

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA
SETOR DE CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

PAULA FERNANDA GONÇALVES DOS SANTOS

**ESTUDO DOS FATORES ASSOCIADOS A TUBERCULOSE
“IMUNOGENÉTICOS E SOCIAIS” EM UMA POPULAÇÃO DE PACIENTES
INTERNADOS NO RIO DE JANEIRO E BRESCIA - ITÁLIA.**

RIO DE JANEIRO

2009.

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

PAULA FERNANDA GONÇALVES DOS SANTOS

**ESTUDO DE FATORES ASSOCIADOS A TUBERCULOSE “IMUNOGENÉTICOS
E SOCIAIS” EM POPULAÇÃO DE PACIENTES INTERNADOS NO RIO DE
JANEIRO E BRESCIA - ITÁLIA.**

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

Orientadores:

Prof. Dr. Afrânio Lineu Kritski. Professor Adjunto do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Doutor em Medicina pela Escola Paulista de Medicina.

Dr^a Martha Maria de Oliveira. Pesquisadora da Unidade de Pesquisa em Tuberculose da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

**RIO DE JANEIRO
Fevereiro, 2009.**

PAULA FERNANDA GONÇALVES DOS SANTOS

**ESTUDO DE FATORES ASSOCIADOS A TUBERCULOSE “IMUNOGENÉTICOS
E SOCIAIS” EM POPULAÇÃO DE PACIENTES INTERNADOS NO RIO DE
JANEIRO E BRESCIA - ITÁLIA.**

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

Aprovada em:

Prof. Dr. Antônio Ruffino Netto. Professor Titular de Medicina Social –
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. Leila de Souza Fonseca . Professor Titular da Universidade Federal do
Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Fabiana Barbosa de Assumpção de Souza. Professor Adjunto da
Escola de Enfermagem Alfredo Pinto - Universidade do Rio de Janeiro.

DEDICATÓRIA

Agradeço pela oportunidade de estar terminando mais uma etapa da minha vida;

Aos meus pais e irmãos, Bárbara, Elaine, Vera e Rose pelo amor incondicional durante toda a jornada;

Aos meus sobrinhos, Luan e Vitória, que sempre trazem uma alegria especial em minha vida;

Ao Daniel pelo amor e carinho sempre;

Ao meu cunhado Sarcinelli pelo apoio e amizade;

Aos tios e padrinhos pelo incentivo e pela presença na minha vida nos bons e maus momentos;

Aos meus orientadores por terem me recebido de braços abertos no grupo e me permitido aprender pessoal e profissionalmente;

Ao querido professor Ruffino transmitir o entusiasmo da vida, com palavras de incentivo e carinho e que, sem dúvida, teve um importante papel no desenvolvimento do trabalho;

Aos amigos da UPT, em especial a minha amiga Alessandra, que muito me ajudaram nas etapas de “nascimento” do trabalho;

A minha amiga, “Tata” que sempre estará em meu coração e sei que sempre posso contar com sua amizade;

A Martha Cecília Suárez-Mutis pela disposição e boa-vontade em ajudar as pessoas. Guardarei com carinho seu gesto de bondade em meu coração;

Aos todos os outros amigos que sempre com gestos e palavras me deram forças para chegar onde cheguei.

“Aos meus pais, minhas irmãs e familiares com carinho dedico este meu trabalho a quem muito devo pelo apoio incondicional”.

RESUMO

SANTOS, Paula Fernanda Gonçalves dos. Estudo de fatores associados à tuberculose “Imunogenéticos e Sociais” em população de pacientes internados no Rio de Janeiro e Brescia – Itália. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica.). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

Introdução: A tuberculose (TB) é um problema de saúde pública mundial. Alguns fatores têm sido associados na susceptibilidade ou proteção a TB entre eles: ambientais, genéticos, sociais, presença de co-morbidade, virulência da micobacteria. O conhecimento a respeito da interação entre fatores ambientais e genéticos que na susceptibilidade a doença demonstra fortes implicações em seu controle e prevenção. **Objetivo:** Avaliar a presença de polimorfismos de base única na região promotora dos genes que codificam para TNF- α na posição -238, IL-10 nas posições -1082, -819 e -592 e IL-1 β na posição -35 em pacientes portadores de TB, não-brancos, internados em hospitais no Rio de Janeiro/Brasil e na cidade de Brescia, noroeste da Itália. **Resultados:** Os pacientes do Brasil tem em média 43,17 \pm 0,98 anos (IC95%:41,22-45,12) comparado aos os pacientes da Itália média de 37,08 \pm 1,2 anos (IC95%: 34,70-39,45)] e essa diferença foi estatisticamente significativa (p<0,0001). O genótipo homozigoto mutante -238AA mostrou uma associação com formas graves de TB entre os pacientes do Brasil; A presença do heterozigoto -35CT foi significativamente maior entre os pacientes com TB Não-Grave no Brasil; **Conclusões:** Os pacientes do Brasil que carregam o genótipo -238AA são mais susceptíveis as formas mais graves de TB; A presença do alelo -35T possa estar associada à proteção entre os pacientes com TB no

Brasil uma vez que a frequência do genótipo encontra-se maior no grupo Não-Grave.

Palavras-Chave: tuberculose, imunogenética, grupos étnicos, Brasil, Itália.

ABSTRACT

SANTOS, Paula Fernanda Gonçalves dos. Estudo de fatores associados à tuberculose “Imunogenéticos e Sociais” em população de pacientes internados no Rio de Janeiro e Brescia – Itália. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

Introduction: Tuberculosis (TB) is a worldwide public health problem. Some factors have been associated with the susceptibility or resistance to TB among them: environmental, genetic, social, presence of comorbidity, virulence of mycobacteria. Knowledge about the interaction between environmental and genetic factors in susceptibility to the disease shows strong implications for its control and prevention. The knowledge regarding the interaction between ambient and genetic factors that in the susceptibilities the illness demonstrates to forts implications in the control and prevention of the same one. **Objective:** To evaluate the presence of polymorphisms of only base in the in position -238, IL-10 in α promotional region of the genes that codify for TNF- in position -35 in carrying patients β positions -1082, -819 and -592 and IL-1 of TB, not-whites, interned in hospitals in Rio De Janeiro/Brazil and the city of Brescia, the northwest of Italy. **Results:** The mean age patients from Brazil is 43.17 ± 0.98 years (95% CI :41,22-45, 12) compared to patients from Italy [mean 37.08 ± 1.2 years (95% CI: 34,70-39,45)] and this difference was statistically significant ($p < 0.0001$). The homozygous mutant genotype showed an association with severe forms of TB; The presence of heterozygote-35CT was significantly higher among non severe forms of TB patients from Brazil; There was a trend in

lower incidence of the-592A allele in the severe forms TB group from Brazil ($p = 0.03$) and Italy ($p = 0.02$). **Conclusions:** Patients from Brazil that career -238AA genotype is more likely the most serious forms of TB. There was no association between the presence of polymorphisms at -238 TNF- α gene and severity of TB in patients admitted to Italy; It was not observed the presence of the-238AA genotype among TB patients from Italy; The presence of T allele may be associated with protection among TB patients from Brazil because the frequency of the genotype is higher among non severe forms of TB patients.

Keywords: tuberculosis, immunogenetic, ethnic groups, Brazil. Italy.

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Foto 1. Identificação de alelos na posição -238 do gene TNF- α	43
Foto 2. Identificação de alelos na posição -35 do gene IL-1 β	44
Foto 3. Identificação de alelos na posição -1082 do gene IL-10	45
Foto 4. Identificação de alelos na posição -819 do gene IL-10	46
Foto 5. Identificação de alelos na posição -592 do gene IL-10	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência de Tuberculose em 2006	20
Figura 2. Incidência do HIV em novos casos de Tuberculose em adultos em 2006	20
Figura 3. Incidência da Tuberculose no Brasil em 2006	23
Figura 4. Incidência de Tuberculose nos Municípios do Rio de Janeiro em 2004	23
Figura 5. Localização de Brescia – Itália	24

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Associação entre a TB grave e origem do paciente atendido na Itália	54
Gráfico 1A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -238 do gene de TNF- α entre pacientes com TB	58
Gráfico 2A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -35 do gene de IL-1 entre pacientes TB.	59
Gráfico 3A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -1082 do gene de IL-10 entre pacientes TB.	60
Gráfico 3B. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -819 do gene de IL-10 entre pacientes TB.	60
Gráfico 3C. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -592 do gene de IL-10 entre pacientes TB.	61
Gráfico 4A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -238 do gene de TNF- α entre pacientes brasileiros com TB.	62
Gráfico 5A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -35 do gene de IL-1 entre pacientes brasileiros com TB.	65
Gráfico 6A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -1082 do gene de IL-10 entre pacientes brasileiros com TB.	68
Gráfico 6B. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -819 do gene de IL-10 entre pacientes brasileiros com TB.	69
Gráfico 6C. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -592 do gene de IL-10 entre pacientes brasileiros com TB.	69
Gráfico 7A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -238 do gene de TNF- α entre pacientes com TB na Itália.	75
Gráfico 8A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -35 do gene de IL-1 entre pacientes com TB na Itália.	78
Gráfico 9A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -1082 do gene de IL-10 entre pacientes com TB na Itália.	81

- Gráfico 9B.** Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -819 do gene de IL-10 entre pacientes com TB na Itália. **82**
- Gráfico 9C.** Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -592 do gene de IL-10 entre pacientes com TB na Itália. **82**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais da população total estudada de acordo com local de atendimento	51
Tabela 2. Forma clínica da Tuberculose encontradas nos três centros de tratamento estudados no Brasil	52
Tabela 3. Associação entre a TB grave e origem do paciente atendido na Itália	53
Tabela 4. Associação entre a forma clínica da TB e as variáveis estudadas na população total	56
Tabela 5. Associação entre a gravidade da TB e as variáveis estudadas na população total:	57
Tabela 6. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -238 do TNF- α entre os pacientes do Brasil de acordo com o sexo e <i>status</i> do HIV	63
Tabela 7. Distribuição genotípica do polimorfismo do gene TNF- α -238 entre os pacientes do Brasil de acordo com a gravidade	64
Tabela 8. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -35 do IL-1 β entre os pacientes do Brasil de acordo com o com o sexo ou <i>status</i> do HIV	66
Tabela 9. Distribuição genotípica do polimorfismo do gene -35 do IL-1 β entre os pacientes do Brasil de acordo com a gravidade	67
Tabela 10. Distribuição genotípica dos polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 do IL-10 entre os pacientes do Brasil de acordo com o sexo	71
Tabela 11. Distribuição genotípica dos polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 do IL-10 entre os pacientes do Brasil de acordo com o <i>status</i> do HIV	72
Tabela 12. Distribuição genotípica do polimorfismo nas posições -1082, -819 e -592 no gene do IL-10 entre os pacientes do Brasil de acordo com a gravidade	74
Tabela 13. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -238 do TNF- α entre os pacientes da Itália de acordo com o sexo	76
Tabela 14. Distribuição genotípica do polimorfismo do gene TNF- α -238 entre os pacientes da Itália de acordo com a gravidade	77
Tabela 15. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -35 do IL-1 β entre os pacientes da Itália de acordo com o sexo	79
Tabela 16. Distribuição genotípica do polimorfismo do gene -35 do IL-1 β entre os pacientes da Itália de acordo com a gravidade	80
Tabela 17. Distribuição genotípica dos polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 do IL-10 entre os pacientes da Itália de acordo com o sexo	84

Tabela 18. Distribuição genotípica do polimorfismo nas posições -1082, -819 e -592 do IL-10 entre os pacientes da Itália de acordo com a gravidade	86
Tabela 19. Análise comparativa da distribuição dos polimorfismos que codifica para TNF- α na posição -238 entre os pacientes da Itália e do Brasil	87
Tabela 20. Análise comparativa da distribuição dos polimorfismos que codifica para IL-1 β na posição -35 entre os pacientes da Itália e do Brasil	88
Tabela 21. Análise comparativa da distribuição dos polimorfismos que codifica para IL-10 nas posições -1082, -819 e -592 entre pacientes da Itália e do Brasil	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
APC	células apresentadoras de antígeno
ARMS	Amplification refractory mutation system
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo biliado Calmette-Guérin
Células NK	Células <i>Natural killer</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DOTS	Estratégia de tratamento supervisionado da tuberculose
EUA	Estados Unidos da América
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Human leukocyte antigens
HESM	Hospital Estadual Santa Maria
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IDT	Instituto de Doenças do Tórax
IDITUB	Instituto de Doenças Infecciosas e Tropicais da Universidade de Brescia
IETAP	Instituto Estadual de Tisiologia Ary Parreira
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-15	Interleucina-15
IL-18	Interleucina-18
LAM	<i>lipoarabinomannan</i>
M. tb.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MBL	Lectina ligadora de manose
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>

MDR	Cepa Multi-droga resistente
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP- α	<i>Macrophage inflammatory protein1-α</i>
NK	Células Natural Killer
NRAMP1	Natural resistência associado a proteína 1 do macrófago
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Polimorfismo de Fragmento de Restrição
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SEL	Socioeconomic level
SNP	Polimorfismo de Base Única
TB	Tuberculose
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Tumor growth factor beta
TLR	Toll-like receptors
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
UPT	Unidade de Pesquisa em Tuberculose
UV	Ultravioleta
XDR	Cepas extensivamente resistentes

