a risk factor for age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2008; 92(4):537-40.

Grandgirard D, Leib SL. Meningitis in Neonates: Bench to Bedside. *Clin Perinatol*. 2010; 37(3):655-76.

Greenwood B. Editorial: 100 years of epidemic meningitis in West Africa - has anything changed? *Trop Med Int Health*. 2006; 11(6):773-80.

Grivennikov SI, Kuprash DV, Liu ZG, Nedospasov SA: Intracellular signals and events activated by cytokines of the tumor necrosis factor superfamily: from simple paradigms to complex mechanisms. *Int Rev Cytol* 2006; 252:129–161.

Grutters JC, Sato H, Pantelidis P, et al. Increased frequency of the uncommon tumor necrosis factor-857T allele in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1119- 1124.

Guan Z, Basi D, Li Q, et al. Loss of redox factor 1 decreases NF-kappaB activity and increases susceptibility of endothelial cells to apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:96–101

- Guikema JE, Linehan EK, Tsuchimoto D, Nakabeppu Y, Strauss PR, Stavnezer J. APE1- and APE2-dependent DNA breaks in immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 2007; 204(12):3017-2
- Guillemin GJ, Croitoru-Lamoury J, Dormont D, Armati PJ, Brew BJ. Quinolinic acid upregulates chemokine production and chemokine receptor expression in astrocytes. *Glia*. 2003; 41:371–381
- Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, Finsen A, Yndestad A, Aukrust P. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology*. 2012;1 22(1):23-35
- Hadi MZ, Coleman MA, Fidelis K, Mohrenweiser HW, Wilson DM 3rd. Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(20):3871-9.
- Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech*. 2000; 1;50(3):216-28.
- Han Q, Cai T, Tagle DA, Li J. Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67(3):353-68. Epub 2009 Oct 15.
- Hassa PO, Hottiger MO. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1534-1553.
- Hayden MS, Ghosh. NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 2012; 26: 203-234.
- Hegde ML, Mantha AK, Hazra TK, Bhakat KK, Mitra S, et al. Oxidative genome damage and its repair: Implications in aging and neurodegenerative diseases. *Mech Ageing* 2012; In Press. doi.org/10.1016/j.mad.2012.01.005.
- Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 114(3):671-6
- Higuchi T, Seki N, Kamizono S, et al. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor-alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998; 51: 605-612.
- Hill JW, Evans MK. Dimerization and opposite base-dependent catalytic impairment of polymorphic S326C OGG1 glycosylase. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(5):1620-32.

- Hinds DA, Stokowski RP, Patil N, Konvicka K, Kershenovich D, Cox DR, Ballinger DG. Matching strategies for genetic association studies in structured populations. *Am J Hum Genet.* 2004;74(2):317-25.
- Hirst RA, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew PW. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol* 2004; 138(2):195-201.
- Hohjoh H, Tokunaga K. Allele-specific binding of the ubiquitous transcription factor OCT-1 to the functional single nucleotide polymorphism (SNP) sites in the tumor necrosis factor-alpha gene (TNFA) promoter. *Genes Immun* 2001; 2(2):105-9.
- Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 2000; 55(12):1023-7.
- Israël A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(3):a000158. Review.
- Iwashita A, K. Hattori, H. Yamamoto, *et al.* Discovery of quinazolinone and quinoxaline derivatives as potent and selective poly(ADPribose) polymerase-1/2 inhibitors, *FEBS Lett* 2005; . 579:1389– 1393.
- Jedinak A, Dudhgaonkar S, Kelley MR, Sliva D. Apurinic/Apyrimidinic endonuclease 1 regulates inflammatory response in macrophages. *Anticancer Res.* 2011;31(2):379-85.
- Jianfeng X, Aubrey T, Joy L, Eugene R. Bleecker, Deborah A. Meyers Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genet* 2002; 111 :573–574.
- Jin XM, Kim HN, Lee IK, *et al.* PARP-1 Val762Ala polymorphism is associated with reduced risk of non-Hodgkin lymphoma in Korean males. *BMC Med Genet.* 2010; 3:11-38.
- Kalin M, Ortqvist A, Almela M. Prospective study of prognostic factors in community-acquired bacteremic pneumococcal disease in 5 countries. *J Infect Dis* 2000; 82(3):840-7.
- Kanegaye JT, Soliemanzadeh P, Bradley JS. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. *Pediatrics* 2001; 108: 1169–74.

- Karahalil B, Bohr V, Wilson D 3rd. Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk *Hum Exp Toxicol* October 2012 31(10):981-1005.
- Kargi A, Yalcin AD, Erin N, Savas B, Polat HH, Gorczynski RM. IL8 and serum soluble TRAIL levels following anti-VEGF monoclonal antibody treatment in patients with metastatic colon cancer. *Clin Lab*. 2012; 58(5-6):501-5.
- Karplus TM, Jeronimo SM, Chang H, *et al*. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. *Infect Immun*. 2002 ; 70(12):6919-25.
- Kastenbauer S, Koedel U, Becker BF, Pfister HW. Oxidative stress in bacterial meningitis in humans. *Neurology* 2002; 58(2):186-91.
- Kelley MR, Georgiadis MM, Fishel ML. APE1/Ref-1 role in redox signaling: translational applications of targeting the redox function of the DNA repair/redox protein APE1/Ref-1. *Curr Mol Pharmacol*. 2012 ;5(1):36-53. Review.
- Kelly D F, Moxon ER, Pollard AJ. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Immunology*. 2004;113:163–174
- Kershaw RM, Hodges NJ. Repair of oxidative DNA damage is delayed in the Ser326Cys polymorphic variant of the base excision repair protein OGG1. *Mutagenesis*. 2012; 27(4):501-10.
- Khobta A, Anderhub S, Kitsera N, Epe B. Gene silencing induced by oxidative DNA base damage: association with local decrease of histone H4 acetylation in the promoter region. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 4285-4295.
- Kilpinen H, Dermitzakis ET. Genetic and epigenetic contribution to complex traits. *Hum Mol Genet*. 2012; 15;21(R1):R24-8.
- Kim KS. Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect Dis*. 2010; 10(1):32-42.
- Kim KS. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6(8):625–34.
- King NJ, Thomas SR. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:2167–2172.
- Klein M, Koedel U, Pfister HW. Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy? *Prog. Neurobiol*. 2006; 80 269–280.

Klungland A, Höss M, Gunz D, *et al.* Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. *Mol Cell*. 1999; 3(1):33-42.

Koedel U, Klein M, Pfister HW. New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23: 217-223.

