

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ELISANGELA DE SOUZA CUNHA

Polimorfismos no Éxon 1 do Gene da Lectina de Ligação a Manose (LLM) em
Contatos Adultos de Pacientes com Tuberculose Pulmonar.

RIO DE JANEIRO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ELISANGELA DE SOUZA CUNHA

Polimorfismos no Éxon 1 do Gene da Lectina de Ligação a Manose (LLM) em
Contatos Adultos de Pacientes com Tuberculose Pulmonar.

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Clínica Médica, Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica.

Orientadores:

Dra. Martha Maria de Oliveira

Pesquisadora - Unidade de Pesquisa em Tuberculose

Instituto de Doenças do Tórax - UFRJ

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - UFRJ

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Neio Lucio Fernandes Boéchat

Professor Adjunto da Faculdade de Medicina - UFRJ

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ

RIO DE JANEIRO

2008

Cunha, Elisangela de Souza

Polimorfismos no éxon 1 do gene da lectina de ligação a manose (LLM) em contatos adultos de pacientes com tuberculose pulmonar / Elisangela de Souza Cunha. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2008. xvi, 132 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Martha Maria de Oliveira e Neio Lucio Fernandes Boéchat

Dissertação (mestrado) – UFRJ/Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina, Clínica Médica, 2008.

Referências bibliográficas: f. 84-106

1. Lectina de ligação a manose - genética. 2. Lectina de ligação a manose - imunologia. 3. Polimorfismo genético. 4. *Mycobacterium tuberculosis* - imunologia. 5. Teste tuberculínico. 6. Tuberculose pulmonar. 7. Humano. 8. Pneumologia – Tese. I. Oliveira, Martha Maria de. II. Boéchat, Neio Lucio Fernandes. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação Medicina, Clínica Médica. IV. Título.

ELISANGELA DE SOUZA CUNHA

Polimorfismos no Éxon 1 do Gene da Lectina de Ligação a Manose (LLM) em
Contatos Adultos de Pacientes com Tuberculose Pulmonar.

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós Graduação em
Clínica Médica, Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica.

Apresentada em:

Rio de Janeiro, 27 de fevereiro de 2008.

Dra. Martha Maria de Oliveira/Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Neio Lucio Fernandes Boéchat/ Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Dr. Afrânio Lineu Kritski / Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Prof^ª. Dra. Leila de Souza Fonseca/Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Dra.Liane de Castro/Fiocruz

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, a minha avó e ao meu noivo e aos meus irmãos, em especial ao Aldir e William. Agradeço pelo carinho, apoio e compreensão. Tenho certeza que tudo que aprendi durante todo esse tempo foi graças a todos vocês que sempre acreditaram e nunca mediram esforços para estarem ao meu lado. Obrigada pela imensa dedicação e por todo entendimento durante a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e aos meus pais, por terem me dado contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores.

A minha orientadora no mestrado, Martha Oliveira, pela dedicação com que me guiou nos primeiros passos do mundo da pesquisa científica.

Ao professor Afrânio kritski, pelas discussões e sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

A minha amiga Jocilea Candido, por ouvir e ajudar nos momentos mais difíceis e por toda dedicação durante a fase desse trabalho.

A Anna Cristina Calçada Carvalho, agradeço por todo carinho e pelo grande auxílio estatístico.

As amigas e em especial, à Roberta, Lúcia, Paula e Alessandra pela amizade e boa vontade em compartilhar seus conhecimentos profissionais e por sempre me acolher, permitindo a realização de parte deste trabalho.

Aos amigos em especial, Adalberto Resende e Joseane Costa pelo imenso carinho e por todo aprendizado e paciência durante o tempo de convivência no laboratório. Dedico a minha imensa gratidão.

As amigas do PCTH: Soraia e Lúgia pela convivência, a qual permitiu que os dias de trabalho se passassem entre conversas, conselhos e piadas, e que desta forma ou pelas sugestões e ajudas contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos da Unidade de Pesquisa em Tuberculose: Adriana, Marcelo, Raquel, Érica e Sandra, pela cooperação e amizade sempre demonstradas.

A CAPES pela bolsa de mestrado, a qual permitiu que eu vivesse com dignidade enquanto desenvolvia este trabalho, e também pelos recursos de reserva técnica, que proporcionaram completo suporte financeiro para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivo Geral	8
2.1 Objetivos Específicos	8
3.0. Revisão da Literatura	9
3.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
3.2. Epidemiologia da Tuberculose	10
3.3. Transmissão da Tuberculose.....	12
3.4. Patogenia da Tuberculose.....	13
3.5 Os contatos da TBP.....	15
3.6. Resposta Inata e Adaptativa da TB.....	17
3.7. Imunogenética e a Tuberculose.....	21
3.8. Papel da LLM	26
3.9. Polimorfismo no gene LLM (<i>LLM2</i>).....	26
3.10. Doenças Associadas aos Polimorfismos de LLM.....	33
4.0. Método e Modelo Experimental.....	36
4.1. Modelo do Estudo.....	36
4.2. Período do Estudo.....	36
4.3. Local do Estudo.....	36
4.4. População de Referência.....	37
4.5. Pacientes do Estudo(elegíveis).....	37
4.6. Aspectos Éticos.....	37
4.7. Participantes do Estudo.....	37
4.8. Critério de Inclusão.....	38
4.9. Critério de Exclusão.....	38
4.10. Grupo de Estudo.....	38
4.11. Definição de Termos.....	39
4.12. Plano de Coleta de Dados.....	41
4.13. Cálculo Amostral.....	44
4.14. Análise dos Dados.....	44
4.15. Cálculo das Freqüências Alélicas.....	45
5.0. Métodos Moleculares.....	45
6. Resultados	50
7. Discussão.....	72
8. Conclusões.....	82
9. Principais Limitações.....	82
10. Perspectiva da Linha de Pesquisa.....	83
11. Bibliografia.....	84
12. Anexos.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN/DNA - Ácido Desoxirribonucléico
- AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- Arg- Arginina
- Asp - Ácido Aspártico
- BAAR- Bacilo álcool –ácido resistente
- BCG- Bacilo Calmette Guerin
- CD4- Proteína de superfície expressa na maioria de células T auxiliares (Th)
- CD8- Proteína de superfície expressa na maioria de células T citotóxicos (CTLs)
- CDR – Domínio de Reconhecimento de Carboidratos
- CEP- Comitê de Ética em Pesquisa
- CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
- CpG- Citosina não metilada
- CR - Receptor de Complemento
- CRP- Proteína C Reativa
- Cys - Cisteína
- DC - Células Dendríticas - *Dendritic Cell*
- DOT - Tratamento diretamente observado
- ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay
- Glu - Ácido Glutâmico
- Gly - Glicina
- HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica
- HCV - Vírus da Hepatite C
- HIV-Vírus da Imunodeficiência Humana - *Human Immunodeficiency Virus*
- HLA - Antígenos Leucocitários Humanos - *Human Leucocytes Antigen*

HUCFF - Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

IDT - Instituto de Doenças do Tórax

IFN γ - Interferon gama – *gamma interferon*

IgE – Imunoglobulina E

IL- Interleucinas

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-1R - Receptor de interleucina 1

IL- 1RA – Antagonista do Receptor de IL-1

LES - Lúpus Eritematoso Sistêmico

LLM - Lectina de Ligação de Manose

LPS - Lipopolissacarídeo

LTA - Ácido Lipoprotéico

M. tb - Mycobacterium tuberculosis

MDR - Multi Droga Resistente

MR - Receptor de Manose

NRAMP1 - Proteína de Macrófago Associado à Resistência Natural

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAMPs - Perfis de Moléculas Associadas a Patógenos - *Pathogen-associated molecular patterns*

PCR - Reação de Polimerização em Cadeia - *Polymerase Chain Reaction*

PCTH - Programa de Controle da Tuberculose Hospitalar

PGN - Peptoglicano

PPD - Derivado Protéico Purificado - *Purified Protein Derivated* Derivado Protéico Purificado

PRMs - Moléculas de Reconhecimento de Perfil - *Pattern-recognition molecules*

PRRs - Receptores de Reconhecimento de Perfil - *Pattern-recognition receptors*

PT -Prova Tuberculínica

RC – Razão de Chance

RFLP- Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA – Ácido Ribonucléico

SINAM - Sistema Nacional de Atendimento Médico

SNP - Polimorfismo de Base Única - *Single Nucleotide Polymorphisms*

SPA - Surfactantes Pulmonares A

SPD - Surfactantes Pulmonares D

SR - Receptor de *Scavenger*

TBP - Tuberculose Pulmonar

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF α - Fator de Necrose Tumoral – Alfa - *Tumor Necrosis Factor*

Th - Linfócitos T “helper” ou auxiliares

Th1 e Th2 - Linfócito T auxiliar tipo 1 ou 2

TNF - α - Fator de Necrose Tumoral alfa - *Tumor Necrosis Factor – α*

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

UPT - Unidade de Pesquisa em Tuberculose

VDR - Receptor da vitamina D

WHO – *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização gênica da LLM (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim).....	6
Figura 2: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> visto por micrografia eletrônica.....	9
Figura 3: Taxas estimadas de incidência de TB para cada 100.000 hab em 2007..	12
Figura 4: Estrutura e Organização da LLM (Prensanis e cols, 2003).....	27
Figura 5: Digestão <i>LLM2</i> Códon 54.....	48
Figura 6: Digestão <i>LLM2</i> Códon 57.....	48
Figura 7: Digestão <i>LLM2</i> Códon 52.....	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1A: Representação gráfica da distribuição genotípica da mutação do gene <i>LLM2</i> no alelo B (códon 54) entre os contatos estudados.....	62
Gráfico 1B: Representação gráfica da distribuição genotípica da mutação do gene <i>LLM2</i> no alelo C (códon 57) entre os contatos estudados.....	63
Gráfico 1C: Distribuição genotípica da mutação do gene <i>LLM2</i> no alelo D (Códon 52) entre os contatos estudados.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mutações estruturais no éxon 1 do gene <i>LLM2</i>	31
Tabela 2: Doenças associadas aos polimorfismos de LLM.....	35
Tabela 3: Tabela 3: Tabela descritiva do gene <i>LLM2</i>	44
Tabela 4: Enzima e comprimento do fragmento de restrição.....	48
Tabela 5: Características sócio-demográficas e epidemiológicas dos contatos incluídos no estudo.	51
Tabela 6: Condições predisponentes a infecção e adoecimento pelo <i>M.tb</i> entre os contatos.	52
Tabela 7: Situação clínica laboratorial relacionado aos 291 casos índices no momento inicial do estudo.	53
Tabela 8: Resposta a prova tuberculínica entre contatos de pacientes com tuberculose, segundo o Manual de Normas do Programa Nacional de Tuberculose, 2002.....	54
Tabela 9: Resultados da prova tuberculínica no início e durante o seguimento ambulatorial dos contatos adultos.	55
Tabela 10: TB infecção latente e adoecimento entre os contatos incluídos no estudo.....	56
Tabela 11: Característica da baciloscopia do CI e sua relação aos resultados da 1ª PT, conversão da PT, PT positiva final e adoecimento dos contatos.	57
Tabela 12: Presença de tosse com duração superior a 4 semanas no CI em relação aos resultados da 1ª PT, conversão da PT, prova tuberculínica final e adoecimento dos contatos.....	57
Tabela 13: Vacinação com BCG.....	58
Tabela 14: Distribuição dos resultados da 1ª PT, conversão da PT, prova tuberculínica final e adoecimento por tuberculose segundo a cor dos contatos do estudo.....	59
Tabela 15: Distribuição dos resultados da 1ª PT, da conversão da PT, prova tuberculínica final e adoecimento por TB em relação ao tipo de contato.....	60

Tabela 16: Distribuição dos resultados da 1ª PT, conversão da PT, prova tuberculínica final e adoecimento por TB de acordo com o local de residência do contato.....	61
Tabela 17: Distribuição das freqüências genotípicas e alélicas dos polimorfismos no éxon 1 do gene <i>LLM 2</i> que codifica para LLM nos alelos B, C e D de acordo com gênero.....	64
Tabela 18: Distribuição das freqüências genotípica e alélica das SNPs no éxon 1 do gene <i>LLM 2</i> que codifica para LLM nos alelos B, C e D nos grupos de convertores e não convertores da resposta a PT.....	66
Tabela 19: Distribuição das freqüências genotípicas e alélicas das SNPs no éxon 1 do gene <i>LLM 2</i> que codifica para LLM nos alelos B, C e D nos grupos de convertores e não convertores da resposta a PT.	68
Tabela 20: Distribuição das freqüências genotípicas e alélicas dos polimorfismos no éxon 1 do gene <i>LLM 2</i> que codifica para LLM nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52) na avaliação de infecção final latente positiva e negativa.	69
Tabela 21: Distribuição das freqüências genotípicas e alélicas das SNPs no éxon 1 do gene <i>LLM 2</i> que codifica para LLM nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52) nos grupos de contatos que adoeceram e que não adoeceram por TB.....	70
Tabela 22: Distribuição das freqüências genotípicas e alélicas das SNPs no éxon 1 do gene <i>LLM 2</i> que codifica para LLM nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52) nos grupos de contatos de cultura positiva e negativa para <i>M.tb</i>	71

RESUMO

Introdução: A Lectina de Ligação da Manose (LLM) é uma proteína do soro que desempenha um importante papel na resposta imune inata, interagindo diretamente com receptores de superfície das células apresentadoras de antígeno, favorecendo a opsonização/fagocitose. Estes processos podem ocorrer de modo dependente ou independente da ativação do sistema complemento. Associação de variabilidade dos níveis séricos da LLM e polimorfismos do gene que codifica esta proteína foram descritos em diversas populações, inclusive no Brasil. Apesar da associação entre polimorfismos do gene *LLM2* e a suscetibilidade ao adoecimento por *Mycobacterium tuberculosis* parece variar em função da origem étnica da população estudada. Os polimorfismos do gene *LLM2* podem constituir marcadores de suscetibilidade a doenças caracterizadas por baixos níveis séricos de LLM. **Objetivo:** Descrever as frequências genotípicas e alélicas encontradas no códon 54 (alelo B), códon 57 (alelo C) e códon 52 (alelo D), localizados no éxon 1 do gene *LLM2* em contatos adultos de pacientes com tuberculose pulmonar e avaliar possível associação destas frequências genotípicas e alélicas com a infecção e o adoecimento por *M.tb*

Metodologia: Foram utilizados 525 contatos adultos de 246 pacientes com TB pulmonar confirmada que foram acompanhados no Programa de Controle de TB do Hospital Universitário da UFRJ de outubro de 1998 a março 2004. A genotipagem foi realizada por PCR-RFLP. **Resultados:** O genótipo heterozigoto (G/A) do alelo C mostrou uma associação com o grupo dos indivíduos que converteram a prova tuberculínica [PT] ($p=0,04$; OR: 2,91; IC: 1,01-8,79). A frequência do alelo D (códon 52) foi maior no grupo de contatos adultos com PT < 10 mm ($p= 0,03$; OR: 0,64; IC: 0,43-0,96), e também no grupo que não converteu a PT ($p=0,0008$; OR: 0,26; IC: 0,11-0,61). Nenhuma associação significativa foi encontrada para o alelo B.

Conclusões: O alelo D esteve associado a um efeito “protetor” em relação ao adoecimento (tuberculose pulmonar). Analisadas independentemente, o alelo C mostrou-se associado ao favorecimento da infecção por *M. tb* Nenhuma associação significativa foi encontrada para o alelo B.

ABSTRACT

Introduction: Mannose-binding lectin (MBL) is a serum protein that plays a central role in the innate immune response. Interacting directly with receptors on the surface of antigen-presenting cells MBL favors the opsono-phagocytosis process. This process can occur dependently or independently of the activation of the system complement. Changes in MBL serum levels associated with *MBL2* gene polymorphisms have been reported in various populations, including Brazilians. The association between genetic polymorphisms and susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* apparently differs depending on the ethnic background of these populations. *MBL2* gene polymorphisms may have potential use as surrogate marker for diseases associated with variability of MBL serum levels, including *M. tuberculosis*. **Objective:** To describe the frequency of genotypic and allelic mutations in the B allele - codon 54 and C allele - codon 57 and in the D allele - codon 52, respectively in Éxon 1 of the *MBL2* contacts of adult patients with pulmonary tuberculosis. Association between *M. tuberculosis* infection and disease development and the frequencies of genotypic and allelic mutations in the *MBL2* gene were investigated. **Methodology:** From October 1998 to March 2004 five hundred twenty five (525) contacts of 246 adult patients with confirmed pulmonary TB were studied at the Federal University of Rio de Janeiro (FURJ) TB Clinic. The study was approved by the FURJ IRB and all patients that agreed to participate in the study signed an informed consent. Their blood was drawn and submitted to the DNA extraction and PCR-RFLP analysis. **Results:** The heterozygous genotype of the mutation of the C allele showed an association in the group of converters ($p = 0.04$, OR: 0.30, CI: 0.09-0.92). The frequency of the mutation of the D allele (codon 52) was more significant in the group of contacts adults with PT <10 mm ($p = 0.0033$; OR: 0.75, CI: 0.58-0.98), as well as the group that does not become a PT ($p = 0.0008$, OR: 0.26; CI: 0.11-0.61). **Conclusions:** Mutation in the D allele (codon 52) was associated with a “protective” effect concerning disease development after *M. tuberculosis* infection. Mutation in the C allele was associated with *M. tuberculosis* infection after exposure. Neither protection nor increased susceptibility to *M. tuberculosis* infection or disease was observed for the B allele.

1. Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença que ainda hoje, permanece como uma das maiores causas de morte por doença infecciosa no mundo (Raviglione, 2003). Tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*), um bacilo álcool-ácido resistente, aeróbico e de crescimento lento, o qual é transmitido principalmente por meio de aerossóis (produzidos durante a expectoração) que são inalados, proporcionando o início da infecção (Flynn & Chan, 2001; Wiegeshaus e cols, 1989).

Acredita-se que 1/3 da população mundial esteja infectada pelo bacilo da TB (WHO/Tuberculosis Program, 2002), contudo apenas 10 a 15% das pessoas infectadas manifestam doença ativa ao longo da vida (Aisu e cols, 1995; Narain e cols, 1992).

Os mecanismos de susceptibilidade ou de proteção que o ser humano utiliza para enfrentar o bacilo da TB são objetos de vários estudos (Schluger, 2001; Boom e col, 2003; Strieter e cols, 2003). Dentre os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento de infecção ou doença são: infecção pelo HIV, idade avançada, mal-nutrição, abuso de álcool, diabetes, uso de corticoesteróides e exposições prolongadas aos doentes (em prisões, hospitais e albergues) (Bellamy, 2000). A compreensão não só da resposta imune protetora contra *M.tb*, mas também das razões porque sua falha leva ao desenvolvimento de TB infecção e TB doença é relevante para um futuro controle desta pandemia.

Segundo revisto por Frieden e cols, (2003) a infecção com *M.tb* ocorre inicialmente nos pulmões, podendo expandir-se para outros órgãos via disseminação hematogênica. A defesa imune do hospedeiro contra *M.tb* tem início após a entrada da micobactéria no pulmão, onde estão diferentes mecanismos de defesa do hospedeiro, e o resultado final da infecção por *M.tb* e as diferentes manifestações

clínicas da doença refletem o desequilíbrio entre o bacilo infectante e os mecanismos de defesa imune do hospedeiro (Flynn & Chan, 2001). Inicialmente, o bacilo alcança os alvéolos pulmonares, onde ocorre a fagocitose pelos macrófagos alveolares residentes e células dendríticas (Crevel e cols, 2002). Uma primeira resposta inata ou inespecífica é iniciada, uma série de eventos é induzida que sucede com produção de citocinas/quimiocinas, ativação de monócitos e macrófagos e, finalmente, no início da resposta imune adaptativa. A eficácia desta primeira resposta, inata, dura entre uma a duas semanas e depende basicamente: 1) da virulência do bacilo infectante; 2) da carga micobacteriana inicial; 3) do estágio de diferenciação e ativação dos macrófagos do hospedeiro e 4) dos fatores genéticos do hospedeiro (Crevel e cols, 2002).

M.tb é um patógeno intracelular facultativo, que utiliza preferencialmente os macrófagos como sua célula hospedeira. Cepas de *M.tb* resistente envolvem interações complexas entre a bactéria e o sistema imunológico. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como macrófagos capturam a micobactéria resistente. Estes incluem geração de reação de oxigênio e reação de nitrogênio intermediário, acidificação de fagossomo, fusão de fagolisossoma e limitação de ferro intrafagosomal (Kaufmann e cols, 1990). Macrófagos são ativados por interferon- γ (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral - α (TNF- α), Vitamina-D e interleucina-6 (IL-6) (Armstrong & Hart, 1971). A interação destas citocinas pode ser responsável pela destruição tecidual que ocorre nesta doença (Rook, 1988).

Vários fatores circulantes e receptores estão envolvidos na resposta inata *M.tb* (Jo e cols, 2003; Crevel e cols, 2002), dentre eles, a Lectina de Ligação a Manose (LLM), uma glicoproteína plasmática da família das colectinas. Trata-se de uma lectina cálcio dependente secretada pelo fígado, sendo um forte componente

da resposta na fase aguda, fazendo parte do sistema imune inato e que atua em conjunto com o sistema complemento para opsonizar e facilitar a fagocitose de microorganismos (Turner e cols, 1996).

LLM é um modelo bem característico de receptor de reconhecimento e participa ativamente do sistema imune inato (Turner, 1996; Jack e cols, 2001). Tem afinidade por oligossacarídeos, N-acetilglicosamina e manose presentes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, (Turner, 1996; Kuhlman e cols, 1989) fungos (Tabona & Mellor, 1995; Schelenz e cols, 1995), alguns vírus (Ezekowitz e cols, 1989; Anders e cols, 1990), fosfolipídios e ácidos nucléicos (Palaniyar e cols; 2004). Induzindo a fagocitose diretamente através de receptores ainda não bem definidos ou indiretamente, pela ativação do sistema complemento (Soborg e cols, 2003).

Variações nos níveis séricos desta proteína e associações com polimorfismos genéticos têm sido relatado em várias populações, incluindo África (Bellamy e cols, 1998), Reino Unido (Crosdale e cols, 2000), China (Ip e cols, 2000), Japão (Hakozaki e cols, 2002), Austrália (Minchinton e cols, 2002) e Brasil (Santos e cols, 2001). Desta maneira, polimorfismos genéticos na LLM poderiam ser utilizados como possíveis marcadores de susceptibilidade a doenças caracterizadas por baixos níveis de LLM (Malik e cols, 2003).

Estudos indicam que os níveis séricos de LLM são geneticamente determinados, apesar da ampla existência de variabilidade interindividual, em parte, devido ao seu comportamento como uma proteína de fase aguda. (Megia e cols, 2004). Cada uma das três variantes alélicas influencia a estabilidade do produto final da proteína, resultando níveis reduzidos do soro e uma disfunção da variante de LLM com baixo peso molecular do que a proteína normal (Gadjeva e cols, 2004;

Steffensen e cols, 2000). A concentração no plasma de LLM varia entre menos do que 10 ng/mL até 10 000 ng/mL (Turner, 2003; Steffensen e cols, 2000).

Variações interindividuais na resposta imune do hospedeiro frente a um determinado patógeno são um dos mais importantes fatores para determinação de susceptibilidade, gravidade ou mesmo proteção à doença, a qual, provavelmente é o resultado dos efeitos ambientais contra o *background* de fatores genéticos. Assim, a identificação de fatores genéticos que estão de alguma forma associados a maior ou menor susceptibilidade é de fundamental importância para a predição do desenvolvimento ou o estabelecimento de determinada doença e identificação de marcadores que possam ser úteis na avaliação de novas intervenções terapêuticas. (Segal & Hill, 2003; Conley, 2003; Bellamy & Hill, 1998).

O estudo da expressão de genes que codificam para diferentes proteínas e receptores envolvidos na resposta imune compreende um importante método de avaliação do sistema imune e aliado a outras metodologias, pode-se inferir sobre a atividade biológica da proteína. A recente descrição de uma série de polimorfismos de base única (SNPs) em genes de citocinas e receptores com importante atividade funcional na regulação da expressão gênica, na atividade biológica da proteína, bem como associações com várias doenças têm aberto um interessante e novo campo de estudo (Hill, 1998; Bidwell e cols, 1999, 2001).

Em relação à TB, vários fatores têm sido relacionados com um risco aumentado, e conseqüentemente com susceptibilidade à TB ativa após a infecção com *M.tb*, dentre os quais estão o alcoolismo e a desnutrição (Howard e cols, 2002). Além disso, possíveis defeitos imunológicos podem predispor as infecções micobacterianas (Selvaraj e col, 2000; Jouanguy e col, 1997). Em vários estudos é sugerido que alguns pacientes têm uma predisposição genética para a TB. Esta

hipótese foi sugerida através de estudos com gêmeos mono e dizigóticos e de acordo com risco de TB devido à história ancestral (Stead, 2001). Estudos populacionais têm mostrado uma associação entre TB e alguns alelos dos antígenos leucocitários humanos (HLA), bem como com polimorfismos no gene que codifica para a NRAMP1 (proteína de macrófago associado à resistência natural) (Bellamy e cols, 1998), receptor de vitamina D (VDR) (Wilkinson e cols, 2000) e Interleucina 1 (IL-1) (Bellamy e cols, 1998), além de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) (Oliveira e cols, 2004), (LLM) (El Sahly e cols, 2004; Bellamy e cols, 2000) e Interferon gama (IFN- γ) (Amim, 2004).

Existem dois genes de LLM em humanos: a *MBL-1* que é um pseudogene e a *MBL-2* que codifica uma proteína (Dommett e cols, 2006). O gene da LLM (*LLM2*) funcional está localizado na porção q11. 2-q21 (Dommett e cols, 2006) no braço longo do cromossomo 10 e contém quatro éxons e três polimorfismos genéticos nos códons 52, 54 e 57 no éxon 1. (Turner, 1996; Sumiya e cols, 1991; Lipscombe e cols, 1992), sendo três mutações missense em comum que codifica um NH2 terminal da parte da hélix do colágeno (Larsen e cols, 2004). O éxon 1 codifica o peptídeo sinal, possuindo uma região rica em cisteína e uma outra região de colágeno rica em glicina. O éxon 2 codifica o restante da região de colágeno e o éxon 3 codifica uma estrutura espirada helicoidal- α , a qual é conhecida como região de “ligação”. O éxon 4 codifica o CDR (Domínio de Reconhecimento de Carboidratos), o qual adota uma conformação globular. A região promotora do gene LLM contém um número de elementos regulatórios, os quais afetam na transcrição da proteína (Dommett e cols; 2006). (FIGURA 1)

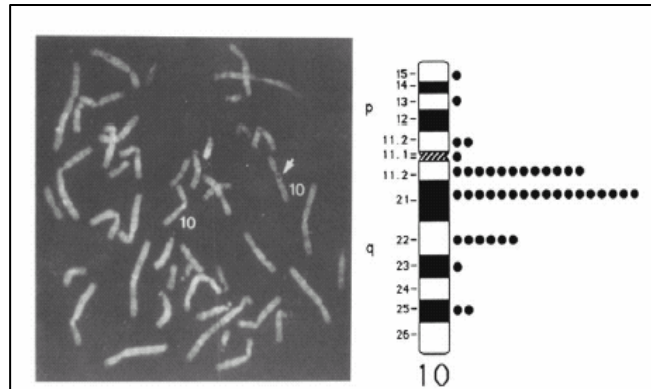


Figura 1: Localização gênica da LLM (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim).