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
1.1. Introdução	1
CAPÍTULO II	9
2. Objetivos	9
3. Justificativa	10
3.1. Histórico	10
3.2. Agente etiológico da Tuberculose	12
3.3. Transmissão e reposta Imune	13
3.4. Epidemiologia da Tuberculose - Dados Estatísticos e Geográficos	18
3.5. Tuberculose no Brasil – Dados Demográficos	21
3.6. Tuberculose em Brescia – Dados Demográficos	24
3.7. Fatores Ambientais e Sociais na Tuberculose que influenciam na Suceptibilidade e Imunidade	26
3.8. Fatores Imunogenéticos e Tuberculose	28
3.9. Associação entre polimorfismos no gene TNF- α e Tuberculose	31
3.10. Associação entre polimorfismos no gene IL-1 β e Tuberculose	32
3.11. Associação entre polimorfismos no gene IL-10 e Tuberculose	33
CAPÍTULO III	35
4. Pacientes e Métodos	35
4.1. Tipo de Estudo	35
4.2. Período do Estudo	35
4.3. População de Referência e de Estudo	35
4.4. População de Estudo	35
4.4.1. Hospital Universitário Clementino Fraga Filho	36
4.4.2. Hospital Estadual Santa Maria	36
4.4.3. Instituto Estadual de Tisiologia Ary Parreiras	37

4.4.4. Instituto de Doenças infecciosas e Tropicais da Universidade de Brescia	37
4.5. Local do estudo e Período do Estudo	37
4.6. Critério de Elegibilidade	38
4.7. Critério de Inclusão	39
4.8 Critérios de Exclusão	39
4.9. Coleta e Análise de dados Clínicos e Laboratoriais	39
4.10. Definição de Termos	40
5. Descrição das Técnicas	41
5.1. Extração de DNA e genotipagem das células do hospedeiro	41
5.2. Amplificação do DNA por PCR e Genotipagem	41
5.3. Desenho Experimental	47
5.4. Estudo Amostral	48
5.5. Análise Estatística	48
5.6. Cálculo das Frequências	49
5.7. Aspectos éticos	49
CAPÍTULO IV	50
6. Resultados	50
CAPÍTULO V	94
7. Discussão	94
CAPÍTULO VI	107
8. Conclusões	107
9. Limitações	111
10. Perspectivas	112
CAPÍTULO VII	113
11. Referências Bibliográficas	113

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que, ainda hoje, continua sendo um problema de saúde pública mundial (RAJA, 2004). Segundo dados da Organização Mundial de saúde (OMS) é a doença infecciosa que apresenta as mais altas taxas de morbi-mortalidade no mundo: três milhões de mortes por ano e aproximadamente cinco mortes por minuto (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2005; WHO, 2008).

Anualmente cerca de oito milhões de casos de TB são notificados por ano em nível mundial; no Brasil, são registrados cerca de 80.000 casos de TB por ano com, aproximadamente, 5.000 mortes associados à TB (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2005). Segundo OMS (WHO, 2008), o Brasil ocupa a 16^o colocação entre os 22 países de maior carga mundial, com uma taxa de incidência de 50/100.000. Atualmente estima-se que 12% dos casos de TB estão associados à infecção por HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e que 0,9% são casos de multi-resistência aos fármacos utilizados no tratamento (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2005). No Rio de Janeiro, segundo o Boletim Informativo do Programa de controle da TB do Município (2007), em 2006, foram notificados 7.734 casos de TB e a taxa de mortalidade foi de 5,4/100.000. Tais dados são reflexos dos principais fatores associados ao crítico quadro da TB no mundo: aumento da pobreza, movimentos migratórios, desigualdades sociais, co-morbidades principalmente AIDS-HIV e baixa adesão ao tratamento medicamentoso (MATTEELLI e cols, 2000; PONTICIELLO e cols, 2005; BAUSSANO e cols, 2006).

Em dois estudos realizados em Gâmbia (África), com adultos (LIENHARDT e cols, 2003a) e crianças (LIENHARDT e cols, 2003b) foi mostrado que alguns fatores podem aumentar o risco de desenvolver a doença ativa, dentre eles: sexo, tabagismo, asma, estado civil, proximidade do caso-índice, história familiar de TB, número de indivíduos por residência entre outros. Nestes estudos, a contribuição dos fatores genéticos também foi enfatizada. O risco de prova tuberculínica positiva foi menor entre os parentes mais distantes, após correção pelas variáveis: idade, sexo, tamanho do domicílio, gravidade da doença, e proximidade social com o caso-índice. A pobreza representa um aspecto de facilitação para o desenvolvimento da TB: baixas condições sócio-econômicas podem propiciar a disseminação da micobactéria resultando em predomínio da infecção da TB e aumento conseqüente na incidência da TB (GERALDES e cols, 2007). O acesso limitado aos serviços de saúde pode também interferir na incidência da doença, que pode ser agravado devido aos atrasos no diagnóstico e tratamento, aumentando o período de transmissão e risco de infecção entre seus contatos (GERALDES e cols, 2007).

O aumento do fluxo migratório a partir de países com altas taxas de TB tem-se mostrado um fenômeno associado à elevação das taxas de TB na Europa Ocidental e Estados Unidos da América do Norte (EUA) (EL-HAMAD e cols, 2001; PATEL e cols, 2007; CAIN e cols, 2008; TOCQUE e cols, 1999; HELDAL e cols, 2003). Em estudo realizado no período de 2001 a 2006, Cain e cols. (2008) reportaram aproximadamente 47.000 casos registrados de TB diagnosticados entre imigrantes, sendo as taxas mais altas entre indivíduos da África subariana e sudeste da África. A incidência de TB associada a fatores

sócio-econômicos em Nápoles, Itália, também foi investigada por Ponticiello e cols. (2005) que constataram que o elevado percentual de imigrantes, com destaque para imigração oriunda da África, o desemprego e a alta densidade populacional estavam diretamente associados à alta taxa de incidência de TB na cidade. Matteelli e cols. (2000) desenvolveram um estudo para avaliar a adesão de imigrantes ilegais a terapia da TB latente, supervisionada e não-supervisionada, no nordeste da Itália, e concluíram que os pacientes não conseguem aderir ao tratamento supervisionado. Segundo Lienhardt e cols. (2005) tem sido observado que muitos dos trabalhos apresentados na literatura científica a respeito dos fatores de risco para desenvolver a doença foram realizados em países desenvolvidos. Logo, pouco se conhece a respeito dos fatores que possam influenciar no risco de infecção e doença por TB principalmente em países subdesenvolvidos. Vendramini e cols. (2006) ao analisar indicadores de morbi-mortalidade na cidade de São José do Rio Preto, São Paulo, a fim de descrever a relação entre risco de TB e o nível sócio-econômico (socio economic level - SEL), detectou que o risco de TB é duas vezes mais elevado nas áreas de mais baixo SEL do que nas áreas com SEL mais elevado.

O conhecimento a respeito da interação entre fatores ambientais e genéticos que contribuem para a susceptibilidade a doença mostra fortes implicações no controle e prevenção da mesma. Nas últimas décadas foram realizados vários estudos, em diferentes populações que apresentam características étnicas distintas, que sugerem o papel importante de fatores genéticos do hospedeiro na susceptibilidade a TB (FITNESS e cols, 2004; MARQUET e cols, 2001). Polimorfismos em diferentes genes têm sido

associados à susceptibilidade ou resistência à TB em populações etnicamente diferentes a fim de explicar as diferenças na suscetibilidade, progressão e doença (GAO e cols, 2000; DELGADO e cols, 2002; BELLAMY e cols, 1998; WILKINSON e cols, 1999; SHIN e cols, 2005). Bellamy e cols. (1998) realizaram um estudo do tipo caso-controle no qual observaram uma associação dos polimorfismos no gene NRAMP1 (proteína 1 de macrófago associada a resistência natural) à susceptibilidade por TB em pacientes africanos. Os autores mostraram que a variação no homólogo do gene estava associada à susceptibilidade em pacientes com baciloscopia positiva. Em outro estudo onde foi avaliada a influência do gene receptor da vitamina D na susceptibilidade a doenças infecciosas tal como a TB, malária, hepatite B, observou-se que homozigóticos para o polimorfismo no códon 352 (genótipo TT) estiveram significativamente associados à ocorrência de TB persistente e hepatite B, mas não em indivíduos com Malária quando comparados com demais genótipos (Bellamy e cols, 1998).

O envolvimento de fatores genéticos na susceptibilidade a TB tem sido valorizado em razão de informações oriundas de quatro áreas: a) estudos realizados em irmãos gêmeos onde se observou maior susceptibilidade ao adoecimento entre irmãos monozigóticos que dizigóticos (BERINGTON & HAWN, 2007 *apud* COMSTOCK, 1978); b) o modelo mendeliano atribuível a raras mutações pontuais com alta penetrância onde a maioria das desordens imunodeficiências primárias estão associadas com susceptibilidade a micobactéria; c) influência genética dada por meio de alelos, comuns na população, com baixa penetrância para qualquer alelo único. Muitos dos estudos sobre genoma têm sido realizados por meio de estudos de família, os

quais identificaram alguns loci como o 2q35¹⁰ na população canadense, 8q12-13¹¹ na população marroquina e o 17q11.2¹² na população brasileira que associam a presença de polimorfismos em genes à susceptibilidade a TB; d) e, por último, estudos que envolvem a avaliação da frequência de polimorfismos em genes que podem estar associados à doença nos quais se incluem polimorfismos em nucleotídeos de base única (SNPs), inserções, deleções ou marcadores de microsatélites.

Com o seqüenciamento do genoma humano, vários SNPs foram descritos. Eles são estáveis e estão presentes ao longo de todo o genoma. A recente descrição de uma série de SNPs em genes de citocinas com importante atividade funcional na regulação da expressão gênica bem como associações com várias doenças têm renovado o interesse da comunidade científica (BIDWELL e cols, 1999; BIDWELL e cols, 2001).

Citocinas são as principais mediadoras da resposta imune e seu papel na resposta imune frente a *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*) tem sido bem caracterizado. Durante a fase inicial de infecção por *M. tb.* desde a entrada pelas vias aéreas até os pulmões, uma resposta inata inespecífica é desencadeada. O reconhecimento por macrófagos alveolares e células dendríticas, mediadores como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 (IL-1), quimiocinas e receptores como Toll-Like *receptors* são fundamentais. A partir desta resposta inespecífica uma resposta antígeno-específica é ativada e amplificada, mediadores inflamatórios e citocinas são produzidos no local da infecção e o curso da doença dependerá totalmente da interação entre os mecanismos de evasão da micobactéria e a resposta imune do hospedeiro.

Dentre os mediadores inflamatórios e citocinas que participam na resposta específica a infecção por *M.tb.* o Interferon-gama (IFN- γ) (VIDYARANI e cols, 2006) e o TNF- α (SELVARAJ e cols, 2001) são as principais citocinas associadas com ativação do macrófago e ação antimicrobactericida. O IFN- γ é uma citocina-chave no controle da infecção por *M. tb.* sendo a mesma produzida principalmente por células CD4⁺, CD8⁺ e por células *natural killer* (NK) (RAJA, 2004). Indivíduos com defeitos nos genes que codificam IFN- γ ou nos genes que codificam o seu receptor (IFN- γ receptor) têm-se mostrado mais susceptível a infecção por *M. tb.* (LÓPEZ-MADERUELO e cols, 2003; PYO e cols, 2003; COOKE e cols, 2006). Da mesma forma, o papel do TNF- α na resposta protetora contra a micobactéria é essencial, sua ativação induz a formação do granuloma (RAJA, 2004) e o “clearance” bacteriano por meio das suas atividades microbidas. Foi mostrado que indivíduos que fazem uso de anticorpos anti-TNF- α no tratamento da artrite reumatóide apresentam maior incidência de reativação da TB o que sugere o papel protetor dessa citocina na doença (GÓMEZ-REINO e cols, 2007). O uso de endotoxina *ex vivo* de células do sangue total de gêmeos monozigóticos e seus parentes de primeiro grau resultou numa variação de 60% TNF- α e 75% de IL-10 na capacidade de produção de tais citocinas, sugerindo que tais respostas podem ser geneticamente determinada (OH e cols, 2007). Outra citocina pró-inflamatória importante na resposta a micobactéria é a IL-1 cuja função envolve a indução de febre, caquexia, e sintomas característicos na TB (RAJA, 2004). Wieland e cols. (2006) estudaram a função endógena da IL-1 na defesa do hospedeiro durante infecção pulmonar por *Mycobacterium kansasii*, que induz uma doença pulmonar semelhante a TB, em camundongos *knockout*

para o receptor IL-1 do tipo 1. Estes autores observaram que tais animais apresentaram reduzida resposta anti-micobacteriana, acentuada disseminação da micobactéria nos pulmões e acentuada resposta inflamatória.