Koedel U, Scheld WM, Pfister HW. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. ***Lancet Infect Dis*** 2002a; 2(12):721-36.

Koedel U, Winkler F, Angele B, Fontana A, Pfister HW. Meningitis-associated central nervous system complications are mediated by the activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002b; 22(1):39-49.

Koh DW, Dawson TM, Dawson VL. Poly(ADP-ribosyl)ation regulation of life and death in the nervous system. *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62(7-8):760-8. Review.

Královicová J, Vorechovsky I. Global control of aberrant splice-site activation by auxiliary splicing sequences: evidence for a gradient in exon and intron definition. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(19):6399-413.

Kroeger K M, Abraham L J. Identification of an AP-2 element in the -323to-285 region of the TNF-alpha gene. *BiochemMolBiolInt* 1996; 40:43-51.

Kurosaki T, Aiba K, Kometani S, Moriyama Y, Takahashi. Unique properties of memory B cells of different isotypes, *Immunol* 2010; 237(1):104-16. Review

Lamrabet O, Drancourt M. Genetic engineering of *Mycobacterium tuberculosis*: A review. *Tuberculosis (Edinb)* 2012; 92(5):365-76.

Lapinet JA, Scapini P, Calzetti F, Pérez O, Cassatella MA. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect Immun* 2000; 68: 6917-6923.

[Laudisi F](#), [Sambucci M](#), [Pioli C](#). Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) as immune regulator. [Endocr Metab Immune Disord Drug Targets](#). 2011;11(4):326-33.

Lee HM, Yuk JM, Shin DM, Yang CS, Kim KK, Choi DK, Liang ZL, Kim JM, Jeon BH, Kim CD, Lee JH, Jo EK. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 is a key modulator of keratinocyte inflammatory responses. *J Immunol*. 2009; 183:6839-6848.

Lehninger AL; Nelson DL; Cox MM. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*, 4a. Edição, Editora Sarvier; 2007.

- Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell* 2007; 128, 707–719.
- Lindberg K, Rynnel-Dagoo B, Sundqvist KG. Cytokines in nasopharyngeal secretions; evidence for defective IL-1beta production in children with recurrent episodes of acute otitis media. *Clin Exp Immunol*. 1994;97:396–402.
- Lindell DM, Standiford TJ, Mancuso P, Leshen ZJ, Huffnagle GB. Macrophage inflammatory protein 1alpha/CCL3 is required for clearance of an acute *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection. *Infect Immun* 2001; 69(10):6364-9.
- Liu B, K. Shuai, Targeting the PIAS1 SUMO ligase pathway to control inflammation, *Trends Pharmacol. Sci*; 2008; 29: 505–509.
- Lo YL, Jou YS, Hsiao CF, *et al.* A polymorphism in the APE1 gene promoter is associated with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 223–229.
- Lu MC, Yang KL, Tung CH, *et al.* Higher LPS-stimulated TNF-alpha mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells from Chinese ankylosing spondylitis patients with -308G/A polymorphism in promoter region of tumor necrosis factor: association with distinct A33/B58/Cw10 haplotypes. *Rheumatol Int* 2008; 29: 189-195.
- [Lukens JR, Gross JM, Kanneganti TD.](#) IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Front Immunol*. 2012; 3:315.
- Mabley JG, Pacher P, Deb A, Wallace R, Elder RH, Szabó C. Potential role for 8-oxoguanine DNA glycosylase in regulating inflammation. *FASEB J* 2005; 19(2):290-2.
- Mace SE. Acute bacterial meningitis. *Emerg Med Clin North* 2008; 26: 281–317.
- MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:117-39.
- Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; 29(3):431-41.
- [Mándi Y, Vécsei L.](#) The kynurenine system and immunoregulation. *J Neural Transm*. 2012 ;119(2):197-209.
- Mccarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62(12):3369-72.

McGaha TL, Huang L, Lemos H, Metz R, Mautino M, Prendergast GC, Mellor AL. Amino acid catabolism: a pivotal regulator of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2012 ;249(1):135-57.

Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004;4:762–774.

Milicic AF, Lindheimer S, Laval M, *et al.* Interethnic studies of TNF polymorphisms confirm the likely presence of a second MHC susceptibility locus in ankylosing spondylitis. *Genes Immun* 2000; 1(7):418-22.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Técnico da Vacina Pneumocócica 10-valente (CONJUGADA) – Brasília, 2010.

Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol* 2003; 81(4):247-65.

Mogensen TH, Paludan SR, Kilian M, Ostergaard L. Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 267-277.

Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, van de Beek D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24(3):557-91. Review.

Moraes JC e Barata RB. A doença meningocócica em São Paulo, Brasil, no século XX: características epidemiológicas. *Cad. Saúde Pública* 2005; 21(5): 1458-1471.

Myint AM, Kim YK, Verkerk R, Scharpé S, Steinbusch H, Leonard B. Kynurenine pathway in major depression: evidence of impaired neuroprotection *Journal of Affective Disorders* 2007; 98(1-2):143-51.

[Nakajima](#) H, Nagaso H, Kakui N, Ishikawa M, Hiranuma T, Hoshiko S. Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells. *J Biol Chem.* 2004; 279(41):42774-86.

Nathan BR, Scheld WM. New advances in the pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Curr Infect Dis Rep* 2002; 2:332–336.

- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, *et al.* Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009;374:893–902.
- O'Connor JC, André C, Wang Y, *et al.* Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Neurosci*. 2009; 29:4200–4209.
- O'Hara AM, Bhattacharyya A, Bai J, *et al.* Tumor necrosis factor (TNF)-alpha-induced IL-8 expression in gastric epithelial cells: role of reactive oxygen species and AP endonuclease-1/redox factor (Ref)-1. *Cytokine* 2009; 46:359-69.
- Ostergaard C, Benfield TL, Sellebjerg F, *et al.* Interleukin-8 in cerebrospinal fluid from patients with septic and aseptic meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996, 15(2):166–9.
- Paes, Ângela Tavares. Itens essenciais em bioestatística. *Arq. Bras. Cardiol*. 1998; 71(4) 575-580.
- Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. 2011; 16;6(2):17063.
- Perecin GE, de Garcia CM, Bertolozzi MR. Epidemiological profile of *Haemophilus influenzae* B meningitis in Regional Health Board of Piracicaba--São Paulo-Brazil. *Rev Esc Enferm USP* 2010; 44(3):642-8.
- Perillo B, Ombra MN, Bertoni A, *et al.* DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression, *Science* 2008; 319:202–206.
- Perkins MN, Stone TW. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid *Brain Research* 1982; 247 (1) pp. 184–187.
- Pfeiffer R. Vorläufige mitteilungen über die erregere der influenza. *Dtsch. Med. Wochenschr* 1982; 18, 28–34.
- Phillips EJ, Simor AE. Bacterial meningitis in children and adults. Changes in community-acquired disease may affect patient care. *Postgrad Med* 1998; 103(3):102-117.