Cadeias peptídicas idênticas (LLM 52, 54 e 57) de 32 kDa se associam para formar trímeros de 96 kDa e estes se juntam em oligômeros maiores (trímeros-hexamêros) que circulam no soro. Baixos níveis de LLM no soro são causados por três variações alélicas, na posição +230 (alelo B - códon 54), troca uma glicina por um ácido aspártico, na posição +239 (alelo C – códon 57) troca uma glicina por um ácido glutâmico e na posição + 223 (alelo D - códon 52) troca uma arginina por uma cisteína, respectivamente no éxon 1. Essas trocas nos aminoácidos modificam a cadeia de colágeno na molécula LLM (Madsen e cols, 1995), levando a uma proteína não funcional. O alelo normal selvagem é comumente designado alelo A, e as três variantes alélicas são designadas O. As variantes alélicas reduzem a quantidade de LLM funcional em um fator de 5 a 10 vezes em heterozigose, enquanto praticamente nenhuma LLM funcional pode ser detectada em carreadores do alelo variante homozigoto mutante. Além disso, a concentração de LLM é independentemente influenciada por algumas substituições nucleotídicas na região promotora do gene *LLM2*. Particularmente, uma substituição de um nucleotídeo na região promotora -221 (G→C) (mudança no promotor de X para Y) tem um grande efeito na regulação negativa nos níveis séricos de LLM (Madsen e cols, 1995).

Variações alélicas no gene da LLM têm sido associadas com uma maior susceptibilidade a doenças infecciosas em crianças (Garred e cols, 1995; Koch e cols, 2001), assim como em adultos (Garred e cols, 1997; Garred e cols, 2002). Vários estudos têm indicado um efeito protetor parcial de heterozigose para variantes alélicas de LLM contra TB (Hill, 1998; Garred e cols, 1997; Hoal-van e cols, 1999). Assim como susceptibilidade para os homozigotos mutantes (Selvaraj e cols, 1999).

A associação entre polimorfismos genéticos e susceptibilidade a TB difere de acordo com a origem étnica, uma vez que certas populações parecem ser mais susceptíveis à infecção (Stead e cols, 1999) e desenvolvimento de doença ativa (Newport e cols, 1996; Altare e cols, 1998). Uma vez que não há relatos na literatura de estudo de associação de polimorfismos em genes da imunidade inata e a TB na população brasileira até o momento, estudos imunogenéticos que avaliem a associação de marcadores da resposta imune inata com a TB na nossa população são de suma importância. Espera-se que, a compreensão dos mecanismos envolvidos na imunidade inata, forneça ferramentas para o desenvolvimento de novas vacinas, e alvos terapêuticos mais efetivos no controle da TB.

Diante do exposto, pretendemos iniciar estudos que nos permitam elucidar o quanto a LLM pode estar envolvida na fisiopatologia da TB, avaliando inicialmente a distribuição dos alelos de LLM nos contatos adultos de pacientes com TB pulmonar.

2. Objetivo Geral

Estimar as frequências genotípicas e alélicas encontradas no códon 54 (alelo B), códon 57 (alelo C) e códon 52 (alelo D), localizados no éxon 1 do gene *LLM2* em contatos adultos de pacientes com tuberculose pulmonar.

2.1 Objetivos Específicos

- Descrever a frequência de polimorfismos do gene que codifica para a proteína LLM (códon 52, 54 e 57) em contatos adultos de pacientes com TB pulmonar;
- Investigar a associação entre polimorfismos no éxon 1 do gene *LLM2* com susceptibilidade ou proteção à infecção pelo bacilo da TB.

3. Revisão da Literatura

3.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Taxonomicamente, as micobactérias pertencem à ordem dos *Actinomycetales*, família das *mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. *M.tb* é um bacilo com 2 a 4 μm de comprimento e 0,3 μm de espessura. Possui características clássicas de seu gênero: resistência álcool ácido que é dependente da integridade da estrutura celular (o método de coloração de Ziehl-Neelsen é empregado na identificação das bactérias álcool ácidos resistentes), resistência a determinados agentes químicos e sensibilidade a UV e calor. É um bacilo imóvel, não formador de esporos, aeróbio estrito, e obtém energia pela oxidação de vários compostos simples de carbono. É um microorganismo considerado parasito intracelular facultativo, sendo capaz de sobreviver no interior de células fagocitárias (Bier, 1984; Brasil, Ministério da Saúde, 2002). Possui longo tempo de geração (14 a 20 horas), dependendo da oferta de oxigênio, de nutrientes e do pH do meio. Devido à presença de uma parede celular complexa, o bacilo é protegido da ação de agentes químicos, embora seja facilmente destruído por agentes físicos como o calor e a radiação ultravioleta (Brasil, Ministério da Saúde, 2002). (FIGURA 2).



Figura 2: *Mycobacterium tuberculosis* visto por micrografia eletrônica (www.niaid.nih.gov/dir/labs/lhd/barry.htm). Acesso em: 25/02/05

3.2. Epidemiologia da tuberculose

Acredita-se que 1/3 da população mundial esteja infectada pelo *M. tuberculosis* sendo a maioria em países em desenvolvimento. (FIGURA 3). Com nove milhões de casos e dois milhões de mortes a cada ano, a epidemia global da TB é um dos mais importantes desafios para o desenvolvimento e humanização global (WHO, 2006).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2004, houve uma prevalência de 14,6 milhões de casos dos quais 6,1 milhões eram BAAR positivos, uma incidência de 8,9 milhões de casos a uma taxa de crescimento de 0,6% anualmente. Acredita-se que cerca de 2 milhões de pessoas morrem de TB a cada ano, sendo que um grande número destas mortes ocorre na região africana, onde a co-infecção com o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) tem aumentado a epidemia de TB e a probabilidade de morte por TB (OMS, 2006).

Dentre os principais fatores responsáveis por estes números está a co-infecção pelo HIV, o empobrecimento da população, o aumento do processo migratório, o surgimento de cepas Multi Drogas Resistente (MDR) e a falta de interesse dos órgãos públicos de saúde e a política governamental principalmente nos países em desenvolvimento (Bloom & Murray, 1992; Ellner e cols, 1993; Kritski & Ruffino-Neto, 2000).

Entre os 15 países com maior estimativa de incidência de TB, 11 estão na África. Ao compararmos diferentes partes do mundo, a região africana (24%), a região sudeste da Ásia (35%) e a região oeste do Pacífico (24%) juntas contabilizam 83% de todos os novos casos e recidivas notificadas (WHO, 2006). Incidências intermediárias de 25-49/100.000 e 50-99/100.000 são relatadas na América Latina, Europa Orienta e na Índia respectivamente (WHO, 2007).

No Brasil, a TB é um grave problema de saúde pública, ocupando o 16º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de TB no mundo, com estimativa de 110 mil casos em números absolutos (WHO, 2006). Calcula-se uma prevalência de 50 milhões de infectados, uma média anual de aproximadamente 100 mil casos novos e 6 mil óbitos. (Brasil, Ministério da Saúde, 2002).

O Estado do Rio de Janeiro (RJ) se destaca no quadro nacional, por apresentar anualmente a maior taxa de incidência de TB do país. Nesta cidade são notificados em média 16.000 casos de TB a cada ano. Os 32 municípios prioritários concentram 95% dos casos de tuberculose e a região metropolitana é responsável por 86% dos casos notificados no estado. (Boletim Eletrônico da Secretaria de Saúde do Município do Rio de Janeiro).

Esforços em controlar a TB em nível nacional têm sido insuficientes para conter o crescimento do número de casos e o aparecimento de cepas resistentes às drogas. Entre 1997 e 1998 o Brasil foi identificado pela OMS como o país de maior prioridade para aumentar os esforços de controle da TB.

Entre 1995 e 2005 foram notificados pelo programa DOT, um total de 26,5 milhões de novos casos e recidivas e 13,0 milhões eram BAAR positivos. Segundo as estimativas da vigilância epidemiológica houve uma prevalência de 8,8 milhões de novos casos de tuberculose em 2004 (136 por 100.000) incluindo 3,9 milhões (60 por 100.000) de novos casos eram BAAR positivos (WHO, 2007).

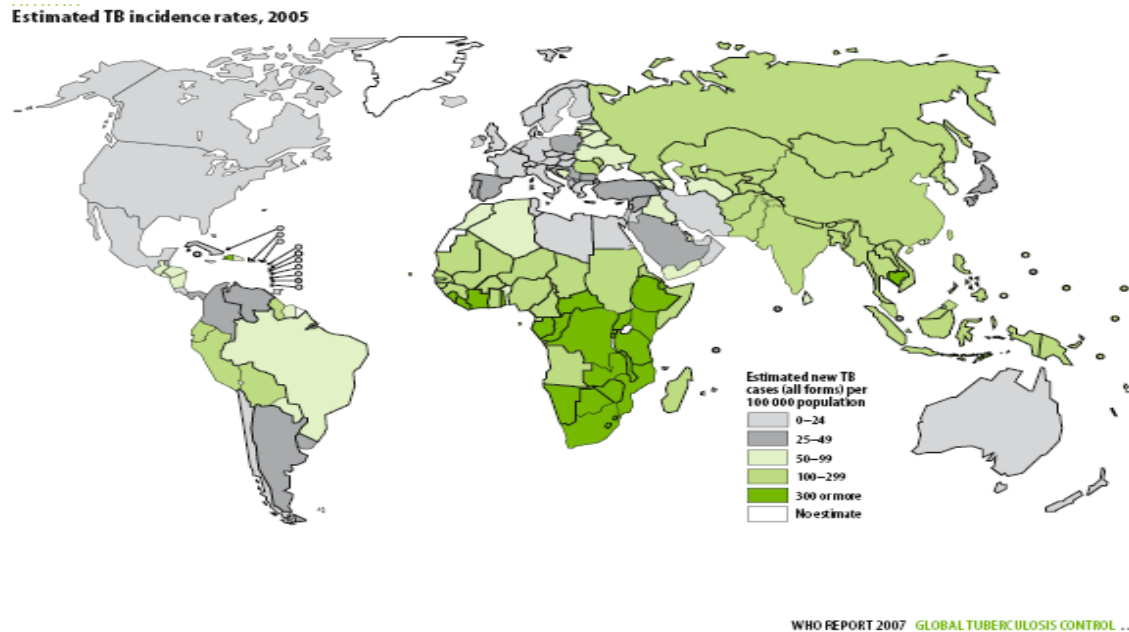


Figura 3: Taxas estimadas de incidência de TB para cada 100.000 hab em 2007.
(Fonte: Organização Mundial da Saúde – www.who.int./gtb)

3.3. Transmissão da TB

Sabe-se que a transmissão da TB se dá por vias aéreas e as maiores fontes de infecção são pessoas contaminadas que ao tossirem produzem pequenas gotículas infectantes que, após sofrerem evaporação, permanecem em suspensão na forma de núcleos infecciosos contendo de um a dois bacilos (núcleo de Wells). Em locais fechados estas gotículas podem ficar suspensas no ar por longos períodos de tempo a menos que sejam removidas por ventilação ou irradiação por UV (Wells, 1934).

É importante salientar que o risco de transmissão da TB se relaciona diretamente com os fatores ambientais, com o tipo de contato e com a forma de apresentação da doença do caso índice (paciente com tuberculose pulmonar bacilífero).

Um indivíduo susceptível ao respirar ar contaminado com estas gotículas infectantes corre o risco de se tornar infectado, a magnitude deste risco é

dependente da concentração de partículas infectantes suspensas no ar o tempo em que o indivíduo permanece neste ambiente. Assim, geralmente as infecções ocorrem em lugares fechados (Brasil, Ministério da Saúde, 2002).

Uma vez que o indivíduo está infectado com *M.tb*, ele pode permanecer alguns anos ou a vida toda sem desenvolver a doença. Cerca de 5 % das pessoas infectadas desenvolvem a doença dentro de algumas semanas após a infecção (TB Aguda, Primária ou Forma dita da Criança). A maior parte, entretanto, não desenvolve a doença seguindo a exposição e infecção inicial. De fato, 95% dos indivíduos passarão desta fase inicial ao estado de infecção crônica, completamente assintomática, denominada estado de “TB latente” (Andersen, 1997). Estima-se que entre os indivíduos que compõem este grupo, apenas 5 % a 10% desenvolverão alguma forma de TB manifestada clinicamente durante toda a duração de suas vidas. O desenvolvimento de doença ativa normalmente ocorre durante os dois primeiros anos após o estabelecimento da infecção. Os estados de imunodepressão, notadamente a infecção pelo HIV, modificam sensivelmente esta equação (Tufariello e cols, 2003).

A infecção latente é reconhecida pela presença de resposta positiva ao teste cutâneo realizado através de injeção intradérmico com uma dose padrão de suspensão de proteínas purificadas a partir do caldo de cultura de *M.tb*, procedimento conhecido como teste de Mantoux (Tufariello e cols, 2003; Brasil, Ministério da Saúde, 2002).

3.4. Patogenia da tuberculose

A TB é adquirida por inalação de pequenas partículas aéreas infectantes que atingem os alvéolos pulmonares. A probabilidade de infecção depende da intensidade de exposição e provavelmente de uma eficiência do sistema imune.

Macrófagos alveolares em alguns indivíduos podem ter um alto grau de resistência micobacteriana inata e nestas pessoas, o bacilo da tuberculose é presumidamente destruído antes que a infecção se instale. (Hass & Des Prez, 1995; Stead, 1992). Em outros indivíduos a micobactéria inalada sobrevive a fagocitose, replica e se espalha para linfonodos regionais através do sangue.

A resposta imune mediada por células para *M.tb* é caracterizada por complexas interações entre diferentes subtipos de linfócitos e células como monócitos e macrófagos (Hass & De Prez, 1995; Orme e cols, 1993). Após ingerir a micobactéria, macrófagos sensibilizam linfócitos T pela secreção de IL-1, IL-12 e IFN- γ que são citocinas que medeiam à resposta inata e os apresentam aos antígenos micobacterianos processados. Linfócitos T precursores TB específicos são estimulados a proliferar e a secretar linfocinas. Estas linfocinas agem sobre monócitos circulantes e induzem a sua maturação em macrófagos com atividade fagocítica e microbicida aumentada. Na resposta granulomatosa, os bacilos da tuberculose são mortos por repetidos ciclos de fagocitose, citólise e exposição a produtos microbicidas. Apesar disto a resposta imunológica ao *M.tb* é freqüentemente “não esterelizante” e organismos sobreviventes, mas dormentes, às vezes causam infecção latente. A doença clínica ocorre quando a replicação micobacteriana que se segue à infecção inicial não pode ser controlada (TB primária progressiva) ou quando organismos latentes dominam o controle imunológico (TB por reativação).

3. 5 Os Contatos da TB

Dados epidemiológicos de países industrializados sugerem que a incidência da TB diminuiu significativamente na década passada e a eliminação da TB tem sido uma meta, baseada no tratamento eficiente dos casos de TB e no tratamento de infecção latente de TB prevenindo assim, o desenvolvimento da doença ativa (Barnes, 2001). No entanto, a situação não é tão favorável em países em desenvolvimento, onde o número elevado de incidência e prevalência assim como óbitos associados à TB é encontrado (Dye e cols, 1999).

A TB é contagiosa espalhando-se através do ar, uma pessoa com doença ativa não tratada pode infectar cerca de 10 a 15 pessoas por ano e estima-se que um terço da população mundial tem infecção latente com *M.tb* (OMS, 2006), logo os contatos representam um grupo de elevado risco de infecção e adoecimento por TB. Em média, um doente não tratado contagia uma pessoa por mês, podendo um só paciente gerar entre 24 e 96 novos infectados, 10% dos quais desenvolverão a doença durante sua vida (Tufariello e cols, 2003).

O desenvolvimento da TB em humanos apresenta duas etapas em cuja pessoa se expõe ao bacilo, podendo se infectar e/ou depois de um intervalo de anos ou décadas pode mais adiante desenvolver uma doença. Os fatores de riscos de infecção são diferentes de fatores de riscos para o desenvolvimento da doença (Comstock, 1975). Muitos estudos têm sido realizados focando mais os fatores de riscos para o adoecimento por TB. Contudo muitos deles investigaram fatores de riscos para o desenvolvimento da doença mais do que infecção, e esses estudos são realizados principalmente em países industrializados (Lienhardt, 2001).

Entre pessoas expostas a um caso de tuberculose, o risco de se tornar infectado é determinado primariamente por ação de três fatores: 1) infectividade do

caso fonte (virulência da micobactéria e a densidade do bacilo no escarro); 2) a intensidade da pessoa susceptível exposta a um caso de TB e 3) a susceptibilidade à infecção (Shaw & Wynn-Williams, 1954; Grzybowski e cols, 1975). Fatores apresentados para influenciar os riscos de infecção por micobactéria incluem: idade, sexo, condições socio-econômicas, urbanização, grupos étnico/raciais e infecção pelo HIV (Enarson & Rouillon, 1994; Lienhardt, 2001). Em pacientes com infecção por *M.tb*, a doença pode desenvolver-se, em qualquer momento através de reativação de uma infecção anteriormente adquirida (latente) ou por meio de re-infecção exógena (Styblo, 1978; Smith, 1994).

Estudos epidemiológicos mostraram que os riscos para se infectar pela TB são aumentados entre contatos adultos de pacientes com exame positivo de escarro e que a prevalência da doença ativa aumenta com a intimidade do contato (Andersen & Geser, 1960; Rouillon e cols, 1976). Altas taxas de transmissão foram encontradas dentro de famílias de pacientes de TB com escarro positivo, que moram em áreas de altas prevalências (Beyers e cols, 1997). Entretanto, tem sido sugerido que a maioria dos casos na comunidade é adquirida de contatos desconhecidos e sem intimidade (Madico e cols, 1995).

Durante um século a Prova Tuberculínica (PT) tem sido o método clássico utilizado para identificar indivíduos infectados com *M. tb*. e para notificar a prevalência de populações infectadas pelo bacilo (Huebner e cols, 1993). Tem sido relatado que a prevalência para reações positivas em PT nas populações em geral variar de acordo com idade e sexo (Roelsgaard e cols, 1964, National Tuberculosis Institute Bangalore, 1974). Estudos mostraram que nas décadas de 60 e 70 o risco de infecção por TB foi aumentando entre contatos de casos de TB comparados com a população em geral (Andersen, & Geser, 1960; Roelsgaard e cols, 1964; Raj

Narain, 1966; Grzybowski e cols, 1975). Possivelmente o risco à infecção aumentou devido à intimidade entre o contato e o caso índice (Saiman e cols, 2001). Além disso, o grau de exposição de risco de infecção por TB depende da infectividade dos casos fontes de TB.

As medidas de prevenção, o controle dos esquemas terapêuticos, esclarecimento sobre o diagnóstico e as investigações epidemiológicas facilitariam muito a identificação e o tratamento dos pacientes com TB e possivelmente as chances de infecção da população diminuiriam. Para um melhor controle da infecção pelo *M.tb* é necessário à elaboração de esquemas terapêuticos mais eficazes e esclarecimento quanto à importância do tratamento, assim como, um melhor acompanhamento dos contatos de pacientes com TB nas formas bacilíferas.

3.6. Resposta Inata e Adaptativa da TB

Organismos multicelulares têm evoluído sob pressão seletiva imposta por microorganismos infecciosos, e têm desenvolvido mecanismos de defesa que são disparados pela infecção e protegem o hospedeiro destruindo o agente invasor e/ou neutralizando os fatores responsáveis por sua virulência. A resposta imune pode ser inata ou adaptativa por um intercâmbio bem estabelecido. A caracterização dos mecanismos usados pelo sistema imune adaptativo antígeno específico para identificar seus alvos, foi uma das grandes realizações da imunologia molecular (Crevel e cols, 2002).

A resposta adaptativa utiliza vários receptores clonais gerados através de mecanismos somáticos (ex: rearranjos gênicos) durante a ontogênese de cada organismo individual. Estes alvos antigênicos das células T e B são múltiplos e variam altamente. Em contraste, o sistema imune inato reconhece patógenos

microbianos, através de um número relativamente pequeno de moléculas/receptores da linhagem germinativa, são capazes de reconhecer uma grande variabilidade e heterogeneidade de patógenos. Estes patógenos altamente heterogêneos são inicialmente apresentados às células do sistema imune como moléculas não específicas, normalmente compartilhadas pela maioria dos patógenos, chamadas de perfis de moléculas associadas à patógenos (*PAMPs: pathogen associated molecular patterns*). PAMPs são produtos altamente conservados produzidos por numerosos microorganismos. As células do hospedeiro reconhecem PAMPs dos patógenos, discriminando entre o próprio e não próprio. Alguns dos exemplos de PAMPs nos patógenos são: lipopolissacarídeo (LPS), peptoglicano (PGN), ácido lipoprotéico (LTA), *motif* guanina fosfato citosina não metilada do patógeno (CpG), fita dupla do RNA de vírus e componentes de manose da parede celular. O LPS é um componente da parede bacteriana de muitas bactérias Gram-negativas, já o PGN é um componente da parede celular de bactéria Gram-positiva, Gram-negativa e micobactérias (Medzhitov & Janeway, 1997).

O reconhecimento inato do PAMPs é mediado por um conjunto de moléculas/receptores codificadas por uma linhagem germinativa não clonal que são conhecidas como moléculas/receptores de perfil de reconhecimento (PRMs/PRRs) que possuem especificidade variada. Os PRRs são expressos em células de vertebrados e são responsáveis pelo primeiro encontro com o patógeno durante a infecção (Medzhitov & Janeway, 1997). Estes complexos: PRRs/PRMs podem ser distribuídos em três classes funcionais distintas: 1) receptores endocíticos; 2) proteínas secretadas e 3) receptores de sinalização (Kopp & Medzhitov, 1999) .

Os receptores endocíticos incluem o receptor de manose (MR) do macrófago, o receptor *scavenger* do macrófago (SR) e as integrinas CD11b e CD18 que facilitam

a opsonização e a fagocitose (Medzhitov & Janeway, 1997; Kopp & Medzhitov, 1999).

As proteínas secretadas incluem LLM, C1q, surfactantes pulmonares A e D (SP-A e SP-D) e proteína C reativa (CRP). Proteínas secretadas promovem a opsonização, processo que favorece a fagocitose. O sistema complemento destrói os microorganismos ligados a proteínas secretadas (Crevel e cols, 2002).

LLM pertence à subfamília de proteínas chamadas colectinas é capaz de opsonizar diversos micro-organismos *in vitro* e foi descrita como sendo capaz de favorecer a fagocitose de micobactérias (Neth e cols, 2000).

As LLMs desempenham um importante papel no sistema imune inato, interagindo diretamente com receptores de superfície das células apresentadoras, promovendo opsono-fagocitose que podem ser dependente ou independente da ativação do sistema complemento, além disso, estas proteínas estão envolvidas no processo inflamatório e promoção de apoptose (Turner, 2003).

Os bacilos aspirados pelo indivíduo podem alcançar os alvéolos pulmonares, onde são fagocitados por macrófagos alveolares. Normalmente as bactérias são destruídas quando fagocitadas pelo macrófago, entretanto *M.tb* pode não ser destruído pelo macrófago e, após a sua ingestão, ocorre indução da produção de IL1, IL2 e IL12. Por estas células, que irão sensibilizar linfócitos CD4+ Th1 e linfócitos NK a secretar IFN γ , que conseqüentemente proporcionará a ativação dos próprios macrófagos a produzirem radicais de oxigênio e nitrogênio, que irão destruir ou inibir o crescimento *M.tb*, formando o granuloma fibrosado. Em torno de 20 a 40 dias após o controle da infecção, linfócitos T CD4+ começam a produzir interleucina-4 (IL4), que é a citocina ligada à resposta linfocitária do tipo Th2, com o objetivo de

inibir os mecanismos efetores da resposta imune mediada por células e assim controlar o processo, auxiliando no controle da inflamação.

Caso o bacilo consiga escapar destes mecanismos microbicidas e se multiplicar dentro dos macrófagos, a própria IL2 estimula o linfócito T CD8+, que é citotóxico, a alcançar e lisar precocemente o macrófago ou induzir a antecipação do fenômeno chamado apoptose ou morte celular programada.

Por alguma razão ainda não elucidada, alguns indivíduos produzem um padrão de resposta imunológica permissiva ao *M.tb*, ou seja, em vez de resposta Th1, ocorre resposta Th2, com predomínio de estimulação de citocinas envolvidas na produção de Imunoglobulina E (IgE), no recrutamento de eosinófilos e na inibição de linfócitos Th1 e linfócitos NK, produzindo uma imunidade não protetora que, no caso da TB, corresponde à evolução para a doença.

Rotas distintas de entrada para *M.tb* podem induzir diferentes sinais de transdução, ativação imune e sobrevivência intracelular da micobactéria. Por exemplo, fagocitose mediada pelo receptor $Fc\gamma$ está diretamente ligada a uma resposta inflamatória, e a ligação com o receptor de complemento não tem esta ligação (Aderem, 1999; Underhill e cols, 1999). A sobrevivência intracelular é favorecida quando *M. tb*. entra na célula via receptor CR1 comparado à entrada via CR3 ou CR4 (da Silva e cols, 1989).

A fagocitose de micobactéria opsonizada por SP-A, pelos macrófagos alveolares suprime a reação de intermediários de nitrogênio (Pasula e cols, 1999), um dos potenciais mecanismos microbicidas da célula fagocítica (Nozaki e cols, 1997; Chan e cols, 1992; Arias e cols, 1997). Espécies virulentas de micobactérias são fagocitadas através do MR, enquanto espécies atenuadas não são (Schlesinger, 1993), sugerindo que esta rota de entrada é uma desvantagem para a micobactéria.

A compreensão dos mecanismos que *M.tb* utiliza para entrar na célula hospedeira, assim como os mecanismos que são utilizados pelo organismo para permitir sua entrada, reconhecimento e apresentação, mas também as razões porque sua falha leva ao desenvolvimento da doença ativa é relevante para um futuro controle desta pandemia. Devido ao papel destes genes na imunidade inata e adaptativa, suas variações genéticas podem ter um maior impacto na defesa do hospedeiro ou patogênica de doenças inflamatórias.

3.7. Imunogenética e a Tuberculose

O desenvolvimento de estudos populacionais que permitem uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento da TB ativa e/ou TB latente tem se tornado um importante campo de investigação. O estabelecimento de uma resposta imune eficiente envolve várias moléculas, das quais, as citocinas têm um papel relevante. As citocinas atuam numa complexa rede coordenada, na qual induzem e reprimem não somente sua própria síntese como também a de outras citocinas e receptores. Além disso, é fato conhecido que várias citocinas são pleiotrópicas enquanto outras são redundantes, prejudicando assim os estudos para análise tanto da função individual de uma citocina como a possível influência de polimorfismos genéticos na regulação da expressão gênica e desenvolvimento de doença e/ou infecção (Balkwill & Burke, 1989).

