

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA**

**ȘCOALA DOCTORALĂ**



**TEZA DE DOCTORAT**

**Rezumat**

**IMPLICAREA POLIMORFISMELOR GENELOR  
SISTEMULUI IMUN ÎNNĂSCUT ÎN INFECȚIA CU  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

**Conducător de doctorat:  
Prof. univ. dr. Mihai Cruce**

**Student-doctorand:  
Alina-Liliana Mogoi (Cimpoeru)**

**Craiova**

**2013**



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI  
PROTECȚIEI SOCIALE  
AMPOSDRU



Fondul Social European  
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
CERCETĂRII  
TINERETULUI  
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE CRAIOVA

**Investește în oameni !**

**FONDUL SOCIAL EUROPEAN**

**Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane**

**2007 – 2013**

**Axa prioritară 1**

**„Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii  
economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”**

**Domeniul major de intervenție 1.5**

**„Programe doctorale și postdoctorale în sprijinul cercetării”**

**Titlul proiectului**

***„Creșterea calității și vizibilității rezultatelor cercetării științifice a  
doctoranzilor cu frecvență prin acordarea de burse doctorale”***

**Contract nr: POSDRU/107/1.5/S/82705**

**Beneficiar**

**Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova**

## INTRODUCERE

Tuberculoza rămâne, în continuare, o problemă majoră de sănătate la nivel mondial, reprezentând a doua cauză de mortalitate, de natură infecțioasă, primul loc aparținând infecției cu virusul imunodeficienței umane (HIV) (Johanneke și colab., 2011).

Infecția cu *Mycobacterium tuberculosis* este prezentă la o treime din populația lumii, fiind responsabilă de aproximativ 2 milioane de decese pe an (Dye și colab., 1999).

Pentru România studiarea acestei infecții capătă valențe deosebite prin prisma faptului că țara noastră ocupă primul loc în Uniunea Europeană în ceea ce privește numărul cazurilor de tuberculoză. Controlul infecției cu *Mycobacterium tuberculosis* de către organismul uman implică procese de recunoaștere a agentului patogen și de activare atât a sistemului imun înnăscut cât și a celui adaptativ.

Identificarea acelor gene, care prezintă mutații responsabile de susceptibilitatea la tuberculoză, a permis identificarea componentelor esențiale ale sistemului imun de apărare împotriva micobacteriei.

În acest context, cercetarea noastră își propune evaluarea asocierii principalelor polimorfisme localizate în gene care codifică citokine și susceptibilitatea sau rezistența la tuberculoză pulmonară în zona Europei de Est (România), o regiune unde aceste variante genetice nu au fost investigate până în prezent, precum și identificarea unor noi polimorfisme posibil asociate cu tuberculoza pulmonară.

**Cuvinte cheie:** tuberculoza pulmonară , polimorfism mononucleotidic, genotip, citokine, susceptibilitate.

# I. STADIUL CUNOAȘTERII

**Capitolul 1 -Epidemiologia infecției cu *Mycobacterium tuberculosis***- prezintă date recente despre ratele de incidență și mortalitate pentru tuberculoza pulmonară în diferite regiuni ale globului și apoi la nivelul continentului European. România ocupă primul loc între țările UE și locul 3 în Europa.

În **capitolul 2** intitulat ***Mycobacterium tuberculosis*** este prezentată clasificarea și distribuția globală a tulpinilor de *mycobacterium tuberculosis*. De asemenea, sunt prezentate informații referitoare la tuberculoza latentă și metode de diagnostic. În același capitol se discută despre tuberculoza multidrog-rezistentă și vaccinarea BCG.

**Capitolul 3. Genetica gazdei și susceptibilitatea la infecțiile cu *Mycobacterium tuberculosis*** face referire la principalele polimorfisme localizate în citokine și receptorii lor, polimorfisme care au fost studiate și în alte regiuni geografice pentru a evidenția o potențială asociere a acestora cu susceptibilitatea la tuberculoza pulmonară.

Subiecții cu un anumit profil genetic bazat pe o combinație de gene marker care codifică citokine / chemokine (de exemplu, IL- 1B, IL-10, IL-8, TNF- $\alpha$ ) și componente ale răspunsului imun înnăscut (de exemplu, TLR2) pot răspunde în mod exagerat la infecția cu *Mycobacterium tuberculosis*, ceea ce poate determina o susceptibilitate crescută la tuberculoză.

## II. CONTRIBUȚII PROPRII

### CAPITOLUL 4 . SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Studiul nostru a pornit de la evaluarea principalelor polimorfisme localizate în gene ce codifică citokine, receptori Toll-like în loturile de pacienți cu și fără tuberculoză și corelarea variantelor genetice depistate cu susceptibilitatea la tuberculoză pulmonară în zona Europei de Est/România, o regiune unde aceste variante genetice nu au fost investigate.

Îndeplinirea scopului propus s-a realizat prin:

- ✓ determinarea frecvenței genotipurilor principalelor gene ce codifică citokine,
- ✓ determinarea frecvenței genotipurilor pentru gene care codifică receptori Toll-like,
- ✓ stabilirea unor posibile asocieri între genele evaluate și susceptibilitatea la tuberculoza pulmonară.