Pittman M. Variation and type specificity in the bacterial species of *Haemophilus influenzae*. *J. Exp. Med* 1931; 53: 471–492.

Polo SE, Roche D, Almouzni G. New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* 2006; 127: 481–493.

Quagliarello VJ, Scheld WM. New perspectives on bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 1993; 17(4):603-8.

Ramsay ME, Andrews N, Kaczmarski EB, Miller E. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. *Lancet* 2001; 357:195-6.

Reinholdt J, Kilian M. Comparative analysis of immunoglobulin A1 protease activity among bacteria representing different genera, species, and strains. *Infect Immun* 1997; 65(11):4452-9.

Rosenthal DS, Ding R, Simbulan-Rosenthal CM, Vaillancourt JP, Nicholson DW, Smulson M. Intact cell evidence for the early synthesis, and subsequent late apoptosis-mediated suppression, of poly(ADP-ribose) during apoptosis. *Exp Cell Res*. 1997 ;232(2):313-21.

[Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al.](#) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001;409(6822):928-33.

Sáez-Llorens X, McCracken GH Jr. Bacterial meningitis in neonates and children. *Infect Dis Clin North Am*. 1990; 4 (4):623-44.

Sáfadi MAP e Pimentel BAP. Vacinas meningocócicas conjugadas: eficácia e novas combinações. *J. Pediatr*. 2006; 82:3

Sallusto F, Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol*. 2008; 9(9):949-52.

Sanders MS, van Well GT, Ouburg S, Morré SA, van Furth AM. Genetic variation of innate immune response genes in invasive pneumococcal and meningococcal disease applied to the pathogenesis of meningitis. *Genes Immun* 2012; 12: 321-334.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994; 17(5):914-21.

Sashio H, Tamura K, Ito R, Yamamoto Y, Bamba H, Kosaka T. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with

- susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics* 2002; 53(12):1020-7.
- Schafer A; Hawkins JR. DNA variation and the future of human genetics. *Nature Biotechnology* 1998; 16:33-39.
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2006; 7(7):517-28.
- Schuurman T, de Boer RF, Kooistra-Smid AM, van Zwet AA. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 734-40.
- Sellner J, Täuber MG, Leib SL. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections. *Handb Clin Neurol* 2010; 96:1-16.
- Sessegolo JF, Levin AS, Levy CE, Asensi M, Facklam RR, Teixeira LM. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Brazil from 1988 to 1992. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 906-11.
- Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 1998; 58: 604-8.
- Shockett P, Stavnezer J. Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase increase antibody class switching. *J Immunol* 1993; 151:6962-76.
- Silva TA, Fontes FL, Coutinho LG, de Souza FR, de Melo JT, de Souto JT, *et al.* SNPs in DNA repair genes associated to meningitis and host immune response. *Mutat Res* 2011; 713(1-2):39-47.
- Silva WA, Pinheiro AM, Coutinho LG, Marinho LA, Lima LF. Epidemiological profile of acute bacterial meningitis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010, 43(4):455-7.
- Sjölinder H, Mogensen TH, Kilian M, Jonsson AB, Paludan SR. Important role for Toll-like receptor 9 in host defense against meningococcal sepsis. *Infect Immun* 2006; 76: 5421-5428.
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res.* 2003; 531(1-2):231-51. Review.

- Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Ben Ahmed S, Helal AN, Chouchane L. Genetic variation in IL-8 associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *Human Immunol* 2006; 67(1-2):13-21.
- Soldani C, Lazzè MC, Bottone MG, *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage during apoptosis: when and where? *Exp Cell Res*. 2001; 269(2):193-201.
- Song JD, Lee SK, Kim KM, *et al.* Redox factor-1 mediates NF- κ B nuclear translocation for LPS-induced iNOS expression in murine macrophage cell line RAW 264.7. *Immunology* 2008; 124: 58–67.
- Souza FR, Fontes FL, da Silva TA, Coutinho LG, Leib SL, Agnez-Lima LF. Association of kynurenine aminotransferase II gene C401T polymorphism with immune response in patients with meningitis. *BMC Med Genet* 2011; 12:51.
- Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 2007; 369(9580):2196-210.
- Stone TW e Darlington LG. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:609–620.
- Stone TW. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol* 2001; 64:185–218.
- Stranger BE, Stahl EA, Raj T. Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics. *Genetics* 2011; 187: 367-383.
- Suryaprasad AG, Prindiville T. The biology of TNF blockade. *Autoimmun Rev* 2003; 2(6):346-57.
- Swartz MN. Bacterial meningitis: a view of the past 90 years. *N Engl J Med* 2004; 351(18):1826-8.
- Tacon CL, Flower O. Diagnosis and management of bacterial meningitis in the paediatric population: a review. *Emerg Med Int*. 2012; 2012:320309.
- Tan EC, Chong SA, Tan CH, Teo YY, Peng K, Mahendran R. Tumor necrosis factor- α gene promoter polymorphisms in chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2003; 54(11):1205-11.
- Tarng DC, Tsai TJ, Chen WT, Liu TY, Wei YH. Effect of human OGG1 1245C-->G gene polymorphism on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels of leukocyte DNA among patients undergoing chronic hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12(11):2338-47.

- Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA Jr, Goeddel DV. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:9292–9296.
- Tell G, Zecca A, Pellizzari L, *et al.* An 'environment to nucleus' signaling system operates in B lymphocytes: redox status modulates BSAP/Pax-5 activation through ref-1 nuclear translocation. *Nucleic Acids Research* 2000; 28(5):1099-105.
- Ternstrom L, Jeppsson A, Ricksten A, Nilsson. Tumor necrosis factor gene polymorphism and cardiac allograft vasculopathy, *J. Heart Lung Transplant* 2005; 24: 433–438.
- Tezcan G, Gurel CB, Tutluoglu B, Onaran I, Kanigur-Sultuybek G. The Ala allele at Val762Ala polymorphism in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene is associated with a decreased risk of asthma in a Turkish population. *J Asthma*. 2009; 46(4):371-4.
- Touati E, Michel V, Thiberge J, *et al.* Deficiency in OGG-1 protects against inflammation and mutagenic effects associated with *H. pylori* infection in mouse. *Helicobacter* 2006; 11(5):494-505.
- Tsuji M, Suzuki K, Kitamura H, Maruya M, Kinoshita K, Ivanov II, *et al.* Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* 2008;29(2):261-71.
- Tsukamoto K, Ohta N, Shirai Y, Emi M. A highly polymorphic CA repeat marker at the human tumor necrosis factor alpha (TNFA alpha) locus. *J Hum Genet* 1998; 43:278–279.
- Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, *et al.* Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 2004; 39(9):1267-84.
- Ugliolara AM, Turbay D, Pesavento PA, *et al.* Identification of three new single nucleotide polymorphism in the human tumour necrosis factor-alpha gene promoter. *Tissue Antigens* 1998; 52: 359- 362.
- Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Derka S, Vassiliou S, Nkenke. The interleukin-8 (-251 A/T) polymorphism is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33(4):504-7.
- [Valinluck](#) V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain

(MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res.* 2004; 32 (14):4100-8.

van Heel DA, Udalova IA, De Silva AP, McGovern DP, Kinouchi Y, et al. Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF(-kappa)B transcription factors. *Hum Mol Genet* 2002; 11:1281-1289.

Vascotto C, Fantini D, Romanello M, et al. APE1/Ref-1 interacts with NPM1 within nucleoli and plays a role in the rRNA quality control process. *Mol Cell Biol* 2009; 29:1834–1854.

Vieusseux G. Memoire sur la maladie qui regne` a` Geneve au printemps de 1805. *Journal de Me´decine, de Chirurgie et de Pharmacologie* 1806; 11: 50–53.

Vodicka P, Stetina R, Polakova V, et al. Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. *Carcinogenesis.* 2007; 28(3):657-64.

Wang J, Simonavicius N, Wu X, et al. Kynurenic Acid as a Ligand for Orphan G Protein-coupled Receptor GPR35. *J Biol Chem* 2006; 281(31):22021-8.

Wang XG, Wang ZQ, Tong WM, Shen Y. PARP1 Val762Ala polymorphism reduces enzymatic activity. *J Biol Chem* 2007; 281(31):22021-8.

Weisfelt M, van De Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, de Gans J. Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. *Lancet Neurol* 2006; 5: 123-9.

Weksler ME, Goodhardt M, Szabo P. The effect of age on B cell development and humoral immunity, *Springer Semin. Immunopathol* 2002; 24:35–52.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195-3199.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Statistics on Haemophilus influenzae Type b: Global Immunization 1990–2010; 2011.

[WORLD HEALTH ORGANIZATION.](#) Mortality and Burden of Disease Estimates for WHO Member States in 2002 (xls).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2007; 82 (12):93-104.

- Wramner LG, Norrby J, Hahn-Zoric M, *et al.* Impaired kidney graft survival is associated with the TNF-alpha genotype. *Transplantation* 2004; 78:117–121.
- Wu M, Huang H, Zhang W, *et al.* Host DNA repair proteins in response to *P. aeruginosa* in lung epithelial cells and in mice. *Infect. Immun.* 2011; 79:75–87.
- [Xanthoudakis](#) S, Miao G, Wang F, Pan YC, Curran T. Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.* 1992;11(9):3323-35.
- Xiao W. Advances in NF-κB signaling transduction and transcription. *Cellular & Molecular Immunol.* 2004;1: 425–433.
- Yachie A, Konno A, Ohta K, *et al.* Delineation of producing ability of IgG and IgA subclasses by naive B cells in newborn infants and adult individuals. *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 102: 204–209.
- [Yamane A](#), [Kohno](#) T, Ito K, *et al.* Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell in vivo. *Mol Carcinog.* 2005; 42(3):127-41.
- Ye F, Cheng Q, Hu Y, Zhang J, Chen H. PARP-1 Val762Ala polymorphism is associated with risk of cervical carcinoma. *PLoS One.* 2012; 7(5):e37446.
- Yosunkaya E, Kucukyuruk B, Onaran I, Gurel CB, Uzan M, Kanigur-Sultuybek G. Glioma risk associates with polymorphisms of DNA repair genes, XRCC1 and PARP1. *Br J Neurosurg.* 2010;24(5):561-5.
- Youn C, Song K, Kim MH, *et al.* Human 8-oxoguanine DNA glycosylase suppresses the oxidative stress-induced apoptosis through a p53-mediated signaling pathway in human fibroblasts. *Mol. Cancer Res* 2007; 5:1083–1098.
- Yu E, Gaucher SP, Hadi MZ. Probing conformational changes in Ape1 during the progression of base excision repair. *Biochemistry* 2010; 49:3786–3796.
- Yu P, Li Z, Zhang L, Tagle DA, Cai T. Characterization of kynurenine aminotransferase III, a novel member of a phylogenetically conserved KAT family *Gene* 2006;365: 111–118.
- Zádori D, Klivényi P, Vámos E, *et al.* Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. *J Neural Transm* 2009; 116: 1403-1409.

- Zhang Y, Liu C, Peng H, Zhang J, Feng Q. IL1 Receptor Antagonist Gene IL1-RN Variable Number of Tandem Repeats Polymorphism and Cancer Risk: A Literature Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2012; 7(9):e46017
- Zheng Q, Chaikof EL. Interface between hemostasis and adaptive immunity *Curr Opin Immunol* 2012; 22(5):634-42.
- Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Roord JJ, van Furth AM. Chemotactic factors in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis. *Infect Immun* 2006; 74(3):1445-51.
- Resegue R, Bricks LF, Rodrigues D. Vacina anti-Haemophilus influenzae do tipo b (Hib) - Atualização. *Pediatria* 1994; 16:167-75.
- van de Beek D, de Gans J, Tunkel AR, Wijdicks EF. Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med* 2006, 354(1):44-53.
- [Hill JW](#), [Hazra TK](#), [Izumi T](#), [Mitra S](#). Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. [Nucleic Acids Res](#). 2001; 29(2):430-8.
- [Sidorenko VS](#), [Nevinsky GA](#), [Zharkov DO](#). Mechanism of interaction between human 8-oxoguanine-DNA glycosylase and AP endonuclease. [DNA Repair \(Amst\)](#). 2007; 6(3):317-28.