Para controlar os efeitos deletérios da resposta inflamatória, uma resposta anti-inflamatória é produzida e observamos a presença de citocinas como IL-10, IL-4 e IL-6. A IL-10 é uma citocina com atividades anti-inflamatórias, capaz de inibir tanto proliferação de linfócitos de perfil Th1 quanto à secreção de suas respectivas citocinas (RAJA, 2004). Polimorfismos na região promotora da IL-10 são capazes de alterar sua expressão gênica (BIDWELL e cols, 1999; BIDWELL e cols, 2001). A heterogeneidade na região promotora do gene IL-10 está associada com susceptibilidade ou resistência a diversas doenças como hepatite crônica (TAMBUR e cols, 2001) e artrite reumatóide (CRAWLEY e cols, 1999). Westendorp e cols (1997) avaliaram a influência genética na produção da IL-10 e sua contribuição para o desfecho fatal em pacientes de primeiro grau e gêmeos monozigóticos que apresentaram doença meningocócica. Os autores observaram que a hereditariedade foi de 0,75 para produção desta citocina e que famílias com alta produção de IL-10 aumentaram vinte vezes o risco para evolução fatal.

O estudo da expressão de genes que codificam diferentes citocinas e outras moléculas inflamatórias envolvidas na resposta imune compreende um importante método de avaliação do sistema imune e aliados a outras metodologias podem inferir sobre a atividade biológica da proteína. Uma vez que a taxa de transcrição é um dos principais fatores envolvidos na regulação e expressão gênica, culminando na produção de determinada proteína, é sugerido que polimorfismos genéticos na região regulatória do gene podem

contribuir para uma variação na expressão da proteína em algumas situações (BIDWELL e cols, 1999).

Em diferentes estudos realizados em pacientes com TB apresentando distintos *background* étnicos têm-se observado dados conflitantes para alguns polimorfismos associados à TB como, por exemplo, TNF- α e IL-10 (ESKDALE e cols, 1998; KNIGHT e cols, 2001). Tais resultados conflitantes podem estar associados ao fato de que as maiorias dos estudos relatados na literatura foram realizadas em populações étnicas fechadas. Torna-se necessário a realização de tais estudos em populações com maior heterogeneidade genética, de modo que os resultados tenham maior representatividade da população mundial e possam ser fornecer informações sobre a susceptibilidade ou resistência a TB, nas diferentes regiões do mundo. Portanto, o entendimento e a elucidação de quais marcadores e genes podem ser considerados como fatores de susceptibilidade e ou proteção a TB na população brasileira, composta de negros, índios e caucasianos, ainda permanece desconhecido.

Pelo acima exposto, no presente estudo pretende-se avaliar o papel de fatores genéticos na ocorrência de TB grave em pacientes internados em hospitais: a) população brasileira atendida no Rio de Janeiro, de cor de pele negra ou parda e, b) imigrantes, maioria de origem africana, atendidos na cidade de Brescia, no noroeste da Itália.

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar a presença de polimorfismos de base única (SNPs) na região promotora dos genes que codificam para TNF- α na posição -238, IL-10 nas posições -1082, -819 e -592 e IL-1 β na posição -35 em pacientes portadores de TB, não-brancos, internados em hospitais no Rio de Janeiro/Brasil e na cidade de Brescia, noroeste da Itália.

2.2 Objetivos Específicos:

- Estimar as frequências genotípicas e alélicas das mutações pontuais na região promotora do gene que codificam para TNF- α na posição -238; IL-10 nas posições -1082, -819 e -592; IL-1 na posição -35;
- Descrever as diferenças das mutações estudadas entre as duas populações;
- Descrever a possível associação entre a presença de mutações nos genes estudados com susceptibilidade ou proteção desenvolvimento de formas graves de TB;
- Descrever a possível associação dos polimorfismos incluídos no estudo em relação ao sexo, infecção pelo HIV e gravidade de TB.

3. JUSTIFICATIVA

3.1. Histórico:

A TB (ou *Consumption*) é conhecida desde a Antiguidade entre os egípcios, gregos, árabes e outros os povos do Oriente. Permaneceu como uma doença sem grande significado durante o Feudalismo europeu tornando-se uma doença muito comum nos centros urbanos europeus no início dos séculos XVI e XVII quando se espalhou pela Europa na primeira metade do século XIX ficando conhecida como a Grande Peste Branca europeia (OTTENHOFF e cols, 2004; VERONESI, 2005). Estima-se que uma grande parcela da população europeia, cerca de um-quarto, tenha morrido de TB (SMITH, 2003; MURRAY, 2004). A superpopulação dos grandes centros urbanos, desnutrição, carência de higiene, saneamento e atendimento médico precário foram alguns dos fatores que contribuíram para consolidação da TB entre a população europeia (MURRAY, 2004).

No final do século XIX houve um decréscimo na taxa de mortalidade da doença relacionado à implementação de melhorias no sistema de saneamentos e habitação, condições de trabalho e desenvolvimento de um melhor sistema de saúde pública (SMITH, 2003; MURRAY, 2004). Outra forte razão foi a criação, no início do século passado, por Albert Calmette e Camille Guérin, de uma técnica para produção da vacina contra TB a partir de uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) cultivadas em bile de boi (MURRAY, 2004). Albert Calmette e Camille Guérin observaram que após utilizar um único isolado de tal organismo em passagens seriadas, de um total de 230 passagens, em uma variedade de animais (cobaias, porcos, vacas, coelhos,

macacos e chimpanzés) esta perdia sua virulência, contudo ainda era capaz de induzir uma resposta imune e uma resistência parcial a re-infecção com *M. bovis* e *M. tb.* (MURRAY, 2004). Primeiramente nomeada de *Bacille Billé* por bacteriologistas e, logo depois renomeada de Biliado Calmette-Guérin, BCG, a vacina começou, a partir de 1921, a ser usada em larga escala como imunizante contra TB e até hoje comumente usada em todo mundo (MURRAY, 2004). Com o Colonialismo e a Expansão Comercial houve a disseminação da TB para outros continentes, todavia, a implantação de medidas de saúde pública nos mesmos permitiu o controle da doença nos países desenvolvidos (SMITH, 2003).

Durante o século XX nos países desenvolvidos a taxa de morbimortalidade permaneceu relativamente baixa e isso foi possível graças a melhorias nas práticas de saúde públicas, o uso da vacina BCG e a adoção de agentes quimioterápicos no final da década de 40. O primeiro esquema terapêutico associava a estreptomicina, descoberta em 1944 ao ácido para-amino-salicílico (descoberto em 1946) e, posteriormente, a isoniazida, descoberta em 1952, foi incluída nesse esquema de drogas (Hijjar e cols, 2007). O avanço da ciência permitiu a avaliação da eficácia de diferentes esquemas terapêuticos que nos anos seguintes foram propostos sendo instituído, em 1964, como esquema terapêutico padronizado: isoniazida, rifampicina e pirazinamida com duração de dezoito meses de tratamento (mudado logo após para doze meses) que permanece ainda como o principal esquema terapêutico em uso (Hijjar e cols, 2007).

A partir da década de 80 com o advento da AIDS e o empobrecimento da população as taxas de notificação que antes se mantinham estáveis

começaram a subir assustadoramente. Nas últimas décadas a incidência global de casos de TB ainda permaneceu alta, sendo o reflexo da pobreza e más-condições de vida, da co-infecção TB-AIDS e da disseminação de cepas de *M. tb.* resistentes ao tratamento (KUSNER, 2005; ZAHRT, 2003) e já é considerada uma doença reemergente, e endêmica, nos países desenvolvidos.

3.2. Agente etiológico da Tuberculose:

Mycobacterium tuberculosis é o agente etiológico da TB. É um patógeno intracelular de crescimento lento, gram-positivo e aeróbico. O gênero *Mycobacterium* pertence à ordem dos Actinomicetos que incluem as famílias *Mycobacteriaceae*, *Streptomyetaceae* e *Nocardiaceae* (DORRONSORO & TORROBA, 2007). Tem como principal característica uma espessa parede celular composta principalmente de ácido micólico resistente à coloração álcool-ácida e são conhecidos como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). As micobactérias do complexo *Mycobacterium* apresentam mais de 99,9% de homologia em seu DNA e sequência do RNA ribossomal (RNAr) idêntica com exceção do *Mycobacterium canettii* (DOS VULTOS e cols, 2008). São pertencentes a ao Complexo *Mycobacterium* sete espécies e subespécies: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii* e *Mycobacterium caprae* (ERNST e cols, 2007). São micobactérias com alta capacidade de resistência ao calor, frio, ácidos, álcalis e desinfetantes podendo sobreviver durante semanas ou meses sobre objetos inanimados (DORRONSORO & TORROBA, 2007).

3.3. Transmissão e resposta Imune:

A transmissão do bacilo ocorre através da inalação de gotículas de saliva e tal patógeno apresenta predileção por tecidos ricos em oxigênio tal como nos pulmões. Neste local infecta primariamente células fagocíticas residenciais tais como macrófagos alveolares e células dendríticas. Sua replicação no interior dessas células induz a produção de citocinas que iniciam uma resposta inflamatória nos pulmões (RAJA, 2004). Durante as primeiras semanas de infecção (de duas a seis semanas) células da resposta imune específica se multiplicam e ativam e é observada a migração de linfócitos e macrófagos para o local da infecção (RAJA, 2004). Uma vez no sítio da infecção tais células formam o granuloma, mecanismo que tem como objetivo impedir a disseminação do patógeno para outras áreas do pulmão ou outros órgãos bem como restringir a resposta imune ao sítio da infecção (FLYNN & CHAN, 2001). O granuloma é caracterizado por uma área caseosa central de necrose e uma área fibrótica ao seu redor formando nódulos macroscópicos chamados tubérculos e estes mantêm *M. tb.* em estado de latência por meses ou anos (VAN CREVEL e cols, 2003).

É observado que a maioria dos indivíduos infectados desenvolve uma resposta imune inata e adaptativa eficiente para controlar a infecção por *M. tb.* em sua fase inicial. Logo, dos indivíduos expostos a *M. tb.* somente 10-30% desenvolvem a infecção inicial e destes, 90% ou mais não desenvolvem a doença mostrando-se capazes de resolver a infecção através de uma resposta imune efetiva, entretanto, o patógeno não é eliminado e a infecção é dita latente (FLYNN & CHAN, 2001; NORTH & JUNG, 2004).

Em indivíduos imunocompetentes os mecanismos para impedir a disseminação da micobactéria limitam-se a infecção local. Desta forma o indivíduo desenvolve uma infecção assintomática e não-infecciosa, porém, é possível por mecanismos desconhecidos, que ocorra a reativação dos tubérculos bacilares em estado de latência e, subseqüentemente uma infecção aguda secundária seja observada nestes indivíduos (ZAHRT, 2003; FLYNN & CHAN, 2001). Contrariamente, em indivíduos imunocomprometidos uma infecção crônica é observada e caracterizada por uma proliferação e disseminação da micobactéria. Sintomas agudos como fadiga, anorexia, progressiva perda de peso, febre baixa e tosse crônica e contagiosa são observados (ZAHRT, 2003).

M. tb. tem a capacidade de sobreviver no fagossomo dos macrófagos produzindo uma proteína chamada *Exported repetitive protein* que inibe a fusão do fagossoma com o lisossoma (LEVINSON e cols, 2005). Uma vez ativadas, as células fagocíticas são capazes de produzir citocinas inflamatórias com função crucial na resposta imune a micobactéria. Dentre as citocinas produzidas destacam-se o TNF- α e IFN- γ . O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória com importante função na formação do granuloma (VAN CREVEL e cols, 2003). É produzida por monócitos, macrófagos e células dendríticas (VAN CREVEL e cols, 2003). O IFN- γ é uma citocina produzida por linfócitos TCD4, TCD8 e células NK e atua diretamente na proteção contra o patógeno (FLYNN & CHAN, 2001). Outra citocina importante envolvida na resposta imune ao *M. tb.* é a IL-1 β também produzida por monócitos, macrófagos e células dendríticas (VAN CREVEL e cols, 2003). A citocina IL-12 é uma citocina produzida por células fagocíticas

e é importante tem importante papel na indução da produção de IFN- γ (VAN CREVEL e cols, 2003). Outras citocinas como a IL-15 e IL-18 parecem ter importante participação na proteção contra a micobactéria. Foi observado que a IL-15 possui características semelhantes a IL-2 e atua induzindo a proliferação celular de linfócitos e células NK (VAN CREVEL e cols, 2003). Assim como a IL-15, a citocina IL-18 participa ativamente na proteção contra a infecção por micobactéria (VAN CREVEL e cols, 2003). A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória, com características semelhantes a IL-1 e atua estimulando a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de Transcrição (VAN CREVEL e cols, 2003). O processo inflamatório é essencial para inibir o crescimento micobacteriano e controlar a infecção, contudo, tal processo causa extensivo dano tecidual (SMITH, 2003). Dessa forma, as citocinas anti-inflamatórias produzidas atuam antagonicamente reduzindo os efeitos das citocinas pró-inflamatórias na TB em um mecanismo de balanço regulatório. Dentre as citocinas anti-inflamatórias produzidas durante a infecção pela micobactéria estão presentes a IL-4, IL-10 e TGF- β (Tumor growth factor β). Foi observado que a citocina IL-4 atua na supressão da produção de IFN- γ e ativação macrófaga (VAN CREVEL e cols, 2003). Outra citocina capaz de induzir a supressão da produção de IFN- γ é a IL-10. É produzida por macrófagos e linfócitos T durante a infecção pela micobactéria. O TGF- β é produzido por monócitos e células dendríticas induzidos por produtos micobacterianos como a lipoarabinomanana (LAM) (VAN CREVEL e cols, 2003, FLYNN & CHAN, 2001). Tal citocina atua inibindo a produção de IFN- γ nos linfócitos e antagoniza a apresentação antigênica, produção de citocinas e induz

ativação celular pelos macrófagos (VAN CREVEL e cols, 2003). A interação entre macrófagos e outras células na formação do granuloma envolve não somente as citocinas como também quimiocinas, moléculas responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias para o sítio da infecção. Foi observado que a IL-8 tem direta participação no recrutamento de neutrófilos, basófilos, linfócitos T e, possivelmente monócitos na infecção micobacteriana por meio de uma variedade de estímulos (RAJA, 2004). Foi observado também que macrófagos estimulados com *M. tb.* ou LAM são capazes de produzir IL-8, contudo, essa produção é bloqueada pela neutralização na produção de TNF- α e IL-1 β indicando o direto controle dessas citocinas na sua produção (VAN CREVEL e cols, 2003; RAJA, 2004). Outras quimiocinas foram observadas durante a infecção micobacteriana em modelos murinos tais como a MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant protein 1*), RANTES, MIP- α (*Macrophage inflammatory protein1- α*), MIP2, MCP-1, MCP-3, MCP-5 e IP10 (FLYNN & CHAN, 2001; RAJA, 2004).