Pentru îndeplinirea obiectivelor de mai sus, s-au parcurs următoarele etape:

- **Stabilirea loturilor de studiu și realizarea unei baze de date,** identificându-se principalii parametri de interes: sex, vârstă, etnie, mediu de proveniență, ocupația, numărul membrilor familiei/locuință, numărul membrilor familiei cu tuberculoză, status fumător, istoric TB, tratament, semne și simptome, examen fizic, severitatea semnelor pe radiografia toracică, examenul microscopic al sputei, rezultatele culturilor din spută,

- rezultatele testelor de rezistență la medicamente, rezultatele testelor de laborator, comorbiditate.
- **Investigarea polimorfismelor genetice** propuse, și identificarea variantele polimorfice ale unor gene ce codifică citokine, familia de receptori TLR (Toll-like receptors) - receptori de recunoaștere a modelelor moleculare (non-self) specifice agenților infecțioși (PAMPs - pathogen - associated molecular patterns) atât la lotul pacienților cu tuberculoză cât și la lotul martor.
  - **Analiza biostatistică a datelor.**

## **CAPITOLUL 5. MATERIAL ȘI METODĂ**

### **5.1. Stabilirea loturilor și includerea pacienților în studiu**

În acest studiu au fost incluși 388 de pacienți diagnosticați cu tuberculoză pulmonară pe baza istoricului TB, examenului clinic, examenului radiologic, toate cazurile fiind confirmate prin examenul microscopic al sputei și obținerea culturilor de *Mycobacterium tuberculosis* din spută. Pacienții cuprinși în acest studiu au fost diagnosticați în Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Pneumoftiziologie „Victor Babeș” din Craiova - Dolj, Spitalul de Pneumoftiziologie Leamna - Dolj și Spitalul de Pneumoftiziologie „Tudor Vladimirescu” – Runcu, Gorj, în intervalul martie 2011- martie 2013.

Lotul control (pacienți fără TB activ sau în antecedente) a fost constituit din subiecți înrolați în unitățile spitalicești mai sus menționate, precum și în cadrul Spitalul Clinic de Urgență Craiova. Ambele loturi au fost stabilite pe baza criteriilor descrise mai jos. Atât pacienții cu tuberculoză, cât și subiecții control au

semnat un consimțământ informat de includere în studiu, precum și un chestionar detaliat pentru a obține importante date demografice.

## **I. Lotul de pacienți cu tuberculoză**

### **a.criterii de includere în studiu:**

- \* pacienți diagnosticați cu tuberculoză activă sau în antecedente,
- \* vârsta peste 18 ani.

### **b. criterii de excludere din studiu:**

- ◆ febră peste 38.5°C;
- ◆ pierdere semnificativă în greutate;
- ◆ tuse productivă și transpirații nocturne o perioadă mai mare de 2 săptămâni;

## **II. Lotul control**

### **a. criterii de includere:**

- \* pacienți sănătoși fără tuberculoză pulmonară activă sau în antecedente,
- \* mediu socio-economic identic cu cel al pacienților din lotul de studiu,
- \* lot potrivit în ceea ce privește vârsta și raportul bărbați/femei cu lotul tuberculoză pulmonară

### **b. criterii de excludere din studiu:**

- ◆ pacienți cu tuberculoză în antecedente, fără a ține cont de localizare,
- ◆ pacienți care au avut contact TB,
- ◆ pacienți cu suspiciune de tuberculoză pulmonară pe imaginea radiografică.

## **Recoltarea probelor și materialul biologic**

În ceea ce privește pacienții din lotul cu tuberculoză pulmonară, materialul biologic a fost reprezentat de sânge (aproximativ 2,5 - 5 ml de sânge venos) recoltat pe EDTA și menținut la 4°C până în momentul izolării ADN-ului. În cazul subiecților din lotul de control, materialul biologic a fost sângele venos recoltat pe EDTA. Probele au fost codificate cu litere și numere acordate în ordinea recoltării.

## **5.2. Identificarea polimorfismelor genetice**

Identificarea polimorfismelor a fost efectuată în Laboratorul de Biologie Celulară și Moleculară, din cadrul Universității de Medicină și Farmacie din Craiova (genele IL-1B, IL-1RN, IL-4R, IL-10, TNF- $\alpha$  și TLR2).

Protocolul de identificare a polimorfismelor genetice a inclus următoarele etape:

- ✓ izolarea ADN-ului genomic din sânge,
- ✓ evaluarea spectrofotometrică,
- ✓ identificarea variantelor alelice prin tehnica Real Time PCR cu sonde TaqMan,
- ✓ interpretarea rezultatelor.



### **5.3. Analiza statistică**

- evaluarea echilibrului Hardy-Weinberg – testul  $X^2$ ,
- corelarea și stabilirea asocierii între parametrii studiați și rezultatele investigațiilor genetice – odds ratio (OR) și intervale de încredere (95% CI), p.

## **CAPITOLUL 6. REZULTATE**

### **6.1. Caracteristicile loturilor studiate**

În acest studiu am inclus un număr de 750 de pacienți: 388 pacienți diagnosticați cu tuberculoză pulmonară și 362 de subiecți control sănătoși. Caracteristicile celor două loturi sunt sintetizate în tabelul 1.

Au fost selectați pacienți diagnosticați cu tuberculoză pulmonară activă sau în antecedente, diagnosticați pe baza examenului de spută pozitiv, cultură pozitivă pentru *Mycobacterium tuberculosis*, precum și pe baza modificărilor radiologice.