8. APÊNDICE

9.1. Resumos publicados em Anais de Congressos e Simpósios

- • **Fontes, F. L.** ; Silva, T. A. ; Araujo, L.F ; Souza, F. R. S ; Coutinho, L. G ; Leib, S ; Agnez-Lima, L. F. Genetic markers in bacterial meningitis: the course of disease can be predetermined?. In: international workshop on genomics of diseases, 2011, Natal-RN.
- • Silva, T. A. ; **Fontes, F. L.** ; Melo, J. T. A; Pinheiro, D. M. L; Coutinho, L.G; Leib, S; Agnez-Lima, L. F. Influence of APE-1 genetic variation in response to meningitis inflammatory model..In: international workshop on genomics of diseases, 2011, Natal-RN.
- • Coutinho, LG; Oliveira, RKM ; **Fontes, F. L.** ; Silva, T. A. ; Leib, S ; Agnez-Lima, L. F. Apurinic/aprimidinic endonuclease/redox effector factor (Ape1/Ref-1) as a new target to reduce inflammation. In: international workshop on genomics of diseases, 2011, Natal-RN.
- • Silva, T. A. ; **Fontes, F. L.**; Coutinho, L. G ; Sousa, F. R. S ; Melo, J. T. A ; Souto, J. T. ; Leib, S ; Agnez-Lima, L. F. SNPs in APE-1, OGG1 and PARP-1 associated to meningitis and host immune response. In: 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia-SP.
- • **Fontes, F. L.**; Silva, T. A, Melo, J. T. A; Pinheiro, D. M. L; Coutinho, L.G; Leib, S; Agnez-Lima, L. F. Marcadores Genéticos Associados com a resposta inflamatória na MB e desenvolvimento de nova terapia adjuvante. In: III Simpósio Internacional de Genética Clínica da UFRN, 2011, Natal-RN.
- • Silva, T. A.; **Fontes, F. L.**; Melo J. T. A; Pinheiro, D. M. L; Coutinho, L.G; Leib, S; Agnez-Lima, L. F. OGG1 Genetic variation associated with inflammatory disease in meningitis model. In: X Congresso Brasileiro - SBMCTA, 2011, São Pedro-SP.
- **Fontes, F. L.**; Silva, T. A.; Araujo, L.F; Souza, F. R. S; Coutinho, L. G; Leib, S; Agnez-Lima, L. F. Genetic polymorphisms associated with inflammatory response in bacterial meningitis. In: 2º Congresso Latinoamericano de Farmacogenética e Medicina Personalizada, 2012, Rio de Janeiro-RJ.

9.2 Certificados de honra ao mérito por trabalhos premiados em congressos/simpósios

- Prêmio de 2º Lugar, ao poster: INFLUENCE OF APE-1 GENETIC VARIATION IN RESPONSE TO MENINGITIS INFLAMMATORY MODEL, Natal-RN, International Workshop on Genomics of Health and Diseases, 2011.
- Prêmio de 1º lugar, apresentação oral ao trabalho: SNPS IN APE-1, OGG1 AND PARP-1 ASSOCIATED TO MENINGITIS AND HOST IMMUNE RESPONSE, Águas de Lindoia-SP, 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011.
- Prêmio com menção honrosa, ao poster: MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS COM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA MB E DESENVOLVIMENTO DE NOVA TERAPIA ADJUVANTE, Natal-RN, III Simpósio Internacional de Genética Clínica da UFRN, 2011.

10. ANEXOS

10.1. Participação como autor em artigo científico submetido:

Título: Genetic polymorphisms associated with inflammatory response in bacterial meningitis

Autores: **Fabricia Lima Fontes**, Thayse Azevedo da Silva, Luíza Ferreira de Araújo, Fladjule Rejane Soares de Souza, Leonam Gomes Coutinho, Stephen L. Leib, Lucymara Fassarella Agnez-Lima.

Revista: Plos One

Fator de Impacto: 4,41.

Qualis CAPES: A1 Medicina II

PLOS ONE

Genetic polymorphisms associated with inflammatory response in bacterial meningitis
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Genetic polymorphisms associated with inflammatory response in bacterial meningitis
Short Title:	Genetic polymorphisms in bacterial meningitis
Corresponding Author:	Lucymara Fassarella Agnez-Lima Universidade Federal do Rio Grande do Norte Natal, RN BRAZIL
Keywords:	Bacterial meningitis; polymorphism; susceptibility; APE1; TNF-alpha; AADAT; IL-8; infectious disease; inflammatory response
Abstract:	Bacterial meningitis (BM) is an infectious disease that presents high mortality and morbidity. Differences in the immune response and disease severity have been attributed to host genetic variability. The aim of this study was to investigate the association of polymorphisms in TNF -308G/A, TNF -857C/T, IL-8 -251A/T, AADAT +401C/T, APEX1 Asn148Glu, OGG1 Ser326Cys and PARP1 Val762Ala with BM. The genotypes were investigated by PIRA-PCR or PCR-RFLP. Allele and genotype frequencies were also associated with levels of cytokines, measured by x-MAP method, and cell count. We did not find significant association between the SNPs TNF -857C/T and IL-8 -251A/T and the disease. However, a higher frequency of variant allele TNF -308A was observed in control group, associated with changes in cytokine levels compared to individuals with wild type genotypes, suggesting a possible protective role. In addition, combined inter-gene interaction analysis showed significant association between some genotypes and BM, mainly involving the alleles TNF -308G, APEX1 148Glu, IL8 -251T and AADAT +401T. These genotypes combinations showed to affect the cyto/chemokines level and cell count in CSF samples from BM patients. In conclusion, this study shows significant association between the genetic variability and altered inflammatory responses during BM.
Order of Authors:	Fabrcia Lima Fontes Thayse Azevedo Silva Luiza Ferreira Araujo Fladjule Rejane Soares Souza Leonam Gomes Coutinho Stephen L Leib Lucymara Fassarella Agnez-Lima
Suggested Reviewers:	Tatiana Barichello Barichello Universidade do Extremo Sul Catarinense tba@unescc.net Nancy Reich Stony Brook University nancy.reich@stonybrook.edu
Opposed Reviewers:	



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E GENÉTICA

Natal, October 31, 2012.

Dear Editor,

In attached file is our paper entitled "Genetic polymorphisms associated with inflammatory response in bacterial meningitis" (PONE-D-12-12982), which we would like to resubmit for publication in the journal PLoS ONE. The reviewers' comments and criticisms were taken in consideration for this new version of our manuscript. We would like to thank for their constructive comments. We believe they improved our manuscript. In annex, I am sending the file with revised manuscript in which we attended all suggestions done by the referees and above we are presented the answers of specific points asked by referees. I hope this work now fits within the scope and quality of this Journal.