A patogênica de muitas doenças infecciosas, auto-imunes e malignas, parece ser influenciada pelo equilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Uma vez que o nível de produção de diferentes citocinas varia entre indivíduos expostos ao mesmo estímulo, provavelmente as diferenças no perfil genético levam

a regulação da expressão gênica podendo refletir na resposta. Assim, o perfil genético tem sido fortemente relacionado com a variação na produção de citocinas (Bidwell e cols, 1999). Dados da literatura relatam que polimorfismos genéticos presentes dentro da região regulatória de vários genes que codificam para citocinas estão associados com regulação positiva ou negativa da expressão gênica, levando a diferença na produção das mesmas. Ultimamente, SNPs presentes na região promotora de diferentes genes de citocinas têm sido descritos e associados com susceptibilidade e/ou proteção a um grande número de doenças étnicas diversas.

Dados epidemiológicos derivados de estudos com gêmeos claramente indicam que, a susceptibilidade ao adoecimento por TB apresenta determinante genético (Comstock, 1989). Vários estudos têm relatado um aumento na frequência de HLA-DR2 em pacientes com TB pulmonar (TBP) na Indonésia (Bothamley e cols, 1989) e na Índia (Brahmajothi e cols, 1991; Rajalingam e cols, 1996). Estudos de associação baseados em família, também têm mostrado evidências que sugerem o papel do HLA-DR2 na TB. Recentes estudos com métodos de tipagem molecular que utilizaram DNA na análise têm mostrado aumento na frequência de DRB1*1501 (um alelo DR2) em pacientes com TBP na Índia (Mehra e cols, 1995; Ravikumar e cols, 1999), no México (Teran-Escandon e cols, 1999) e dois alelos DQ1, DQB1*0503 na Camboja (Goldfield e cols, 1998) e DQB1*0501 no México.

A proteína 1 de macrófago associada a resistência natural (NRAMP1) foi inicialmente identificada como um gene (*Bcg*) de susceptibilidade a infecção por micobactéria em camundongos (Skamene e cols, 1982). Seu homólogo humano foi identificado, clonado, e variações deste gene têm sido analisadas em relação à susceptibilidade ao desenvolvimento de TB ativa em várias populações. O primeiro relato, que referiu uma associação entre susceptibilidade a TB ativa e o gene

NRAMP1 consistiu num estudo do tipo caso controle conduzido na Gâmbia, no qual quatro diferentes polimorfismos no gene *NRAMP1* foram identificados e associados com susceptibilidade a TB ativa (Bellamy e cols, 1998). Posteriormente, a associação de polimorfismo neste gene com susceptibilidade a TB foi também relatada na Korea (Ryu e cols, 2000), no Japão (Gao e cols, 2000) e entre famílias aborígenas canadenses (Greenwood e cols, 2000).

Mais recentemente foi mostrada que a forma ativa da vitamina D, $1\alpha,25\text{-}(\text{oh})_2\text{D}_3$, pode estar relacionada com susceptibilidade e/ou proteção a TB, portanto a mesma está sendo responsável pela diferenciação, crescimento e função de vários tipos celulares, incluindo células dendríticas (Rockett e cols, 1998; Rook e cols, 1986).

A influência de polimorfismos no receptor do gene da vitamina D tem sido investigada. Em um estudo do tipo caso-controle foi investigado a presença de um polimorfismo no éxon 9 no receptor do gene da vitamina D (alelos T/t) na Gâmbia. Uma maior proporção de homozigotos (tt) foi observada entre pacientes com TBP quando comparados com controle (Bellamy e cols, 1999). Em um estudo realizado com pacientes hansenianos na Índia (Roy e cols, 1999), foi verificado que a frequência de homozigotos tt foi maior em pacientes que apresentavam a forma tuberculóide quando comparada com controles e o alelo T em homozigose TT foi mais freqüente entre pacientes com a forma lepromatosa quando comparados com controles.

A citocina pró-inflamatória IL-1 β desempenha um importante papel na defesa contra micobactéria em camundongos, como sugerido por estudos com camundongos deficientes para o receptor de IL1 (Juffermans e cols, 2000). O papel de polimorfismos nos genes que codificam para IL-1 β e o antagonista do receptor de

IL-1 (IL-1RA) foram recentemente investigados em uma população de Asiáticos Gujarati que vivem na Inglaterra (Wilkinson e cols, 2000). A frequência do alelo IL-1RA foi maior em pacientes com TB ativa quando comparados com controles. O alelo de 186 pb do IL-1 α foi maior no grupo de pacientes comparado com os controles. Entretanto, entre pacientes com tuberculose pleural, foi super expresso o alelo IL-1 β e não o alelo IL-1RA A2.

Em um estudo realizado no Brasil por Oliveira e colaboradores em 2004, a presença do alelo -238A do gene TNF- α foi associada com susceptibilidade à infecção, ocorrência de doença e gravidade das formas clínicas de TB. Por outro lado o alelo -308 foi associado com proteção ao desenvolvimento da TB.

Amim e colaboradores em 2004 avaliaram a distribuição do polimorfismo na posição +874 T/A (íntron) do gene que codifica para IFN- γ em pacientes com tuberculose ativa e um grupo de profissionais de saúdes sadios. Análises das frequências genóticas e alélicas nos dois grupos mostraram um aumento significativo do genótipo AA e do alelo A no grupo de pacientes com TB em relação ao grupo de contatos e um aumento significativo do genótipo TT no grupo de contatos com PT+. A análise, de acordo com gênero, mostrou uma associação significativa do genótipo AA com o grupo de pacientes e do genótipo TT com o grupo de contatos do sexo masculino. Foi observada uma associação significativa entre o genótipo AA com a conversão da resposta a PT e entre o heterozigoto AT com a não conversão, ambos entre as mulheres. E também foi verificada uma frequência aumentada do homozigoto AA entre os homens no grupo de não convertores.

Polimorfismos nos 4 locus do gene *SLC11A1* ou '*NRAMP1*', não mostrou associação estatisticamente significante entre as variantes do gene *SLC11A1* e susceptibilidade para TB nos indivíduos com ascendência Européia, enquanto outro

grupo mostrou uma associação significativa entre os indivíduos da Ásia (exceto a variante INT4), os africanos (exceto a variante 3_UTR) e a população como um todo (exceto a variante INT-4) (Liu e cols, 2006).

Um estudo de caso-controle realizado na Tunísia incluiu um pequeno grupo de pacientes com TB. A frequência de pacientes carregando o alelo T do gene Toll-like receptor 2 (*TLR2*) na posição 677Trp, mostrou um aumento significativo nos pacientes com TB comparados com o grupo dos contatos. Os autores relataram que polimorfismos na posição R753Q do gene *TLR2* foi associado com um aumento de risco para o desenvolvimento da TB (Texereau e cols, 2005).

Polimorfismos no gene que codifica para o TLR2 mostraram uma forte associação com diminuição na resposta de macrófagos ao *M. leprae* e *M.tb*. Foi mostrado também que uma mutação no gene *TLR2* em camundongos (*TLR2*-P681H) atua como inibidor da sinalização de TLR2, e a expressão desta mutação em linhagens de células RAW inibiu a produção de TNF- α em resposta *M.tb* virulento e avirulento (Underhill e cols, 1999). Reiling e cols (2002) avaliaram resistência à infecção aérea pelo *M.tb* em camundongos *knockout* (mutante) para TLR2, TLR4, CD14 e um grupo controle normal, e mostraram que camundongos *knockout* para TLR2 tinham uma resistência menor a TB após altas exposições, mas nenhuma diferença foi observada entre os expostos a baixas doses de infecção aérea. Estes dados sugerem que a presença do gene *TLR2* possa ser um fator importante a ser considerado na susceptibilidade em desenvolver doença (Bochub e cols, 2003).

Em nosso meio foi realizado um estudo com os genes *TLR2* (Arg753Gln) e *TLR4* (Thr399Lle) onde foi observado que esses genes mostraram uma maior ocorrência entre os contatos adultos com tuberculose pulmonar que apresentavam

conversão à prova tuberculínica ou adoeceram por TB. A presença de tais mutações pode ser utilizada como marcador de risco para infecção e/ou adoecimento. (Simião Silva, 2007).

3.8 Papel da LLM

O receptor de manose é uma proteína de 175 kDa que é expressa nas superfícies de células apresentadoras de antígenos como os macrófagos (Stahl & Ezekowitz, 1998) e células dendríticas (Sallusto e cols, 1995) e se liga as bases ligantes do reconhecimento de grupos de manose terminal. Este critério de ligação facilita o receptor de manose e torna ideal para reconhecer patógenos que contém glicoprotéínas na superfície, inclusive *M.tb* (Weis e cols, 1998). A expressão do receptor de manose é altamente regulada e totalmente dependente do ambiente de citocinas da resposta pulmonar e ativação do estado da célula.

O sistema respiratório permanece constantemente inalando substâncias e agentes infecciosos, propiciando defesas naturais que incluem mecanismos, respostas e mecanismos celulares, assim como uma variedade de área sintetizada e sistematicamente derivada de moléculas de defesa. Recentes estudos têm focado muita atenção para importância das proteínas associadas à Surfactantes, especialmente a pulmonares Surfactante A (SP-A) e pulmonares Surfactante D (SP-D), deste da resposta inata, natural e sistema de defesas não clonal (Sastry & Ezekowitz, 1993; van Golde, 1995).

3.9. Polimorfismo no gene LLM (*LLM2*)

O nome de colectina é derivado da palavra “colágeno” e “lectina”. Estas moléculas são compostas de quatro regiões diferentes: uma região terminal-N, uma região de colágenos, um espirado hélice- α e um domínio de lectina terminal-C. Com exceção da região terminal -N, essas regiões ou tipos de domínios são também

encontrados em outras moléculas. A presença de uma região como colágeno significa que essas moléculas contêm uma estrutura trímica. Isto é, um pré-requisito para tornar suas funções mais apropriadas; e o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), uma colectina única de afinidade por carboidratos, é fraca, mas a organização trímica permite uma trivalência e daí uma forte interação entre colectinas e superfície alvo contendo carboidrato. A LLM em humanos existe em várias formas oligoméricas assim como, trimêras, tetrâmeras e pentâmeras (Dahl e cols, 2001). (FIGURA 4)

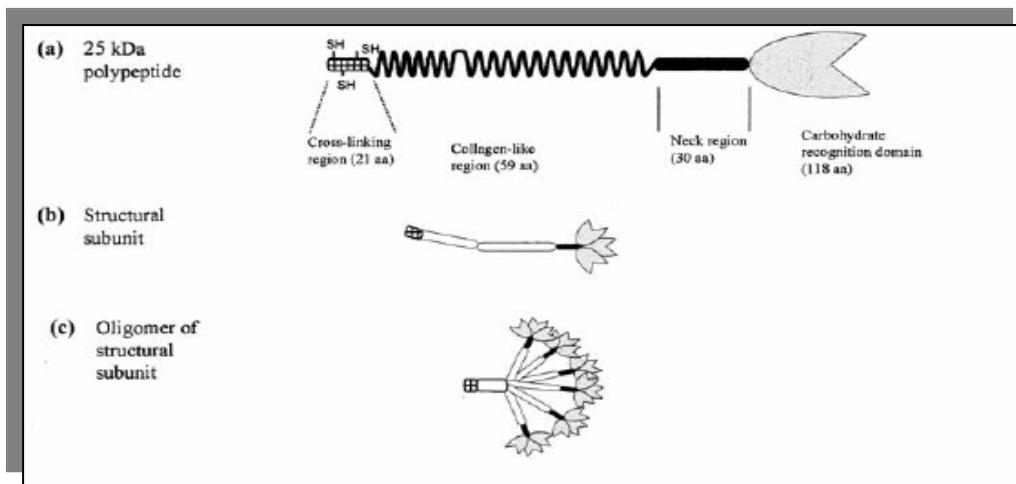


Figura 4: Estrutura e Organização da LLM (Prensanis e cols, 2003).

Alguns trabalhos têm mostrado a importância estrutural de CRD (Weis e cols, 1991; Weis & Drickamer, 1994; Ezekowitz e cols, 1989; Sheriff e cols, 1994). Cada CRD se liga ao cálcio, permitindo uma forma coordenada para a ligação com 3- e 4-grupos de hidroxila de açúcares específicos, incluindo manose, N-acetil-d-glucosamina, N-acetil-manosamina, frutose e glicose. As três CDRs em cada estrutura são separadas por 45 -Å de distância (Sheriff e cols, 1994).

Muitas lectinas já foram isoladas de diversas classes de seres vivos, desde animais (vertebrados e invertebrados) até plantas. (Turner, 1996). As lectinas no soro foram descritas por Robinson e cols em 1975 e a proteína foi isolada em 1978

por frações citosólicas de fígado do coelho por Kawasaki e cols. Subseqüentemente, Wild e cols em 1983 foram capazes de isolar LLM do fígado de humanos e de ratos.

A LLM foi primeira isolada e clonada em hepatócitos e o fígado é considerado o local principal de síntese desta proteína (Summerfield & Taylor, 1986). Entretanto, vários estudos clínicos e epidemiológicos sugeriram que LLM pode ser sintetizada em tecidos não hepáticos. Dados experimentais relataram o conceito de síntese de LLM em tecidos não hepáticos. Monócitos humanos e células dentríticas derivadas de monócitos são ambas capazes de sintetizar LLM *in vitro* (Downing e cols, 2003).

SPA e a maioria das LLMs apresentam formas complexas como buquê com seis trímeras. O grau de oligomerização difere entre proteínas, mas pode também variar dentro da população molecular. Somente complexos grandes como, por exemplo, pentâmeros ou hexâmeros, participam de respostas biológicas completas em termos de estimulação de macrófagos e ativação de complemento. Entretanto, a organização estrutural de SP-A e a de LLM é similar a do sistema complemento de C1q, ampliando a analogia entre essas proteínas para abranger ambas as funções e estruturas. Portanto, o grau de oligomerização de LLM parece estar mais baixo no fígado do que no soro, e a MBL-C de ratos tem sido relatado ter um único trímero (Wallis & Drickamer, 1997) como colectinas 43 (CL-43) (Holmskov e cols, 1995).

A organização estrutural permite uma alta-afinidade de interação entre domínios de lectina de LLM e oligossacarídeos de patógenos, resultando em uma mudança conformacional da estrutura multímera da LLM e ativação de moléculas associadas a proteases serinas (MASP). LLM é estruturalmente e funcionalmente similar a C1q, iniciador da via clássica do complemento, não possui domínios de lectina ou atividade de se ligar a carboidratos (Turner, 1996), embora a LLM pode se ligar a patógenos independente de anticorpos (Worthley e cols, 2005).

A LLM no plasma existe em complexo com MASPs, MASP-1 (Matsushita & Fujita, 1992), MASP-2 (Thiel e cols, 1997) e MASP-3 (Dahl e cols, 2001) e com uma variante pequena de MASP-2, conhecida como Map-19 (Schwaeble e cols, 2002; Stover e cols, 1999) ou sMAP (Takahashi e cols, 1999). Essas proteínas associadas não são igualmente distribuídas entre os diferentes oligômeros de LLM (Gadjeva e cols, 2004). As MASPs são ativadas quando a LLM se liga a modelos de carboidratos (Vorup-Jensen e cols, 2000).

MASP-2 e Map19 são codificadas pelo mesmo gene *MASP2/MAP19* em cromossomo 1. Similarmente a MASP-1 e MASP-3 são codificadas pelo mesmo gene *MASP-1/3* em cromossomo 3 (Worthley e cols, 2005). A MASP-2 ativa via complemento através da clivagem de proteínas C4 e C2 (Vorup-Jensen e cols, 2000; Rossi e cols, 2001).

O complemento é um complexo sistema de defesa do hospedeiro designado para eliminar patógenos. Consiste aproximadamente de 30 soros e proteínas associadas à membrana, entretanto, possui uma importante função no início da infecção contra agentes microbianos. Ativação do complemento pode ocorrer através de três diferentes vias. A primeira é a Via Clássica requer a presença de anticorpos e envolve ativação inicial de C1 e subseqüentemente, reação com C4 e C2. A segunda é a Via Alternativa que ocorre na ausência de anticorpos, diretamente por estruturas de superfície de microorganismos. E a última é a Via LLM que é ativada na ausência de C1 e anticorpos, pois a LLM se liga a carboidratos presentes na superfície de microorganismos invasores (Thiel e cols, 1992). LLM pode também agir como uma opsonina, aumentando então a captura de microorganismos por células fagocíticas (Kuhlman e cols, 1989; Walport, 2001; Walport, 2001).

A via da LLM pode também ser ativada por uma proteína chamada ficolina. Esta por sua vez, apresenta estruturas similares a das colectinas, possuindo domínios de colágenos ligantes, domínios com fibrogênio, contendo propriedades ligantes de açúcares. As L-ficolina e H-ficolina são fatores humorais sintetizados pelos hepatócitos, embora H-ficolina tem sido observada em fluido de alvéolo pulmonar e na bile (Akaiwa e cols, 1999). Em contraste, a M-ficolina é encontrada nas Células Monucleares do Sangue Periférico e Células Polimorfonucleares e células epiteliais do pulmão tipo II (Liu e cols, 2005). As ficolinas são também encontradas em complexos com a MASPs e são consideradas diferentes em relação a especificidade a ligantes comparadas com LLM (Lynch e cols, 2004).

Polimorfismos genéticos podem contribuir para variação na expressão, assim como na estrutura da proteína em algumas situações (Bidwell e cols, 1999). Variações importantes nas concentrações séricas de LLM têm sido associadas à presença de estados polimórficos.

A variação nos níveis de LLM pode ser atribuída a três mutações estruturais no gene *LLM2*, que resultam em polimerização defeituosa e a interação de vários polimorfismos na região promotora que influenciam na transcrição do gene. As mutações estruturais têm sido observadas em uma frequência superior a 15% nas populações estudadas (Turner e cols, 1996). As substituições de base única nos códons 52, 54 e 57 do éxon 1 são: Arg 52- Cys (variante D), Gly 54- Asp (variante B) e Gly 57- Glu (variante C), respectivamente. Dentro da região promotora, substituições nucleotídicas nas posições -550, -221 e + 4, dando origem às variações H/L, Y/X e P/Q influenciam a expressão de LLM (Presanis e cols, 2004) (TABELA 1).

TABELA 1: Mutações estruturais no éxon 1 do gene *LLM2*

Proteína normal	Arg	Gly	Gly
DNA normal (alelo A)	CGT	CGC	GGA
Códons	52	54	57
Mutações	TGT	GAC	GAA
Alelos mutantes	D	B	C
Proteína mutante	Cys	Asp	Glu

A concentração de LLM no soro em grande parte é determinada geneticamente e estudos prévios têm indicado que três variantes alélicas B, C e D e alguns haplótipos na região promotora do gene tem um efeito dominante nos níveis desta proteína (Madsen e cols, 1995; Steffensen e cols, 2000).

Super e colaboradores (1989) observaram que a perda relativa de LLM representa um defeito de opsonização em pessoas contaminadas com fungos, porém são mais propensas para infecções recorrentes, apesar da imunidade adaptativa satisfatória. E foi subseqüentemente mostrado que a substituição de aminoácidos interrompe a hélix do colágeno em códon 54 (alelo B) realçando baixos níveis de LLM (Sumiya e cols, 1991).

Vários estudos têm associado à diminuição dos níveis de LLM no soro com a presença de polimorfismos e susceptibilidade a doenças infecciosas e auto-imunes (Super e cols, 1989; Summerfield e cols, 1995; Summerfield e cols, 1997). Baixos níveis desta proteína foram associados com polimorfismos no éxon 1 de pacientes com doenças auto-imune como Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (Davies e cols, 1995; Super e cols, 1989) e artrite reumática (Graudal e cols, 1998; Garred e cols, 2000), assim como em pacientes com história progressiva de AIDS (Garred e cols, 1997), e fibrose cística (Garred e cols, 1999).

A associação de homozigose para mutação no alelo B (éxon 1) (Matsushita e cols, 1998) foi observada em pacientes com hepatite C crônica que não respondiam ao tratamento com interferon.

A presença de mutação no éxon 1 (códon 52, 54 e 57) foi associada com susceptibilidade a TB na população Indiana. No entanto, o perfil genético associado aos níveis elevados de LLM foi considerado como responsável por uma desvantagem competitiva face à infecção por *M.tb* (Selvaraj e cols, 1999). A presença do alelo B do éxon 1 foi associado com susceptibilidade a TB entre africanos (El Sahly e cols, 2004).

O estudo de fatores genéticos do hospedeiro e sua contribuição no desenvolvimento de doenças infecciosas orientam questões fundamentais no entendimento de enfermidades como a TB. O estudo de imunogenética tem estimulado pesquisa em novos fármacos assim como vacinas. Contudo, a despeito da enorme variabilidade genética nas diferentes populações, se faz necessário o entendimento das bases genéticas da nossa população brasileira, que apresenta características bem distintas das populações relatadas na maioria dos estudos. A resposta imune a TB ativa e/ou infecção também é controlada por fatores genéticos (entre outros) (Casanova & Abel, 2002). O estudo da variabilidade genética (principalmente em genes que codificam para citocinas e seus receptores), e a associação com TB compreendem um caminho promissor, pois podem contribuir na identificação de potenciais marcadores de susceptibilidade e proteção à infecção pelo *M.tb*

O interesse em investigar os SNPs aumentou muito desde conclusão do projeto genoma humano. E é amplamente aceito que os SPNs representam as formas mais abundantes de variações genéticas entre os indivíduos. Na realidade,

pode ser considerada uma poderosa ferramenta para identificação de genes envolvidos em Mendeliano, poligênico e doenças multifatoriais (Gray e cols, 2000). Por isso são fundamentais as pesquisas nesta área, assim podemos descrever as associações de susceptibilidade/ou proteções em determinados genes, buscando uma melhor terapia para cada paciente, contribuindo para qualidade de vida da população.

3.10. Doenças Associadas aos Polimorfismos de LLM

Existe um interesse substancial no papel que a LLM pode ter na infecção por HIV, estudos recentes mostraram que LLM purificada foi capaz de se ligar a células infectadas por HIV e diretamente inibiu à infecção do HIV nos linfoblastos. LLM se liga a gp120 glicoproteínas de células de linhagens de derivados isolados (Ezekowitz e cols, 1989) e isolados primários (Saifuddin e cols, 2000) ativando o sistema complemento, nos quais apresentam um rico resíduo de manose e é crucial para interações dos vírus com marcadores de superfícies celulares, portanto CD4 que estão localizados na superfície das células T são alvos dos vírus (Haurum e cols, 1993).

Em alguns estudos parece que a insuficiência de LLM predispõe para susceptibilidade para infecção por HIV, mas dados sobre essa influência em progressão da doença são conflitantes. Um estudo de coorte prospectivo em Danish com adultos infectados por HIV revelou infecção e associação de susceptibilidade a doença com variantes alélicas de LLM e baixos níveis no soro. Em recém-natos italianos adquiriram à infecção por HIV, o alelo H da região promotora (associação com altos níveis de LLM) parece proteger contra infecção por HIV (Boniotto e cols, 2000), embora não houve diferença em susceptibilidade a infecção baseados em

alelo B de LLM que foi mostrado em crianças com HIV negativa ou positiva de mães portadora do HIV (Amoroso e cols, 1999).

Polimorfismos no gene de LLM têm sido associados com aumento de susceptibilidade para infecção por HIV-1 em crianças brasileiras (Boniotto e cols, 2003) e com progressão acelerada da doença em crianças italianas infectadas por HIV-1 (Amoroso e cols, 1999) nascidas de mães soro-positivo.

LLM estimula fagocitose de *Neisseria meningitidis* por neutrófilos, macrófagos e monócitos, aumentando a proporção de organismos mortos, embora module a resposta imune através da redução de citocinas pro-inflamatórias (Jack e cols, 2001). Em um estudo envolvendo populações negras do Sul da África, o alelo B foi associado com proteção de meningite tuberculósica e doenças pulmonares (Hoal-van Helden e cols, 1999).

Altas freqüências de variantes alélicas B e C de LLM em muitas populações sugerem que estes alelos podem conferir algumas vantagens biológicas (Lipscombe e cols, 1992; Garrede cols, 1994; Hoal-van Helden e cols, 1999). Uma delas é que LLM deficiente ajuda a proteger o hospedeiro contra infecção por parasitas intracelulares, como por exemplo, as micobacteria e leishmania. Uma outra proposta é que essas altas freqüências de mutações são observadas em regiões tropicais e podem servir para redução do efeito excessivo e danoso da ativação do complemento (Lipscombe e cols, 1992). Ambas as variantes alélicas B (Yuen e cols, 1999) e D (Thomas e cols, 1996) têm sido associadas com a hepatite B crônica (HBV).

A insuficiência de LLM em alguns indivíduos susceptíveis às infecções recorrentes ou doenças auto-imunes (Kilpatrick, 2002; Vasta e cols, 1999) e altos níveis de LLM está associado com algumas desvantagens biológicas (Lipscombe e

cols, 1992; Matsushita e cols, 2001). Considerando que a asma é uma doença inflamatória crônica em pacientes susceptíveis geneticamente e em geral associado com exposição à alérgenos na infância, LLM pode ser um fator contribuinte para inflamação asmática em crianças (Uguz e cols, 2005).

Tem sido sugerido que baixos níveis de LLM são associados com várias doenças. A associação entre os genótipos, níveis de LLM, susceptibilidade a doença, e aplicações terapêuticas de LLM têm sido muito discutidos (Kilpatrick, 2003; Casanova & Abel, 2004). Além do mais o papel da LLM em modificar a resposta inflamatória tem sido revisado (Jack & Turner, 2003).

Na tabela 2 estão apresentados estudos relevantes do gene *LLM2* em diversas populações.

TABELA 2: Doenças associadas aos polimorfismos de LLM.

Gene <i>LLM2</i>	Doença	Local	Referência
Estudo Funcional e Haplotípico (éxon 1 e região promotora).	Lúpus Eritematoso	China	Huang e cols, 2003.
Variantes Alélicas	Artrite Reumatóide	Dinamarca	Garred e cols, 2000.
Variantes Alélicas	Hepatite C	Japão	Matsushita e cols, 1998
Variantes Alélicas e região promotora	Fibrose Cística	Dinamarca	Garred e cols, 1999.
Variantes Alélicas	Meningite tuberculósica	Gâmbia	Hoal-van Helden e cols, 1999.
Estudo funcional (Variantes Alélicas)	Tuberculose pulmonar	Índia	Selvaraj e cols, 1999.
Estudo Funcional	Síndrome de Sjögren	Japão	Tsutsumi e cols, 2001.
Estudo Funcional (Variantes Alélicas)	Leishmania	Brasil	Santos e cols, 2001.
Estudo Funcional (B, C e D)	Tuberculose Pulmonar	Índia	Selvarj e cols, 2006.
Estudo Funcional e Haplotípico (éxon 1 e região promotora)	Asma	Japão	Wang e cols, 2007;
(Variantes Alélicas)	HCV	Brasil	Segat e cols, 2007.
Estudo Funcional (Variantes Alélicas)	AIDS	Dinamarca	Garred e cols, 1997.

4.0 Método e Modelo Experimental

4.1. Modelo de Estudo

Um estudo descritivo para:

- Estimar a prevalência dos polimorfismos no éxon 1 da LLM (alelos 52, 54 e 57) em contatos adultos de pacientes com TB pulmonar.