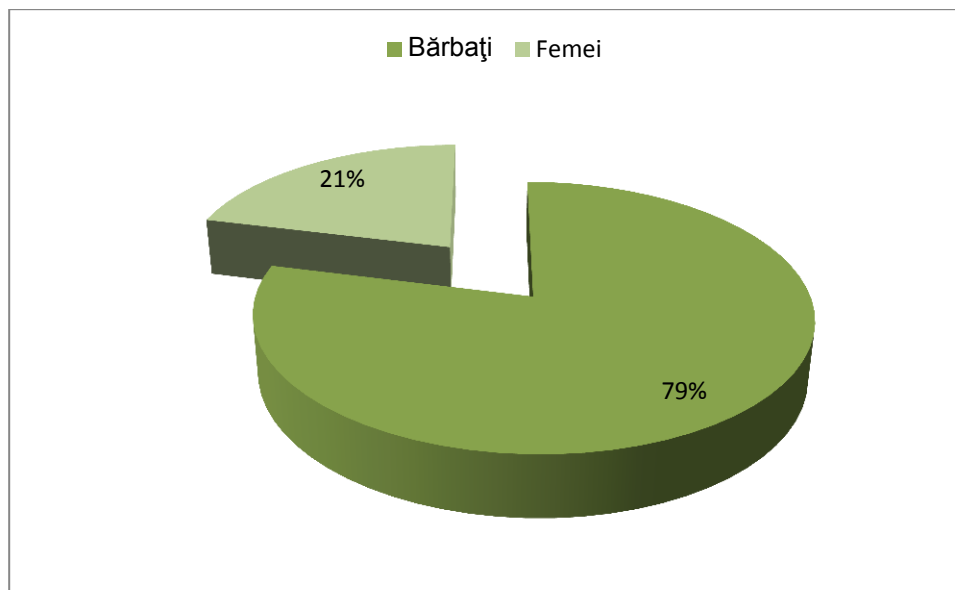
Grupul control a fost selectat atât în cadrul unităților spitalicești implicate în înrolarea pacienților, precum și în cadrul Spitalul Clinic de Urgență Craiova.

**Tabelul 1. Caracteristicile celor 2 loturi**

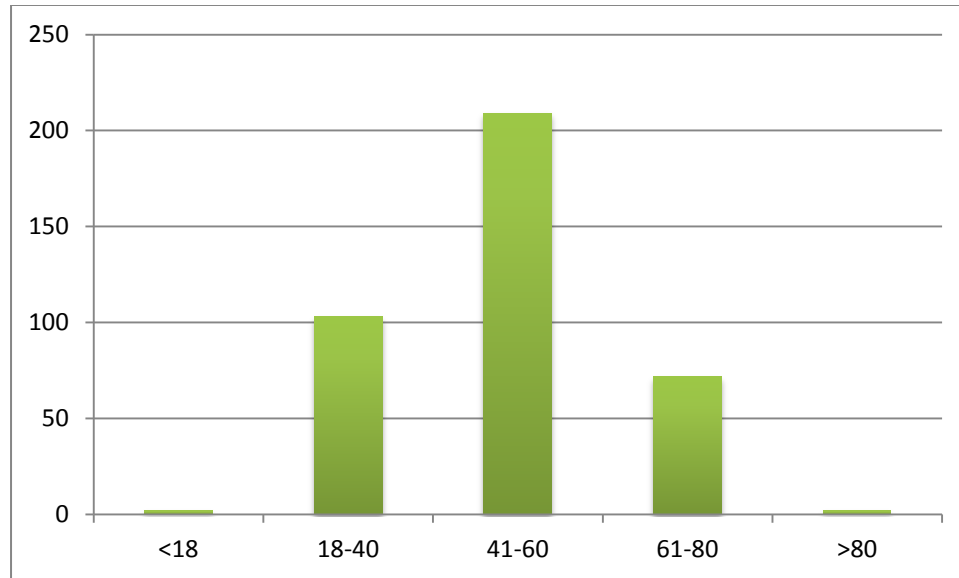
	<b>Tuberculoză pulmonară</b>	<b>Control</b>
	<b>N=388</b>	<b>N=362</b>
<b>Bărbați/Femei</b>	306/82	240/122
<b>Vârsta (ani), media±SD</b>	48.42 (14.62)	57.77 (14.78)
<b>Mediu de proveniență</b>		
- urban	103	46
- rural	285	52
- nedeclarat		264
<b>Ocupație</b>		
- student	13	1
- salariat	47	10
- ajutor social	126	12
- fără ocupație	9	1
- pensionar	185	74
- nedeclarat	8	264
<b>Istoric TB</b>		
- în trecut	174	
- în ultimul an	45	
- niciodată	118	
- nu știu	51	
<b>Status fumător</b>		
- în prezent	182	28
- în trecut	45	21
- niciodată	154	46
- nedeclarat	7	267

<i>Continuare tabelul 1</i>	Tuberculoză pulmonară N=388	Control N=362
<b>Vaccinare BCG</b>		
- da	209	33
- nu	4	3
- nedeclarat	175	326
<b>Criterii de diagnostic</b>		
- microscopie/cultură pozitivă	230	
- radiografie	208	

În ceea ce privește raportul dintre cele două sexe, s-a observat o valoare de aproape patru ori mai mare la bărbați față de femei (figura 1).