The major point asked by referees was the number of our samples. We recognize that in the previous version the sample size had several limitations for our conclusions. In this new version, we include some patients and doubled the number of controls. From this new sample, we obtained 80% of study power for almost all analyzes. This is a statistical test that is defined as probability for identified a difference between treatments or effect when this is indeed real. Therefore, the sample size analyzed was enough to have statistical significance, which in turn is corroborated when evaluating combinations between genotypes and levels of inflammatory modulators measured both in plasma and in cerebrospinal fluid.

In a previous study, our research group described the association of the variant alleles of *AADAT* +401C/T and *APEXI* Asn148Glu with the occurrence of bacterial meningitis (BM). These single nucleotide polymorphisms (SNPs) also influenced innate and adaptive immune responses. In the present study, we expanded the analysis for SNPs to the *TNF* and *IL8* genes and assessed the effect of combinations of these SNPs. Although several molecular markers have become the focus of research, few studies have considered their interplay. The present study investigated genetic association data concerning a BM-susceptibility model that integrates the important routes activated during the disease. Our data showed that, individually, the *TNF*-308A allele may have a potential role in protecting against BM. In addition, genetic combinations, particularly those involving *TNF*-308G, *APEXI* 148Glu, *IL8* -251T and *AADAT* +401T alleles, showed a relationship with the inflammatory process, in general, leading to decreased expression of cyto/chemokines and cell count in CSF samples of BM patients. This may be related to a reduced ability to eradicate the pathogen and consequent susceptibility to disease. This investigation proposes a possible model for gene-gene interaction between the main pathways activated during BM. Our data indicate that extensive evaluation of the variability of these genes may contribute to greater understanding of susceptibility to BM, and possibly to other infectious or inflammatory diseases. This, in turn, may lead to decreased morbidity and mortality through risk assessment and improved administration of prophylactic therapies.

The authors declare that there are no conflicts of interest and that this manuscript is not being considered for publication in any other journal.

Thank you for your attention in this matter and should you require any further information, please do not hesitate to contact me.

Sincerely yours,

Dr. Lucymara Fassarella Agnez-Lima

Departamento de Biologia Celular e Genética-UFRN

10.2. Participação como autor em artigo científico publicado, cujo tema tem correlação com o abordado na dissertação.

Título: Association of kynurenine aminotransferase II gene C401T polymorphism with immune response in patients with meningitis.

Autores: Fladjule Rejane Soares de Souza, **Fabírcia Lima Fontes**, Thayse Azevedo da Silva, Leonam Gomes Coutinho, Stephen L. Leib, Lucymara Fassarella Agnez-Lima.

Revista: BMC Medical Genetics

Publicado em: Abril de 2011

Fator de Impacto: 2,44

Qualis CAPES: B1 Medicina II

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Association of kynurenine aminotransferase II gene C401T polymorphism with immune response in patients with meningitis

Fladjule Rejane Soares de Souza¹, Fabricia Lima Fontes¹, Thayse Azevedo da Silva¹, Leonam Gomes Coutinho¹, Stephen L Leib² and Lucymara Fassarella Agnez-Lima^{1*}

Abstract

Background: The kynurenine (KYN) pathway has been shown to be altered in several diseases which compromise the central nervous system (CNS) including infectious diseases such as bacterial meningitis (BM). The aim of this study was to assess single nucleotide polymorphisms (SNPs) in four genes of KYN pathway in patients with meningitis and their correlation with markers of immune response in BM.

Methods: One hundred and one individuals were enrolled in this study to investigate SNPs in the following genes: indoleamine-2,3-dioxygenase (*IDO1* gene), kynureninase (*KYNU* gene), kynurenine aminotransferase I (*CCBL1* gene), and kynurenine aminotransferase II (*AADAT* gene). SNP analyses were performed by primer-introduced restriction analysis-PCR (PIRA-PCR) followed by RFLP. Cytokines were measured using multiplex bead assay while immunoglobulins (Ig) by immunodiffusion plates and NF-kappaB and c-Jun by dot blot assay.

Results: The variant allele of SNP AADAT+401C/T showed prevalent frequency in patients with BM. A significant decrease ($p < 0.05$) in TNF- α , IL-1 β , IL-6, MIP-1 α /CCL3 and MIP-1 β /CCL4 levels was observed in BM patients homozygous (TT) to the SNP AADAT+401C/T. Furthermore, a significant ($p < 0.05$) decrease in cell count was observed in cerebrospinal fluid (CSF) from patients with TT genotype. In addition, an increase in the IgG level in adults ($p < 0.05$) was observed. The variant allele for *KYNU*+715G/A was found with low frequency in the groups, and the SNPs in *IDO1*+434T/G, *KYNU*+693G/A, *CCBL1*+164T/C, and *AADAT*+650C/T had no frequency in this population.

Conclusions: This study is the first report of an association of SNP AADAT+401C/T with the host immune response to BM, suggesting that this SNP may affect the host ability in recruitment of leukocytes to the infection site. This finding may contribute to identifying potential targets for pharmacological intervention as adjuvant therapy for BM.

Keywords: Kynurenine Pathway Polymorphism, Meningitis, Inflammatory response

Background

Bacterial meningitis (BM) is a severe infectious disease of the central nervous system (CNS) associated with acute inflammation that contributes to the development of subsequent brain damage. Despite the availability of effective antimicrobial therapy and intensive care, the outcome of meningitis remains associated with a high mortality. Moreover, brain and/or cochlear damage

occur in up to 50% of the survivors [1]. An overactive immune response and the subsequent oxidative stress production, rather than the bacterial pathogen *per se*, are thought to be responsible for the neuronal damage, such as hearing loss and cognitive impairment [2].

Extensive research has been done in the last decades on the role of tryptophan (TRP) metabolism in the CNS under normal and pathological conditions. In recent years, a clear association has been made between tryptophan catabolism and inflammatory reactions in a vast array of disease states. Much of the focus of this

* Correspondence: fagniez@ufmet.br

¹Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



Título: SNPs in DNA repair genes associated to meningitis and host immune response.

Autores: Thayse Azevedo da Silva, **Fabrcia Lima Fontes**, Fladjule Rejane Soares de Souza, Leonam Gomes Coutinho, Stephen L. Leib, Lucymara Fassarella Agnez-Lima.