4.2. Período do Estudo

A população elegível para o estudo constitui em contatos adultos atendidos no Programa de Controle de TB Hospital no período de outubro de 1998 a março de 2004.

4.3. Local de Estudo

Centro Hospitalar Instituto de Doenças do Tórax (IDT) e Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Situado na cidade do Rio de Janeiro, na Ilha do Fundão, na Área Programática AP-3.1, o Centro Hospitalar da UFRJ é um centro nacional de referência para AIDS e para tuberculose e referência estadual para doenças em geral. Dispõe de 527 leitos, dos quais 20 leitos são específicos para o atendimento de paciente infectado pelo HIV e 20 leitos para o atendimento de pacientes com pneumopatias. Atualmente, o Centro Hospitalar dispõe de 12 leitos para isolamento respiratório (isoladamente de paciente com suspeita de tuberculose pulmonar). São atendidos e acompanhados, anualmente no Centro Hospitalar, cerca de 180 pacientes com tuberculose, 100 na forma pulmonar (60 bacíferos) com média de 3 contatos por indivíduo, sendo 20% dos pacientes infectados pelo HIV; em 25% deles, o diagnóstico de TB é realizado no período de internação ou no atendimento ambulatorial.

4.4. População de Referência

Contatos adultos de pacientes com diagnóstico de TB pulmonar confirmado bacteriologicamente, atendidos no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ.

4.5. Pacientes do Estudo (elegíveis)

Foram considerados elegíveis para o estudo, contatos adultos de pacientes com diagnóstico de TB pulmonar confirmado bacteriologicamente, incluídos na coorte de contatos do Programa de Controle de TB Hospitalar da UFRJ, no período de estudo.

4.6. Aspectos Éticos

Os procedimentos relacionados a este estudo não trouxeram risco significativo para aqueles que foram incluídos; todos os indivíduos incluídos foram submetidos à entrevista abordando dados da vida pessoal, a venopuntura e a telerradiografia de tórax. Todos os contatos de TB pulmonar foram submetidos à prova tuberculínica com PPD Rt23. Quando o indivíduo se sentiu esclarecido, foi convidado a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; o projeto foi submetido ao CEP da Faculdade de Medicina/HUCFF/UFRJ, aprovado com o número 007/04.

4.7. Participantes do estudo

Participaram do estudo os contatos que preencheram os critérios de inclusão. Os contatos responderam a um questionário padronizado e foram submetidos à coleta de amostra sanguínea, após a concordância por escrito no TCLE. Quando indicado, os contatos ou seu representante legal realizaram Prova Tuberculínica

(PT) e novo exame radiológico de tórax. Sempre que possível à informação foi coletada junto ao contato e seus familiares e os dados constantes da ficha do PCTH e prontuário médico. Neste estudo o protocolo de estudo e o TCLE foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa da FM-HUCFF e ao CONEP, por se tratar de estudo genético, aprovado com número de 007/04.

4.8. Critérios de Inclusão

Foram incluídos neste estudo contatos de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 15 anos, independentes de cor de pele que:

- a) eram contato de paciente com TB pulmonar com diagnóstico confirmado bacteriologicamente e exposição ≥ 4 horas por no mínimo uma semana que eram contatos de pacientes com TBP confirmada;
- b) Aceitaram a participação com assinatura do TCLE.

4.9. Critérios de Exclusão

Foram excluídos os contatos:

- a) que não foram encontrados na residência, o endereço era incorreto, a área residencial era de risco para realizar visita, ou não compareceram ao hospital para entrevista e coleta de amostra clínica;
- b) que evoluíram para óbito após seu atendimento no PCTH;
- c) cujo material clínico não tenha sido submetido aos exames constantes do protocolo de rotina de investigação diagnóstica.

4.10. Grupo de Estudo

Este estudo compreendeu amostras de sangue de contatos incluídos no seguimento ambulatorial do PCTH que: a) evoluíram para TB ativa; b) apresentaram

viragem da Prova Tuberculínica (PT), c) permaneceram com PT positiva, identificada desde o início de sua avaliação; d) continuaram com PT negativa durante o seguimento clínico.

4.11. Definição de Termos

Diagnóstico de tuberculose:

4.11.1. TB confirmada entre os casos índices: foi considerado quando ocorreu com cultura positiva para micobactéria com subsequente confirmação da espécie como *M. tb* em espécime clínico, por meio de testes bioquímicos. (Kent & Kubica, 1975; Brasil, Ministério da Saúde, 1994b).

4.11.2. TB ativa entre os contatos adultos: foi considerado nos casos com confirmação bacteriológica (ver acima) ou quando recebeu tratamento anti-TB na Unidade Básica de Saúde. Nestes casos, foram analisadas as informações constantes dos prontuários médicos nestas unidades, a presença de sua notificação no SINAM, aliada a resposta clínica e radiológica aos medicamentos anti-TB.

4.11.3. Contatos: Pessoas que residiam no mesmo domicílio do paciente com TB pulmonar ativa por um período mínimo de 3 meses, durante os 2 anos anteriores à data do diagnóstico e com período de exposição maior que 4 horas por semana.

4.11.4. Diagnóstico de TB latente, utilizada no estudo:

- a) Prova tuberculínica positiva inicial: induração cutânea igual ou superior a 10 mm.
- b) Prova tuberculínica negativa inicial: induração cutânea inferior a 10 mm na 1ª dose da prova tuberculínica ou após a 2ª dose realizada uma a três semanas após a 1ª dose (análise do efeito booster).

- c) Tuberculose infecção recente (viragem tuberculínica): quando a prova tuberculínica inicial apresentou induração inferior a 10 mm (resultado da 1ª ou 2ª dose, quando da avaliação do efeito booster) e no período de 4 a 12 meses ocorreu um aumento de induração igual ou superior a 10 mm na prova tuberculínica nos não vacinados com BCG ou nos vacinados com BCG há mais de 2 anos. Nos vacinados com BCG há menos de 2 anos, considerou-se viragem tuberculínica com um aumento de pelo menos 15 mm em relação da induração anterior.
- d) prova tuberculínica positiva final: induração cutânea igual ou superior a 10 mm ao final do seguimento ambulatorial em contato que não adoeceu por TB;
- e) prova tuberculínica negativa final: induração cutânea inferior a 10 mm ao final do acompanhamento ambulatorial em contato que não adoeceu por TB.

4.11.5. Definição da Prova tuberculínica segundo o Ministério da Saúde:

- a) indivíduos com induração da PT de 0 a 4 mm – não reator: indivíduo não infectado por *M.tb* ou outras micobactérias; infectado pelo *M.tb* ainda em fase de viragem tuberculínica (ou excepcionalmente em pacientes imunodeprimidos) considerado como infecção;
- b) indivíduos com induração da PT de 5 a 9 mm, foram considerados como reator fraco: indivíduo vacinado com BCG, infectado por *M.tb* ou outras micobactérias;
- c) indivíduos com induração da PT de 10 mm ou mais foram considerados como reator forte.

4.11.6 Diagnostico de infecção pelo HIV

Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV): reatividade ao teste de Elisa (*Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands*), realizado por duas vezes com

a mesma amostra de soro e confirmado posteriormente, em uma segunda amostra, pelo teste de Western-Blot (*Du Pont Company, Wilmington, Delaware, USA*).

4.11.7. Diagnóstico de Diabetes Mellitus

Presença de glicemia em jejum igual ou maior que 126 mg/dl em pelo menos duas ocasiões distintas.

4.11.8. Diagnóstico de alcoolismo

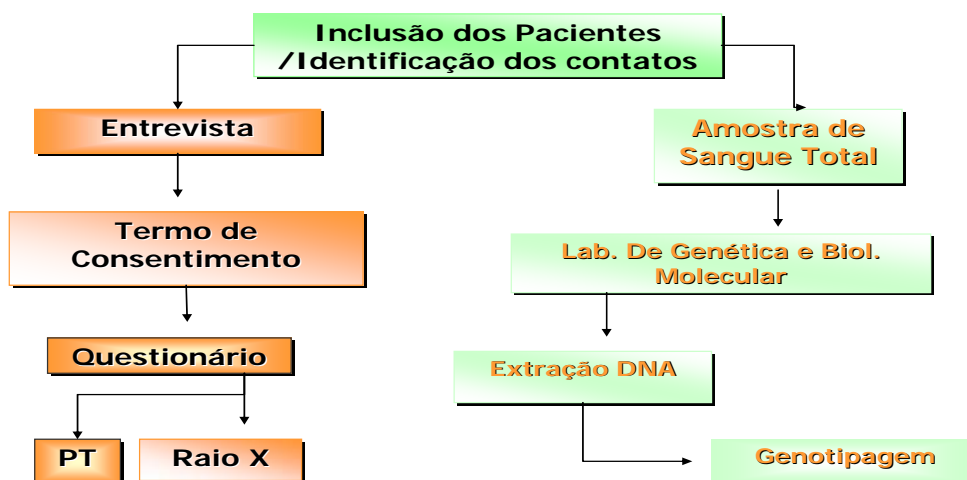
Foi utilizado o critério CAGE para o diagnóstico de alcoolismo (tais informações são coletadas rotineiramente no PCTH).

4.11.9. Diagnóstico de vacinação com BCG

Presença de cicatriz vacinal em deltóide direito.

4.12. Plano de Coleta de Dados

Coleta de dados



4.12.1. Entrevista dos contatos:

Após esclarecimento sobre os objetivos do estudo e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, os contatos responderam a um questionário padronizado contendo questões referentes a seus dados sócio-demográficos, clínico e laboratorial e tiveram sangue coletado para estudos genéticos e testagem anti-HIV, quando indicado (caso esta informação não estivesse disponível na ficha do PCTH).

4.12.2. Procedimentos:

Após consentimento por escrito dos contatos de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (ou seu representante legal, caso estivesse impedido de assinar tal documento), foram realizados:

1. Exame físico e entrevista padronizada que consistiu na análise de dados clínico-epidemiológicos.
2. Exames radiográficos do tórax em pósterio anterior-PA, quando indicado, foram analisados seguindo a rotina do PCTH/HUCFF).
3. Testes cutâneos: Os testes cutâneos foram realizados por profissionais treinados por técnicos que preenchiam os critérios do Ministério da Saúde, com grau de concordância intra-individual nas leituras da prova tuberculínica de mais de 80%. O teste tuberculínico foi praticado com 2UT de PPD RT23 (fornecido pelo Centers for Disease Control-CDC dos EUA), segundo a técnica de Mantoux, com leitura entre 48 e 72 horas.
4. Obtenção de sangue total: Um volume de 1,5 mL de sangue periférico foi coletado de cada contatos em tubo contendo anticoagulante. Após homogeneização por inversão o mesmo foi congelado a -20°C para posterior extração do DNA.

As variáveis constantes dos instrumentos de coleta de dados foram selecionadas baseadas em fatores de risco já conhecidos e descritos na literatura. Foram incluídos fatores que poderiam estar relacionados à predisposição para TB nos países em desenvolvimento, especialmente as relações familiares e as variáveis sócio-econômicas. Em relação ao paciente com TB pulmonar ativa foi analisado as seguintes variáveis constantes da ficha do PCTH ou dos prontuários médicos: tempo de sintomas respiratórios em semanas, presença ou não de cavidade no radiograma de tórax, carga bacilar da amostra de escarro (BAAR +, ++,+++) ou BAAR -/cultura+. Na entrevista dos contatos foram analisados as seguintes variáveis: a intensidade de exposição de cada membro da família dos casos índices de tuberculose pulmonar, a frequência de contato intradomiciliar, além das atividades compartilhadas durante o dia. Foram utilizadas as seguintes questões: (1) dormiu na mesma casa, mas não no mesmo quarto; (2) dormiu no mesmo quarto, mas não na mesma cama e (3) dormiu no mesmo quarto e na mesma cama. O contato diário foi avaliado da seguinte forma: “ocasional”, “parte do dia” (contato inferior a metade do dia) ou “a maior parte do dia” (contato superior a metade do dia) .Todos os contatos foram categorizados como parentes em primeiro grau (pais, filhos do mesmo casal), parentes em segundo grau (filhos de outros cônjuges, avos, netos, tios, sobrinhos), parentes em terceiro grau (primos em primeiro grau); parentes em quarto grau (primos por parte de mãe /ou pai,) ou quinto grau (primos em segundo grau).

4.13 Cálculo Amostral

De acordo com as frequências encontradas em diferentes populações (tabela 3), e assumindo uma população de 600 pessoas, para uma estimativa com variação aceitável de até 10% e intervalo de confiança de 95% foram necessários à inclusão de 80 indivíduos.

Tabela 3: Tabela descritiva do gene *LLM2*.

Gene	Mutação	Frequência	Referência
<i>LLM2</i>	Alelo B	28%	Turner, 1996
	Alelo C	60%	Turner, 1996
	Alelo D	7,6%	Turner, 1996
	Alelo B	42%	Madsen e cols, 1998
	Alelo B	46%	Madsen e cols, 1998
	Alelo C	24%	Madsen e cols, 1998
	Alelo D	6%	Madsen e cols, 1998

4.14. Análise dos dados

A frequência gênica foi testada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando o teste exato de Haldane (Weiss & Martinez, 2007). A significância estatística entre as proporções dos dados sócio-demográficos, resultados da prova tuberculínica, e a associação das frequências alélicas para os alelos B, C e D do gene *LLM2* foi avaliada usando o teste do qui-quadrado ou o teste exato de *Fischer*, quando indicado. Para a comparação entre variáveis contínuas e a frequência alélica foi utilizado o teste t de *student* ou não paramétrico quando indicado. O nível de significância escolhido foi de 5%. Os valores de *P* descritos são bicaudais (*two-tailed*).

Para a comparação dos diferentes alelos e as freqüências de infecção e doença tuberculosa entre os contatos foram descritas as razões entre as proporções (*Odds Ratio*) com intervalo de confiança de 95%. Os alelos G e C foram utilizados como categoria de referência na análise da associação entre a presença do mutante (A e T) e infecção e doença tuberculosa. Os dados coletados foram repassados ao Programa Access para Windows versão 2003. Para a análise estatística foi utilizado o programa SPSS 11.0 para Windows.

4.15. Cálculo das freqüências alélicas

As freqüências alélicas foram calculadas a partir da seguinte fórmula:

$$f(\text{alelo}) = \frac{n^{\circ} \text{ genótipo mutantes homocigoto} \times 2 + n^{\circ} \text{ genótipo heterocigoto}}{n^{\circ} \text{ de genótipos totais} \times 2}$$

5.0. Descrição de Métodos

5.1.1. Técnica de Mantoux (realização da prova tuberculínica)

O material utilizado para realização da PT foi o derivado protéico purificado (PPD), partida RT23, com 0,04 mg de tuberculina por 0,1 mililitros. O material foi proveniente da Dinamarca e diluído pelo Centro de Referência Professor Hélio Fraga, do Ministério da Saúde. Foi utilizada a técnica de Mantoux, com aplicação via intradérmica de 0,1ml de PPD na face volar do antebraço direito, por um profissional qualificado pelo Ministério da Saúde (MS). Foram utilizadas seringas descartáveis, com agulhas estéreis, não recicláveis, de 27 mm.

A leitura do teste foi realizada em 48-72 horas, após a aplicação do PT, como sugerido pelos "CDC" (CDC 1994). Os resultados da leitura foram registrados, segundo os critérios dos "CDC" e MS: teste tuberculínico positivo foi considerado

aquele com enduração ≥ 10 mm e PT negativo se a enduração foi < 10 mm (CDC 1994); forte reator: enduração ≥ 10 mm, fraco reator: enduração < 10 mm e ≤ 5 mm e não reator: enduração < 5 mm. (Brasil, Ministério da Saúde, 2002). O método utilizado para a leitura foi o palpatório. No momento da leitura, os indivíduos que apresentarem PT com enduração igual ou maior do que 10 mm foram indagados quanto à presença de sintomas respiratórios prolongados e febre. Havia disponibilidade de recursos de exame clínico ambulatorial e radiográfico, caso houvesse suspeita clínica de TB. Uma semana após a realização do PT, um segundo PT (Thompson cols, 1979) foi realizada nos indivíduos não reatores e fraco reatores (PPD < 10 mm).

5.1.2. Métodos Moleculares

A análise laboratorial foi realizada as cegas, ou seja, não tínhamos conhecimento de quem era o paciente. O técnico do laboratório não teve acesso aos códigos que identificavam a qual grupo pertencia à amostra clínica.

5.1.3. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando o Kit FlexiGene (Quiagen). Basicamente, 250 μ L de tampão de lise (FG1) foram adicionados a 100 μ L de sangue total, homogeneizado por inversão (5x) e centrifugado por 20s a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 50 μ L do tampão de desnaturação (FG2), sendo homogeneizado por inversão (3x) e depois incubado por 5 min a 65°C. Cinqüenta μ L de isopropanol foi adicionado à mistura. Após precipitação do DNA, o tubo foi submetido à centrifugação por 3 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco. Um volume de 50 μ L de etanol 70% foi adicionado, posteriormente centrifugado por 3 min a 10.000 rpm e o

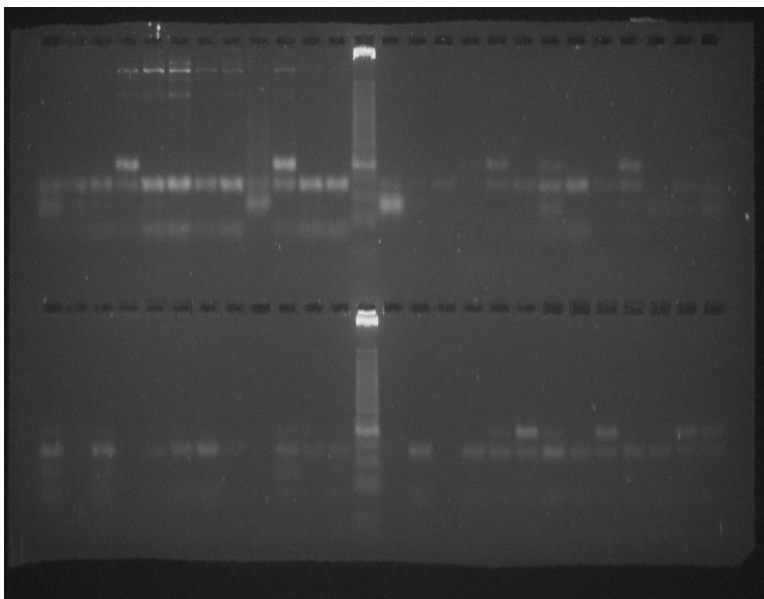
sobrenadante descartado. Após seco, ao precipitado foram adicionados 100 μ L de tampão de hidratação (FG3) e posteriormente incubado por 5 min a 65°C. Após esta etapa, o material já pode ser usado para amplificação.

5.1.4. Amplificação do DNA por PCR e Genotipagem

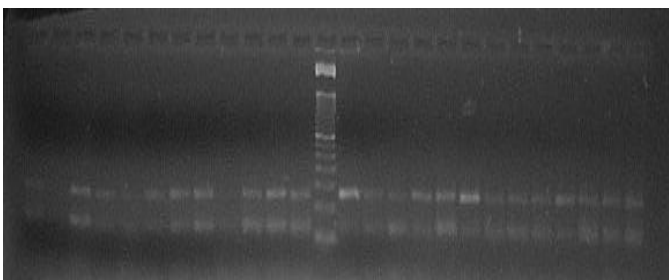
Foi utilizada a metodologia de PCR-RFLP. Em resumo, foram utilizados os *Primers* 5'-CATCAACGGCTTCCCAGGCAAAGACGCG -3' (*sense*) e 5'AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3' (*antisense*). O volume total do PCR foi de 30 μ L contendo 20 ng de DNA genômico, 1 U de Taq DNA polimerase (Gibco), 2,0 μ L de tampão 10x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs e 9 pmol de cada *primer*. Seguindo as seguintes condições em um termociclador: 4 minutos de desnaturação inicial à 94° C, seguidos de 35 ciclos de desnaturação por 30 segundos à 94°C, anelamento por 1 minuto a 60° C e extensão por 2 minutos a 72°C. Extensão final por 5 minutos a 72° C. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídio. 7 μ L de produto de PCR foram incubados por 16 horas a 37° C com 1U de *MbolI*, 1U *BAnI* e 1U *HhaI* para cada reação em um volume total de 25 μ L. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 3% (Dahl e cols, 2004).

Tabela 4: Enzima e comprimento do fragmento de restrição.

Gene <i>LLM2</i>	Enzima	Varição	Comprimento
Códon 54 (alelo B)	<i>BanI</i>	Selvagem - alelo G Mutante - alelo A	90 pb e 35pb 125 pb
Códon 57 (alelo C)	<i>MboII</i>	Selvagem - alelo G Mutante - alelo A	125 pb 69 pb e 28 pb
Códon 52 (alelo D)	<i>HhaI</i>	Selvagem - alelo C Mutante - alelo T	97 pb e 28 pb 125 pb

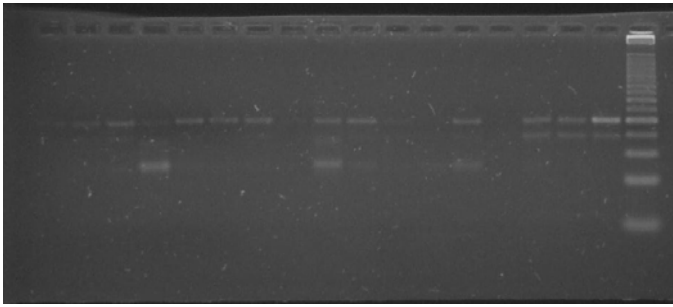


Digestão: Códon 54(Alelo B)
 Marcador: 25 pb
 Selvagem: 90 pb 35pb
 Mutante: 125 pb

Figura 5: Digestão *LLM2* Códon 54

Digestão: Códon 57(Alelo C)
 Marcador: 50 pb
 Selvagem: 125 pb
 Mutante: 69 pb e 28 pb

Figura 6: Digestão *LLM2* Códon 57



Digestão: Códono 52 (Alelo D)
Marcador : 25 pb
Selvagem: 97 pb e 28 pb
Mutante: 125 pb

Figura 7: Digestão *LLM2* Códono 52

6. Resultados

6.1. Características gerais da população estudada

No período de outubro de 1998 a março 2004, um total de 606 indivíduos se apresentaram ao ambulatório do serviço de Pneumologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) com diagnóstico de TB confirmado por métodos bacteriológicos ou foram submetidos ao tratamento quimioterápico anti-tuberculose baseado em critérios clínico-radiológicos de probabilidade. Hum mil setecentos e dois indivíduos que tiveram contato com o caso índice e estavam dentro dos critérios de contato estabelecidos para o estudo, foram contactados pela equipe do PCTH, sendo que 525 (43,3% do total de 1211) contatos de 291 casos índices que foram acompanhados no ambulatório do PCTH, responderam ao questionário padronizado e tiveram sangue periférico coletado para análise genética. A mediana de acompanhamento foi de 53,7 meses. Quarenta e três contatos adoeceram por TB, com a mediana da ocorrência do evento de 12 meses.

Dos 525 contatos incluídos no estudo 344 (65,5%) eram do gênero feminino; duzentos e vinte oito (44,4%) foram classificados como brancos e 79 (15,4%) negros, 199 (38,7%) pardos e 08 (1,5%) não responderam. A mediana da idade foi de 41,18 anos (mínimo de 15 e máximo de 91 anos). Trezentos e noventa e quatro (75,4%) eram naturais do Estado do Rio de Janeiro, e 131(24,6%) eram naturais de outros estados: Minas Gerais (24; 4,6%), Paraíba (24; 4,6%) e Pernambuco (13; 2,5%). Com relação ao grau de parentesco com o caso índice, 474 (90,6%) eram familiares, dentre estes 201 (38,3) eram cônjuges e 122 (23,2%) eram filhos. Com relação ao tempo de contato 455 (87%) referiam contato diário contínuo com o caso índice, 34 (6,5%) diário intermitente, 25 (4,8%) contato freqüente e 9 (1,7%) contato ocasional. Um total de 426 (81,8%) contatos avaliados habitava na mesma moradia

do caso índice, 13 (2,5%) eram vizinhos e 82 (15,7%) não residiam próximo ao caso índice (Tabela 5).

Tabela 5: Características sócio-demográficas e epidemiológicas dos contatos incluídos no estudo.

Variáveis	Freqüências (%)
Gênero ⁽¹⁾	
Masculino	181 (34,5%)
Feminino	344 (65,5%)
Cor da Pele ⁽²⁾	
Branca	228 (44,4%)
Negro	79 (15,4%)
Pardo	199 (38,7%)
Não responderam	08(1,5%)
Naturalidade ⁽³⁾	
Rio de Janeiro	394 (75,4%)
Minas Gerais	24 (4,6%)
Paraíba	24 (4,6%)
Pernambuco	13 (2,5%)
Outros	70 (12,9%)
Grau de Parentesco ⁽⁴⁾	
Não Consangüíneo	197 (37,5%)
Consangüíneo	328 (62,5%)
Tipo de Contato ⁽⁵⁾	
Familiar	474 (90,6%)
Não Familiar	49 (9,4%)
Freqüência de Contato ⁽⁶⁾	
Diário contínuo	455 (87%)
Diário intermitente	34 (6,5%)
Freqüente	25 (4,8%)
Ocasional	9 (1,7%)
Proximidade do Contato ⁽⁷⁾	
Mesma casa	426 (81,8%)
Vizinho	13 (2,5%)
Sem proximidade	82 (15,7%)

n=(1) 525; (2) 514 ; (3) 525; (4)525; (5)523; (6)523 ; (7) 521

6.2. Fatores de risco associados à infecção e doença entre os contatos adultos.

Foi analisada a presença de co-morbidades que pudessem estar associadas a um maior risco de infecção e adoecimento pelo *M.tb* pelos contatos. Um total de 436 (98,2%) contatos não relataram história de TB prévia e 8 (1,8%) relataram TB prévia. Co-morbidades como diabetes, leucemia, linfomas, neoplasias, HAS, cardiopatias, hepatopatias, doenças do colágeno e silicose foram relatados em 1 % dos contatos avaliados. Apenas 1 (0,2 %) contato relatou historia de reclusão em cadeia e/ou prisão nos últimos 24 meses e 3 (0,7%) foram internados nos doze meses que precederam ao início da avaliação. Durante o momento de avaliação, apenas três (0,7%) contatos eram usuários de drogas imunossupressoras, um (0,2%) informou fazer uso de drogas injetáveis e 06 (1,6%) relataram usar drogas não injetáveis; 66 (12,6%) eram tabagistas e 458 (87,4%) não eram tabagistas. (Tabela 6).

Tabela 6: Condições predisponentes à infecção e/ou ao adoecimento por *M tb* entre os contatos.