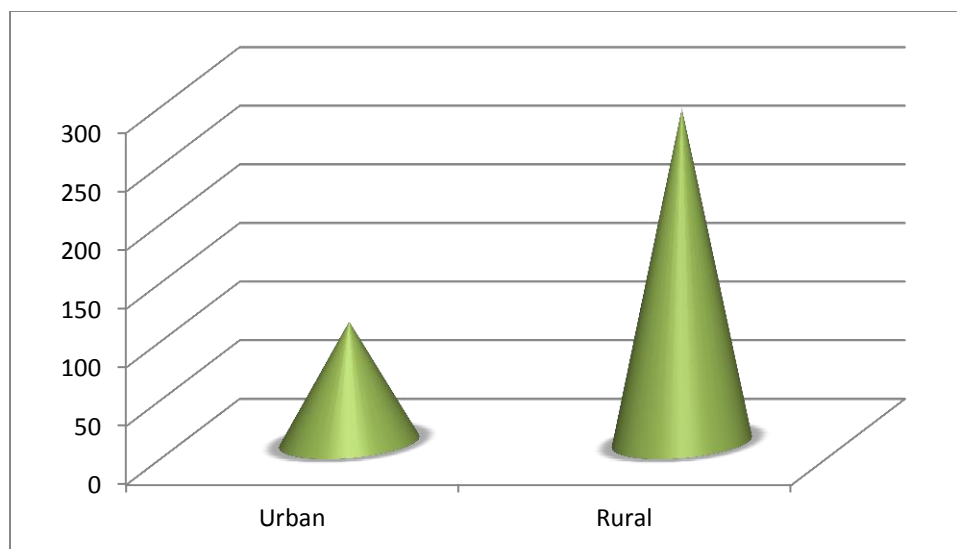
**Figura 1. Distribuția pe sexe a pacienților cu tuberculoză luați în studiu**



***Figura 2. Distribuția pe grupe de vârstă a pacienților cu tuberculoză luați în studiu***

Analiza distribuției afecțiunii pe grupe de vârstă arată valoarea maximă pentru pacienții cu vârste cuprinse între 41 și 60 de ani (figura 2).

Raportul pe medii de rezidență arată o valoare de aproape trei ori mai mare pentru mediul rural față de mediul urban (figura 3).



***Figura 3. Distribuția pe mediul de proveniență a pacienților cu tuberculoză luați în studiu***

## **6.2. Comportamentul genelor investigate - relația de echilibru Hardy-Weinberg (HWE)**

În ceea ce privește polimorfismele investigate în lotul martor, nu au existat devieri de la echilibrul Hardy-Weinberg corespunzător ( $p > 0.05$ ,  $\chi^2 < 3.84$ ), cu excepția polimorfismului TLR2 1892C>A în care s-a constatat o deviere semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg ( $p < 0.05$ ,  $\chi^2 > 3.84$ ).

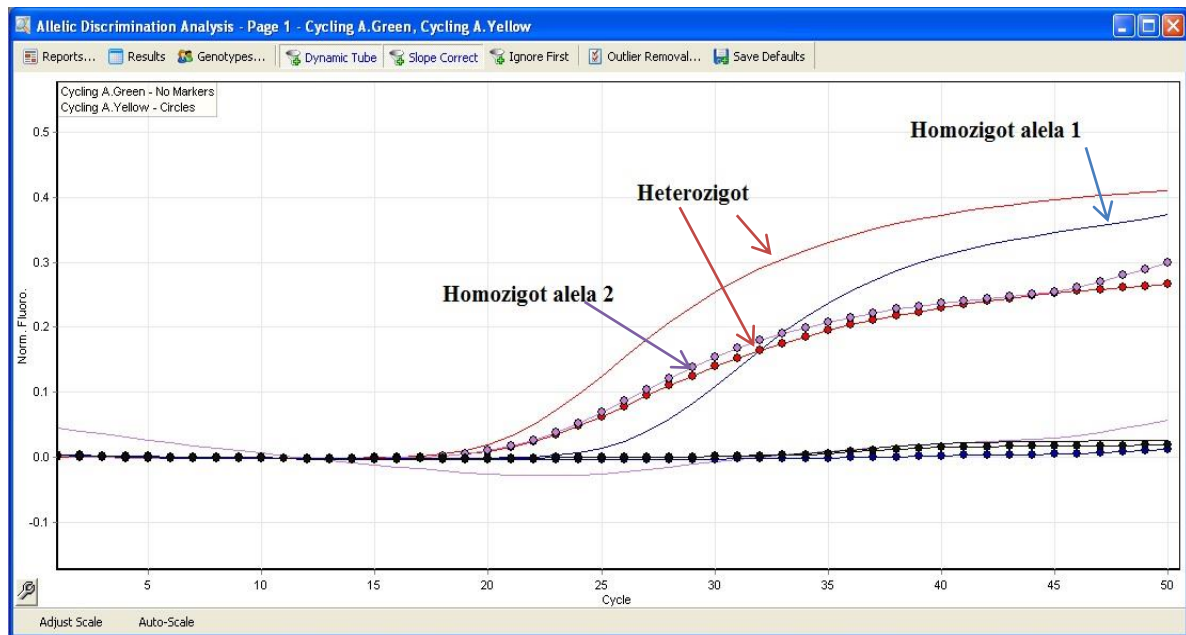
### **Rezultatele polimorfismelor investigate**

Pentru următoarele polimorfisme a fost utilizată tehnica Real Time PCR cu sonde specific de tip TaqMan:

- **IL-1B -31T>C (rs1143627),**
- **IL-1B -511C>T (rs16944),**
- **IL-1B +3954C>T (rs1143634),**
- **IL1-RN +2018T>C (rs419598),**
- **IL-8 -251T>A (rs4073),**
- **TNF-A -308G>A (rs1800629),**
- **IL-4R -3223C>T (rs2057768),**
- **IL-10 -1082A>G (rs1800896),**
- **TLR2 1892C>A (rs5743704).**

Pe baza semnalului fluorescent emis de perechile de sonde TaqMan au fost identificate cele două alele: alela 1 – semnal FAM și alela 2 – semnal VIC și

implicit cele 3 genotipuri: homozigot alela 1, heterozigot și homozigot alela 2 (figura 4).