Revista: Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis

Publicado em: Agosto de 2011

Fator de Impacto: 3,2

Qualis CAPES: A2 Medicina II



SNPs in DNA repair genes associated to meningitis and host immune response

Thayse Azevedo da Silva^a, Fabrícia Lima Fontes^a, Leonam Gomes Coutinho^a,
 Fladjule Rejane Soares de Souza^a, Juliane Tamara Araújo de Melo^a, Janeusa Trindade de Souto^b,
 Stephen L. Leib^c, Lucymara Fassarella Agnez-Lima^{a,*}

^a Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Av. Salgado Filho s/n, 59072-970 Natal, RN, Brazil

^b Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brazil

^c Institute for Infectious Diseases, University of Bern, Friedbuehlstrasse 51, CH-3010 Bern, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 6 March 2011
 Received in revised form 11 May 2011
 Accepted 20 May 2011
 Available online 27 May 2011

Keywords:
 Base excision repair
 Polymorphism
 Meningitis
 Inflammatory response

ABSTRACT

In vitro and in animal models, APE1, OGG1, and PARP-1 have been proposed as being involved with inflammatory response. In this work, we have investigated if the SNPs APE1 Asn148Glu, OGG1 Ser326Cys, and PARP-1 Val762Ala are associated to meningitis. The patient genotypes were investigated by PIRA-PCR or PCR-RFLP. DNA damages were detected in genomic DNA by Fpg treatment. IgG and IgA were measured from plasma and the cytokines and chemokines were measured from cerebrospinal fluid samples using Bio-Plex assays. A higher frequency ($P < 0.05$) of APE1 Glu allele in bacterial meningitis (BM) and aseptic meningitis (AM) patients was observed. The genotypes Asn/Asn in control group and Asn/Glu in BM group was also higher. For the SNP OGG1 Ser326Cys, the genotype Cys/Cys was more frequent ($P < 0.05$) in BM group. The frequency of PARP-1 Val/Val genotype was higher in control group ($P < 0.05$). The occurrence of combined SNPs is significantly higher in BM patients, indicating that these SNPs may be associated to the disease. Increasing in sensitive sites to Fpg was observed in carriers of APE1 Glu allele or OGG1 Cys allele, suggesting that SNPs affect DNA repair activity. Alterations in IgG production were observed in the presence of SNPs APE1 Asn148Glu, OGG1 Ser326Cys or PARP-1 Val762Ala. Moreover, reduction in the levels of IL-6, IL-1Ra, MCP-1/CCL2 and IL-8/CXCL8 was observed in the presence of APE1 Glu allele in BM patients. In conclusion, we obtained indications of an effect of SNPs in DNA repair genes on the regulation of immune response in meningitis.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Despite advances in vaccine development and therapy, bacterial meningitis (BM) is among the top ten infectious diseases related to death. The main etiological agents of BM are *Neisseria meningitidis* (meningococci) and *Streptococcus pneumoniae* (pneumococci) [1]. Invasive disease is preceded by nasopharyngeal colonization. Asymptomatic colonization by pneumococci and meningococci occurs in around 100% and 18%, respectively, of the normal population [2,3]. Aseptic meningitis (AM) can be caused by multiple conditions mainly including viral infection and also many non-infectious etiologies. In general, AM is a less severe disease than BM [4].

In BM, the disease severity and the prognosis are influenced by the host's response to the invading pathogen, suggesting that particular aspects, such as genetic characteristics, may render an individual more or less susceptible to develop more serious symptoms. Deficiency in innate or acquired immunity has been described to be associated with susceptibility to pneumococcal and meningococcal infections [5,6].

Studies in BM have demonstrated an involvement of oxidative stress in the pathogenesis of cerebral injury, as apparent in neuronal necrosis and apoptosis. Oxidative molecules generated during inflammatory response contribute to the brain damage that underlies the occurrence of neuronal sequels [7]. Several studies have focused on identifying strategies to reduce the oxidative stress related to the host's inflammatory response to BM [8,9].

In the brain, the base excision repair (BER) has been associated to the repair of oxidative DNA damage [10,11]. In animal models, the induction of BER activity has been observed in cerebral cortex after induced ischemia, which has been attributed to the increased expression of genes and activation of selective enzymes of BER, particularly OGG1 [12,13]. This enzyme is a glycosylase that acts in removing from DNA the 8-oxo-7-hydro-deoxyguanosine

* Corresponding author at: Laboratório de Biologia Molecular e Genômica-LBMG, Departamento de Biologia Celular e Genética, Centro de Biociências - UFRN, Campus Universitário, Lagoa Nova, 59072-970 Natal, RN, Brazil. Tel.: +55 84 3211 9200; fax: +55 84 3215 3425.

E-mail address: lfagnez@ufnet.br (L.F. Agnez-Lima).

10.3. Termo de consentimento livre e esclarecido- Grupo MB

FR 063922

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Novos parâmetros para estudo de danos cerebrais induzidos por meningite bacteriana: identificação de novos alvos terapêuticos. NATAL/RN-BRASIL

A meningite é uma doença que pode causar alguns problemas graves e os tratamentos atuais ainda não são suficientes. Esta pesquisa tem o objetivo de estudar os mecanismos envolvidos com a destruição de células do cérebro que está relacionado com os problemas observados em pacientes que tiveram meningite. Por esta razão, convidamos você a participar de uma pesquisa que vai procurar em um pedacinho (genes) do seu DNA (DNA é uma substância que está dentro de nossas células, que foi herdado de nossos pais e que passamos para nossos filhos), alguma informação que explique se certas pessoas têm mais facilidade de contrair a meningite e desenvolver complicações depois da doença do que outras.

Para o diagnóstico da meningite, é necessário que os médicos solicitem exames de líquor (líquido retirado da medula espinhal) e de sangue. Para realização de nossa pesquisa precisamos de amostras de líquor e de sangue de pessoas afetadas pela meningite, por esta razão estamos pedindo sua autorização para que as suas amostras de líquor e sangue, retiradas para os exames solicitados pelo seu médico, possam ser também usadas em nossa pesquisa. Esclarecemos que nenhum procedimento adicional é necessário, estaremos usando uma parte das amostras que você precisou retirar para realização de seus exames de diagnóstico.

Essa pequena porção de líquor e sangue serão encaminhados para o Instituto de Doenças Infecciosas de Berna (Suíça) obedecendo todo processo recomendado pelo Ministério de Ciência e Tecnologia do Brasil, e para isso estamos solicitando sua autorização.

No Brasil, os pesquisadores irão analisar os pedacinhos de DNA (genes) que produzem as proteínas (moléculas com variadas funções no corpo) envolvidas com complicações durante a meningite, enquanto que na Suíça os pesquisadores irão analisar essas proteínas no líquor e no sangue. Essas informações trarão benefícios

para o desenvolvimento de novos tratamentos, capazes de reduzir a mortalidade e as complicações causadas pela meningite.