A apresentação de antígenos micobacterianos pelas células apresentadoras de antígeno (APC): macrófagos e células dendríticas, envolve diferentes receptores expressos em sua superfície celular. Os antígenos leucocitários humanos (Human leukocytes antigen- HLA) são proteínas expressas na superfície celular ligadas a epítomos micobacterianos que ativam linfócitos através de receptores específicos (LEVINSON, 2005). São conhecidas duas classes de receptores HLA: HLA de classe I, expresso em todas as células nucleadas, e que se liga a receptores de linfócitos T CD8 e HLA de classe II, presentes em macrófagos, que se liga a receptores no linfócito T CD4 (VAN CREVEL e cols, 2003). Há também o HLA de classe

I não-polimórfico também divididos em dois grupos: o grupo I que envolve o CD1 (-a, -b e -c) e o grupo II onde está presente o CD1d (FLYNN & CHAN, 2001; VAN CREVEL e cols, 2003). Tais moléculas apresentam estruturas semelhantes ao HLA de classe I e também estão associados à molécula β 2-microglobulina. Esses receptores são comumente encontrados em linfócitos TCD4⁻8⁻ ou TCD8⁺ os quais reconhecem lipídios ou glicolipídios micobacterianos. Uma vez que os antígenos são processados e expressos na membrana das APCs a imunidade celular é estimulada e mediada principalmente pelos linfócitos. Os linfócitos TCD4 são os mais importantes na imunidade a *M. tb.* já que sua função efetora na infecção por micobactéria é produzir citocinas, destacando-se o IFN- γ , que por sua vez ativará macrófagos os quais tentarão controlar a infecção e eliminar o patógeno (FLYNN & CHAN, 2001).

Tem sido observado que a ativação das APCs ocorre via interação dos receptores CD40 ligante, presentes nos linfócitos TCD4, e CD40 nos macrófagos e células dendríticas (FLYNN & CHAN, 2001). A importância de tais linfócitos pode ser observada em indivíduos co-infectados HIV/TB onde é observada a redução no número de linfócitos TCD4 durante a infecção pelo HIV o que refletirá no progresso da infecção do HIV pela TB (RAJA, 2004). Os linfócitos TCD8 atuam auxiliando os linfócitos TCD4 a conter a infecção micobacteriana cuja função primária é produzir citocinas, principalmente IFN- γ , e lisar células infectadas, via produção de perforina e granulosa através da interação dos receptores Fas-Fas ligante (FLYNN & CHAN, 2001). A apresentação dos antígenos micobacterianos também envolve a presença de sinais co-estimulatórios aos linfócitos T através dos

receptores B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) expressos nas APCs que se ligam ao CD28 e CTLA-4 dos Linfócitos T, respectivamente (VAN CREVEL e cols, 2003).

A expressão dos alelos do HLA I e II nos indivíduos determinam a capacidade do mesmo de responder a infecção (DORRONSORO e cols, 2004). Talvez polimorfismos em certos alelos de antígenos leucocitários (HLA) possam explicar a vulnerabilidade de certas populações, como as populações indígenas da Amazônia, quando expostas a TB (FLYNN & CHAN, 2001).

Tais informações expostas acima mostram a importância dos estudos sobre os mecanismos envolvidos tanto na patogenicidade e resistência a micobactéria quanto nos mecanismos envolvidos na resposta imune protetora na TB e a importância do aprofundamento no conhecimento a respeito da patologia.

3.4. Epidemiologia da Tuberculose – Dados Estatísticos e Geográficos:

A TB permanece ainda como um dos maiores problemas de saúde em nível mundial e foi decretado estado de emergência em 1993 baseando-se na alta taxa de morbi-mortalidade principalmente entre os países em desenvolvimento. A maioria dos casos de TB, aproximadamente 95%, ocorre em países de terceiro mundo assim como 98% dos óbitos (RUFFINO-NETTO, 2002). Em 2006 foi estimada uma incidência de 6.5 milhões de novos casos de

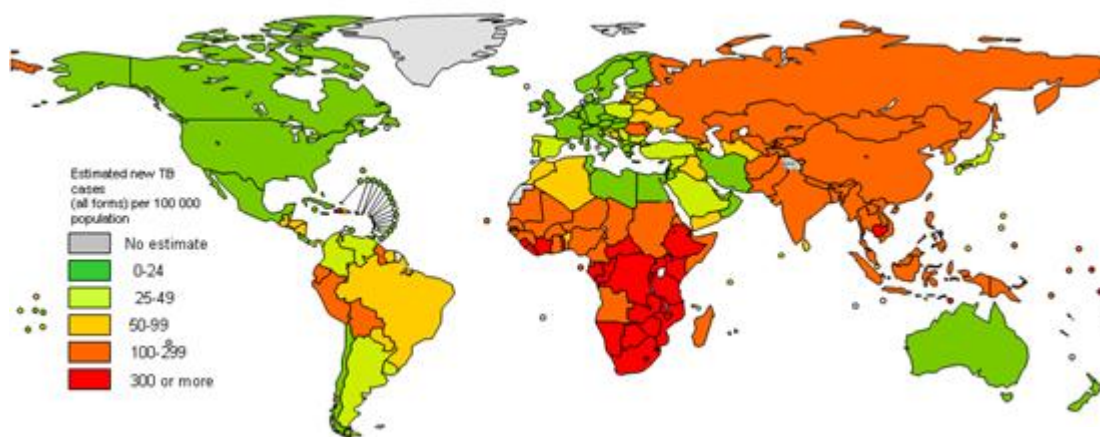
TB sendo mais de 80% desses novos casos observados na África, sudeste da Ásia e sudeste do Pacífico segundo WHO (WHO, 2008).

A TB tem sido destaque como a causa de morte de indivíduos HIV positivo em todo mundo, principalmente na África a associação TB-HIV é considerada o fator determinante no aumento do número de casos de TB nos últimos dez anos (WHO, 2008).

Nos últimos anos, apesar da estratégia de tratamento supervisionado da tuberculose (DOTS) ter conseguido um aumento nas taxas de cura dos pacientes com TB, ela não foi suficiente para controlar a infecção (WHO 2006). Segundo estimativas da OMS para os próximos 10 anos, cerca de 50 milhões de pessoas receberão tratamento para TB, 800.000 pacientes com TB multi-resistente serão identificados e mais de três milhões de pessoas com TB e HIV iniciarão a terapia anti-retroviral (WHO, 2006).

O aumento do número de cepas multi-drogas resistentes (MDR), e mais recentemente, de cepas extensivamente resistentes (XDR) torna o problema da TB mais complicado. Mais de 90% dos casos ativos se localizam nos países em desenvolvimento. Uma das possíveis razões para a gravidade da pandemia de TB é o grande número de pessoas infectadas no mundo.

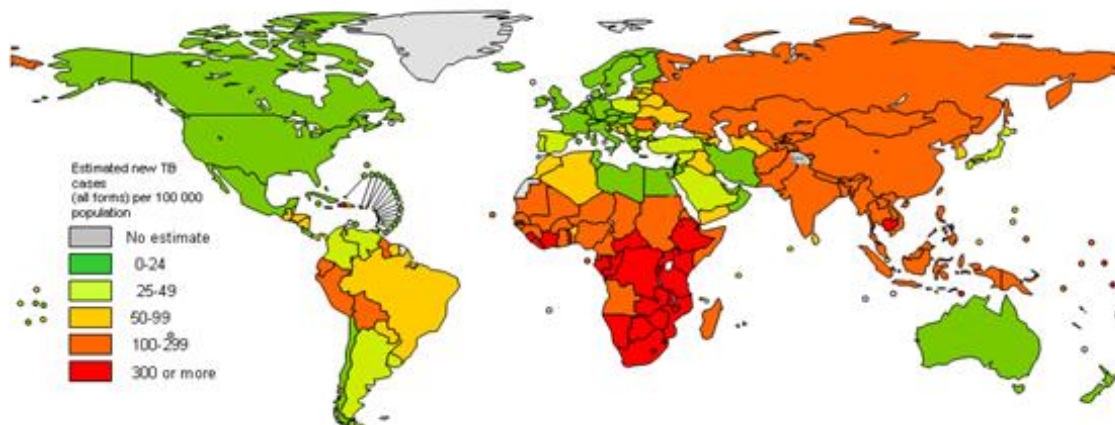
Figura 1: Incidência de Tuberculose em 2006.



Fonte: OMS – who.int/gtb

Estimativa de novos casos de TB / 100 000 hab.

Figura 2: Incidência do HIV em novos casos de Tuberculose em adultos em 2006.



Fonte: OMS – who.int/gtb

Estimativa de novos casos de TB / 100 000 hab.

3.5. Tuberculose no Brasil – Dados Demográficos:

O Brasil é um dos países com alta prevalência de TB, aproximadamente 76 mil casos por ano ocupando a 16ª posição entre os 22 países de maior número de notificações de casos de TB no mundo e, segundo OMS (2008), em 2006 foram notificados 83.293 casos de TB dos quais 77.632 eram novos casos de TB pulmonar. A estratégia DOTS foi implantada em Unidades de Saúde que notificaram 65.699 (78%) casos de TB. O abandono do tratamento anti-TB foi maior em unidades de saúde que não adotaram a estratégia DOTS (11,8%; 1.924/16.347) em comparação à Unidades de saúde que adotaram a DOTS (8,7%; 5.631/ 64.057). Em grandes metrópoles, como Rio de Janeiro e São Paulo, respectivamente, 28% a 32% dos casos de TB são notificados em hospitais, com letalidade de TB superior a 30%, usualmente associado ao HIV/AIDS ou outras co-morbidades (SINAN, 2006).

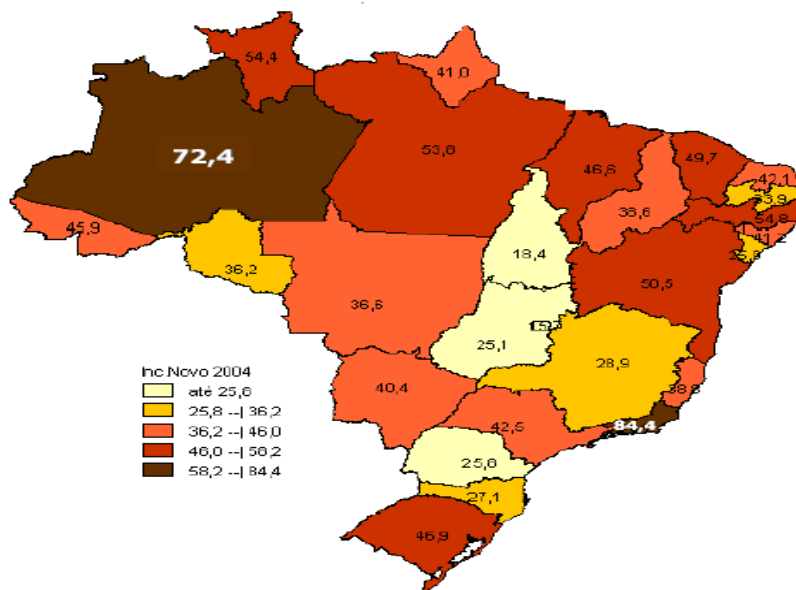
Na cidade do Rio de Janeiro, em 2006, entre 5.139 casos de TB, 2.272 (44%) iniciaram o tratamento sem confirmação bacteriológica 1.129 com baciloscopia negativa (21%) e 1.143 (22%) não realizaram baciloscopia. O Rio de Janeiro é um dos estados que mais notificam casos e segundo a Secretaria Estadual de Saúde, em 2004, foram registrados no SINAN 8.946 casos dos quais 6.519 são casos novos, apresentando uma taxa de incidência de 108,5/100.000 habitantes e uma taxa de mortalidade de 6,3/100.000 habitantes (WHO, 2007). Em 2006 o Rio de Janeiro houve uma mudança no quadro da TB no estado. Um declínio no número de casos notificados foi observado (7.734 dos quais 5.749 foram registrados como novos casos) e com incidência de 79,1/100.000 habitantes e mortalidade por TB de 5,4/100.000 habitantes segundo o Programa de Controle da TB (WHO, 2007).