Variáveis	Freqüências (%)
Tuberculose no passado ⁽¹⁾	
Sim	08 (1,8%)
Não	436 (98,2%)
Presença de co-morbidade ⁽²⁾	
Sim	05 (1,1%)
Não	443 (98,9%)
Prisão nos últimos 24 meses ⁽³⁾	
Sim	01 (0,2%)
Não	447 (99,8%)
Internação nos últimos 4 meses ⁽⁴⁾	
Sim	03 (0,7%)
Não	445 (99,3%)
Uso de imunossupressor ⁽⁵⁾	
Sim	03 (0,7%)
Não	445 (99,3%)
Drogas Injetáveis ⁽⁶⁾	
Sim	01 (0,2%)
Não	446 (99,8%)
Drogas não injetável ⁽⁷⁾	
Sim	06 (1,6%)
Não	437 (98,4%).
Tabagistas ⁽⁸⁾	
Sim	66 (12,6)
Não	458 (87,4%)

n= (1) 444; (2) 448; (3) 448; (4) 448; (5) 448; (6) 447; (7) 443; (8) 52

6.3. Características clínica laboratorial dos casos índices.

No momento da inclusão no estudo foi avaliada a situação clínico-laboratorial dos casos índices em relação ao risco de transmissão da TB para seus contatos. Estes dados estão representados na tabela 7. Dos 291 casos índices analisados, 212 (72,86%) apresentavam baciloscopia positiva no escarro sendo que destes 110 (37,8%) eram ≥ 3 cruces (esses contatos em particular tinham maior chance de serem infectados, pois um BAAR de 3 cruces expressa a maior carga bacífera que um paciente com TBP pode apresentar). Cento e noventa e dois (65,9%) apresentavam tosse ≥ 8 semanas. Com relação à imagem do Raio-X 250 (85,8%) não apresentavam lesão escavada à radiografia do tórax.

Tabela 7: Situação clínico-laboratorial relacionada aos 291 casos índices no momento inicial do estudo.

Variáveis	Freqüências (%)
Baciloscopia positiva	
Sim	212 (72,8%)
Não	79 (27,2%)
Baciloscopia $\geq 3 +$	
Sim	110 (37,8%)
Não	181 (62,2%)
Tempo de tosse	
< 8 semanas	192 (65,9%)
≥ 8 semanas	99 (34,1%)
Presença de cavidade no RX tórax	
Sim	41 (14,2%)
Não	250 (85,8%)

6.4. Avaliação de Infecção recente entre os Contatos

6.4.1. Resposta à prova tuberculínica

Todos os contatos incluídos neste estudo realizaram PT ao menos uma vez. Consideramos o momento da aplicação da primeira PT como a data da primeira avaliação do contato. Esta data foi utilizada para o cálculo do tempo de acompanhamento do contato. O tempo médio de avaliação foi de um ano.

De acordo com o Manual de Normas do Programa Nacional de Tuberculose, os contatos avaliados foram divididos em não reator, reator fraco e forte reator

(Brasil, Ministério da Saúde, 1995a) na primeira avaliação do teste tuberculínico. Duzentos e onze (40,3%) foram classificados como forte reator e 313 contatos avaliados (59,8%) apresentaram induração menor que 10 mm (Tabela 8).

Tabela 8: Resposta à prova tuberculínica entre contatos de pacientes com tuberculose, segundo o Manual de Normas do Programa Nacional de Tuberculose, 2002.

Classificação do contato quanto à resposta a PT	Freqüências (%)
Não reator (0-4 mm)	265 (50,5%)
Reator fraco (5-9 mm)	48 (9,2%)
Reator forte (\geq 10 mm)	211 (40,3%)

Os 313 contatos (59,7%) que apresentaram PT < 10 mm foram convidados para se apresentarem ao PCTH em 2 semanas para realização de *booster*. De 240 contatos que compareceram trinta e nove (16,2%) foram classificados como *booster* positivos.

Os 201 (83,8%) contatos que permaneceram com PT < 10 mm após avaliação do efeito *booster* foram orientados a retornarem após 4 meses para novo teste tuberculínico. Destes, 153 retornaram para avaliação de 4 meses e 98 retornaram após um ano para última avaliação. Na tabela 9 são mostrados os resultados dos testes tuberculínicos nos diferentes momentos.

Tabela 9: Resultados da prova tuberculínica no início e durante o seguimento ambulatorial dos contatos adultos.

Classificação	Frequências (%)
1ª Prova Tuberculínica ⁽¹⁾	
< 10 mm	313 (59,7%)
≥ 10 mm	211 (40,3%)
Avaliação do <i>Booster</i> ⁽²⁾	
≥ 10mm	39 (16,2%)
< 10mm	201 (83,8%)
PT 4º mês ⁽³⁾	
0-4 mm	105 (68,6%)
5-9 mm	13 (8,5%)
≥10 mm	35 (22,9%)
PT 12 meses ⁽⁴⁾	
< 10 mm	91 (92,9%)
≥ 10 mm	07 (7,1%)

n= (1) 524; (2) 240; (3)153; (4) 98; PT: prova tuberculínica.

Dos 525 contatos avaliados, 1 (0,2%) não realizou PT de 4 meses, 11 (2,1%) não fizeram avaliação de PT após um ano, 36 (6,9%) abandonaram após a primeira avaliação de PT, 50 (9,5%) abandonaram após avaliação de *booster*, 36 (6,9%) abandonaram após avaliação de PT de 4 meses, 26 (5%) realizaram quimioprofilaxia, 320 (87,9%) completaram a avaliação de conversão à prova tuberculínica.

A positividade inicial a PT foi de 40,3% (211 em 525), e entre os 313 com critério para *follow up*, apenas 177 completam a avaliação de maneira satisfatória e entre eles 23 (13%) apresentaram conversão a PT. Trezentos e sessenta e quatro completaram o *follow up* clínico, destes 44 (12,1%) adoeceram por TB. As características sócio-demográficas e epidemiológicas para tuberculose entre os contatos do estudo são mostradas na Tabela 10.

Tabela 10: TB infecção latente e adoecimento entre os contatos incluídos no estudo.

Variáveis	Frequências (%)
Infecção latente ⁽¹⁾	
Sim	273 (64,7%)
Não	149 (35,3%)
Conversão ⁽²⁾	
Sim	23 (13,1%)
Não	153 (86,9%)
Adoecimento ⁽³⁾	
Sim	44 (12,1%)
Não	320 (87,9%)

n= (1)422; (2)176; (3)364.

6.5. Avaliação de variáveis clínicas do caso índice

Para verificar quais os fatores clínico-laboratoriais associados a um maior risco a infecção e/ou adoecimento dos contatos, realizamos análise univariada com as seguintes variáveis: baciloscopia, cultura do escarro, presença e tempo de tosse e laudo do raio-X dos casos índices e sua associação com infecção pelo *M.tb* e doença TB entre os contatos que completaram o acompanhamento de um ano.

6.5.1. Baciloscopia do caso índice.

Observamos uma associação significativa com a baciloscopia maior que 3+ do caso índice em relação à infecção final positiva (1ª PT > 10 mm + booster positivo + viragem) entre os contatos ($p=0,02$; OR: 2,11 IC: 1,13–3,93). Para as demais variáveis (conversão a PT, infecção final e adoecimento) não observamos associação significativa. Os dados obtidos da análise da baciloscopia do caso-índice (<3+ e > 3+) e sua associação com o resultado da primeira avaliação da PT dos contatos, assim como associação com conversão a PT, infecção final e adoecimento dos contatos esta representada na tabela 11.

Tabela 11: Característica da baciloscopia do CI e sua relação aos resultados da 1ª PT, conversão da PT, PT positiva final e adoecimento dos contatos.

Variável	Baciloscopia < 3 +	Baciloscopia ≥ 3 +	Valor de p	OR (IC 95%)
1ª PT ⁽¹⁾				
< 10 mm	92 (59%)	52 (47,3%)	0,06	1,60 (0,98-2,62)
≥ 10 mm	64 (41%)	58 (52,7%)		
Conversão ⁽²⁾				
Sim	05 (9,1%)	0 (0%)	0,31	00 (0,00-0,32)
Não	50 (90,9%)	20 (100%)		
Infecção Final ⁽³⁾				
Positiva	79 (62,2%)	66 (77,6%)	0,02	2,11 (1,13–3,93)
Negativa	48 (37,8%)	19 (22,4%)		
Adoecimento ⁽⁴⁾				
Sim	10 (8,8%)	09 (11%)	0,63	1,27 (0,49-3,28)
Não	103 (91,2%)	73 (89%)		

n= (1) 266; (2) 75; (3) 212; (4)195.

6.5.2. Presença e tempo de tosse do caso índice

Verificamos uma associação significativa com adoecimento entre os contatos (p: 0,01; OR: 8,19; IC: 1,09-61,05) e a presença de tosse do caso-índice, porém, não foi observada associação significativa com o resultado da 1ª PT, infecção final e conversão a PT (Tabela 12).

Tabela 12: Presença de tosse com duração superior a 8 semanas no CI em relação aos resultados da 1ª PT, conversão da PT, prova tuberculínica final e adoecimento dos contatos.

Variável	Tosse ≥ 8 semanas	Tosse < 8 semanas	Valor de p	OR (IC 95%)
1ª PT ⁽¹⁾				
< 10 mm	233 (59,7%)	38 (54,3%)	0,42	0,80 (0,48-1,33)
≥ 10 mm	157 (40,3%)	32 (45,7%)		
Conversão ⁽²⁾				
Sim	15 (11,5%)	01 (4,3%)	0,46	2,87 (0,36-22,85)
Não	115 (88,5%)	22 (95,7%)		
Infecção Final ⁽³⁾				
Positiva	201 (64,4%)	38 (65,5%)	1,00	0,95 (0,52–1,71)
Negativa	111 (35,6%)	20 (34,5%)		
Adoecimento ⁽⁴⁾				
Sim	38 (14,1%)	01 (2%)	0,01	8,19 (1,09-61,05)
Não	232 (85,9%)	50 (98%)		

n= (1) 460; (2) 153; (3) 370; (4)321.

6.6. Avaliação das variáveis clínicas laboratoriais dos Contatos.

A presença de cicatriz de BCG, relação da cor da pele, que no nosso estudo embora não tenhamos feito marcadores de etnia foi extratificado a partir da descrição no questionário como branco e não brancos (negros e pardos), tipo de parentesco (familiar e não familiar), residência (mesma residência ou residência diferente), e tempo de contato com o caso índice (diário contínuo, diário intermitente, freqüente e ocasional) e distribuição dos contatos do estudo de acordo com a 1ª PT, conversão, infecção final e adoecimento foi avaliado por análise univariada.

6.6.1. Cicatriz vacinal em relação ao BCG

A presença de cicatriz vacinal foi verificada no momento da inclusão do contato a fim de avaliar a influência da vacinação pelo BCG no resultado da PT. Trezentos e quarenta e seis contatos (66,4%) apresentavam cicatriz de vacinação intradérmica, foram considerados como vacinados pelo BCG. Destes, 82 (23,69%) foram vacinados a mais de 10 anos e 254 (73,4%) não souberam informar o tempo de vacinação (Tabela 13).

Tabela 13: Vacinação com BCG.

Variáveis	Freqüências (%)
Cicatriz BCG ⁽¹⁾	
Sim	346 (66,4%)
Não	175 (33,6%)
Tempo vacinação ⁽²⁾	
< 10 anos	10 (2,9%)
≥ 10 anos	82 (23,7%)
Não souberam responder	254 (73,4%)

n= (1) 521; (2)346.

Não foram, observados diferenças significativas nas avaliações da primeira PT, conversão da PT, infecção total e adoecimento dos contatos em relação à presença ou não de BCG (dados não mostrados).

6.6.2. Cor da pele

No critério de avaliação por cor da pele, os indivíduos do estudo foram classificados em brancos e não brancos (negros/pardos) e foi observada uma associação significativa entre $PT \geq 10$ mm entre os indivíduos classificados como não brancos ($p: 0,005$; OR: 1,69; IC: 1,17-2,43), assim como para infecção final positiva ($p: 0,01$; OR: 1,67; IC: 1,11–2,52). Para as variáveis, conversão e adoecimento, não observamos associação estatisticamente significativa (Tabela 14).

Tabela 14: Distribuição dos resultados da 1ª PT, conversão da PT, prova tuberculínica final e adoecimento por tuberculose segundo a cor dos contatos do estudo.

Característica	Branco	Negro/Pardo	Valor de p	OR (IC 95%)
1ª PT ⁽¹⁾				
< 10 mm	153 (67,1%)	152 (54,7%)	0,005	1,69 (1,17-2,43)
≥ 10 mm	75 (32,9%)	126 (45,3%)		
Conversão ⁽²⁾				
Sim	11 (12,1%)	12 (14,6%)	0,65	1,24 (0,51-3,00)
Não	80 (87,9%)	70 (85,4%)		
Infecção Final ⁽³⁾				
Positiva	104 (57,8%)	158 (69,6%)	0,01	1,67 (1,11–2,52)
Negativa	76 (42,2%)	69 (30,4%)		
Adoecimento ⁽⁴⁾				
Sim	22 (13,7%)	21 (11%)	0,51	0,77 (0,40-1,46)
Não	138 (86,3%)	170 (89%)		

n= (1) 506; (2) 173; (3) 407; (4) 351.

6.6.3. Contatos familiares e não familiares

Na análise univariada em relação ao tipo de contato (familiar ou não) com seus respectivos casos índices e distribuição dos contatos do estudo de acordo com a 1ª PT, conversão, infecção final e adoecimento verificamos uma associação significativa entre o tipo de contato ser familiar e resultado da 1ª PT > 10 mm quando comparados com os contatos não familiares (p: 0,003; OR: 0,34; IC: 0,16–0,71). Observamos também um maior risco de conversão entre os contatos não familiares (p: 0,01; OR: 4,02; IC: 1,42–11,33). Não foi observado associação com resultado da 1ª PT, conversão, infecção final e adoecimento dos contatos quando extratificamos o grau de parentesco (filho, pai, cônjuge ou namorado do caso-índice) (dados não mostrados). Tabela 15.

Tabela 15: Distribuição dos resultados da 1ª PT, da conversão da PT, prova tuberculínica final e adoecimento por TB em relação ao tipo de contato.

Característica	Familiar	Não familiar	Valor de p	OR (IC 95%)
1ª PT ⁽¹⁾				
< 10 mm	272 (57,5%)	39 (79,6%)	0,003	0,34 (0,16-0,71)
≥ 10 mm	201 (42,5%)	10 (20,4%)		
Conversão ⁽²⁾				
Sim	16 (10,4%)	07 (31,8%)	0,01	4,02(1,42-
Não	138 (89,6%)	15 (68,2%)		11,33)
Infecção Final ⁽³⁾				
Positiva	250 (65,3%)	23 (60,5%)	0,59	0,81(0,41–1,61)
Negativa	133 (34,7%)	15 (39,5%)		
Adoecimento ⁽⁴⁾				
Sim	41 (12,3%)	03 (10,7%)	1,00	0,85 (0,24-2,95)
Não	292 (87,7%)	25 (89,3%)		

n= (1) 522; (2) 176; (3) 421 (4) 361. PT: prova tuberculínica.

6.6.4. Tipo de contato

Foi avaliado se o contato residia na mesma moradia que o caso-índice comparando com os seguintes resultados: 1ª PT, conversão, infecção final e adoecimento dos contatos. Observamos uma associação significativa dos contatos que residiam na mesma residência do caso-índice com contatos que apresentavam PT maior que 10 mm na primeira avaliação (p : 0,01; OR: 1,80; IC: 1,12–2,90), assim como à infecção latente positiva (p : 0,02; OR: 1,80; IC: 1,09–2,97). Não houve associação com viragem e adoecimento (Tabela 16).

Tabela 16: Distribuição dos resultados da 1ª. PT, conversão da PT, prova tuberculínica final e adoecimento por TB de acordo com o local de residência do contato.

Característica	Mesma residência	Residência diferente	Valor de p	OR (IC 95%)
1ª PT ⁽¹⁾				
< 10 mm	243 (57,2%)	70 (70,7%)	0,01	1,80(1,12-2,90)
≥ 10 mm	182 (42,8%)	29 (29,3%)		
Conversão ⁽²⁾				
Sim	16 (11,9%)	07 (16,3%)	0,44	0,69 (0,26-1,82)
Não	118 (88,1%)	36 (83,7%)		
Infecção Final ⁽³⁾				
Positiva	232 (67,2%)	41 (53,2%)	0,02	1,80 (1,09–2,97)
Negativa	113 (32,8%)	36 (46,8%)		
Adoecimento ⁽⁴⁾				
Sim	38 (12,8%)	06 (9,2%)	0,53	1,44 (0,58-3,58)
Não	258 (87,2%)	59 (90,8%)		

n= (1) 524; (2) 177; (3) 422; (4) 36; PT: prova tuberculínica

6.6.5. Tempo de contato

Quando foi avaliado tempo de contato não foi evidenciada associação com 1ª PT, conversão, infecção final e adoecimento dos contatos (dados não mostrados).

6.6.6. Proximidade de contato

Quando foi avaliada proximidade de contato não foi evidenciada associação com 1ª PT, conversão, infecção final e adoecimento dos contatos (dados não mostrados).

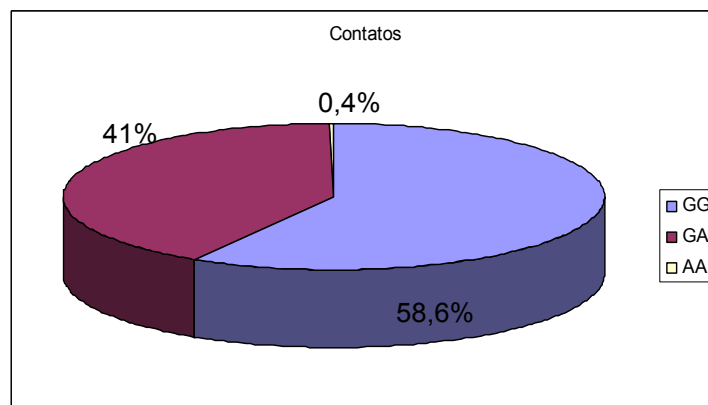
6.7. Distribuição genóticas e alélicas do polimorfismo no éxon 1 do gene que codifica para LLM (alelos B, C e D)

A presença de mutação nos alelos B, C e D no éxon 1 do gene *LLM2* foi analisada por PCR-RFLP.

6.7.1. Avaliação da distribuição de genótipos para mutação no éxon 1 (alelos B, C e D) da LLM na população estudada.

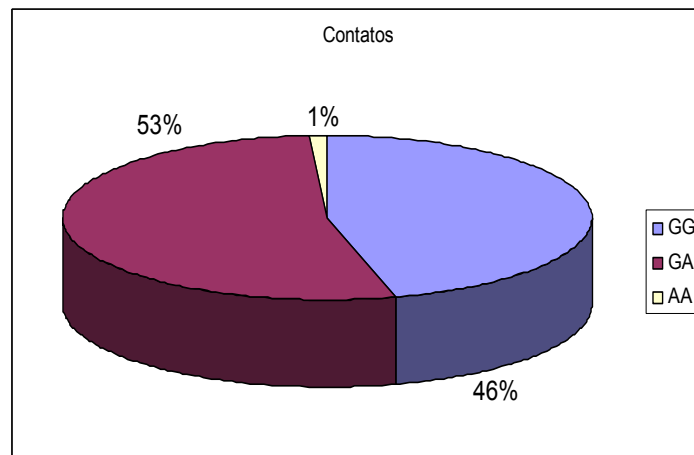
Um total de 502, 507 e 501 contatos de pacientes com TB foram avaliados para a identificação dos polimorfismos no gene *LLM2* nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52), respectivamente. As distribuições genóticas e alélicas das mutações estudadas entre todos os contatos estão representadas no Gráfico 1A, 1B e 1C respectivamente.

Gráfico 1A: Representação gráfica da distribuição Genotípica da mutação do gene *LLM2* no alelo B (códon 54) entre os contatos estudados.



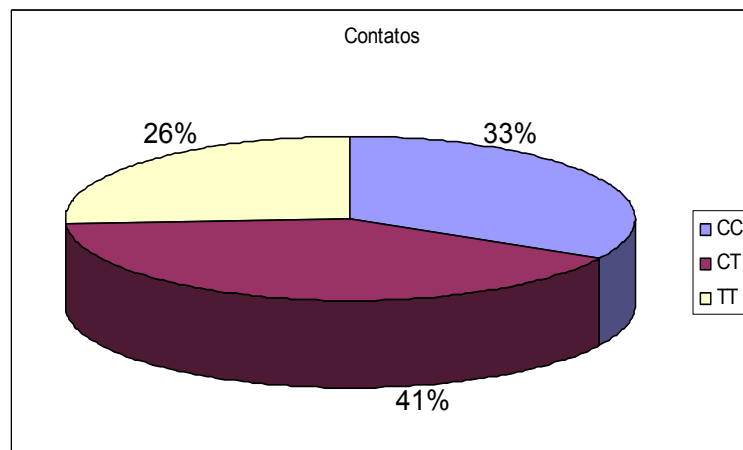
Legenda: GG genótipo homocigoto selvagem; GA genótipo heterocigoto; AA genótipo homocigoto mutante

Gráfico 1B: Representação gráfica da distribuição Genotípica da mutação do gene *LLM2* no alelo C (Códon 57) entre os contatos estudados.



Legenda: GG genótipo homozigoto selvagem; GA genótipo heterozigoto; AA genótipo homozigoto mutante.

Gráfico 1C: Distribuição Genotípica da mutação do gene *LLM2* no alelo D (Códon 52) entre os contatos estudados.



Legenda: CC genótipo homozigoto selvagem; CT genótipo heterozigoto; TT genótipo homozigoto mutante.

6.8. Avaliação das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos no gene *LLM2* nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52) respectivamente de acordo com o gênero.

A análise individual nos códons 54, 57 e 52 mostrou que não houve diferença significativa na frequência dos alelos mutantes ou de nenhum dos genótipos possíveis, quando o grupo analisado foi de acordo com gênero, cor da pele, tipo de

contato, proximidade do contato, cicatriz de BCG, tempo de vacinação (dados não mostrados). A distribuição por gênero esta representada na tabela 17.

Tabela 17: Distribuição das freqüências genótípicas e alélicas dos polimorfismos no éxon 1 do gene *LLm2* que codifica para LLM nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52) de acordo com gênero.

Alelo B	Masculino n=175	Feminino n=327	p=value	OR	IC
GG	97 (55,4%)	197 (60,2%)	0,34	0,82	0,56-1,21
GA	78 (44,6%)	128 (39,1%)	0,27	1,25	0,85-1,84
AA	0	2 (0,7%)			
f (A)	0,22	0,2	0,48	1,13	0,82-1,57
Alelo C	Masculino n=175	Feminino n=332	p=value	OR	IC
GG	77 (44%)	155 (46,7%)	0,62	0,9	0,61-1,32
GA	94 (53,7%)	175 (52,7%)	0,90	1,04	0,71-1,53
AA	4 (2,3%)	2 (0,6%)	0,18	3,80	0,60-30,61
f (A)	0,29	0,26	0,50	1,11	0,83-1,50
Alelo D	Masculino n=172	Feminino n=329	p=value	OR	IC
CC	60 (34,9%)	106 (32,2%)	0,61	1,13	0,75-1,69
CT	76 (44,2%)	128 (38,9%)	0,29	1,24	0,04-1,84
TT	36 (20,9%)	95 (28,9%)	0,06	0,65	0,41-1,03
f (T)	0,43	0,48	0,12	0,81	0,6-1,06

n = Número de indivíduos analisados; p= value Valor de P; OR razão de odds; IC Intervalo de confiança; GG genótipo homocigoto selvagem; GA genótipo heterocigoto; AA genótipo homocigoto mutante; f = freqüência.

6.9. Avaliação das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos no gene *LLM2* nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52) respectivamente de acordo com conversão a PT.

Na tabela 18 são mostradas as genotípicas e alélicas observadas nos grupos convertidores e não convertidores a resposta a PT.

Observamos um aumento significativo na frequência do genótipo selvagem GG para o códon 57 (alelo C) entre os não convertidores quando comparados ao convertor ($p=0,03$; OR 0,30; IC: 0,09-0,92). Inversamente, observamos um aumento do genótipo heterozigoto GA no grupo de convertidores ($p=0,04$; OR 2,91; IC 1,01-8,79). Embora não significativa, a frequência alélica estava aumentada entre os convertidores com uma associação *boderline* ($p=0,07$; OR: 1,87; IC: 0,94-3,71).

Para a avaliação do códon 52 (alelo D) observamos um aumento significativo na frequência do genótipo homozigoto selvagem no grupo dos convertidores ($p=0,003$; OR: 4,18; IC: 1,48-12,06). Inversamente, ambos os genótipos homozigoto mutante TT e a frequência alélica estavam significativamente aumentados no grupo dos não convertidores. ($p=0,05$; OR 0,14; IC 0,01-1,14 e $p=0,0008$; OR: 0,26 IC: 0,11-0,61) respectivamente.

Tabela 18: Distribuição das freqüências genotípica e alélica das SNPs no éxon 1 do gene *LLM2* que codifica para LLM nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52) nos grupos de convertores e não convertores da resposta a PT.

	Convertores	Não Convertores	p -value	OR	IC
Alelo B (54)	n=22	n= 149			
GG	15 (68%)	86(57,7%)	0,48	1,57	0,56-4,55
GA	07 (32%)	62 (41,6%)	0,52	0,65	0,23-1,84
AA	0	1(0,7%)			
F (A)	0,15	0,21	0,51	0,69	0,27-1,72
Alelo C (57)	n=23	n= 150			
GG	05 (21,7%)	72 (48%)	0,03	0,30	0,09-0,92
GA	17 (73,97%)	74 (49,4%)	0,04	2,91	1,01-8,79
AA	01 (4,4%)	04 (2,6%)	0,52	1,59	
F (A)	0,41	0,27	0,07	1,87	0,94-3,71
Alelo D (52)	n=23	n= 147			
CC	16 (69,6%)	52 (35,4%)	0,003	4,18	1,48-12,06
CT	06(26,1%)	59 (40,1%)	0,28	0,53	0,17-1,53
TT	01 (4,3%)	36 (24,5%)	0,05	0,14	0,01-1,04
F (T)	0,17	0,44	0,0008	0,26	0,11-0,61

n = Número de indivíduos analisados; p = value Valor de P; OR razão de odds; IC Intervalo de confiança; GG genótipo homocigoto selvagem; GA genótipo heterocigoto ; AA genótipo homocigoto mutante: f = freqüência.

6.10. Avaliação das freqüências genóticas e alélicas dos polimorfismos no gene *LLM2* nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52) respectivamente de acordo com resultado da 1ª Prova Tuberculínica.

Na avaliação do códon 52 (alelo D) observamos um aumento significativo na freqüência do genótipo selvagem CC no grupo que apresentou PT < 10 mm ($p=0,03$; OR 0,64; IC: 0,43-0,96). Inversamente, observamos um aumento estatisticamente significativo na freqüência alélica entre indivíduos que apresentaram PT > 10 mm na primeira avaliação ($p=0,03$; OR: 1,34; IC: 1,04-1,75).

Não observamos diferença estatisticamente significativa quando comparamos os grupos que apresentaram PT > 10 mm na primeira avaliação daqueles que apresentaram PT < 10 mm para os alelos B e C (códon 54 e 57 respectivamente) tanto para a avaliação genotípica como alélica (Tabela 19).

Tabela 19: Distribuição das freqüências genótípicas e alélicas das SNPs no éxon 1 do gene *LLM2* que codifica para LLM nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52) nos grupos de convertores e não convertores da resposta a PT.