Todo o material biológico (líquor e sangue) será usado apenas nessa pesquisa e seus dados pessoais serão mantidos em sigilo absoluto. Não permitiremos a terceiros, tais como, seguradores de saúde, empregadores e superiores hierárquicos, acesso a essas informações. Apenas os pesquisadores, que trabalham nessa pesquisa, e você, se desejar, terão acesso às informações e os resultados obtidos com suas amostras (líquor e sangue).

Esclarecemos que os resultados esperados não trazem consigo nenhum grau de discriminação e/ou prejuízo moral individual ou coletivo, no entanto havendo necessidade de aconselhamento genético, você o terá sem nenhum custo, também os resultados da pesquisa serão tornados públicos através da publicação de artigos em revistas científicas. Caso você concorde em participar desta pesquisa, sua participação será mantida em sigilo, uma vez que as amostras coletadas receberão um número de identificação para ser utilizado no laboratório. Se qualquer publicação ou relatório resultar desta pesquisa sua identidade não será revelada. Além disso, você pode desistir de participar dessa pesquisa em qualquer momento sem penalização alguma ou prejuízo para seu tratamento.


A sua participação é voluntária, você não será remunerado por consentir participar desta pesquisa, porém você será reembolsado ou indenizado caso ocorra algum dano ou prejuízo comprovadamente decorrente dessa pesquisa;

Em qualquer momento desse trabalho você pode tirar suas dúvidas entrando em contato com a Professora Lucymara F. Agnez-Lima responsável pelo Projeto.

Declaro que estou devidamente esclarecido, quanto ao que essa pesquisa deseja realizar, e que consinto em participar.

Natal, ___/___/___

Assinatura do sujeito da pesquisa ou


Impressão dactiloscópica

Assinatura do responsável legal pelo sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador responsável pela aplicação do TCLE

10.4 Termo de consentimento livre e esclarecido- Grupo Controle

Projeto: Novos parâmetros para estudo de danos cerebrais induzidos por meningite bacteriana: identificação de novos alvos terapêuticos. – NATAL/RN-BRASIL

A meningite é uma inflamação das membranas que recobrem e protegem o sistema nervoso central, que pode causar alguns problemas graves e os tratamentos atuais ainda não são suficientes. Esta pesquisa tem o objetivo de estudar os mecanismos envolvidos na facilidade do indivíduo contrair meningite. Por esta razão, convidamos você a participar de uma pesquisa que vai procurar em um pedacinho (genes) do seu DNA (DNA é uma substância que está dentro de nossas células, que foi herdado de nossos pais e que passamos para nossos filhos), alguma informação que explique se certas pessoas têm mais facilidade de contrair a meningite e desenvolver complicações depois da doença do que outras.

Para realização de nossa pesquisa precisamos de amostras de sangue de pessoas aparentemente saudáveis, por esta razão estamos pedindo sua autorização para que a sua amostra de sangue possa ser usada em nossa pesquisa. O seu sangue será colhido por profissional da área da saúde habilitado e nas devidas condições de higiene.

Os pesquisadores irão analisar os pedacinhos de DNA (genes) que produzem as proteínas (moléculas com variadas funções no corpo) envolvidas com complicações durante a meningite e a facilidade de contrair a doença. Essas informações trarão benefícios para o desenvolvimento de novos tratamentos, capazes de reduzir a mortalidade e as complicações causadas pela meningite.

Todo o material biológico (líquor e sangue) será usado apenas nessa pesquisa e seus dados pessoais serão mantidos em sigilo absoluto. Não permitiremos a terceiros, tais como, seguradores de saúde, empregadores e superiores hierárquicos, acesso a essas informações. Apenas os pesquisadores, que trabalham nessa pesquisa, e você, se desejar, terão acesso às informações e os resultados obtidos com suas amostras (líquor e sangue).

Esclarecemos que os resultados esperados não trazem consigo nenhum grau de discriminação e/ou prejuízo moral individual ou coletivo, no entanto havendo

necessidade de aconselhamento genético, você o terá sem nenhum custo, também os resultados da pesquisa serão tornados públicos através da publicação de artigos em revistas científicas. Caso você concorde em participar desta pesquisa, sua participação será mantida em sigilo, uma vez que as amostras coletadas receberão um número de identificação para ser utilizado no laboratório. Se qualquer publicação ou relatório resultar desta pesquisa sua identidade não será revelada. Além disso, você pode desistir de participar dessa pesquisa em qualquer momento sem penalização alguma ou prejuízo.

A sua participação é voluntária, você não será remunerado por consentir participar desta pesquisa, porém você será reembolsado ou indenizado caso ocorra algum prejuízo ou dano comprovadamente decorrente dessa pesquisa.

Em qualquer momento desse trabalho você pode tirar suas dúvidas entrando em contato com a Professora Lucymara F. Agnez-Lima, através do telefone 3211-9209 responsável pelo Projeto.

Declaro que estou devidamente esclarecido, quanto ao que essa pesquisa deseja realizar, e que consinto em participar.

Natal, ___/___/___



Assinatura do sujeito da pesquisa ou

Impressão dactiloscópica

Assinatura do responsável legal pelo sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador responsável pela aplicação do TCLE

10.5 Termos de aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 219/2006

Registro CONEP: 12317 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 86/C5 Processo nº 25000.140699/2005-93
 Projeto de Pesquisa: "Novos parâmetros para estudo de danos cerebrais induzidos por meningite bacteriana: identificação de novos alvos terapêuticos".
 Pesquisador Responsável: Dra Lucymara Fassarella Agnez Lima
 Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte
 Patrocinador: USB Optimus Foundation
 Área Temática Especial: cooperação estrangeira/genética humana

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 1885/2005, cabem as seguintes considerações:

- a) A pesquisadora adequou o cronograma e apresentou tradução do documento de parceria com a USB Optimus Foundation, acordo de colaboração do Diretor Geral do Hospital Giselda Trigueiro quanto à coleta de dados e amostras propostos no projeto e nova Folha de Rosto com o número corrigido de sujeitos.
- b) Foram apresentados, também, embasamento para o cálculo amostral, informações detalhadas sobre armazenamento e destinos do material biológico. A transferência de tecnologia está garantida no acordo de parceria.
- c) Nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi apresentada com adequação da linguagem e informações adicionais.
- d) As informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.
- e) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 20 de março de 2006.


 WILLIAM SAAD HOSSNE
 Coordenador da CONEP/CNS/MS