*Figura 4. Identificarea celor trei genotipuri pe baza semnalului fluorescent emis de coloranții FAM și VIC (FAM – verde, VIC – galben). Imagine generată cu ajutorul programului sistemului Real-Time Rotor-Gene 6200HRM (Corbett)*

### **6.3. Polimorfismul genelor ce codifică citokine proinflamatorii: IL-1B, IL-1RN, IL-8 și TNF- $\alpha$**

Frecvența genotipurilor pentru polimorfismele: - IL-1B -31T>C , IL-1B 511C>T, IL-1B +3954C>T, IL1-RN +2018T>C, IL-8 -251T>A și TNF-A -308G>A este redată în tabelul 2.

*Tabelul 2. Riscul de tuberculoză pulmonară în funcție de genotip pentru polimorfismele genelor care codifică citokine pro-inflamatorii*

<b>Polimorfism</b>	<b>Tuberculoză pulmonară n=321</b>	<b>Control n=331</b>	<b>OR (95%CI)</b>	<b>p</b>
<b><i>IL-1B -31T&gt;C</i></b>				
TT	148 (46.10%)	156 (47.12%)	Ref	
TC	135 (42.05%)	140 (42.29%)	1.02(0.73-1.41)	0.92
CC	38 (11.83%)	35 (10.57%)	1.14(0.69-1.91)	0.6
Purtători alela C	173 (53.89%)	175 (52.87%)	1.04 (0.76-1.42)	0.8
<b><i>IL-1B -511C&gt;T</i></b>				
CC	142 (38.06%)	153 (43.83%)	Ref	
TC	153 (41.01%)	145 (41.54%)	1.13(0.82-1.57)	0.43
TT	78 (20.91%)	49 (14.04%)	<b>1.71(1.12-2.62)</b>	<b>0.012</b>
Purtători alela T	231 (61.93%)	194 (55.90%)	1.28(0.95-1.73)	0.10
<b><i>IL-1B +3954 C&gt;T</i></b>				
CC	114 (62.29%)	156 (52%)	Ref	
TC	56 (30.60%)	121 (40.33%)	<b>0.63 (0.42-0.94)</b>	<b>0.023</b>
TT	13 (7.10)	23 (7.66%)	0.77 (0.38-1.6)	0.48
Purtători alela T	69 (37.70%)	144 (48%)	<b>0.65 (0.45-0.95)</b>	<b>0.027</b>

*Continuare tabelul 2*

<b>Polimorfism</b>	<b>Tuberculoză pulmonară n=321</b>	<b>Control n=331</b>	<b>OR (95%CI)</b>	<b>p</b>
<b><i>IL1-RN +2018T&gt;C</i></b>				
TT	144 (51.79%)	185 (58.17%)	Ref	
TC	76 (27.33%)	109 (34.27%)	0.89(0.62-1.29)	0.55
CC	58 (20.86%)	24 (7.54%)	<b>3.1 (1.84-5.24)</b>	<b>0.00001</b>
Purtători alela C	134 (48.20%)	133 (41.82%)	1.29(0.93-1.79)	0.11
<b><i>IL-8 -251T&gt;A</i></b>				
TT	47 (31.12%)	93 (34.70%)	Ref	
TA	74 (49.00%)	121 (45.14%)	1.21 (0.77-1.91)	0.41
AA	30 (19.86%)	54 (20.14%)	1.1 (0.62-1.94)	0.74
Purtători alela A	104 (68.87%)	175 (65.29%)	1.17(0.77-1.80)	0.45
<b><i>TNF-A -308G&gt;A</i></b>				
GG	295 (76.03%)	289 (79.83%)	Ref	
AG	87 (22.42%)	71 (19.61%)	1.20 (0.84-1.71)	0.31
AA	6 (1.54%)	2 (0.55%)	2.94(0.59-14.68)	0.17
Purtători alela A	93 (23.96%)	73 (20.16)	1.24(0.88-1.76)	0.21

Polimorfismul IL-1B -511C>T este asociat cu un risc crescut de tuberculoză pulmonară, rezultat obținut atunci când a fost comparat un genotip cu altul (cel mai frecvent a fost utilizat drept referință - CC). Astfel, purtătorii genotipului TT au un



risc crescut de tuberculoză pulmonară de aproximativ 1.71 ori mai mare decât cei cu genotipul CC.

Analiza statistică arată că polimorfismul IL-1B  $-+3954 C>T$  influențează riscul de tuberculoză pulmonară, alela T conferind protecție purtătorilor (OR 0.65; 95% CI: 0.45-0.95). Acest rezultat a fost confirmat prin compararea unui genotip cu altul (OR 0.63; 95% CI: 0.42-0.94, genotip de referință - CC).