	≥ 10mm	< 10mm	p=valor	OR	IC
Alelo B (54)	n= 206	n= 295			
GG	118 ^(57,3%)	176 ^(59,7%)	0,65	0,91	0,62-1,32
GA	87 ^(42,2%)	118 ^(40%)	0,68	1,10	0,75-1,60
AA	01 ^(0,5%)	01 ^(0,3%)	1	1,43	0-52,7
F (A)	0,21	0,20	0,68	1,08	0,78-1,49
Alelo C (57)	n=206	n=300			
GG	90 ^(43,7%)	142 ^(47,3%)	0,47	0,86	0,59-1,25
GA	115 ^(55,8%)	153 ^(51%)	0,32	1,21	0,84-1,76
AA	1 ^(0,5%)	05 ^(1,7%)	0,11	0,19	0,01-1,69
F (A)	0,28	0,27	0,71	1,96	0,80-1,42
Alelo D (52)	n=205	n=295			
CC	56 ^(27,%)	109 ^(37%)	0,03	0,64	0,43-0,96
CT	90 ^(44%)	114 ^(39%)	0,27	1,24	0,85-1,81
TT	59 ^(29%)	72 ^(24,%)	0,32	1,25	0,82-1,91
F (T)	0,5	0,43	0,03	1,34	1,04-1,75

n = Número de indivíduos analisados; p= valor Valor de P; OR razão de odds; IC Intervalo de confiança; GG genótipo homocigoto selvagem; GA genótipo heterocigoto ; AA genótipo homocigoto mutante: f = freqüência

6.11. Avaliação das freqüências genótípicas e alélicas dos polimorfismos no gene *LLM2* nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52) respectivamente de acordo com infecção latente.

Não observamos diferença para nenhum dos genótipos analisados, assim como nas freqüências alélicas para os códons 54, 57 e 52 entre os indivíduos com infecção latente positiva e negativa (Tabela 20).

Tabela 20: Distribuição das freqüências genótípicas e alélicas dos polimorfismos no éxon 1 do gene *LLM2* que codifica para LLM nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52) na avaliação de infecção final positiva e negativa.

	Positiva	Negativa	p=valor	OR	IC
Alelo B (54)	n=144	n=265			
GG	83 ^(57,6%)	154 ^(58,1%)	0,99	0,98	0,64-1,51
GA	60 ^(41,6%)	110 ^(41,5%)	0,94	1,01	0,65-1,55
AA	01 ^(0,8%)	01 ^(0,4%)	1	1,85	0-67,99
F (A)	0,21	0,21	0,96	1,02	0,71-1,47
Alelo C (57)	n=145	n=266			
GG	68 ^(46,9%)	108 ^(40,6%)	0,25	1,29	0,84-1,98
GA	74 ^(51%)	155 ^(58,3%)	0,19	0,75	0,49-1,14
AA	03 ^(2,1%)	03 ^(1,1%)	0,43	1,85	0,29-11,64
F (A)	0,27	0,30	0,46	0,88	0,63-1,22
Alelo D (52)	n=143	n=263			
CC	53 ^(37%)	84 ^(32%)	0,35	1,25	0,8-1,97
CT	55 ^(38,5%)	107 ^(41%)	0,74	0,91	0,59-1,41
TT	35 ^(24,5%)	72 ^(27%)	0,60	0,86	0,52-1,41
F (T)	0,43	0,47	0,30	0,85	0,63-1,15

n = Número de indivíduos analisados; p= valor Valor de P; OR razão de odds; IC Intervalo de confiança; GG genótipo homocigoto selvagem; GA genótipo heterocigoto ; AA genótipo homocigoto mutante: f = freqüência

6.12. Avaliação das Frequências Genóticas e Alélicas dos polimorfismos no gene *LLM2* no alelo B, C e D, respectivamente de acordo com Adoecimento e não adoecimento.

Não observamos diferença para nenhum dos genótipos analisados, assim como nas frequências alélicas para os códon 54, 57 e 52 entre os indivíduos que adoeceram e que não adoeceram.

Tabela 21: Distribuição das frequências genóticas e alélicas das SNPs no éxon 1 do gene *LLM2* que codifica para LLM nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52) nos grupos de contatos que adoeceram e que não adoeceram por TB.

	Adoeceu	Não Adoeceu	<i>p</i> =value	OR	IC
Alelo B (54)	n=39	n=311			
GG	21 ^(54%)	184 ^(59,2%)	0,64	0,81	0,39-1,65
GA	18 ^(46%)	126 ^(40,5%)	0,61	1,26	0,61-2,58
AA	0	01 ^(0,3%)			
F (A)	0,23	0,20	0,71	1,06	0,63-2,09
Alelo C (57)	n=39	n=311			
GG	17 ^(44%)	139 ^(45%)	0,96	0,96	0,46-1,96
GA	20 ^(51%)	168 ^(54%)	0,87	0,90	0,44-1,83
AA	02 ^(5%)	4 ^(1%)	0,13	4,15	0,51-27,64
F (A)	0,42	0,30	0,74	1,13	0,65-1,93
Alelo D (52)	n=39	n=307			
CC	08 ^(20%)	98 ^(32%)	0,2	0,55	0,22-1,31
CT	19 ^(49%)	133 ^(43%)	0,63	1,26	0,61-2,54
TT	12 ^{(31%)⁴}	76 ^(25%)	0,53	1,35	0,61-2,94
F (T)	0,,55	0,46	0,18	0,71	0,43-1,16

n = Número de indivíduos analisados; *p*= value Valor de P; OR razão de odds; IC Intervalo de confiança; GG genótipo homozigoto selvagem; GA genótipo heterozigoto ; AA genótipo homozigoto mutante: f = frequência

6.13. Avaliação das Frequências Genotípicas e Alélicas do polimorfismo no gene *LLM2* nos alelos B, C e D, respectivamente de acordo a cultura do escarro positiva para *M.tb* do caso-índice.

Quando analisamos o grupo de acordo com a cultura do escarro positiva para *M.tb* dos respectivos casos-índices, observamos um aumento estatisticamente significativo na frequência do alelo D mutante no grupo de contatos expostos a casos índices cuja cultura era negativa ($p=0,03$; OR: 0,44; IC: 0,21-0-0,89).

Tabela 22: Distribuição das frequências genotípicas e alélicas das SNPs no éxon 1 do gene *LLM2* que codifica para LLM nos alelos B (códon 54), C (códon 57) e D (códon 52) nos grupos de contatos de cultura positiva e negativa para *M.tb*

	Cultura Positiva	Cultura Negativa	p=value	OR	IC
Alelo B	n= 263	n=18			
GG	152 (58 %)	11 (61%)	0,97	0,87	0,29-2,52
GA	109 (41%)	7 (39%)	0,97	1,11	0,38-3,29
AA	2 (1%)	0			
F (A)	0,2	0,19	0,93	1,13	0,46-2,92
Alelo C	n=263	n=19			
GG	131 (50 %)	10 (53%)	1	0,89	0,32-2,47
GA	129 (49%)	9 (47%)	0,92	1,07	0,39-2,97
AA	3 (1%)	0			
F (A)	0,25	0,23	0,93	1,11	0,49-2,60
Alelo D	n=262	n=18			
CC	94 (36 %)	3 (17%)	0,16	2,80	0,74-12,50
CT	106 (40 %)	7 (39%)	0,90	1,07	0,37-3,16
TT	62 (24%)	8 (44%)	0,09	0,39	0,13-1,13
F (T)	0,43	0,63	0,03	0,44	0,21-0,89

n = Número de indivíduos analisados; p= value Valor de P; OR razão de odds; IC Intervalo de confiança; GG genótipo homocigoto selvagem; GA genótipo heterocigoto ; AA genótipo homocigoto mutante: f = frequência

7. DISCUSSÃO

Os microorganismos estão continuamente interagindo e respondendo ao meio ambiente sendo capazes de alterar seu perfil de expressão gênica rapidamente em resposta a vários sinais do meio ambiente (Segal & Hill, 2003). O desenvolvimento de determinada enfermidade é o resultado de uma complexa interação entre o microorganismo, o hospedeiro e o meio ambiente. Existem contrastes e divergências entre diversos estudos genéticos, ressaltando que a miscigenação das populações, as infecções e adoecimento estão intimamente relacionados à presença de polimorfismos em genes participantes da resposta imunológica e a interação do sistema imunológico com os microorganismos no hospedeiro. Esta abordagem tem levantado questões acerca da importância dos níveis de gravidade da TB ativa nos diferentes indivíduos, assim como as diferenças nas taxas de infecção em nível populacional. Portanto, há interesse sobre o papel da variabilidade genética do hospedeiro na susceptibilidade a infecção pelo *M. tb* e posterior adoecimento. Por esta razão, associações genéticas podem de certa forma elucidar questões fundamentais sobre a patogênese do *M. tb* e a resposta do hospedeiro.

O presente estudo teve como objetivo, estimar as frequências genotípicas e alélicas encontradas no códon 54 (alelo B), códon 57 (alelo C) e códon 52 (alelo D), localizados no éxon 1 do gene *LLM2* em contatos adultos de pacientes com tuberculose pulmonar. Adicionalmente, avaliamos a presença e associação de polimorfismos de forma isolada e ou combinadas com diversas características clínicas e sócio-demográficas, tais como infecção pelo bacilo da TB e susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento de TB ativa.

Cabe ressaltar que a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura sugere fortemente a associação da contribuição genética da LLM em relação à infecção por

TB em populações étnicas fechadas (Wilkinson e cols, 2000; Delgado e cols, 2002; Bellamy e cols, 1998; Selvaraj e cols, 2001). Neste sentido, este trabalho representa a primeira tentativa de elucidar os mecanismos que antecedem a resposta imune do ponto de vista genético, frente à infecção com *M. tb* na população brasileira, com características étnicas/ raciais bem distintas dos trabalhos relatados na literatura internacional.

7.1. Características gerais da população estudada

Inicialmente foi realizada a avaliação do perfil sócio-demográfico dos contatos adultos observando possíveis diferenças entre os mesmos que pudessem determinar diferentes riscos de infecção e adoecimento por TB. No nosso estudo foi observado que os contatos eram em sua maioria (65,5%) composto por mulheres, apresentavam média da idade de 41,18 anos e maior participação do grupo consangüíneo 62,5%.

Lienhardt e colaboradores (2003) observaram um forte risco de infecção por TB entre contatos familiares, associando com a intensidade da exposição, por meio da proximidade social e extensas atividades compartilhadas com o caso-índice. Em nossa casuística a maioria dos contatos (81,8%) residia no mesmo domicílio dos seus respectivos casos índices, e 90,6% eram familiares, portanto sob risco elevado de contágio. Observamos uma associação significativa entre os contatos que residiam na mesma residência do caso-índice com contatos que apresentavam PT maior que 10 mm na primeira avaliação (p: 0,01; OR: 1,80; IC: 1,12-2,90), assim como a infecção latente total positiva (p: 0,02; OR: 1,80; IC: 1,09–2,97). Verificamos uma associação significativa entre o resultado da primeira PT \geq 10 mm nos contatos

familiares quando comparados com os contatos não familiares ($p: 0,003$; OR: 0,34; IC: 0,16-0,71), assim como conversão a PT ($p=0,01$; OR; 4,02; OC; 1,42-11,33).

O risco de adoecimento entre contatos de casos de tuberculose depende do estado bacteriológico do caso-índice (Capewell & Leitch, 1984; Rose e cols, 1979) e da capacidade de transmitir o bacilo (Denison e cols, 2007). Nossos resultados apontam para a importância do *status* clínico do caso índice, a associação com adoecimento dos contatos foi maior entre os contatos expostos ao caso índice que apresentavam tosse de longa duração ($p=0,01$; OR 8,19; IC 1,09-61,05), assim como a infecção final positiva entre os contatos ter sido significativamente maior entre aqueles cujo caso índice apresentava maior carga bacilar (baciloscopia $\geq 3+$) ($p=0,02$; OR 2,11; IC 1,13-3,93).

De acordo com alguns estudos epidemiológicos o risco de TB é maior entre contatos adultos expostos a pacientes que apresentam cultura de escarro positivo e que a prevalência da doença ativa é elevada com a intimidade do contato (Andersen & Geser, 1960; Rouillon e cols, 1976). Por outro lado observamos um aumento estatisticamente significativo na frequência do alelo D mutante no grupo de 18 contatos expostos a casos índices cuja cultura era negativa ($p=0,03$; OR: 0,44; IC: 0,21-0-0,89). Possivelmente o alelo mutante D esteja associado com proteção à infecção, embora sejam necessários estudos com amostras mais representativas da população.

Em nosso estudo foi verificado um alto percentual de cicatriz de BCG entre os contatos (66,4%) e 73,41 não souberam informar o tempo de vacinação. Uma das limitações desta variável analisada é que a presença de cicatriz vacinal intradérmica a partir dos 35 anos poderia ter sido consequência da vacinação antivariólica, já que

o BCG intradérmico só foi introduzido no município do Rio de Janeiro em 1975 (BRASIL, 1994a).

Em um estudo transversal realizado com os alunos da Faculdade de Medicina de Campos foi observado que a presença de cicatriz vacinal do BCG entre os estagiários durante o período profissionalizante no ambiente hospitalar esteve associada de forma estatisticamente significativa a PT positiva (Soares e cols, 2004). Inversamente, nossos dados não revelaram associação com presença de cicatriz vacinal e positividade a PT, viragem, ou adoecimento por TB, uma possível explicação é que o tempo de vacinação de BCG esteja influenciando a positividade da PT, visto que estudos realizados pelo CDC (1996) mostraram que a reação tuberculínica induzida pelo BCG diminui com o tempo, e em nossa casuística a máxima da idade foi de 91 anos.

Nesta série, encontramos uma associação significativa com resultado da primeira PT maior que 10 mm, assim como na infecção final positiva maior entre indivíduos classificados como não brancos (p: 0,005; OR: 1,69; IC: 1,17-2,43) e (p: 0,01; OR: 1,67; IC: 1,11–2,52) respectivamente. Estes dados são corroborados por Stead e cols (1990) onde em uma clínica no Arkansas encontrou uma frequência maior de infecção *M.tb* entre indivíduos da raça negra. Embora estudos de etnia não tenham sido contemplados no nosso estudo, o agrupamento de cor parda e negra sugere que a presença de marcadores da raça negra na nossa população esta associada com risco para infecção.

Cavalcante e colaboradores em 2007 realizaram um estudo no Rio de Janeiro e verificaram que 73% dos contatos intradomiciliares de casos-índices de TB pulmonar estavam infectados e 4% apresentavam TB ativa. Tais achados corroboram com resultados obtidos no presente estudo onde verificamos uma

freqüência de infecção latente positiva de 64,7% nos contatos estudados e 12,2% de adoecimento. Nossa hipótese é que o adoecimento nestes contatos foi maior do que os resultados apresentados por Cavalcante e cols, possivelmente seja devido à diferença de acompanhamento clínico entre os estudos. As taxas de infecção e adoecimento por TB observadas no nosso estudo se assemelham às encontradas em alguns países da África (Nunn e cols, 1994; Guwatudde e cols, 2003).

7.2. Mutações no éxon 1 do gene *LLM2* e sua associação com infecção e adoecimento.

A LLM é uma proteína do soro sanguíneo que desencadeia a ativação da via complemento, tendo um papel fundamental na imunidade inata. Baixos níveis desta proteína têm sido associados com deficiência na opsonização de organismos patogênicos. Os estudos que enfatizam a função do gene *LLM2* no desenvolvimento da TB têm sido restritos as variantes alélicas no éxon 1, mostrando associações controversas em diversas populações (Liu e cols, 2006). A LLM se liga fortemente a parede da *M.tb*, logo pode facilitar a entrada da micobateria através do processo de fagocitose (Garred e cols, 1997) por meio do MR, sugerindo ser esta via uma desvantagem para micobactéria e uma proteção para o hospedeiro (Schlesinger, 1993).

Baixos níveis de LLM (caráter conferido pelas mutações) também já foram associados com a susceptibilidade à infecção por HIV, HCV, Lúpus e TB em diferentes populações (Garred e cols, 1997; Matsushita e cols, 1998; Tsutsumi e cols, 2001; Garred e cols, 1999). No entanto, alta freqüência desta mutação foi observada nas regiões tropicais (Lipscombe e cols, 1992; Madsen e cols, 1998; Garred e cols, 1992) com redução da ativação do complemento. (Lipscombe e cols,

1992). Por outro lado, os altos níveis da mesma parecem apresentar uma direta associação com doença, como no caso da Síndrome de Sjögren no Japão e da hanseníase na Etiópia (Tsutsumi e cols, 2001; Garred e cols, 1994). Desde modo, é de grande importância estudos funcionais em nossa população, por relatar a relevância da LLM na patogenia da tuberculose, o que poderá fornecer melhores esclarecimentos a respeito da infecção e desenvolvimento da doença.

Uma vez que predisposição genética pode ser considerada um dos fatores de risco para o desenvolvimento e estabelecimento da infecção e doença ativa, tentamos com este estudo, inicialmente, investigar a ocorrência de polimorfismos no éxon 1 do gene *LLM2* e sua possível associação com susceptibilidade a infecção, doença e gravidade da doença ou proteção.

Fidler e colaboradores (2004) observaram uma frequência para o homozigoto selvagem (A) de 0,78, para o alelo B (códon 54) de 0,095, para o alelo C (códon 57) e D (códon 52) a mesma frequência (0,06). Em relação aos níveis séricos de LLM, os indivíduos que apresentam uma concentração de 1000ng/mL desta proteína estão associados com o aumento de risco de SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica). Em nossos achados observamos uma frequência de 58,6% para o homozigoto selvagem, 0,4% do genótipo mutante e 41% do heterozigoto para o alelo B. Para o alelo D encontramos uma frequência de 33% do genótipo homozigoto selvagem, 41% do heterozigoto e 26% do genótipo homozigoto mutante. A ocorrência do alelo C na população do Norte da Tanzânia é muito comum ($C = 0.18$, $B = 0.01$ and $D = 0.008$), assim como em outros países da África. Entretanto a frequência do alelo C foi maior no Kenia (0.33) e Moçambique (0.24) no leste da África (Madsen e cols, 1994; Madsen e cols, 1998) e no Gâmbia (0.30) e Gana (0.31) no oeste da África (Lipscombe e cols, 1992; Garred e cols, 2003). O

nosso estudo foi observado uma freqüência de 46% para o genótipo homozigoto selvagem, 53% para o heterozigoto e 1% para o genótipo homozigoto mutante do gene *LLM2* no grupo de contatos. Tais discrepâncias entre os achados provavelmente pode ser devido às diferenças étnicas, fatores ambientais e condições sócio-econômicas das respectivas populações estudadas.

Estudos apontam para o possível papel do alelo B (códon 54) na infecção pelo *M.tb*, nossos dados não mostraram associação significativa com proteção ou susceptibilidade à infecção em relação ao resultado da primeira PT, conversão a PT ou adoecimento. Estudos funcionais mostraram que a presença do alelo B altera a região de colágeno da proteína e reduz sua concentração no soro. A presença do alelo B foi encontrada com maior freqüência (28%) nos indivíduos saudáveis quando comparados aos pacientes com TB pulmonar (13%) e TB meníngea (8%) (Hoal-van Helden e cols, 1999). Em outro estudo realizado na população africana, onde a TB é endêmica, sugeriu que os genótipos mutantes de LLM possam ter um papel protetor na doença (Garred e cols, 1994; Hoal-van Helden e cols, 1999). Estes dados corroboram com as evidências de que o portador do alelo B pode apresentar maior grau de proteção contra a meningite tuberculósica na África. Inversamente El Sahly e colaboradores (2004) mostraram associação entre o alelo B e susceptibilidade a ocorrência de TB, a freqüência desta mutação (códon 54) foi mais alta entre casos índices quando comparada com controles ($p < 0.01$) negros americanos, mas não foi observada nenhuma diferença entre casos índices e controles brancos e de origem hispânica. Provavelmente, o modelo de estudo, a etnia, o tamanho da amostra e a baixa freqüência do genótipo mutante em nossa casuística sejam os responsáveis por tais divergências.

Em relação ao estudo da mutação no alelo C a frequência do homozigoto selvagem (associado com níveis aumentados de LLM) foi encontrada aumentada entre os contatos que não converteram a PT ($p= 0,03$; OR: 0,30; IC 0,09-0,92) e inversamente a presença da mutação em heterozigose foi encontrado aumentado no grupo de contatos que converteram a PT ($p=0,04$; OR: 2,91; IC: 1,01-8,79). Nossos dados sugerem que os indivíduos que carregam o alelo mutante C do gene *LLM2* são mais susceptíveis a infecção. De acordo com o papel funcional, a presença de heterozigose para as mutações no éxon 1 está associada com níveis intermediários de LLM circulantes, alguns estudos apoiam a hipótese de que, isto seja uma vantagem para a população (Soborg e cols, 2003; Bellamy e cols, 1998).

De acordo com os estudos de Hoal-van Helden (1999) e Garred e cols, (1997) as variantes alélicas no gene *LLM2* estão associadas com fator de proteção à infecção a TB. Bellamy e cols (1998) observaram que a frequência da mutação no alelo C (códon 57) foi estatisticamente significativa entre indivíduos saudáveis quando comparados aos pacientes com TB (0,33 e 0, 28, respectivamente; $p=0,037$), sugerindo uma relação de proteção a TB na população africana. Desta forma, há um questionamento sobre o papel de polimorfismos no gene da LLM e sua associação com proteção ou susceptibilidade à infecção *M.tb* e adoecimento por TB, merecendo novas investigações com diferentes populações e com uma casuística maior.

Nossos dados sugerem que em nossa população a presença do alelo C está associada com susceptibilidade à infecção pelo *M.tb*, porém um estudo mais detalhado com um número amostral maior e com melhor definição de etnia será necessário para um melhor entendimento do papel deste alelo na população brasileira e a sua associação por TB.

Os resultados obtidos com a avaliação do alelo D (códon 52) mostraram que o genótipo selvagem estava aumentado de maneira estatisticamente significativa no grupo de 295 indivíduos que apresentaram PT < 10 mm ($p=0,03$; OR: 0,64; IC: 0,43-0,96), quando comparados aos que apresentaram PT > 10 mm. Por outro lado, a presença do alelo selvagem estava associada com conversão a PT ($p=0,003$) e a presença da mutação neste alelo, seja na forma de homozigose TT ou na frequência alélica, mostrou-se associada com não conversão a PT ($p=0,05$; OR: 0,14; IC: 0,01-1,04) e ($P=0,0008$; OR: 0,26; IC: 0,11-0,61). Nossos resultados sugerem que a participação deste gene na resposta *M.tb* é dual: entre indivíduos não infectados por *M.tb* a presença desta mutação estaria associada com proteção, possivelmente os baixos níveis de LLM proporcionados pela mutação estaria induzindo menos fagocitose do *M.tb* pelo macrófago e conseqüentemente dificultando o processo de infecção. Porém não realizamos estudos funcionais para definir os níveis de LLM entre indivíduos com diferentes genótipos, e não podemos afirmar esta hipótese. Bellamy e colaboradores (1998) em um estudo com a população da Gâmbia encontraram uma prevalência maior do alelo D entre os pacientes com TB comparados com controles, sugerindo que esta mutação pode estar associada com susceptibilidade ao adoecimento, porém neste estudo não foi discriminado quem já era ou não infectado no grupo controle. Estes resultados estão em desacordo com o observado em nosso estudo, onde não encontramos associação com este alelo e ocorrência de doença entre os contatos que adoeceram.

Possivelmente, as diferenças observadas entre os nossos resultados e os descritos na literatura sejam devido às diferenças no modelo de estudo assim como diferenças étnicas poderiam explicar estes resultados discrepantes. Cabe ressaltar que os dados disponíveis na literatura são de grupos étnicos fechados e os modelos

de estudo não contemplam uma coorte de indivíduos não infectados, infectados, recém infectados e que adoeceram como o descrito nesta série.

A resposta imune inata juntamente com a adaptativa, desempenham seu papel de maneira coordenada e possivelmente o papel de determinado gene e/ou proteína que atua no momento inicial da infecção e apresentação *M. tb* portanto, não atua de maneira idêntica entre os indivíduos já infectados, esta hipótese explica o porquê de termos encontrados para o mesmo gene em relação as diferentes associações como as observadas para o alelo D.

Para um melhor entendimento das bases moleculares e imunológicas da LLM, seriam necessários estudos com uma população maior, mais detalhada do ponto de vista étnico e com avaliação funcional e sua participação na resposta imunológica a TB.

Como ainda não foi descrito na literatura nenhum estudo de polimorfismos no gene *LLM2* verificando a associação de conversão à prova tuberculínica entre contatos de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, este trabalho representa um marco inovador no entendimento da resposta inata frente *M. tb*, o que justifica a continuidade de estudos desta natureza na nossa população a fim de contribuir para novas vacinas e produzir proteínas sintéticas para favorecer melhorias na qualidade de vida.

8. CONCLUSÕES

Podemos concluir com este trabalho que:

- O alelo D analisado mostrou uma associação em relação à tuberculose (proteção);
- O alelo C mostrou uma associação em relação à tuberculose (infecção) quando analisadas independentemente;
- Nenhuma associação significativa foi encontrada para o alelo B.
- Devido a grande miscigenação da nossa população, não devemos deixar de realizar estudos que possam melhor esclarecer essas divergentes associações nas diversas regiões. As distribuições genótípicas e alélicas analisadas podem variar de acordo com o grupo étnico/racial, porém as nossas limitações não são as mesmas para populações etnicamente fechadas. Percebemos que é de suma importância estudos similares que possam melhor elucidar as associações que desencadeia proteção ou infecção contra *M. tb*

9. Principais Limitações

As principais limitações encontradas neste estudo foram:

- Dificuldade de distinguir raça na população brasileira;
- Ausência de estudos funcionais
- Ausência de análise de haplótipos;
- Ausência de análise multivariada.

10. Perspectivas da Linha de Pesquisa

- Estudos de Genética da família através da avaliação destes marcadores imunogenéticos entre pacientes e contatos com laços consangüíneos;
- Estudos de Associação entre os polimorfismos em questão com proteção e ou susceptibilidade a infecção *M.tb*, ocorrência de doença ativa e gravidade através da avaliação destes marcadores imunogenéticos entre pacientes e contatos sem laços consangüíneos;
- Inclusão de lectinas envolvidas na resposta imune *M.tb*;
- Inclusão de estudos funcionais;
- Avaliar o efeito sinérgico com outros receptores PRRs;
- Enfatizar e relacionar o polimorfismo com medidas de diagnósticos e terapêuticos a TB.

11. BIBLIOGRAFIA

ADEREM AEUDM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu. **Rev. Immunol**; 17:593-623. 1999.

AISU T, RAVIGLIONE MC, VAN PRAAG E, ERICK P, NARAIN J, BARUGAHARE L, E COLS. Preventive chemotherapy for HIV-associated tuberculosis in Uganda: an operational assessment at a voluntary counseling and testing centre. **AIDS**; 9:267-73. 1995.