Em 2005, o nível nacional da taxa de mortalidade por TB era de 3,1 / 100.000 habitantes e no estado do Rio de Janeiro de 5,2 / 100.000 habitantes, correspondendo a 793 pacientes que evoluíram para o óbito. No Estado do Rio de Janeiro, no período de 2001 a 2006 foram notificados respectivamente 1.268 e 1.203 pacientes co-infectados por TB e HIV. Entretanto, para 45% e 44,6% desses pacientes, o diagnóstico e a notificação ocorreram em nível hospitalar, e, em sua grande maioria, com elevado grau de desnutrição. Em 2006, entre 874 pacientes com idade maior que 15 anos, HIV positivos diagnosticados com baciloscopia negativa, 528 (60,4%) não realizaram a cultura para micobactéria conforme indica o Manual de Normas do Ministério da Saúde para todo HIV positivo. (SVS/SINAN, 2006)

Quanto à TB multirresistente, no Brasil, no período de 2002 a 2007, foram notificados 3.246 casos, sendo 42% dos casos ocorreram no estado do Rio de Janeiro, em sua maioria, na forma secundária (>90%) e associada ao retardo do diagnóstico de TB resistente (MS, 2005).

Esforços para controlar a TB no Brasil têm sido insuficientes para conter o crescimento do número de casos e o aparecimento de cepas resistentes às drogas. Deficiências na organização do Sistema de Saúde retardam o uso de tecnologia disponível, ou mesmo, da avaliação de tecnologia disponível que atendam a necessidade da realidade atual, retardando assim a queda efetiva dos índices da doença.

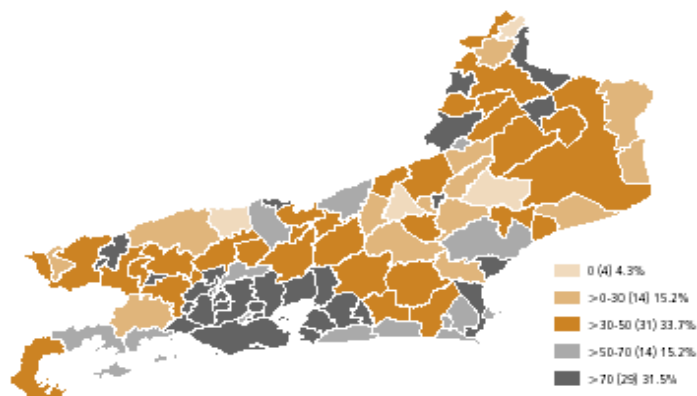
Figura 3: Incidência de Tuberculose no Brasil em 2006.



Coeficiente de Incidência de TB/100.000 hab.

Fonte: MS/SVS/DVE/CGDE?PNCT

Figura 4: Incidência de Tuberculose nos Municípios do Rio de Janeiro em 2004:



Estimativa de novos casos de TB / 100 000 hab.

Fonte: MS / SNVS/SVS

Fonte: MS/SVS/DVE/CGDE?PNCT

3.6. Tuberculose em Brescia – Dados Demográficos:

A Itália é um país localizado no sul do continente europeu, ocupando quase toda a Península Itálica, juntamente com as ilhas da Sardenha e da Sicília, cuja capital Roma tem papel de destaque histórico, sobretudo, como núcleo da Roma antiga e da Igreja Católica. A Lombardia é uma região da Itália setentrional, com 9,4 milhões de habitantes cuja capital é Milão e é a região mais populosa da Itália. A província de Brescia é uma província italiana da região de Lombardia com cerca de 1 100 000 habitantes e é dividida em 206 comunas, sendo a capital Brescia. A cidade de Brescia, localizada na província de mesmo nome, possui aproximadamente 188.000 habitantes estendendo-se por uma área de 90 km². O norte da Itália é uma região altamente industrializada, onde se encontra o centro financeiro do país, a cidade de Milão, apresenta uma taxa de desemprego em torno de 4%.



Figura 5: Localização de Brescia – Itália.

Segundo WHO (2008) a Itália notificou de 7.864 casos de TB em 1990 com 889 casos de mortes pela doença com decréscimo desse número em 2006 quando registrou 4.393 casos com 496 mortes por TB. Na Europa, segundo Dossiê Caritas de 2008, que relata informações a respeito da Imigração, atualmente há 28 milhões de imigrantes na Itália (DOSSIER STATISTICO IMMIGRAZIONE 2008 CARITAS/MIGRANTES, 2008). Na Itália, os estrangeiros, que eram 144.000, em 1970, chegaram a mais de três milhões no início de 2007. No Norte do país há 2.200.000 imigrantes (DOSSIER STATISTICO IMMIGRAZIONE 2008 CARITAS/MIGRANTES, 2008). Cabe ressaltar que embora não se encontre disponível na literatura dados a respeito da incidência e prevalência de TB em Brescia, estudos realizados em algumas regiões do país têm relatado que a maioria casos de TB têm sido notificados entre imigrantes originários de países com alta incidência de TB (MATTEELI e cols, 2000; CARVALHO e cols, 2005, PONTICIELLO e cols, 2005; BAUSSANO e cols, 2006).

Avaliar os fatores envolvidos na baixa adesão ao tratamento e diagnóstico tardio entre essa população tem peso fundamental para uma adequada intervenção por meio das entidades públicas locais.

3.7. Fatores Ambientais e Sociais na Tuberculose que influenciam na Suscetibilidade e Imunidade:

Estudos encontrados na literatura científica apontam que a resposta imune durante a infecção por micobactéria é, em parte, determinada geneticamente, em parte, por outros fatores inerentes ao hospedeiro e ao ambiente ao seu redor e que contribuem na manifestação clínica da doença (VAN DEVERTER, 2000; LIENHARDT, 2001).

Alguns autores acreditam que a carência de nutrientes como o zinco, retinol, albumina e globulina podem estar associados a um *déficit* no sistema imune desses indivíduos e conseqüente agravo do quadro da TB. Metcalfe (2004) ao avaliar o *status* nutricional de pacientes com TB no Sri Lanka observou que tanto indivíduos do gênero masculino quanto do gênero feminino apresentavam baixo *status* nutricional quando comparado ao grupo controle. Tais dados estão concordantes com os Karyadi e cols. (2000) ao reportar, em seu trabalho realizado com pacientes com TB na Indonésia, a carência de micronutrientes, como o retinol e zinco nesses indivíduos.

Menezes e cols. (1998) estudaram o papel dos fatores sócio-econômicos na determinação direta ou indireta da doença em pacientes com TB na cidade de Pelotas, Brasil, e mostraram que há uma forte associação entre a cor de pele não-branca e TB, que se manifesta não só pela genética, mas pelo componente social. A informação reportada acima está em controvérsia com os achados de Schoeman e cols. (1991) que estudaram pacientes negros, da África do Sul, com TB e mostraram que embora houvesse diferenças significantes entre língua falada, grupo de emprego e tipo de alimentação,

nenhuma prova concludente foi encontrada na associação entre fatores sócio-econômicos e o risco de desenvolver a TB. Buskin e cols. (1994) mostraram que fatores associados à TB em adultos como o HIV, a raça não-branca/etnia e país de origem apresentaram alto risco para TB. Outros trabalhos realizados em países europeus, e também nos EUA, têm investigado o impacto dos imigrantes oriundos de países com alta incidência de TB nessas áreas (CAIN e cols, 2008; LAIFER e cols, 2007; EL-HAMAD e cols, 2001; PATEL e cols, 2007; BAUSSANO e cols, 2006, WOOLLESWINKEL-VAN e cols, 2002; FARAH, 2002). Patel e cols. (2007) mostraram que o aumento do risco de TB entre imigrantes possa estar atribuído ao aumento da prevalência de TB latente ou aumento da prevalência da doença entre os imigrantes recém-chegados. Cain e cols. (2008) descreveram o risco de TB e da resistência a drogas entre a população descendente de imigrantes e o impacto da cultura a respeito da doença em seus respectivos países de origem influenciam na implantação de programas de *screening* nessa população nos EUA.

Na Europa Laifer e cols. (2007) mostraram que programas de *screening* em imigrantes recém-chegados são capazes de captar sinais clínicos em menor grau de forma significativa quando comparados a estrangeiros residentes nascidos e nativos residentes em países de baixa incidência de TB como a Suíça.

Após a exposição dos dados na literatura observa-se a necessidade de aprofundar o conhecimento a respeito da influência dos fatores ambientais na susceptibilidade e/ou resistência a doença, pois tais dados serão de extrema importância na construção de programas eficientes de controle e prevenção a TB.

3.8. Fatores Imunogenéticos e Tuberculose:

O reconhecimento e resposta imune a micobactéria são mediados via ativação celular e produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (BERRINGTON & HAWN, 2007) de tal forma que a compreensão dos mecanismos envolvidos na susceptibilidade ou proteção a TB ativa e/ou TB latente tem se tornado um importante campo de investigação. Moléculas como citocinas e receptores atuam numa complexa rede coordenada, na qual elas induzem e reprimem não somente sua própria síntese como também a de outras citocinas e receptores. Além disso, é fato conhecido que várias citocinas e receptores são pleiotrópicos enquanto outras são redundantes prejudicando assim os estudos para análise tanto da função individual de uma citocina e ou receptores como a sua possível influência de polimorfismos genéticos na regulação da expressão gênica e desenvolvimento de doença e/ou infecção (BALKWILL e cols, 2002).

A contribuição genética na resposta imune é de longa data considera importante. Diversas linhas de pesquisa, genéticas e epidemiológicas, apóiam a idéia e realizam investigações a respeito da influência de tais fatores na TB. A susceptibilidade ou resistência à doença em diferentes grupos étnicos tem sido associada a polimorfismos derivados de deleções e mutações pontuais em genes envolvidos na resposta imune. Estudos como os de Ravikumar e cols. (1999), na população indiana, e Goldfeld e cols. (1998) na população cambojana, relataram aumento na freqüência de HLA-DR em pacientes com TB pulmonar.

Skamene e cols. em 1982 identificaram um gene (Bcg) associadoo a susceptibilidade a infecção por micobactéria em camundongos posteriormente chamada de Nramp1. A resistência natural - proteína associada macrófagos 1

(Nramp1) gene (Slc11a1) é responsável por codificar um transportador ativo presente na membrana fagossomal de macrófagos, e mutações nesse gene mostram favorecer a susceptibilidade a infecções causadas por *Mycobacterium bovis* (GAO e cols, 2000). Polimorfismos têm sido descritos no gene NRAMP1 humano a respeito da pertinência deste gene na susceptibilidade a micobactérias (LIU e cols, 1995). Evidências genéticas através de estudos de famílias apontam uma associação entre o gene NRAMP1 e a TB e a população brasileira (SHAW e cols, 1997). Hsu e cols. (2006) observaram uma associação entre o polimorfismo neste gene com susceptibilidade a TB foi também mostrada no Taiwan e entre famílias de aborígenes canadenses (GREENWOOD e cols, 2000). Mais recentemente foi mostrado que as formas ativas da vitamina D podem estar relacionadas com susceptibilidade e/ou proteção a TB. Ela é responsável pela diferenciação, crescimento e função de vários tipos celulares, incluindo células dendríticas (ROCKETT et.al, 1998). Estudos de caso-controle de base populacional têm identificado vários genes candidatos, incluindo aqueles que codificam o receptor de vitamina D (VDR) (HILL, 2001). Wilkinson e cols. 2000, em um estudo do tipo caso-controle, ao investigar a presença de um polimorfismo em um éxon no receptor da vitamina D (T e alelos t) observaram que a presença deste polimorfismo pode contribuir para a susceptibilidade a TB quando considerado em combinação com a deficiência desta vitamina. Selvaraj e cols. (2008) estudaram variações na região regulatória 5´do gene do receptor de vitamina D (VDR) na susceptibilidade ou resistência à TB em pacientes com TB pulmonar na Índia e seus resultados sugerem que o genótipo Cdx-2 G/G está associado a proteção enquanto o haplótipo A-A está associado a susceptibilidade a doença.

A Lecitina de Ligação de Manose (MBL) é uma proteína, produzida no fígado, que reconhece carboidratos da superfície microbiana e tem papel importante na opsonização, fagocitose e ativação do Sistema Complemento (BERRINGTON & HAWN, 2007). Três variações polimórficas no alelo selvagem (A) estão correlacionados com baixos níveis da proteína nos códons 54 (alelo B), 57 (alelo C) e 52 (D). O papel do polimorfismo nesta proteína, e conseqüente perda de sua função têm sido estudados na TB. Na Índia, a freqüência de homozigotos mutantes no MBL foi maior no grupo de pacientes do que em controles sugerindo susceptibilidade a doença na presença da mutação (SELVARAJ e cols, 1999). Em controvérsia, Soborg e cols. (2003) estudaram mutações nos alelos B, C e D e variações nos níveis séricos em pacientes com TB brancos e não-brancos a fim de estudar a relação entre variações genótípicas, níveis séricos e pato-fisiologia clínica da doença. Soborg e cols. (2003) mostraram uma tendência em que se observou uma menor freqüência do genótipo que expressa baixos níveis de MBL em pacientes com TB em ambos os grupos brancos e não-brancos.