Polimorfismul IL1-RN  $+2018T>C$  este asociat cu un risc crescut de tuberculoză pulmonară, rezultat obținut atunci când a fost comparat un genotip cu altul (referință – TT). Astfel, purtătorii genotipului CC au un risc crescut de tuberculoză pulmonară de aproximativ 3.1 ori mai mare decât cei cu genotipul TT.

Pentru polimorfismele IL-1B  $-31T>C$ , IL-8  $-251T>A$ , TNF-A  $-308G>A$  nu a fost observată nici o asocieră cu risc crescut de tuberculoză pulmonară.

#### **6.4. Polimorfismul genelor ce codifică citokine antiinflamatorii: IL-4R și IL-10.**

Rezultatul analizei statistice a demonstrat faptul că IL-4R  $-3223C>T$  este asociat cu un risc crescut de tuberculoză pulmonară. Astfel, purtătorii genotipului CT au un risc crescut de tuberculoză pulmonară de aproximativ 1.41 ori mai mare decât cei cu genotipul CC; de asemenea, purtătorii alelei T au un risc crescut de tuberculoză pulmonară.

Polimorfismul IL-10  $-1082A>G$  este asociat cu un risc crescut de tuberculoză pulmonară, purtătorii genotipului GG având risc crescut de tuberculoză pulmonară de aproximativ 1.61 ori mai mare decât cei cu genotipul AA.

Frecvența genotipurilor pentru polimorfismele: - **IL-4R -3223C>T** și **IL-10 -1082A>G** este redată în tabelul 3.

**Tabelul 3 Riscul de tuberculoză pulmonară în funcție de genotip pentru polimorfismele genelor care codifică citokine anti-inflamatorii**

<b>Polimorfism</b>	<b>Tuberculoză pulmonară n=351</b>	<b>Control n=327</b>	<b>OR (95%CI)</b>	<b>p</b>
<b><i>IL-4R -3223C&gt;T</i></b>				
CC	168 (47.86%)	186 (56.36%)	Ref	
CT	150 (42.73%)	118 (35.75%)	<b>1.41 (1.023-1.94)</b>	<b>0.035</b>
TT	33 (9.40%)	23 (6.96)	1.59 (0.89-2.81)	0.11
Purtători alela T	183 (52.13)	141 (43.11)	<b>1.43(1.06-1.94)</b>	<b>0.02</b>
<b><i>IL-10 -1082A&gt;G</i></b>				
AA	113 (33.53%)	136 (40.23%)	Ref	
AG	165 (48.96%)	156 (46.15%)	1.27(0.91-1.77)	0.15
GG	59 (17.50%)	44 (13.01%)	<b>1.61(1.01-2.56)</b>	<b>0.042</b>
Purtători alela G	224 (66.46)	200 (59.52)	1.34(0.98-1.84)	0.06

### **6.5. Polimorfismul TLR2 1892C>A (rs5743704)**

Frecvența genotipurilor pentru polimorfismul TLR2 1892C>A este prezentată în tabelul 4.

**Tabelul 4. Riscul de tuberculoză pulmonară în funcție de genotip pentru TLR2 1892C>A**

<i>TLR2 1892C&gt;A</i>	<b>Tuberculoză pulmonară n=379</b>	<b>Control n=251</b>	<b>OR (95%CI)</b>	<b>p</b>
CC	335 (88.39%)	234 (93.22%)	Ref	
AC	43 (11.34%)	16 (6.37%)	2.68(0.15-45.57)	0.5
AA	1 (0.26%)	1 (0.39%)	1.43(0.09-23.00)	0.8
Purtători alela A	44 (11.60%)	17 (6.77%)	1.51(0.09-24.28)	0.77

Rezultatul analizei statistice a demonstrat faptul că polimorfismul TLR2 1892C>A nu este asociat cu un risc crescut de tuberculoză pulmonară, atunci când a fost comparat un genotip cu altul (referință - CC) sau când au fost comparați purtătorii alelei de risc A (OR 1.51; 95%CI 0.09-24.28, p=0.77).

## **CAPITOLUL 7. DISCUȚII**

În acest capitol sunt analizate rezultatele prezentate în capitolul 6 prin comparație cu datele existente în literatură pentru fiecare grup de polimorfisme: polimorfismele citokinelor pro-inflamatorii, polimorfismele citokinelor anti-inflamatorii și polimorfismul TLR2 1892C>A.

Pentru populația din România am evaluat, pentru prima dată, o posibilă asociere între tuberculoza pulmonară și polimorfisme ale acestor gene.

Recurența tuberculozei active, în ciuda tratamentului, poate surveni după mulți ani de la infecția primară, cu același tip de tulpină sau poate fi o reinfecție cu o nouă tulpină de *Mycobacterium tuberculosis* (van Rie A și colab., 1999). Factorii care predispun populația la o nouă reinfecție sunt încă neclari.

Factorii care țin de organismul gazdă, în special factorii genetici, vor influența susceptibilitatea și severitatea infecției precum și recuperarea pacientului. Polimorfismele de la nivelul citokinelor pot influența eficiența răspunsului imun la infecție având astfel un rol important în răspunsul organismului gazdă .