AKAIWA M, YAE Y, SUGIMOTO R E COLS. Hakata antigen, a new member of the ficolin/opsonin p35 family, is a novel human lectin secreted into bronchus/alveolus and bile. **J Histochem Cytochem**; 47: 777–86. 1999

ALTARE F, DUARANDY A, LAMMAS D, E COLS. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. **Science**; 280:1432-5. 1998.

Amim L. Estudo de associação entre a tuberculose e o polimorfismo de base única +874T/A no gene que codifica para o IFN γ . 2004. 99 f. **Dissertação** (Mestrado em Clínica Médica) - Instituto de Pneumologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

AMOROSO A, BERRINO M, BONIOTTO M, E COLS. Polymorphism at códon 54 of mannose-binding protein gene influences AIDS progression but not HIV infection in exposed children. **AIDS**; 13:863-4. 1999.

ANDERS EM, HARTLEY CA, JACKSON DC. Bovine and mouse serum beta inhibitors of influenza A viruses are mannose-binding lectins. **Proc. Natl. Acad. Sci . USA**; 87:4485-4489. 1990.

Andersen P. Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Scan. J. Immunol**; 45:1154-131. 1997.

ANDERSEN S, GESER A. The distribution of tuberculous infection among households in African communities. **Bull World Health Organ**; 22:39-60. 1960.

ARIAS M, ROJAS M, ZABALETA J, RODRIGUEZ JI, PARIS SC, BARRERA LF, GARCIA LF. Inhibition of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by Bcg(r) and Bcg(s)

macrophages correlates with nitric oxide production. **J Infect Dis Dec**; 176(6):1552-8. 1997.

ARMSTRONG JA, HART PD. Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. **J Exp Med**. Sep 1;134(3 Pt 1):713-40. 1971.

BALKWILL FR, BURKE F. The cytokine network. **Immunol Today**. Sep; 10(9):299-304. 1989.

BARNES PF. Diagnosing latent tuberculosis infection: the 100-year upgrade. **Am J Respir Crit Care Med**. Mar; 163(4):807-8. 2001.

BELLAMY R, BEYERS N, MCADAM KP, RUWENDE C, GIE R, SAMAAI P, BESTER D, MEYER M, CORRAH T, COLLIN M, CAMIDGE DR, WILKINSON D, HOAL-VAN HELDEN E, WHITTLE HC, AMOS W, VAN HELDEN P, HILL AV. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 97(14):8005-9. 2000.

BELLAMY R, HILL AVS. Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans. **Current Opinion in Immunology**; 10:483-487. 1998.

BELLAMY RJ. Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in Africans: a combined approach using a candidate gene study and a genome-wide screen. **Clinical Science**; 98: 245-50. 2000.

BELLAMY R, RUWENDE C, CORR H T, MCADAM KP WJ, THURSZ M, WHITTLE HC, E COLS. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variations in vitamin D receptor gene. **J Infect Dis**; 179:721-4. 1999.

BELLAMY R, RUWENDE C, CORR H T, MCADAM KP WJ, WHITTLE HC, HILL AVS. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. **N. Engl J Med**; 338:640-4. 1998.

BELLAMY R, RUWENDE C, MCADAM KP WJ, THURSZ M, SUMIYA M, SUMMERFIELD J, E COLS. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage or tuberculosis in Africans. **Q. J. Med**; 91:13-18. 1998.

BEYERS N, GIE RP, SCHAAF HS, VAN ZYL S, TALENT JM, NEL ED, DONALD PR. A prospective evaluation of children under the age of 5 years living in the same household as adults with recently diagnosed pulmonary tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis.** Feb;1(1):38-43. 1997.

Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, e cols. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes and Immunity*; 1:3-19. 1999.

BIDWELL J, KEEN L, GALLAGHER G, KIMBERLY R, HUIZINGA T, MCDERMOTT MF, OKSENBERG J, MCNICHOLL J, POCIOT F, HARDT C, D'ALFONSO S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. **Genes Immun**; Apr.2(2):61-70. 2001.

Bier, OGW. Mycobacteria. In: BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 23ª. Ed. São Paulo, Melhoramentos. 1984.

BLOOM B, MURRAY C. Tuberculosis: commentary on a reemergente killer. **Science**; 21. 257 (5073):1055-64. 1992.

BOCHUD PY, HAWN TR E ADEREM A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. **J. Immunol**; 170:3451-3454. 2003.

Boletim Eletrônico da Secretaria de Saúde do Município do Rio de Janeiro <www.saude.rj.gov.br/Tuberculose/dados.shtml> Acesso em: 24 jan. 2006

BONIOTTO M, BRAIDA L, PIRULLI D, ARRAES L, AMOROSO A, CROVELLA S. MBL2 polymorphism are involved in HIV infection in brazilian perinatally infected children. **AIDS**; 17: 779 -780. 2003.

BONIOTTO M, CROVELLA S, PIRULLI D, E COLS. Polymorphisms in the *MBL2* promoter correlated with risk of HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. **Genes Immun**; 1:346-8. 2000.

BOOM WH, CANADAY DH, FULTON SA, GEHRING AJ, ROJAS RE, TORRES M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis**; 83:98-106. 2003.

BOTHAMLEY G, BECK J, SCHREUDER G, D'AMARO J, DE VRIES R, KARDJITO T, E COLS. Association of tuberculosis and *M. tuberculosis*-specific antibody levels with HLA. **J Infect Dis**; 159:549-55. 1989.

BRAHMAJOTHI V, PITCHAPMAN R, KAKKANAIH V, PALANIMURUGAN K, PARAMASIVAN C, PRABHAKAR R. Association of pulmonary tuberculosis and HLA in South India. **Tubercle**; 72: 123-32. 1991.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. COORDENAÇÃO DE PNEUMOLOGIA SANITÁRIA. **Manual de normas para o controle da tuberculose**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1995a.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 5ª ed. - Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002. 236 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2. ed. Brasília : Ministério da Saúde, 1994b.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **2º Informe técnico sobre a vacinação/revacinação BCG**. Brasília: Ministério da Saúde. 1994a.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Tuberculose**. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília, Brasil; 2002. 99p.

CAPEWELL S, LEITCH AG. The value of contact procedures for tuberculosis in Edinburgh. **Br J Dis Chest**. Oct; 78(4):317-29. 1984

CASANOVA JL, ABEL L. Genetic dissection of immunity to micobactéria: the human model. **Annu Rev Immunol**; 20:581. 2002.

CASANOVA JL, ABEL L. Human mannose-binding lectin in immunity: friend, foe, or both? **J. Exp. Med**; 199: 1295-1299. 2004.

CAVALCANTE SC. ABORDAGENS INOVADORAS PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO. [**Tese de Doutorado**]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2007. 212 p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care facilities. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 43, p. 1-120, 1994.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). The role of BCG vaccine in the prevention and control of tuberculosis in the United States. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 45(4): 1-17.1996

CHAN J, XING Y, MAGLIOZZO RS E COLS.. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. **J. Exp. Med**; 175:1111-1122. 1992

COMSTOCK GW. Frost revisited: the modern epidemiology of tuberculosis. **Am J Epidemiol**. 5:363-382. 1975

COMSTOCK GW. Tuberculosis in twins: are-analysis of the Prophit survey. **Am. Rev. Respir. Dis**; 117:621-24. 1989.

CONLEY ME. Immunogenetics old genes get a new look. **Current Opinion in Immunology**; 15:567-570. 2003.

CREVEL RV, OTTENHOFF THM, MEER JWMVD. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**; 15(2):294-309. 2002.

CROSDALE DJ, OLLIER WER, THOMSON W E COLS. Mannose binding lectin (MBL) genotype distribution with relation to serum levels in UK Caucasoids. **Eur J. Immunogenet**; 27:11-7. 2000.

DAHL M.R, THIEL S, MATSUSHITA M, FUJITA T, WILLIS A.C, CHRISTENSEN T, VORUP-JENSEN J.C. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. **Immunity**; 15:127-135. 2001.

Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. A population-based study of morbidity and mortality in mannose-binding lectin deficiency. **J Exp Med**. May 17; 199(10):1391-9. 2004.

DA SILVA RPH, B. F.; JOINER, K.A. E COLS. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. **J. Immunol**; 143:617-622. 1989.

DAVIES, EJ, SNOWDEN N, HILLARBY MC, CARTHY D, GRENNAN DM, THOMSON W, OLLIER WE. Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**; 38: 110-114. 1995

DELGADO J, BAENA A, THIM S, GOLDFIELD A. Ethnic-Specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**;186:1463-8. 2002.

FREIRE DN, BONAMETTI AM, MATSUO T. Diagnóstico precoce e progressão da tuberculose em contatos. Early Diagnosis and Progression of Tuberculosis in Contacts. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília*,.16(3): 155-163.2007.

DOMMETT RM, KLEIN N, TURNER MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. **Journal Compilation**; 68:193-209. 2006.

DOWNING I, KOCH C, KILPATRICK D. C. Immature dendritic cells possess a sugar-sensitive receptor for human mannan-binding lectin. **Immunology**; 109:360-4. 2003

DYE C, SCHEELE S, DOLIN P, PATHANIA V, RAVIGLIONE MC. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. **JAMA**; 282:677-686. 1999.

ELLNER J. Review: The immune response in human tuberculosis Implications for tuberculosis control. **The Journal of Infectious Diseases**; 176:1351-9. 1993.

EL SAHLY HM, REICH RA, DOU SJ, MUSSER JM, GRAVISS EA. The effect of mannose binding lectin gene polymorphisms on susceptibility to tuberculosis in different ethnic groups. **Scand J Infect Dis**; 36(2):106-8. 2004.

ENARSON DA, ROUILLON A. **The epidemiological basis of tuberculosis control**. In: Davies PD, ed. *Clinical tuberculosis*. London, United Kingdom: Chapman and Hall Ltd, 1994.

EZEKOWITZ RA, KUHLMAN M, GROOPMAN JE, BYRN RA. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. **J Exp Med**; 169:185–96. 1989.

FIDLER KJ, WILSON P, DAVIES JC, TURNER MW, PETERS MJ, KLEIN NJ. Increased incidence and severity of the systemic inflammatory response syndrome in patients deficient in mannose-binding lectin. **Intensive Care Med**; 30:1438-1445. 2004.

FLYNN JL, CHAN J. Immunology of Tuberculosis. **Ann. Rev. Immunol**; 19:93- 129. 2001.

FRIEDEN TR, STERLING TR, MUNSIF SS, WATT CJ, DYE C. Tuberculosis. **Lancet**; 362:887-899. 2003.

GADJEVA M, TAKAHASHI K, THIEL S.. Mannan-binding lectin –a soluble pattern recognition molecule. **Molecular Immunology**; 41:113-121. 2004.

GAO P, FUJISHIMA S, MAO X, REMUS N, KANDA M, ENOMOTO T, E COLS. Genetic variants of NRAMP1 and active tuberculosis in Japanese populations. **Clin Genet**, 58:74-6. 2000.

GARRED P, HARBOE M, OETTINGER T, KOCH C, SVEJGAARD A. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? **Eur. J. Immunogenet**; 21:125-31. 1994.

GARRED P, LARSEN F, MADSEN HO, KOCH C. Mannose-binding lectin deficiency –revisited. **Molecular Immunology**; 40: 73-84. 2003.

GARRED P, MADSEN HO, HOFMANN B, SVEJGAARD A. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. **Lancet**, 346: 941-3. 1995.

GARRED P, MADSEN HO, MARQUART H, HANSEN TM, SORENSE SF, PETERSEN J, VOLCK B, SVEJGAARD A, GRAUDAL NA, RUDD PM, E COLS. Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. **J. Rheumatol**, 27: 26-34. 2000.

GARRED P, PRESSLER T, LANNG S, E COLS. Mannose-binding lectin (MBL) therapy in an MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease. **Pediatr Pulmonol**; 33:201-7. 2002.

GARRED P, PRESSLER T, MADSEN HO, FREDERIKSEN B, SVEJGAARD A, HOIBY N, SCHWARTZ M, KOCH C. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. **J. Clin. Invest**, 104: 431-437. 1999.

GARRED P, RICHTER C, ANDERSEN AB, MADSEN HO, MTONI I, SVEJGAARD A, SHAO J. Mannan-binding lectin in the sub-Saharan HIV and tuberculosis epidemics. **Scand J Immunol**. Aug; 46(2):204-8. 1997.

GARRED P, THIEL S, MADSEN HO, RYDER LP, JENSENIUS JC, SVEJGAARD A. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannan binding protein associated with low serum. **Clin Exp Immunol**. Dec; 90(3): 517-21. 1992.

GOLDFIELD A, DELGADO J, THIM S, BOZON M, UGLIALORO A, TURBAY D, E COLS. Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. **J.A.M.A**; 279:226-28. 1998.

GRAUDAL NA, HOMANN C, MADSEN HO, SVEJGAARD A, JURIK AG, GRAUDAL HK, GARRED P. Mannan binding lectin in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. **J. Rheumatol**; 25:629-635. 1998.

GRAY IC, CAMPBELL DA, SPURR NK. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. **Hum Mol Genet**, 9:2403-2408. 2000

GREENWOOD C, FUJIWARA T, BOTHROYD L, MILLER M, FRAPPIER D, FRANINGG E. Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family. **AM J Hum. Genet**; 67:405-16. 2000.

GRZYBOWSKI S, BARNETT GD, STYBLO K. Contacts of cases of active pulmonary tuberculosis. **Bull Int Union Tuberc Lung Dis**, 5:90-106. 1975.

GUWATUDDE D, NAKAKEETO M, JONES-LOPEZ EC, E COLS. Tuberculosis in household contacts of infectious cases in Kampala, Uganda. **Am J Epidemiol**;158: 887- 898. 2003.

HAKOZAKI Y, YOSHIBA M, SEKIYAMA K, SEIKE E, IWAMOTO J, MITANI K, MINE M, MORIZANE T, OHTANI K, SUZUKI Y, WAKAMIYA N. Mannose-binding lectin and the prognosis of fulminant hepatic failure caused by HBV infection. **Liver**. Feb;22(1):29-34. 2002.

HASS DW, DES PREZ RM. *Mycobacterium tuberculosis*. In: Mandell, G., Douglas, R., Bennett, J. E., Dolin, R. (eds) Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 4th ed. vol 2. New York: **Churchill Livingstone**. 2213-2243. 1995.

HAURUM JS, THIEL S, JONES IM, FISCHER PB, LAURSEN SB, JENSENIUS JC. Complement activation upon binding of mannan-binding protein to HIV envelope glycoproteins. **AIDS**. Oct;7(10):1307-13. 1993.

HILL AV. The immunogenetics of human infectious diseases. **Ann. Rev. Immunol**; 16:593-617. 1998.

HOAL-VAN HELDER EG, EPSTEIN J, VICTOR TC E COLS. Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. **Pediatr. Res**; 45:459-64. 1999.

HOLMSKOV U, LAURSEN SB, MALHOTRA R, WIEDEMANN H, TIMPL R, STUART GR, TORNØE I, MADSEN PS, REID KB, JENSENIUS JC. Comparative study of the structural and functional properties of a bovine plasma C-type lectin, collectin-43, with other collectins. **Biochem J**. Feb 1;305 (Pt 3):889-96. 1995.

HOWARD A, RS K, EE S, MN G. Crack cocaine use and other risk factors for tuberculin positivity in drug users. **Clin Infect Dis**; 15(35). 2002.

HUANG YF, WANG W, HAN JY, WU XW, ZHANG ST, LIU CJ, HU QG, XIONG P, HAMVAS RM, WOOD N, GONG FL, BITTLES AH. Increased frequency of the mannose-binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients. **Eur J Immunogenet**. Apr, 30(2):121-4. 2003.

HUEBNER RE, SCHEIN MF, BASS JB JR. The tuberculin skin test. **Clin Infect Dis**. Dec;17(6):968-75. Review. 1993.

IP WK, LAU YL, CHAN SY, MOK CC, CHAN D, TONG KK, LAU CS. Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern Chinese. **Arthritis Rheum**; 46(2):555-6. 2000.

JACK DL, KLEIN NJ, TURNER MW. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunol Rev**; 180:86-99. 2001.

JACK DL, READ RC, TENNER AJ, E COLS. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. **J Infect Dis**; 184:1152-62. 2001.

JACK DL, TURNER MW. Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. **Biochem Soc. Trans**; 31:753-757. 2003.

JO, EK, PARK, JK, DOCKRELL, HM. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. **Current Opinion in Infectious Disease**; 16:205-210. 2003.

JOUANGUY E, LAMBEMEDI-CHERRADI S, ALTARE F E COLS. Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculosis bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. **J Clin Invest**; 100:2658-64. 1997.

JUFFERMANS N, FLORQUIN S, CAMOGLIO L, VERBON A, KOLK A, SPEELMAN P, E COLS. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. **J Infect Dis**; 182:902-8. 2000.

KAUFMANN SH, FLESCHE IE, GATRILL A, GULLE H, KOGA T, MUNK ME, SCHOEL B, STEINHOFF U, WAND-WÜRTTENBERGER A. Function and antigen specificity of T-cells against mycobacteria. **Trop Med Parasitol**. Sep;41(3):319-20. 1990.

KAWASAKI T, ETOH R, YAMASHINA I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. **Biochem Biophys Res Commun**; 81: 1018-24. 1978.

KENT & KUBICA, 1975, **Manual de Bacteriologia do MS**, 1994.

KILPATRICK DC. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. **Biochim Biophys Acta**; 1572: 401-13. 2002.

KILPATRICK D.C. Therapeutic applications of mannan-binding lectin. **Biochem. Soc. Trans**; 31:745-747. 2003.

KOCH A, MELBYE M, SORENSEN P, HOMOE P, MADSEN HO, MOLBAK K, HANSEN CH, ANDERSEN LH, HAHN GW, GARRED P. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. **Jama**. 285:1316-21. 2001.

KOPP EB, MEDZHITOV R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. **Current Opinion in Immunology**; 11:13-18. 1999.

KRITSKI AL, RUFFINO-NETTO A. A Health Sector Reform in Brazil: impact on Tuberculosis Control and perspectives. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**; 4(7):622-626. 2000.

KUHLMAN M, JOINER K, EZEKOWITZ RA. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. **J Exp Med**; 169:1733-1745. 1989.

LARSEN, F., H. O. MADSEN, R. B. SIM, C. KOCH, GARRED P. Disease associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerisation and activity of the final protein. **J. Biol. Chem.** In press. 2004.

LIENHARDT C, FIELDING K, SILLAH J, TUNKARA A, DONKOR S, MANNEH K, WARNDORFF D, MCADAM KP, BENNETT S. Risk factors for tuberculosis infection in Sub-Saharan Africa: a contact study in The Gambia. **Am J Respir Crit Care Med**, 168(4):448-55. 2003.

LIENHARDT C. From exposure to disease: the role of environmental factors in susceptibility to and development of tuberculosis. **Epidemiol Rev**, 23:288–301. 2001.

LIPCOMBE RJ, SUMIYA M, HILL AV. High frequencies in Africa and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Hum Mol Genet**; 1:709-15. 1992.

LIU W, ZHANG F, XIN Z-T, ZHAO Q-M, WU X-M, ZHANG P-H, VLAS S. DE, RICHARDUS J. H, HABBEMA J. D. F., YANG H, CAO W-C. Sequence variations in

the MBL gene and their relationship to pulmonary tuberculosis in the Chinese Han population. **Int J Tuberc Lung Dis** 10 (10) :1098-1103. 2006.

LIU Y, ENDO Y, IWAKI D, E COLS. Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. **J Immunol**; 175: 3150–6. 2005

LYNCH NJ, ROSCHER S, HARTUNG T E COLS. L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement. **J Immunol**;172: 1198–202. 2004.

MADICO G, GILMAN RH, CHECKLEY W, CABRERA L, KOHLSTADT I, KACENA K, DÍAZ JF, BLACK R. Community infection ratio as an indicator for tuberculosis control. **Lancet**. Feb 18;345(8947):416-9. 1995.

mADSEN ho, gARRED p, kURTZHALS ja, E COLS. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. **Immunogenetics**; 40:37–44. 1994.

MADSEN HO, GARRED P. THIEL S, E COLS. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. **J Immunol**; 155:3013-20. 1995.

MADSEN HO, SATZ ML, HOGH B, SVEJGAARD A, GARRED P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. **J Immunol**; 161: 3169–75. 1998:

MALIK S, ARIAS M, FLUMERI CD, GARCIA LF, SCHURR E. Absence of association between mannanose-binding lectin gene polymorphisms and HIV-1 infection in a Colombian population. **Immunogenetics**; 55:49-52. 2003.

MATSUSHITA M, FUJITA T. Activation of the classical complement pathway by mannanose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. **J Exp. Med**; 176: 1497-1502. 1992.

MATSUSHITA M, HIJIKATA M, OHTA Y, IWATA K, MATSUMOTO M, NAKAO, K, KANAI K, YOSHIDA N, BABA K, MISHIRO S. Hepatitis C virus infection and mutations of mannanose-binding lectin gene *MBL*. **Arch. Virol**; 143:645-651. 1998.

MATSUSHITA M, MIYAKAWA H, TANAKA A, E COLS. Single nucleotide polymorphisms of the mannose-binding lectin are associated with susceptibility to primary biliary cirrhosis. **J. Autoimmun**; 17:251-7. 2001.

MEDZHITOV R, JANEWAY. CA JR. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**; 91(3):295-8. 1997.

MEGIA A, GALLART L, FERNÁNDEZ-REAL JM, VENDRELL J, SIMÓN I, GUTIERREZ C, RICHART C. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with gestational diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab**. Oct;89(10):5081-7. 2004.

MEHRA N, RAJALINGAM R, MITRA D, TANEJA V, GIPHART M. Variants of hla-dr2/drtr51 group haplotypes and susceptibility to tuberculosis leprosy and pulmonary tuberculosis in Asian Indians. **Int J Lepr Other Mycobact**; 63:241-48. 1995.

MINCHINTON RM, DEAN MM, CLARK TR, HEATLEY S, MULLIGHAN. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, ML levels and function in an Australian blood donor population. **Scand. J. Immunol**; 56:630-641. 2002.

NARAIN J, RAVIGLIONE MC, KOCHI A. HIV associated tuberculosis in development countries: epidemiology and strategies for interventions. **Tubercle and Lung Disease**; 73:311-21. 1992.

NATIONAL TUBERCULOSIS INSTITUTE BENGALORE. Tuberculosis in a rural population of South India: a five-year epidemiological study. **Bull World Health Organ**. 51: 473-451.1974.

NETH O, JACK DL, DODDS AW, HOLZEL H, KLEIN NJ, TURNER MW.. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. **Infect. Immun**; 68: 688-693. 2000.

NEWPORT M, HUXLEY C, HUSTON S, HAWRYLOWICZ C, OOSTRA B, WILLIAMSON R, E COLS. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. **N. Engl J Med**; 335:1941-5. 1996.

NOZAKI YH, Y.; ICHIYAMA, S, E COLS. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. **Infect. Immun**; 65:3644-3647. 1997.

NUNN P, MUNGAI M, NYAMWAYA J, E COLS. The effect of human immunodeficiency virus type-1 on the infectiousness of tuberculosis. **Tuber Lung Dis**;75: 25-32. 1994.

OLIVEIRA, MM, SIMIÃO DA SILVA JCS, FONSECA-COSTA JF, AMIM LH, LOREDO CCS, MELLO H, QUEIROZ, LF, MELLO FCQ, LAPA E SILVA JR, KRITSKI AL E SANTOS AR. Distribuição de Polimorfismos de base única (SNPs) no gene de TNF- α (-238/-308) entre pacientes com TB e outras pneumopatias: Marcadores genéticos de susceptibilidade a ocorrência de TB? **Journal de Pneumol**; 30:371-377. 2004.

OMS (World Health Organization). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO report 2004. Geneva, World Health Organization Disponível em: <<http://www.who.org>>. Acesso: 20. fev. 2005.

OMS (World Health Organization). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO report 2006. Geneva, World Health Organization Disponível em: <<http://www.who.org>>. Acesso: 10. jan. 2006.

OMS (World Health Organization). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376). Acesso: 13. jan. 2007.

ORME, IM.; ANDERSEN, P. & BOOM, WH. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis**; 167: 1481-1497. 1993.

PALANIYAR N, NADESALINGAM J, CLARK H, SHIH MJ, DODDS AW, REID KB. Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin. **J Biol Chem**; 279: 32728–36. 2004.

PASULA RWJRK, D.L, E COLS. Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Invest**; 103:483-490. 1999.

PRESANIS JS, HAJELA K, AMBRUS G, GAL P, SIM RB. Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2. **Mol. Immunol**; 40:921-929. 2004.

RAJALINGAM R, MEHRA N, JAIN R, MYNEEDU V, PANDE J. Polymerase chain reaction-based sequence-specific oligonucleotide hybridization analysis of HLA class II antigens in pulmonary tuberculosis: relevance to chemotherapy and disease severity. **J Infect Dis**; 173:669-76. 1996.

RAJ NARAIN, NAIR SS, RAMANATHA R, E COLS. Distribution of tuberculous infection and disease among households in a rural community. **Bull World Health Organ**;34:639-54. 1996.

RAVIGLIONE MC. The TB epidemic from 1992 to 2002. **Tuberculosis**; 83:4-14. 2003.

RAVIKUMAR M, DHEENADHAYALAN V, RAJARAM K, LAKSHMI S, KUMARAM P, PARAMASIVAN C, E COLS. Association of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 alleles with pulmonary tuberculosis in south India. **Tuber Lung Dis**; 79:309-17. 1999.

REILING N, HOLSCHER C, FEHRENBACH A, KROGER S, KIRSCHNING CJ, GOYERT S E EHLERS S. Cutting edge: Toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis* . **J Immunol**;169:3480-3484. 2002.

ROBINSON D, PHILLIPS NC, WINCHESTER B. Affinity chromatography of human liver alpha-D-mannosidase. **FEBS Lett**; 53: 110-2. 1975:

ROCKETT K, BROOKES R, UDALOVA IA, VIDAL S, HILL AVS, KWIATKOWSKI D. 1,25-Dihydroxyvitamin D induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line. **Infection and Immunity**; 66:5314-21. 1998.

ROELSGAARD E, IVERSEN E, BLOCHER C. Tuberculosis in Tropical Africa. **Bull World Health Organ**; 30:459-518. 1964.

ROOK GA. The role of vitamin D in tuberculosis. **Am Rev Respir Dis**. Oct;138(4):768-70. No abstract available. 1988.

ROOK G, STEELE J, FRAHER L, E COLS. Vitamin D, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by humans monocytes. **Immunology**; 57:159-63. 1986.

ROSE CE JR, ZERBE GO, LANTZ SO, BAILEY WC. Establishing priority during investigation of tuberculosis contacts. **Am Rev Respir Dis**. Apr;119(4):603-9. 1979.

ROSSI V, CSEH S, BALLY I, THIELENS N. M, JENSENIUS J.C, ARLAUD G.J. Substrate Specificities of Recombinant Mannan-binding Lectin-associated Serine Proteases-1 and -2 **J. Biol. Chem**; oct ; 276:40880-40887. 2001.

ROUILLON A, PERDRIZET S, PARROT R. Transmission of tubercle bacilli: the effects of chemotherapy. **Tubercle**;57:275–9. 1976.

ROY S, FRODSHAN A, SAHA B, HAZRA SK, MASCIE TAYLOR CG, HILL AVS. 1999. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **J Infect Dis**; 179:187-91. 1999.