Outra família de receptores importantes na resposta imune a micobactéria são conhecidos como *Toll-like receptors* (TLR). Essa família, conhecida como receptores de reconhecimento padrão, reconhecem regiões conservadas presentes em moléculas de diferentes classes de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e negativas, fungos, protozoários e vírus (PASARE & MEDZHITOV, 2004). Abel e cols. (2002) investigaram o papel desempenhado pelo TLR4 em camundongos na resistência a infecção por *M. tb. in vivo* e mostraram que camundongos mutantes no receptor TLR4 tiveram uma redução na capacidade de eliminar o

patógeno dos pulmões, aumento do infiltrado neutrofílico e reduzido recrutamento de macrófagos. Jang e cols. (2004) observaram que a produção das citocinas IL-6 e IL-10 após o estímulo com *M. tb.* é fortemente dependente do reconhecimento do patógeno via TLR2 e TLR4.

O estudo de fatores genéticos do hospedeiro e sua contribuição no desenvolvimento de doenças infecciosas pode ser útil para o entendimento de enfermidades como a TB.

3.9. Associação entre polimorfismos no gene TNF- α e Tuberculose:

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória e seu gene codificante está localizado na região do HLA classe III no braço curto do cromossomo 6 em alto desequilíbrio de ligação com os genes do HLA classe I e II, os quais codificam vários subtipos de genes HLA (HAJEER & HUTCHINSON, 2001; VAN DEVENTER, 2000). Diversos polimorfismos na região promotora desse gene já foram descritos em diferentes posições dentre eles -1031, -862, -856, -574, -376, -308, -238 e -163 (BIDWELL e cols, 1999) e, destes, alguns desses polimorfismos foram associados susceptibilidade a doenças como, por exemplo, a presença do mutante na posição -308 que foi associado à Malária grave e (WATTAVIDANAGE e cols, 1999) e a presença do mutante na posição -238 associado Hepatite Crônica (HÖHLER et, 1998). TNF- α é responsável por algumas manifestações clínicas da TB como perda de peso, suor noturno e destruição tecidual (ROOK,1987). Estudos prévios têm investigado a associação entre polimorfismos na região promotora do TNF- α e a TB (KROEGER e cols, 1997; OLIVEIRA e cols, 2004). Oliveira e cols. (2004)

observaram significativa associação entre o alelo -238A e a susceptibilidade a ocorrência de TB e gravidade das formas clínicas; o alelo -308A foi associado, de forma significativa, à proteção as outras formas da doença pulmonar. Tais resultados estão desacordo com Ates e cols. (2008) que não observaram associação significativa entre o polimorfismo nessa posição -238A e associação à susceptibilidade a TB na população turquesa. Em concordância com o observado anteriormente, Vejbaesya e cols. (2007) em um estudo realizado com pacientes tailandeses não observaram diferenças significativas entre a frequência dos polimorfismos nos alelo -238A e -308A entre o grupo de pacientes com TB e o grupo controle.

3.10. Associação entre polimorfismos no gene IL-1 β e Tuberculose:

A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória com importante função regulatória na inflamação e na defesa do hospedeiro sendo responsável por sintomas da doença tais como febre e a caquexia (CHEN e cols, 2006). A família do gene IL-1 β inclui IL-1 α , IL-1 β e o receptor IL-1 antagonista (IL-1RA) e seus genes codificantes estão localizados no braço curto do cromossomo 2q.12 (VAN DEVENTER, 2000). Muitos estudos de associação têm sugerido tem a influência genética na região do IL-1 em diversas doenças que apresentam componente inflamatório e polimorfismos nas regiões promotoras em diferentes posições tais como -5164, -3959, -3883, -3737, -3686, -3254, -2905, -2394, -2905, -2394, -2378, -1464, -511, -35 (também referido na literatura como IL-1 β -31) e nas regiões do +45 éxon 1 5'UTR, +746 íntron 2, +3877 íntron 4, +3954 éxon 5, +5598 íntron 6, +6506 éxon 7 3'UTR, +6911 éxon 7 3'UTR, éxon

+7214 3' genômico já foram descritos (HONGMIN e cols, 2006). A IL-1 β é produzida na sua forma precursora (pró-IL-1 β) e clivada pela Caspase 1 para sua forma ativa e sua conversão é dependente de estímulo tais como componentes de bactérias incluindo o estímulo por *M. tb.* (BERRINGTON & HAWN, 2007). Evidências observadas em uma coorte com pacientes com TB bacilíferos na Gâmbia, África, sugerem associação entre susceptibilidade à doença clínica e o IL-1 cluster especificamente na variação no gene IL-1RA (BELLAMY e cols, 1998).

Divergências em estudos de associação tais como tamanho da amostra, diferenças nas frequências alélicas e genotípicas e diferenças étnicas mostram a importância do conhecimento mais aprofundamento a respeito da associação entre a presença de polimorfismo e a susceptibilidade à doença.

3.11. Associação entre polimorfismos no gene IL-10 e Tuberculose:

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e tem importante papel durante a fase crônica e latente da TB pulmonar pois atua induzindo a reativação da doença e o gene responsável por sua codificação está presente no cromossomo 1 (PYO e cols, 2003). É uma citocina pleiotrópica que suprime a produção de IFN- γ , TNF- α , produção de linfócitos entre outras funções. Edwards-Smith e cols. (1999) constataram a presença de níveis séricos de IL-10 elevados em pacientes com Hepatite C crônica e ao investigarem a presença de três polimorfismos bialélicos na região promotora desta citocina nas posições -1082, -819 e -592 observaram uma significativa associação entre o haplótipo ATA e baixa produção de citocina na terapia com IFN- γ . Delgado e

cols. (2002) ao estudarem pacientes com TB na Camboja observaram que a heterozigose na posição -1082 está significativamente associada a TB doença. Tal relato corrobora com os achados de Scola e cols. (2003) que sugeriram que traços genéticos afetem a capacidade de responder ao patógeno podendo predispor o indivíduo a exacerbação da doença. Entretanto, não houve diferença significativa na coorte estudada por Prabhu e cols. (2007) na população espanhola cujos achados sugerem que o alelo mutante na posição -1082 não está associado à susceptibilidade ou resistência a TB.

Três polimorfismos na região promotora do gene -1082, -819 e -592 têm sido observados influenciar na patogênese das micobacterioses (BERRINGTON & HAWN, 2007). Contudo dados na literatura apresentam discrepância a respeito da função dos polimorfismos na susceptibilidade a TB em estudos realizados em pacientes com diferentes componentes étnicos (BERRINGTON & HAWN, 2007; PRABHU e cols, 2007).

CAPÍTULO III

4. PACIENTES E MÉTODOS:

4.1. Tipo de Estudo:

Estudo descritivo do tipo observacional de pacientes não-brancos internados com TB ativa em hospitais no Rio de Janeiro – Brasil e Brescia – Itália.

4.2.. Período do Estudo:

Itália: pacientes atendidos de janeiro de 2001 a dezembro de 2002.

Brasil: pacientes internados nos hospitais participantes no período entre janeiro de 2001 e janeiro de 2002.

4.3. População de Referência e de Estudo:

Pacientes com TB atendidos em hospitais de referência para tratamento de TB.

4.4. População de Estudo:

Brasil: pacientes com TB ativa procedentes do estado do Rio de Janeiro atendidos nas seguintes unidades de saúde: Complexo Hospitalar Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) e Instituto de Doenças do Tórax (IDT), hospital terciário para tratamento de TB, Hospital Estadual Santa Maria (HESM) e Instituto Estadual de Tisiologia Ary Parreiras (IETAP). Tais indivíduos

apresentavam diferentes etnias (euro-americanos, afro-americanos e mestiços) e não houve predomínio de nenhum dos grupos citados.

Itália: Foram incluídos pacientes com TB ativa procedentes da cidade de Brescia, atendidos no Instituto de Doenças infecciosas e Tropicais da Universidade de Brescia (IDITUB), hospital de referência para tratamento de TB; a maioria é de origem africana e apresentando formas graves de TB.

4.4.1. Complexo Hospitalar HUCFF/IDT :

O HUCFF está situado na Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, na área programática 3.1 (AP-3.1) sendo o mesmo centro nacional de referência para AIDS e centro de referência estadual para demais doença. Possui cerca de 520 leitos, 20 dos quais específicos para o atendimento de pacientes infectados pelo HIV e 20 para pacientes que apresentam pneumopatias.

4.4.2. Hospital Estadual Santa Maria (HESM):

O HESM constitui uma unidade hospitalar estadual de referência para a internação de pacientes portadores de TB e co-infecção TB/HIV/AIDS no Estado do Rio de Janeiro. O HESM localiza-se no município do Rio de Janeiro, no bairro de Jacarepaguá, área programática 4 (AP-4). Dispõe de cerca de 80 leitos direcionados ao atendimento de pacientes com TB ativa. São realizados 350 atendimentos por ano e, os casos de elevada gravidade apresentam um tempo médio de internação de dois meses, sendo posteriormente encaminhados para unidade de saúde de sua área programática.

4.4.3. Instituto Estadual de Tisiologia Ary Parreiras (IETAP):

O IETAP também é considerado uma unidade hospitalar estadual de referência para a internação de pacientes portadores de TB e co-infecção TB/HIV/AIDS no Estado do Rio de Janeiro. Localizado no município de Niterói, a unidade dispõe de 80 leitos, 15 destes destinados a pacientes co-infectados TB/HIV.

4.4.4. Instituto de Doenças infecciosas e Tropicais da Universidade de Brescia (IDITUB):

O ambulatório TB é parte integrante da Unidade de Infecções da Comunidade do Instituto de Doenças Infecciosas e Tropicais e faz parte do complexo hospitalar do Hospital Civil de Brescia. O ambulatório assiste cerca de 80 novos casos de TB ao ano, dos quais 40% correspondem a formas pulmonares isoladas; entre os pacientes com pelo menos uma manifestação de TB Extrapulmonar (60% do total) e cerca de 30% apresentam TB disseminada. Aproximadamente 80% dos pacientes seguidos no ambulatório são estrangeiros; o Senegal e o Paquistão são os países com maior representação com, respectivamente, 21% e 20% dos casos de TB entre estrangeiros respectivamente.

4.5. Local do estudo e Período do Estudo:

No período de estudo, todos os pacientes que foram internados com TB ativa confirmada no HUCFF, HESM, IETAP e IDITUB foram elegíveis para

participar deste estudo a ser coordenado por pesquisadores da Unidade de Pesquisa em Tuberculose – UPT – localizado no prédio do HUCFF-UFRJ. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido por escrito após informação apropriada a todos os participantes adultos ou de seus representantes para uso das informações obtidas através das entrevistas ou da realização dos exames laboratoriais.

4.6. Critério de Elegibilidade

Foram considerados elegíveis para o estudo todos os pacientes internados no HUCFF/IDT, HESM, IETAP, e IDITUB que receberam diagnóstico bacteriológico de TB por meio de cultura positiva para micobactéria realizada com espécime respiratório (escarro espontâneo, escarro induzido ou lavado bronco-alveolar) e não respiratório. Os pacientes incluídos foram submetidos à entrevista padronizada e responderam a um questionário (ANEXO) e após assinatura do TCLE foi realizada a coleta do material biológico conforme será descrito posteriormente. As informações foram coletadas, sempre que possível, junto ao paciente, médicos assistentes, familiares e através do registro social.

4.7. Critério de Inclusão

No período de estudo, foram incluídos os pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos, cor de pele negra ou parda, infectados ou não por HIV, atendidos nos hospitais participantes:

- a) Cujas amostras clínicas apresentavam cultura positiva para micobactéria;
- b) forneceram TCLE assinado.

4.8 Critérios de Exclusão:

Foram excluídos do estudo os seguintes indivíduos:

- a) Cujos materiais clínicos não cumpriram o protocolo de rotina de investigação diagnóstica;
- b) que albergavam micobactéria não-tuberculosa na sua amostra clínica;
- c) que apresentavam dificuldade de compreensão e/ou de fornecer informações.

4.9. Coleta e Análise de dados Clínicos e Laboratoriais:

Os dados relativos ao paciente foram coletados por profissionais de saúde (enfermeiros, técnicos de enfermagem e nutricionistas) dos Programas de TB Hospitalar nos hospitais participantes. Os profissionais de saúde receberam treinamento e utilizaram questionário padronizado que incluía questões sócio-demográficas e clínico-evolutivas.

DEFINIÇÃO DE TERMOS:

1. Diagnóstico de Tuberculose:

TB ativa: Foi considerado quando observada cultura positiva para micobactéria com subsequente confirmação da espécie como *M. tuberculosis* em espécime clínico, por meio de testes bioquímicos (KENT & KUBICA, Manual de Bacteriologia do MS, 1994).