Regiunea promotorului genei TNF A este înalt polimorfică. Au fost identificate câteva polimorfisme alelice la pozițiile - 863, -857, -308, -238 și - 1031 (Merza și colab., 2009; Sharma și colab., 2010), acestea fiind considerate potențiali factori de susceptibilitate pentru TB.

Până în prezent, au fost efectuate un număr relativ mare de studii publicate, dar rezultatele nu sunt consecvente și sunt limitate din punct de vedere statistic. Cele mai multe cercetări s-au focalizat asupra polimorfismului TNF A - 308G > A.

Rezultatele noastre arată că nu există o asociere a polimorfismul TNF A - 308 cu riscul crescut de tuberculoză pulmonară confirmând cercetările efectuate de: Delgado și colab., (2002); Oh JH și colab., (2007); Amirzargar și colab., (2006); Henao și colab., (2006); Vejbaesya și colab., (2007).

Există mai multe studii care au examinat asocierea polimorfismelor localizate în regiunea promotor a IL - 10 cu severitatea și susceptibilitatea la TB, rezultatele obținute fiind discrepante de la un studiu la altul. În unele studii, alela IL - 10 -1082 A și heterozigozitatea pentru polimorfismul IL -10 -1082 au fost asociate cu susceptibilitatea la TB (Delgado și colab., 2002; Oh și colab., 2007), în timp ce în alte studii care au vizat un număr mare de subiecți, polimorfismul IL - 10 -1082 A > G nu a fost asociat cu TB (Bellamy și colab., 1998; Lopez –

Maderuelo și colab., 2003; Tso și colab., 2005; Shin și colab., 2005). Un alt studiu a arătat că alela IL - 10 -1082 G a fost găsită în mod semnificativ mai frecventă la pacienții cu TB decât în lotul de subiecți sănătoși (Oral HB și colab., 2006).

Într-un studiu publicat în 2012 de Ioana M. și colab., am arătat că polimorfismele TLR2 sunt asociate cu tuberculoza sau, că exercită efecte specifice în susceptibilitatea față de diferite tulpini micobacteriene precum tipul Beijing pentru *Mycobacterium tuberculosis* (Kleinnijenhuis și colab., 2011). Tulpinile de tipul Beijing au o distribuție geografică clară (Kleinnijenhuis și colab., 2011; Parwati și colab., 2010) ceea ce face posibilă ipoteza că receptorul uman TLR2 a co-evoluat în diferite populații, în funcție de presiunea exercitată de diferite infecții într-o anumită regiune.

Pentru a susține și mai mult această ipoteză, Ioana M și colab., (2012) au evaluat distribuția în populație și consecințele funcționale a trei dintre cele mai frecvente polimorfisme ale TLR: 1892C > A, rs5743704; 2029C > T, rs121917864 și 2258G > A. S-a constatat că aceste SNP-uri ale TLR2 influențează susceptibilitatea la diverse infecții. Deși se știe încă foarte puțin în ceea ce privește distribuția lor geografică, când cercetările se vor extinde acest lucru ar putea explica, cel puțin parțial, diferențele de susceptibilitate la infecții între populații diferite.

În acest studiu au fost evaluați un număr de 941 de subiecți grupați din punct de vedere geografic și etnic în șapte grupuri populaționale: români - România, Vlax – Roma - România, olandezi – Olanda, populația europeană, Han -Chineze ( China - Asia ), Dogon (Mali – Africa), Fulani (Mali - Africa ), și Trio - Indieni (Suriname – America de Sud ).

Pentru aceste loturi s-a realizat genotiparea celor trei polimorfisme ale TLR2. Două dintre cele trei polimorfisme, respectiv 1892C>A and 2258G>A, au fost evaluate din punct de vedere al impactului pe care îl au în stimularea secreției de citokine proinflamatorii IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF A, IFN- $\gamma$  și IL-17 în celulele mononucleare periferice.

În ceea ce privește distribuția geografică a celor trei polimorfisme, varianta alelică 1892A a fost identificată exclusiv în populația europeană. Polimorfismul 2029T a fost absent atât în populația europeană cât și non-europeană, cu excepția grupului Vlach – Roma. Varianta alelică 2258A a fost prezentă doar în populația europeană și cu o frecvență foarte mică în grupul Vlach – Roma. Nu s-au constatat diferențe în ceea ce privește capacitatea celulelor periferice mononucleare de a produce citokine proinflamatorii IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF A, IFN- $\gamma$  și IL-17, sub acțiunea a diferite genotipuri TLR2.

O posibilă explicație pentru această aparentă neconcordanță între studii este că variațiile genetice specifice etniei ar putea influența semnificativ imunitatea organismului gazdă la tuberculoză, determinând o susceptibilitate diferită la tuberculoză pentru grupurile etnice studiate. O altă posibilă explicație ar putea numărul subiecților în populația studiată .