RYU S, PARK Y, BAI G, KIM S, PARK S, KANG S. 3'UTR polymorphism in the NRAMP1 gene is associated with susceptibility to tuberculosis in Koreans. **Int J Tuberc Lung Dis**; 4:577-80. 2000.

SAIFUDDIN M, HART ML, GEWURZ H, ZHANG Y, SPEAR GT. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. **J Gen Virol**; 81:949–55. 2000.

SAIMAN L, SAN GABRIEL P, SCHULTE J, VARGAS MP, KENYON T, ONORATO I. Risk factors for latent tuberculosis infection among children in New York City. **Pediatrics**. May;107(5):999-1003. 2001.

SALLUSTO F, CELLA M, DANIELI C, LANZAVECCHIA A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **J Exp Med**. Aug 1;182(2):389-400. 1995.

SANTOS IK, COSTA CH, KRIEGER H, FEITOSA MF, ZURAKOWSKI D, FARDIN B, GOMES RB, WEINER DL. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infect. Immun**; 69:5212-5. 2001.

SASTRY K, EZEKOWITZ RA. Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense. **Curr Opin Immunol**. Feb;5(1):59-66. Review. 1993.

SCHLESINGER LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. **J.Immunol**; 150:2920-2930. 1993.

SCHELENZ S, MALHOTA R, SIM RB, E COLS. Binding of host collectins to the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*: human surfactant protein D acts as a agglutinin for acapsular yeast cells. **Infect Immun**; 63:3360-3366. 1995.

SCHLUGER NW. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. **Respir Res**; 2(3):157-163. 2001.

SCHWAEBLE, W, DAHL M.R THIEL S, STOVER C, JENSENIUS J.C. The mannan-binding lectin-associate de serine proteases (MASPs) and Map19: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. **Immunobiology**; 205: 455-466. 2002.

SEGAL S, HILL AV. Genetic susceptibility to infectious disease. **Trends in Microbiology**; 11(9):445-448. 2003.

SEGAT L, SILVA VASCONCELOS LR, MONTENEGRO DE MELO F, SANTOS SILVA B, ARRAES LC, MOURA P, CROVELLA S. Association of polymorphisms in the first exon of mannose binding lectin gene (MBL2) in Brazilian patients with HCV infection. **Clin Immunol**. Jul;124(1):13-7. Epub 2007 May 21. 2007.

SELVARAJ P, JAWAHAR MS, RAJESWARI DN, ALAGARASU K, VIDYARANI M, NARAYANAN PR. Role of mannose binding lectin gene variants on its protein levels and macrophage phagocytosis with live *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary tuberculosis. **FEMS Immunol Med Microbiol**. Apr;46(3):433-7. 2006.

SELVARAJ P, KURIAN SM, UMA H, REETHA AM, NARAYANAN PR. Influence of non-MHC genes on lymphocyte response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens & tuberculin reactive status in pulmonary tuberculosis. **Indian J Med Res**; 112:86-92. 2000.

SELVARAJ P, NARAYANAN PR, REETHA AM.. Association of functional mutant homozygotes of the mannose binding protein gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis in India. **Tuber Lung Dis**; 79(4):221-7. 1999.

SELVARAJ P, SRIRAM U, KURGAN SM, REETHA A, NARAYANAN P. Tumour necrosis factor alpha (-238 and -308) and beta gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis: haplotype analysis with HLA-A, B and DR genes. **Tuberculosis**, 81: (5/6), 335-341. 2001.

SHAW JB, WYNN-WILLIAMS N. Infectivity of pulmonary tuberculosis in relation to sputum status. **Am Rev Tuberc**;69:724-32. 1954.

SHERIFF S, CHANG CY, EZEKOWITZ RA. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. **Nat Struct Biol**; 1: 789-94. 1994.

Simião Silva, JCS. Estudo de polimorfismos no receptor Toll like 2 (Arg753Gln) e Toll like 4 (Thr399Le) em pacientes com Tuberculose Pulmonar Ativa. 2006. 120 f. **Dissertação** (Mestrado em Clínica Médica) - Instituto de Pneumologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SKAMENE E, GROS P, FORGET A, KONGSHAVN PA, ST CHARLES C, TAYLOR BA. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. **Nature**. Jun 10; 297(5866):506-9. 1982.

SMITH PG. **Epidemiology of tuberculosis**. In: Bloom B, ed. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994.

SOARES LCP, MELLO FCQ, KRITSKI AL. Prevalência da prova tuberculínica positiva entre alunos da Faculdade de Medicina de Campos (RJ). **J. Bras Pneumol**; 30(4) 440-7. 2004.

SOBORG C, MADSEN HO, ANDERSEN AB, LILLEBAEK T, KOK-JENSEN A, GARRED P. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. **Journal of Infectious Diseases**; 188:777-82. 2003.

STAHL PD, EZEKOWITZ RA. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. **Curr Opin Immunol**. Feb; 10(1):50-5. Review. 1998.

STEAD, WW. Genetics and resistance to tuberculosis. Could resistance be enhanced by genetic engineering? **Ann. Intern. Med**; 116: 937-941. 1992.

STEAD WW, SENNER J, REDDICK W, LOFGRIEN J. Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. **N Engl J Med**; 322:422-7. 1999.

STEAD WW, SENNER JW, REDDICK WT, LOFGREN JP. Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. **N Engl J Med**. Feb 15; 322(7):422-7. 1990.

STEAD WW. Variation in vulnerability to tuberculosis in America today: random, or legacies of different ancestral epidemics? **Int J Tuberc Lung Dis**; 5(9):807-814. 2001.

STEFFENSEN R, THIEL S, VARMING K, JERSILD C, JERSENIUS J.C. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence –specific primers. **J Immunol. Methods**. Jul 31; 241(1-2):33-42. 2000.

STOVER C. M, THIEL S, THELEN M, LYNCH N.J, VORUP-JENSEN T, JENSENIUS J.C, SCWAEBLE WJ. Two constituents of the initiation complex of the manna-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. **J Immunol**; 162:3481-3490. 1999.

STRIETER RM, BELPERIO JA, KEANE MP. Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. **Curr Opin Infect Dis**; 16:193-198. 2003

STYBLO K. State of the art: epidemiology of tuberculosis. **Bull Int Union Tuberc**; 53:141–52. 1978.

SUMIYA M, SUPER M, TABONA P, E COLS. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. **Lancet**; 337:1569-70. 1991.

SUMMERFIELD JA, RYDER S, THURSZ M, GORCHEIN A, TURNER MW. Mannose-binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. **Lancet**; 345:886-889. 1995.

SUMMERFIELD JA, SUMYA M, LEVIN M, TURNER MW. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. **BMJ**; 314: 1229-32. 1997.

SUMMERFIELD JA, TAYLOR ME. Mannose-binding proteins human serum: identification of mannose-specific immunoglobulins and a calcium-dependent lectin, of broader carbohydrate specificity, secreted by hepatocytes. **Biochim Biophys Acta**; 883:197-206. 1986.

SUPER M, THIEL S, LU J, LEVINSKY RJ, TURNER MW. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. **Lancet**; 2:1236-9. 1989.

TABONA P, MELLOR A, SUMMERFIELD JÁ. Mannose binding protein is involved in first-line host defense evidence from transgenic mice. **Immunology**; 85:153-159. 1995.

TAKAHASHI M, ENDO Y, FUJITA T, MATSUSHITA M. A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. **Int Immunol**. May; 11(5):859-63. 1999.

TERAN-ESCANDON D, TERÁN-ORTIZ L, CAMARENA-OLIERA A, GONZÁLEZ-ÁVILA G, VACA-MARÍN M, GRANADOS J, E COLS. Human leukocyte antigen-associated susceptibility to pulmonary tuberculosis: molecular analyses of class II alleles by DNA amplification in Mexican patients. **Chest**; 115:428-33. 1999.

TEXEREAU J, CHICHE JD, TAYLOR W, CHOUKROUN G, COMBA B, MIRA JP. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. **Clin Infect Dis**. Nov 15; 41 Suppl 7:S408-15. Review. 2005.

THIEL S, HOLMSKOV U, HVIID L, LAURSEN SB, JENSENIUS JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. **Clin Exp Immunol**: 90: 31–5. 1992.

THIEL S; VORUP - JENSEN, T STOVER, C.M; SCHWAEBLE, W; LAURSEN, S.B; POULSEN, K; WILLIS, A.C EGGLETON, P HANSEN, S. HOLMSKOV, U; REID, K.B; JENSENIUS, J.C. A second serine protease associated with mannan -binding lectin that activates complement. **Nature**; 386: 506 - 510.1997.

THOMAS HC, FOSTER GR, SUMIYA M, E COLS. Mutation of gene of mannose binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. **Lancet**; 348:1417–9. 1996.

THOMPSON, N.J., GLASSROTH, J., SNIDER, D.E. Jr., FARER, L.S. The booster phenomenon in serial tuberculin testing. **Am. Rev Respir Dis**, v. 119, p. 587-597, 1979.

TSUTSUMI A, SASAKI K, WAKAMIYA N E COLS. Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. **Genes Immun**; 2(2):99-104. 2001.

TUFARIELLO JM, CHAN JA, FLYNN A. Latente tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. **Lancet Infect Dis**; 3:578-90. 2003.

TURNER MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule or the innate immune system. **Immunol Today**; 17:532-40. 1996.

TURNER MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Mol. Immunol**; 40:423-429. 2003.

UGUZ A, BERBER Z, COSKUM M, HALIDE AKBAS S, YEGIN O. Mannose –binding lectin levels in children with asthma. **Pediatr Allergy Immunol**; 16:231-235. 2005.

UNDERHILL DM, OZINSKY A, SMITH KD, E ADEREM A. Toll-like receptor -2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. **Proc Natl Acad Sci USA**; 96:14459. 1999.

VAN GOLDE LM. Potential role of surfactant proteins A and D in innate lung defense against pathogens. **Biol Neonate**; 67 Suppl 1:2-17. Review. 1995

VASTA GR, QUESENBERRY M, AHMED H, O' LEARY N. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathways. **Dev Comp Immunol**; 23:401-20. 1999.

VORUP -JENSEN T, PETERSEN S.V, HANSEN A.G, POULSEN K, SCHWAEBLE W, SIM, R.B, REID, K.B, DAVIS S.J, THIEL S, JENSENIUS J.C. Distinct pathways os mannan-binding lectin (MBL) – and C1 complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL – associated serine protease-2. **J. Immunol**; 165: 2093- 2100. 2000.

WALLIS R, DRICKAMER K. Asymmetry adjacent to the collagen-like domain in rat liver mannose-binding protein. **Biochem J**. Jul 15; 325 (Pt 2):391-400. 1997

WALPORT M.J. Complement. First of two parts. **N. Eng J. Med.**; 344:1058-66. 2001.

WALPORT M.J. Complement. Second of two parts. **N. Eng J. Med**; 344:1140-4. 2001.

WANG X, SAITO J, TANINO Y, ISHIDA T, FUJITA T, MUNAKATA M. Mannose binding lectin gene polymorphisms and asthma. **Clin Exp Allergy**. Sep; 37(9):1334-9. 2007.

WEISS ST, MARTINEZ F. Bioinformatics Tools. Exact Hardy-Weinberg. <<http://innateimmunity.net/IIPGA2/Bioinformatics>> Acesso: julho2007.

WEIS WI, DRICKAMER K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. **Structure**; 2: 1227-40. 1994.

WEIS WI, KAHN R, FOURME R, DRICKAMER K, HENDRICKSON WA. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. **Science**. Dec 13;254(5038):1608-15. 1991.

WEIS WI, TAYLOR ME, DRICKAMER K. The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunol Rev**. Jun;163:19-34. Review. 1998.

WELLS, WF. On airborne infection II. Droplets and droplet nuclei. **American Journal of Hygiene**; 20: 611-618. 1934.

WIEGESHAUS E, BALASUBRAMANIAN V, SMITH DW. Immunity to tuberculosis from the perspective of pathogenesis. **Infect Immun**; 57: 3671-6. 1989.

WILD J, ROBINSON D, WINCHESTER B. Isolation of mannose binding proteins from human and rat liver. **Biochem J**; 210: 167-74. 1983

WILKINSON RJ, LLEWELYN M, TOOSSI Z, E COLS. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphism on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. **Lancet**; 355: 618-21. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, financing. Who Report. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2002.295. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Stop TB Partnership. 2006.
WHO/HTM/STB/factsheet/2006.1

WORTHLEY D.L, BARDY P.G, MULLIGHAN CG. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. **Internal Medicine Journal**; 35:548-555. 2005.

YUEN MF, LAU CS, LAU YL, E COLS. Mannose binding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic hepatitis B infection. **Hepatology**; 29:1248–51. 1999.

12. ANEXO

12.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo de polimorfismos em base única na região promotora de genes de citocinas e sua possível associação com a tuberculose pulmonar.

Nos próximos meses será realizado um estudo em pacientes sob suspeita de apresentarem tuberculose no pulmão. Neste estudo, pretende-se avaliar genes de citocinas que possibilitem correlacionar esses genes com possível proteção ou severidade a doença. Este estudo será coordenado pelo Dr. Afrânio Kritski, Dr. Adalberto Rezende, Dra. Fernanda Queiroz Mello, Joseane F. Costa, profissionais em atividades no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ. Este termo de consentimento explica o estudo, portanto leia cuidadosamente. Pergunte o que julgar necessário. Durante o estudo será esclarecido quanto a eventos que possam alterar a sua permanência no estudo. Você deverá compreender adequadamente o estudo antes de assinar este termo de consentimento.

1) Procedimentos

Se eu concordar em participar deste estudo, responderei a um questionário padronizado que investigará algumas doenças que possam está relacionadas a estes genes.

Serão coletados 5ml de sangue no meu antebraço, na face anterior, com agulha e seringa descartáveis, antecedido por anti-sepsia local. O sangue será utilizado para avaliar a presença de variações genéticas existente na região promotora dos genes de citocinas. Os dados gerados pela análise imunogenética não serão divulgados nominalmente e sim sob forma de freqüência.

2) Local do estudo

Estes procedimentos serão realizados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF – UFRJ.

3) Riscos/Desconfortos

Algumas das questões que constam dos questionários podem ser inapropriadas e produzir sentimentos indesejáveis, mas, caso eu ache necessário, poderei interromper a entrevista a qualquer momento. Os riscos da retirada de sangue incluem introdução da agulha, desconforto temporário, pequena ferida e, raramente, infecção local. Não haverá risco financeiro e todos os testes rotineiros para tuberculose serão realizados.

4) Tratamento e compensação por danos

Se eu tiver algum problema de saúde em decorrência deste estudo, o tratamento será fornecido pela instituição participante. O custo deste tratamento será totalmente coberto pelo HUCFF. O HUCFF não prevê nenhuma forma de compensação financeira por possíveis injúrias.

5) Alternativas

Se eu decidir não participar neste estudo, ou interromper a minha participação a qualquer momento, o meu tratamento médico será mantido no HUCFF.

6) Custos para os participantes

Não haverá custos para mim, caso decida pela minha participação neste estudo, nem para o tratamento que porventura necessitar.

7) Benefício

A retirada do meu sangue aos qual eu irei me submeter ajudará no entendimento do desenvolvimento da tuberculose nas pessoas. Com isso, espera-se que mais

conhecimentos científicos sejam obtidos com conseqüente poder determinar quem tem mais chances de adoecer por tuberculose.

8) Reembolso

Não haverá benefícios financeiros para mim em participar no estudo.

9) Confidenciabilidade dos dados

Procedimentos serão adotados pelos responsáveis por este estudo no intuito de proteger a confidencialidade das informações que eu forneça. As informações serão codificadas e mantidas num local reservado o tempo todo. Somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso às informações e aos questionários. Após o término deste estudo, as informações serão transcritas dos questionários para arquivos no computador e aqueles serão mantidos em local reservado. Porém, o acesso permanecerá restrito aos mesmos pesquisadores. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida, portanto serão confidenciais como a lei determina, salvo eu conceda permissão para isso. Os resultados serão discutidos comigo e enviados para o meu médico (salvo eu não deseje isso).

CONSENTIMENTO

O Dr. Afrânio e outros pesquisadores discutiram as informações comigo, responderam as minhas perguntas. Receberei uma cópia deste consentimento para mantê-lo comigo. Nos próximos dias, se tiver qualquer dúvida sobre a minha participação neste estudo, poderei utilizar os seguintes números de telefone: (21) 2550-6903 ou (21) 2562-2426, para contactar o Dr. Afrânio Kritski ou Joseane F. Costa.

A PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA É VOLUNTÁRIA

Eu tenho o direito de não concordar em participar ou mesmo de me retirar do estudo em qualquer momento que eu queira, sem riscos para o meu tratamento médico. Se eu desejar e concordar em participar, devo assinar na linha abaixo. Isso significa que compreendi adequadamente as informações fornecidas e este termo de consentimento.

Se eu desejar participar do estudo, permitirei também que meu endereço e telefone sejam anotados em uma folha separada, para facilitar contato comigo quando necessário. Como já foi esclarecida anteriormente, toda informação pessoal será mantida em sigilo.

Assinatura do voluntário Nome completo Nº do
prontuário

(ou responsável legal)

_____ _____ ____/____/____0004/02

Assinatura do entrevistador Nome do entrevistador Data

12.2

Nº DA MATRÍCULA

PROGRAMA DE CONTROLE DA TUBERCULOSE
FICHA MÉDICA DOS COMUNICANTES

DADOS CADASTRAIS

1. NOME DO PACIENTE:

2. IDADE: _____ ANOS 3. DATA DE NASC.: ____ / ____ / ____

4. SEXO: MASCULINO 1 FEMININO 2Raça-I: branco não branco [caso não branco, responder item 10.1]Raça-II: negro mulato índio asiático NA Não sabeEstado civil: Casado Solteiro SeparadoTem companheiro(a): não sim ignorado8. PROFISSIONAL DE SAÚDE: NÃO 0 SIM 1

9. OCUPAÇÃO: _____

10. NOME DO CASO ÍNDICE:

10 A: NÚMERO DO CI – TB / ANO

11. ENDEREÇO: _____

12. BAIRRO: _____

13. CIDADE: _____

14. CEP: _____ 15. TELEFONE: _____

DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS

15- Quantos anos você estudou? _____

Escolaridade: nenhuma

até ____ série ____ do grau

3º grau incompleto 3º grau completo

16. Grau de escolaridade do chefe da família:

Nenhuma / primário incompleto

Primário completo / ginásial incompleto

Ginásial completo / 2º grau incompleto

2º grau completo / superior incompleto

Superior completo

17. Ocupação do chefe da família: _____

Emprego formal Emprego informal Autônomo

18. Quantas pessoas moram em sua casa? _____

19. Quantos cômodos há em sua casa? _____ (banheiro, cozinha, sala são cômodos tb)

20. Quantos cômodos são usados como dormitório? _____

21. Posse de itens e empregada doméstica:

	NÃO TEM	TEM			
		1	2	3	≥4
Televisão em cores					
Rádio					
Banheiro					
Automóvel					
Empregada mensalista					
Aspirador de pó					
Máquina de lavar					
Videocassete e/ou DVD					
Geladeira					
Freezer ou geladeira duplex					

Total de pontos:	Classe social:
------------------	----------------

22. RENDA FAMILIAR:SEM RENDA 0 0-2 SM 1 3-5 SM 2 +5 SM 3**DADOS CLÍNICOS****23. HDA: SINAIS E SINTOMAS:**TOSSE POR > 2 SEMANAS EXPECTORAÇÃO POR > 2 SEMANAS HEMOPTISE DOR TORÁCICA FEBRE SUDORESE NOTURNA HIPOREXIA EMAGRECIMENTO ASTENIA ROUQUIDÃO LINFADENOMEGALIA24. SINTOMAS DE TB? NÃO 0 SIM 1HPP: USO CORTICÓIDE/ IMUNOSSUPRESSOR DIABETES SARCOIDOSE SILICOSE GASTRECTOMIA/ÚLCERAPÉPTICA DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA INSUF. RENAL CRÔNICA CANCER/ LEUCEMIA/LINFOMA ANTI HIV POSITIVO 25. DOENÇAS ASSOCIADAS? NÃO 0 SIM 126. TRATAMENTO PRÉVIO PARA TB: NÃO 0 SIM 1SE SIM, (26 A) ABANDONOU? NÃO 0 SIM 127. CICATRIZ DE BCG? NÃO 0 SIM 128. GRAVIDEZ: NÃO 0 SIM 1 SUSPEITA 2 NSA 8**HÁBITOS:**29. FUMA OU JÁ FUMOU? NÃO 0 SIM 130. FAZ OU JÁ FEZ USO DE DROGAS? NÃO 0 SIM 131. MORA EM ASILO: NÃO 0 SIM 132. MORADOR DE RUA: NÃO 0 SIM 133. ESTEVE PRESO NOS ÚLTIMOS 2 ANOS: NÃO 0 SIM 1**QUAL O TIPO DE BEBIDA VOCÊ PREFERE?**CERVEJA, VINHO, WHISKY, CACHAÇA OU NENHUMA

SE FOR AFIRMATIVA :

A. VOCÊ TEM FACILIDADE DE FAZER AMIZADES?:

NÃO 0 SIM 1

B. ALGUMA VEZ SENTIU QUE DEVERIA DIMINUIR A QUANTIDADE DA BEBIDA?

NÃO 0 SIM 1

C. ALGUÉM CRITICA OU JÁ CRITICOU O SEU MODO DE BEBER? NÃO 0
SIM 1

D. VOCÊ COSTUMA BEBER PELA MANHÃ PARA DIMINUIR O NERVOSISMO OU A RESSACA? NÃO 0 SIM 1

34 E. VOCÊ SE SENTE CULPADO PELA MANEIRA QUE COSTUMA BEBER? NÃO 0 SIM 1

SE A RESPOSTA FOI SIM PARA PELO MENOS DUAS DAS QUESTÕES B, C, D OU E, ENTÃO Q. 34 (ETILISMO) = 1 (SIM)

34. ETILISMO ? NÃO 0 SIM 1

CONTÁGIO INTRA-DOMICILIAR:

35. ANTES DO SR/SRA(NOME DO CI) JÁ TINHA MORADO COM ALGUÉM QUE TEVE TB ANTES? NÃO 0 SIM 1

36. MORAVA COM O CASO ÍNDICE NA ÉPOCA EM QUE ELE COMEÇOU A TOSSIR? NÃO 0 SIM 1

SE SIM, CLASSIFIQUE:

37. TIPO DE CONTATO INTRA-DOMICILIAR:

Quantas horas por dia teve contato com o caso índice, desde que ele começou a ficar doente?

DIÁRIO CONTÍNUO 1 DIÁRIO INTERMITENTE 2 SEMANAL 3
QUINZENAL 4 EVENTUAL 5 NSA 8

38. CLASSIFICAÇÃO DO CONTATO INTRA-DOMICILIAR:

DORMIA E CONTINUOU 1 DORMIA E PAROU 2 NUNCA DORMIU 3

NÃO DORMIA E PASSOU A DORMIR 4

NSA 8

39. TEVE CONTATO COM O CI OU ALGUÉM COM TB FORA DA SUA CASA? NÃO 0 SIM 1

SE SIM ,CLASSIFIQUE:

40. TIPO DE CONTATO EXTRA-DOMICILIAR (pode marcar mais de 1):

VIZINHO 1 AMBIENTE DE TRABALHO 2 FAMILIAR 3

HOSPITALAR 4 SOCIAL (AMIGO, NAMORADO, ETC) 5 NSA 8

41. CLASSIFICAÇÃO DO CONTATO EXTRA-DOMICILIAR:

DIÁRIO CONTÍNUO 1 DIÁRIO INTERMITENTE 2 SEMANAL 3

QUINZENAL 4 EVENTUAL 5 NSA 8

RESULTADO DOS EXAMES

42. TELERRADIOGRAFIA de TÓRAX:

NORMAL 0 TB ATIVA 1 TB INATIVA/SEQÜELA 2 OUTRA DOENÇA 3

NÃO REALIZADA 8

43. Em caso de TB ativa responde:

1 Cavitação: não sim ignorado

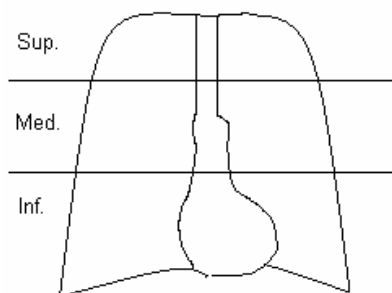
2 Padrão típico (infiltrado em lobo(s) superior(es) e/ou segmento apical de lobo inferior) não sim ignorado

3 Compatível (alargamento mediastinal ou linfonodo hilar, padrão miliar, ou derrame pleural) não sim ignorado

4 Atípico (qualquer outro padrão) não sim ignorado

8 NSA 9 IGNORADA

DATA: ____/____/____



44. PT:

0. NÃO REATOR (0 A 4 mm)

FRACO REATOR (4-9mm)

1. REATOR (10 OU + mm)

9. NÃO REALIZADO

LEITURA EM MILÍMETROS: MILÍMETROS

DATA DA APLIC: ____/____/____

DATA DA LEITURA: ____/____/____

DATA: ____/____/____

RESUMO DA CONSULTA

DATA: ____/____/____

PACIENTE ATÉ 15 ANOS:

PPD REATOR: NÃO 0 SIM 1

SINTOMAS: NÃO 0 SIM 1

PATOLOGIAS ASSOCIADAS: NÃO 0 SIM 1

RX TÓRAX ALTERADO: NÃO 0 SIM 1

SE SIM P/ UM DOS ÍTENS ACIMA ENCAMINHAR À PNEUMO

PACIENTE MAIOR DE 15 ANOS:

PT REATOR: NÃO 0 SIM 1 NSA 8

SINTOMAS: NÃO 0 SIM 1

PATOLOGIAS ASSOCIADAS: NÃO 0 SIM 1

RX TÓRAX ALTERADO: NÃO 0 SIM 1

SE SIM P/ UM DOS ÍTENS ACIMA ENCAMINHAR À PNEUMO

45. CONDUTA:

TRATAMENTO PARA TB 1

TB CONFIRMADA 11 TB PROBABILIDADE 12

QUIMIOPROFILAXIA 2 INVESTIGAÇÃO 3 ALTA 4

46. EXAMES DE DIAGNÓSTICO DE TB SOLICITADOS:

NENHUM 0

ESCARRO 1 ESCARRO INDUZIDO 2

LAVADO BRÔNQUICO 3 ESCARRO PÓS BRONCOSC. 4

CULTURA ESCARRO 5 CULT. ESCARRO INDUZIDO 6

CULTURA LAVADO BRÔNQUICO 7

CULTURA ESCARRO PÓS BRONCOSCOPIA 8

BIÓPSIA PULMONAR 10 BIÓPSIA PLEURAL 11

BIÓPSIA GÂGLIONAR 12 OUTROS 13

CONSULTA DE RETORNO

DATA: ___/___/___

RESULTADO DOS EXAMES:

45. CONDUTA:

TRATAMENTO PARA TB 1

TB CONFIRMADA 11 TB PROBABILIDADE 12

QUIMIOPROFILAXIA 2 INVESTIGAÇÃO 3 ALTA 4

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)