TB Grave: Paciente com TB ativa nas seguintes formas: TB pulmonar miliar, TB extrapulmonar (exceto ganglionar periférica ou pleural isolada), TB disseminada (paciente com TB em mais de um único órgão ou sistema, sendo forma pulmonar associada a outro extrapulmonar, exceto a pleural, ou em dois sítios extrapulmonares) e meningoencefalite tuberculosa (KRITSKI, 2000).

2. Infecção por HIV:

Reatividade ao teste ELISA realizado por duas vezes com uma mesma amostra de soro e confirmado posteriormente com uma segunda amostra de soro pelo teste de Western-Blot ou Imunofluorescência na ausência de sinais e sintomas associados à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (CDC, 1999).

5. Descrição das Técnicas:

5.1. Extração de DNA e genotipagem das células do hospedeiro:

O DNA genômico foi obtido a partir de sangue coletado e congelado com citrato de sódio utilizando-se o kit comercial de extração de DNA FexiGene (Quiagen) e seguindo as recomendações do fabricante. Sumariamente, 100µL de sangue total foi misturado a 250µl de tampão desnaturado (FG1) e o sedimento (*pellet*) resuspenso em 50µl de tampão desnaturado e incubado durante 5min a 65°C adicionando-se 50µL de isopropanol. Com a precipitação de DNA, sua resuspensão foi obtida com a adição de 100µL de tampão hidratado seguido de aquecimento por 65°C, durante 5min. O rendimento da extração de DNA e a sua qualidade foram verificados em gel de agarose após a imersão em brometo de etídio. O material foi posteriormente estocado em -20°C.

5.2. Amplificação do DNA por PCR e Genotipagem:

Foram utilizados diferentes pares de oligonucleotídeos (Anexo) apresentando um ou dois *mismatches* em relação à seqüência original utilizando para amplificação do fragmento de interesse uma região promotora presente dos genes estudados (TNF- α -238, IL-1 β -35 e IL-10 -1082, -819 e -592) de forma a apresentarem um sítio de restrição específico para cada mutação e permitindo assim, posterior tipagem. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada pela mestranda Paula Fernanda Gonçalves dos Santos.

Para descrição do polimorfismo na região promotora do gene TNF- α -238 foram realizadas amplificações da região de interesse pelo método de PCR-ARMS alelo-específica. Para reação de amplificação da mutação na posição -238 100ng do DNA extraído foram adicionados a uma mistura de reação com um volume final 10 μ L cuja concentração final dos reagentes foi de 1X Tampão de Reação, 1,5mM de MgCl₂, 200mM de cada dNTP, 1 μ M de cada iniciador específico, 1 μ M de cada iniciador genérico, 1 μ M de primer de controle interno e 1U DNA polimerase. As reações foram realizadas em Termociclador seguindo as condições dos ciclos: 1minuto a 96°C, seguidos de 10 ciclos de 96°C por 15'', 63.5°C por 50'', 72°C por 40'', 20 ciclos de 96°C por 10'', 60°C por 50'', 72°C por 40''. O produto final de amplificação apresentando 447pb para o alelo G, e 447pb para o alelo A foi diretamente observado em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio (0,5 μ g/mL) e visualizado em Transiluminador UV.

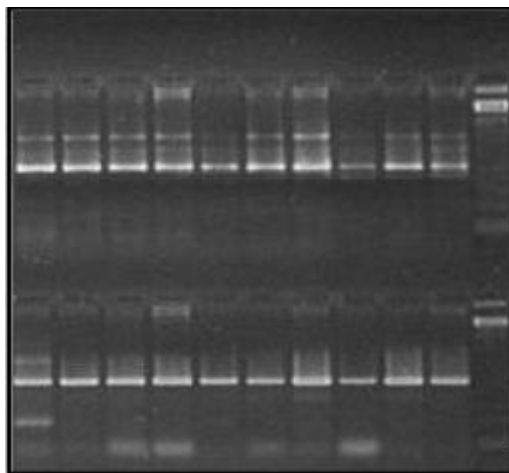


Foto 1: Identificação de alelos na posição -238 do gene TNF- α .

Para descrição do polimorfismo na região promotora do gene IL-1 β -35 foi realizado PCR-ARMS alelo-específico. Para reação de amplificação da mutação na posição -35 100ng do DNA extraído foram adicionados a uma mistura de reação com um volume final 10 μ L cuja concentração final dos reagentes foi de 1X Tampão de Reação, 2.75mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 12% sucrose, 1 μ M de cada iniciador específico, 1 μ M de cada iniciador genérico, 0,2 μ M de iniciador de controle interno e 0,25U DNA polimerase. As reações foram realizadas em Termociclador seguindo as condições dos ciclos: 1minuto a 96°C, seguidos de 10 ciclos de 96°C por 15", 63.5°C por 50", 72°C por 40", 20 ciclos de 96°C por 10", 60°C por 50", 72°C por 40". O produto final de amplificação apresenta 159pb (alelos G e A) e um controle interno de 796pb utilizado para ambos alelos foi diretamente observado em gel de agarose a 2% corados com Brometo de Etídio (0,5 μ g/mL) e visualizado em Transiluminador UV.



Foto 2: Identificação de alelos na posição -35 do gene IL-1 β .

Para descrição do polimorfismo na região promotora do gene IL-10 na posição -1082 foi realizada a técnica de PCR-RFLP. Para reação de amplificação da mutação na posição -1082 e -819 100ng do DNA extraído foram adicionados a uma mistura de reação com um volume final 40 μ L e cuja concentração final dos reagentes foi de 10mM pH 8.3Tris-HCl (Tampão de Reação), 1.5mM de MgCl₂, 10mg/mL BSA (Bovine Serum Albumine), 200 μ M de cada dNTP, 50pmol/ μ L de cada iniciador Sense, 50pmol/ μ L de cada iniciador Anti-sense e 1.25U DNA polimerase. As reações foram realizadas em Termociclador seguindo as condições dos ciclos: 3minutos a 94°C, seguidos de 1035 ciclos de 94°C por 30", 58°C, 30", 72°C 45" e 72°C por 5 minutos. O produto amplificado contendo 360pb foi digerido pela enzima BseRI para observação da mutação na posição -1082 produzindo posteriormente um produto amplificado de 318pb para o alelo mutante homozigoto e 359pb para o alelo selvagem. Para mutação na posição -819 o produto amplificado de 359pb foi digerido pela enzima RsaI formando um fragmento de 359pb no alelo mutante homozigoto e 294pb no alelo selvagem. O produto final foi observado em gel de agarose 3%, corado com Brometo de Etídio (0,5 μ g/mL) e visualizado em Transiluminador UV.

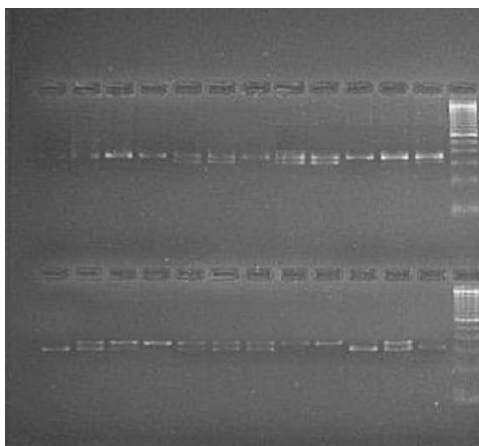


Foto 3: Identificação de alelos na posição -1082 do gene IL-10.

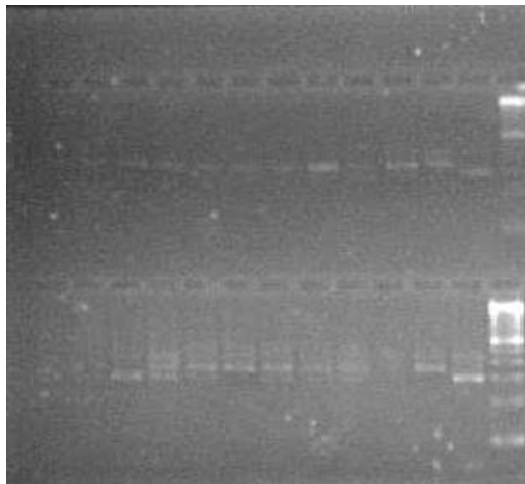


Foto 4: Identificação de alelos na posição -819 do gene IL-10.

Na região promotora do gene IL-10 na posição -592 100ng do DNA extraído foi adicionado a uma mistura de reação com um determinado volume final 30 μ L e cuja concentração final dos reagentes foi de 1X Tampão de Reação, 25mM de MgCl₂, 25mM de cada dNTP, 10mg/mL BSA, 50pmol/ μ L de cada iniciador específico, e 5U DNA polimerase. As reações foram realizadas em Termociclador seguindo as condições dos ciclos: 10 minutos a 95°C, seguidos de 38 ciclos de 94°C por 30'', 60°C por 30'', 72°C por 40'' e 72°C por 7'. O produto final foi observado em agarose 3%, corado com Brometo de Etídio (0,5 μ g/mL) e visualizado em Transiluminador UV. O produto amplificado contendo 480pb, após digestão pela enzima RsaI apresenta um produto amplificado contendo 240pb para o alelo mutante homozigoto e 480pb para o alelo selvagem. O produto final observado em gel de agarose 3% corado com Brometo de Etídio (0,5 μ g/mL) e visualizado em Transiluminador UV.

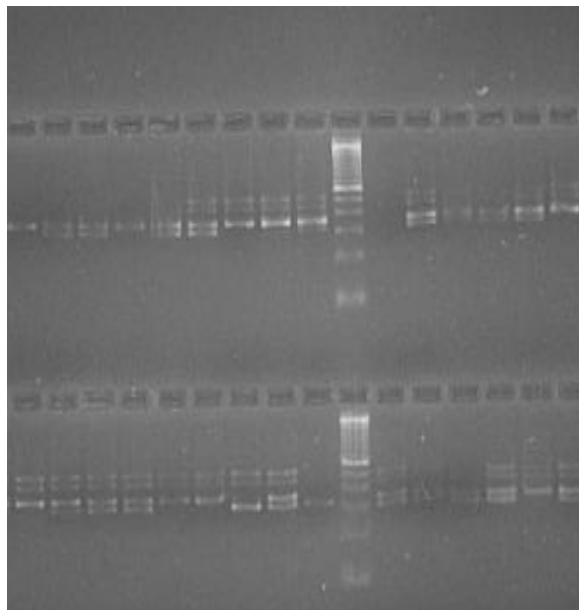


Foto 5: Identificação de alelos na posição -592 do gene IL-10.

5.3. Desenho Experimental:

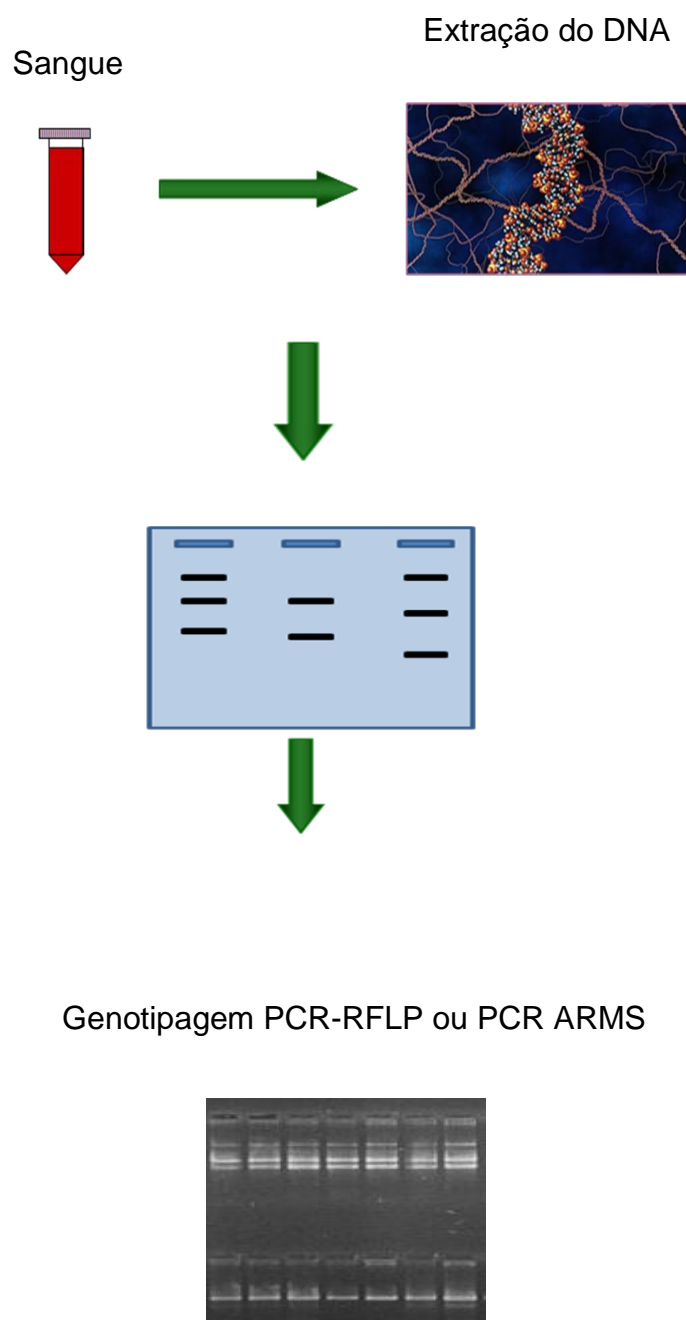


Figura ilustrativa.