## CONCLUZII

- ★ Studiul nostru este primul care evaluează principalele polimorfisme localizate în gene ce codifică citokine și riscul de tuberculoză pulmonară în Europa de Est (România).
- ★ Polimorfismul IL-1B -511C>T este asociat cu un risc crescut de tuberculoză pulmonară, rezultat obținut atunci când a fost comparat un genotip cu altul (cel mai numeros a servit ca referință -CC). Astfel, purtătorii genotipului TT au un risc crescut de tuberculoză pulmonară de aproximativ 1.71 ori mai mare decât cei cu genotipul CC.
- ★ Polimorfismul IL-1B -+3954 C>T influențează riscul de tuberculoză pulmonară, alela T conferind protecție purtătorilor (OR 0.65; 95% CI: 0.45-0.95). Acest rezultat a fost confirmat prin compararea unui genotip cu altul (OR 0.63; 95% CI: 0.42-0.94, cel mai numeros a servit ca referință -CC).
- ★ Polimorfismul IL1-RN +2018T>C este asociat cu un risc crescut de tuberculoză pulmonară, rezultat obținut atunci când a fost comparat un genotip cu altul (cel mai numeros a servit ca referință -TT). Astfel, purtătorii genotipului CC au un risc crescut de tuberculoză pulmonară de aproximativ 3.1 ori mai mare decât cei cu genotipul TT.
- ★ Rezultatul analizei statistice a demonstrat faptul că IL-4R -3223C>T este asociat cu un risc crescut de tuberculoză pulmonară, atunci când a fost

comparat un genotip cu altul (cel mai numeros a servit ca referință -CC) sau când au fost comparați purtătorii alelei de risc T. Astfel, purtătorii genotipului CT au un risc crescut de tuberculoză pulmonară de aproximativ 1.41 ori mai mare decât cei cu genotipul CC; de asemenea, purtătorii alelei T au un risc crescut de tuberculoză pulmonară.

- ★ Polimorfismul IL-10 -1082A>G este asociat cu un risc crescut de tuberculoză pulmonară, rezultat obținut atunci când a fost comparat un genotip cu altul (cel mai numeros a servit ca referință -AA). Astfel, purtătorii genotipului GG au un risc crescut de tuberculoză pulmonară de aproximativ 1.61 ori mai mare decât cei cu genotipul AA.
  
- ★ Pentru polimorfismele IL-1B -31T>C, IL-8 -251T>A, TNF-A -308G>A, TLR2 1892C>A nu a fost observată nici o asociere cu tuberculoza pulmonară în populația din România. Lipsa asocierii acestor polimorfisme cu riscul de tuberculoza pulmonară ar putea fi o reflectare a heterogenității genetice în patogeneza tuberculozei pulmonare.

## **BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ**

1. Amirzargar AA., et al. (2006). Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. Eur. Cytokine Netw. 17:84–89.



2. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* 1998;338:640–4.
3. Delgado, J. C., Baena, A., Thim, S., & Goldfeld, A. E. (2002). Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*, 186(10), 1463-1468.
4. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama* 1999;282: 677-86
5. Henao MI., Montes C., Paris SC., Garcia LF., (2006). Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb.)*86:11–19.
6. Ioana M, Ferwerda B, Plantinga TS, Stappers M, Oosting M, McCall M, Cimpoeru A, Burada F, Panduru N, Sauerwein R, Doumbo O, van der Meer JW, van Crevel R, Joosten LA, Netea MG. Different patterns of Toll-like receptor 2 polymorphisms in populations of various ethnic and geographic origins. *Infect Immun*. 2012 May;80(5):1917-22. doi: 10.1128/IAI.00121-12. Epub 2012 Feb 21.
7. Johanneke Kleinnijenhuis, Marije Oosting, Leo A. B. Joosten, Mihai G. Netea, and Reinout Van Crevel, “*Innate Immune Recognition of Mycobacterium tuberculosis*,” *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2011, Article ID 405310, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/405310
8. Kleinnijenhuis, J., M. Oosting, L. A. Joosten, M. G. Netea, and R. Van Crevel. 2011. Innate Immune Recognition of Mycobacterium tuberculosis. *Clinical & developmental immunology*

346 2011:405310.

9. Lopez-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, Gonzalez A, Codoceo R *et al.* Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167: 970–5.
10. Merza, M., et al., 2009. The NRAMPI, VDR and TNF-alpha gene polymorphisms in Iranian tuberculosis patients: the study on host susceptibility. *Braz. J. Infect. Dis.* 13, 252–256
11. Oh JH, Yang CS, Noh YK, Kweon YM, Jung SS, Son JW, Kong SJ, Yoon J, Lee JS, Kim HJ, Park JK, Jo EK, Song CH. Polymorphisms of interleukin-10 and tumour necrosis factor- $\alpha$  genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis. *Respirology.* 2007;12:594–98.
12. Oral HB, Ferah B, Uzaslan EK, Basturk B, Bekar A, Akalın H, Ege E, Ener B, Goral G. Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. *Cytokine* 2006;35:6143–7.
13. Parwati, I., R. van Crevel, and D. van Soolingen. 2010. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *The Lancet infectious diseases* 10:103-111.
14. Sharma, S., Rathored, J., Ghosh, B., Sharma, S.K., 2010. Genetic polymorphisms in TNF genes and tuberculosis in North Indians. *BMC Infect. Dis.* 10, 165–174.
15. Shin HD, Park BL, Kim YH, Cheong HS, Lee IH, Park SK. Common interleukin 10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. *Exp Mol Med.* 2005;37(2):128–32.

16. Tso HW, Ip WK, Chong WP, Tam CM, Chiang AKS, Lau YL. Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. *Genes Immun.* 2005;6: 358–63.
17. van Rie A, Warren R, Richardson M, Victor TC, Gie RP *et al.* Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341: 1174–9.
18. Vejbaesya S, Chierakul N, Luangtrakool P, Sermduangprateep C. NRAMP1 and TNF- $\alpha$  polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Thais. *Respirology.* 2007;12:202–6.