5.5. Estudo Amostral:

A ocorrência das diferentes mutações descritas na população geral brasileira foi de 3,5% na posição -238 da região promotora do gene TNF- α e de 30%, 64% e 64% nas posições -592, -819 e -1082, respectivamente, na região promotora do gene IL-10. Assumindo como distribuição normal um valor alfa de 0,05 e um valor beta de 0,20 para uma estimativa com variação aceitável de até 4% e intervalo de confiança de 95% seria necessária a inclusão de 135 a 354 indivíduos (SANTOS e cols, 2002).

Assumindo que não há informações na literatura brasileira acerca da ocorrência de mutações na região promotora do gene IL-1 descrito neste estudo na população atendida no HUCFF e HESM, Brasil, e IDITUB, Itália, foi utilizada uma amostra de conveniência.

5.6. Análise Estatística:

A significância estatística entre as proporções das freqüências alélicas e genotípicas foi avaliada utilizando o teste Qui-quadrado, quando apropriado, e o teste exato de Fisher (EpiInfo versão 6, *Center for Disease Control and Prevention*). A magnitude das associações foi estimada como razão de chances (*Odds ratio*, OR) com seus respectivos intervalos de confiança. O nível de significância estatística adotado foi de 5%.

5.8. Cálculo das Freqüências:

As freqüências alélicas foram calculadas a partir da seguinte fórmula:

$$F \text{ (alelo)}: \frac{n^{\circ} \text{ de genótipos mutantes homozigotos} \times 2 + n^{\circ} \text{ de genótipos heterozigotos}}{n^{\circ} \text{ de genótipos totais} \times 2}$$

5.9. Aspectos éticos:

O projeto iniciou-se após a aprovação e liberação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio de Janeiro e pela Comissão Nacional de Ética em pesquisa no Brasil (CONEP) sob numero 004/02 em 17 de janeiro de 2001.

CAPÍTULO IV

6. RESULTADOS

6.1. Características gerais da população total estudada:

Do total de 346 indivíduos com TB incluídos no estudo, 238 (68,8%) eram do sexo masculino. A mediana da idade foi de 39 anos ($Q_1=30$; $Q_3=48$). *Status* HIV positivo foi identificado em 30 (16%) pacientes. Segundo a forma clínica desses indivíduos, observou-se que 239 (69,7%) apresentaram forma pulmonar, 71 (19,6%) forma extrapulmonar, 37 (10,7%) forma disseminada correspondendo a um total de 105 (30,3%) apresentando formas graves. Em relação à origem do material, observou-se que 188 (54,3%) eram oriundos dos hospitais do Brasil e 158 (45,7%) oriundos do hospital na Itália (tabela 1).

Entre os 188 pacientes oriundos dos centros de tratamento do Brasil que foram avaliados, 134 (71,3%) eram do sexo masculino; a mediana da idade foi de 43 anos ($Q_1=33$; $Q_3=52$), e *status* HIV positivo ocorreu em 30 (16%) pacientes. Forma pulmonar e grave foi identificada em 171 (91%) e 15 (8%) casos respectivamente. Entre 158 pacientes incluídos no estudo oriundos da Itália, 104 (65,8%) eram do sexo masculino; nenhum dos indivíduos apresentou *status* positivo para HIV, e a mediana da idade foi de 37 anos ($Q_1=28$; $Q_3=42$). Em relação à forma clínica, 68 (43%) pacientes apresentaram a forma pulmonar e 90 (57%) TB grave (30 (19%) pacientes com TB disseminada, 60 (38%) com TB extrapulmonar). Na análise comparativa, observou-se que idade inferior a 29 anos ou superior a 50 anos, a forma pulmonar, TB não Grave, e infecção por HIV foram mais freqüentes entre pacientes oriundos do Brasil em relação aos pacientes da Itália (tabela 1).

Tabela 1. Características gerais da população total estudada de acordo com local de atendimento:

Características Gerais da população	Hospital Brasil n=188	Hospital Itália n=158	Total N=346	Valor de p	OR	IC (95%)
Sexo						
Masculino	134 (71,3%)	104 (65,8%)	238 (68,8%)	1		
Feminino	54 (28,7%)	54 (34,2%)	108 (31,2%)	0,275	1,29	0,80-2,09
Idade (anos)						
≤ 29	31 (16,5%)	52 (32,9%)	83 (24%)			
30-49	91 (48,4%)	83 (52,5%)	174 (50,3%)			
≥ 50	61 (32,4%)	20 (12,7%)	81 (23,4%)	0,0005*		
Ignorado	5 (2,7%)	3 (1,9%)	8 (2,3%)	-		
Status						
HIV-	126 (67%)	158 (100%)	284 (82,1%)	1		
HIV+	30 (16%)	1*	30 (8,7%)	<0,0001*	0,03	0,0-0,19
Ignorado	32 (17%)	1*	32 (9,2%)	-		
Forma Clínica						
Pulmonar	171 (91%)	68 (43%)	239 (69,7%)	1		
Extrapulmonar	10 (5,3%)	60 (38%)	71 (19,6%)	p<0,0001***	13,3	7,13-25,14
Disseminada	7 (3,7%)	30 (19%)	36 (10,7%)			
Gravidade						
Sim	15 (8%)	90 (57%)	105 (30,3%)	1		
Não	173 (92%)	68 (43%)	241 (69,7%)	p<0,0001*	0,07	0,03-0,13

1* - Valor inserido para possibilitar a análise estatística.

** - Qui quadrado para tendência/ Não Incluído pacientes com informações ignoradas.

*** - Pulmonar versus Extrapulmonar + Disseminada.

Dos 188 pacientes com TB, 84 (44,7%) indivíduos foram tratados no HESM, 30 (16%) no IETAP e 74 (39,3%) no HUCFF/IDT (tabela 2).

Tabela 2. Forma clínica da Tuberculose encontrada nos três centros de tratamento estudados no Brasil:

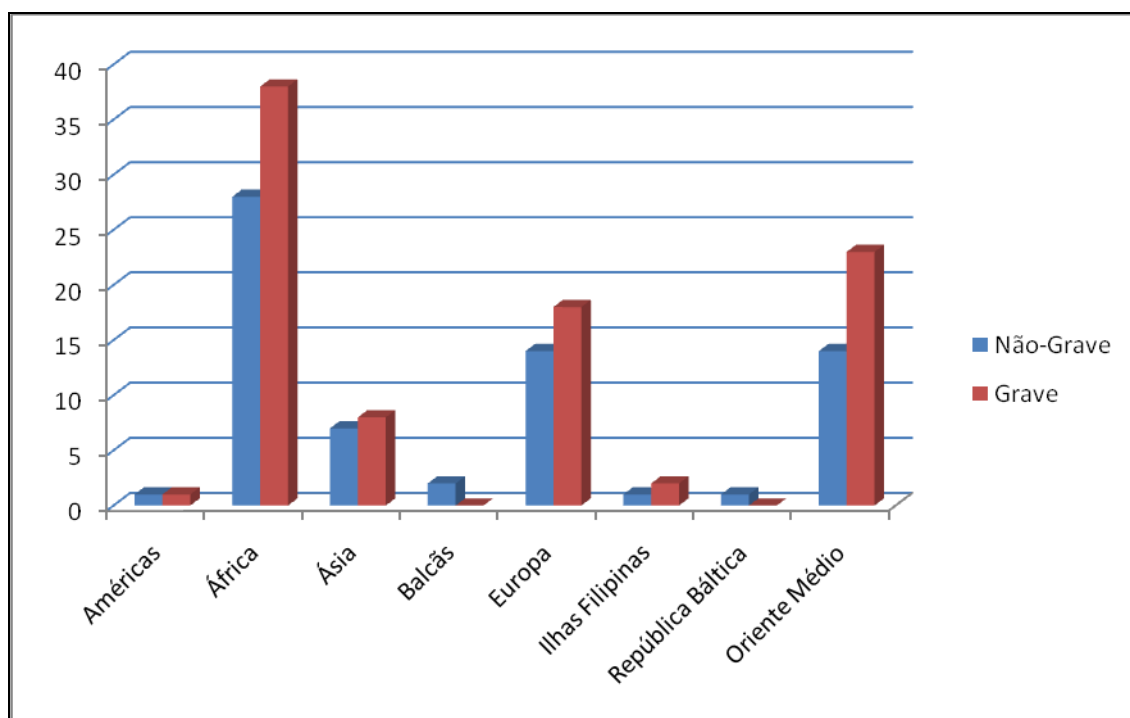
	Centro de	Referência	para Tratamento
	HESM	IETAP	HUCFF
	n=84	n=30	n=74
Forma Clínica			
Pulmonar	76 ^(90,5%)	30 ^(100%)	65 ^(87,9%)
Extrapulmonar	5 ^(6,0%)	0	5 ^(6,7%)
Disseminada	3 ^(3,5%)	0	4 ^(5,4%)
TB Grave			
Sim	8 ^(9,5%)	0	7 ^(9,5%)
Não	76 ^(90,5%)	30 ^(100%)	67 ^(90,5%)

Das amostras clínicas oriundas da Itália, 41% dos pacientes apresentavam nacionalidade africana, 24% origem italiana e 34% de outras nacionalidades. O país de origem e a frequência da forma clínica de acordo com a gravidade estão representados na tabela 3 e no gráfico 1.

Tabela 3. Associação entre a TB grave e origem do paciente atendido na Itália:

Nacionalidade (n= 188)	Não Grave	Grave
Bangladesh	0	1 (1,11%)
Bósnia e Herzegovina	1 (1,47%)	0
Brasil	1 (1,47%)	0
China	2 (2,94%)	2 (2,22%)
Egito	0	1 (1,11%)
Eritrea	1 (1,47%)	1 (1,11%)
Filipinas	1 (1,47%)	2 (2,22%)
Gana	3 (4,41%)	2 (2,22%)
Guinea Konakry	1 (1,47%)	0
Índia	5 (7,35%)	5 (5,56%)
Itália	10 (14,71%)	14 (15,56%)
Kosovo	1 (1,47%)	0
Lituânia	1 (1,47%)	0
Maldovia	1 (1,47%)	0
Marrocos	7 (10,29%)	7 (7,78%)
Nigéria	0	2 (2,22%)
Paquistão	14 (20,59%)	23 (25,56%)
Peru	0	1 (1,11%)
Roma	0	1 (1,11%)
Romênia	2 (2,94%)	2 (2,22%)
Senegal	15 (22,06%)	21 (23,33%)
Somália	0	4 (4,44%)
Tunísia	1 (1,47%)	0
Ucrânia	1 (1,47%)	0
Iugoslávia	0	1 (1,11%)
Total	68	90

Gráfico 1. Associação entre a TB grave e origem do paciente atendido na Itália:



6.2. Características clínicas da população estudada:

Na tabela 4, observamos que entre 238 indivíduos do sexo masculino que participaram do estudo, 162 apresentaram forma pulmonar, e entre 108 indivíduos do sexo feminino 77 apresentaram forma pulmonar. A tuberculose pulmonar ocorreu em pacientes com faixa etária ≤ 29 anos, 30-49 e ≥ 50 anos respectivamente em 54, 112 e 66 casos. Em relação status HIV, a forma pulmonar foi observada em 186 pacientes HIV negativos e em 24 pacientes HIV positivos.

Na tabela 5, observa-se que TB não grave ocorreu com maior frequência entre pacientes com idade superior a 50 anos ($p=0,007$) e não houve diferença entre a TB grave e não grave em relação ao sexo e infecção por HIV.

Tabela 4. Descrição das formas clínicas da TB e os variáveis estudadas na população total:

Variáveis	Forma Clínica			
	Pulmonar n=239	Extrapulmonar n=70	Disseminada n=37	Total
Sexo				
Masculino	162 ^(68,1%)	49 ^(20,6%)	27 ^(11,3%)	238
Feminino	77 ^(71,3%)	21 ^(19,4%)	10 ^(9,3%)	108
Idade (anos) (anos)				
≤ 29	54 ^(65,1%)	20 ^(24,1%)	9 ^(10,8%)	83
30-49	112 ^(64,4%)	40 ^(23%)	22 ^(12,6%)	174
≥ 50	66 ^(81,5%)	9 ^(11,1%)	6 ^(7,4%)	81
Ignorado	7 ^(87,5%)	1 ^(12,5%)	0	8
Status				
HIV-	186 ^(78%)	67 ^(94,4%)	31 ^(86,1%)	284
HIV+	24 ^(10%)	1 ^(2,8%)	5 ^(11,1%)	30
Ignorado	29 ^(12%)	2 ^(2,8%)	1 ^(2,8%)	32
Total				346

Tabela 5. Associação entre a gravidade da TB e as variáveis estudadas na população total:

Gravidade						
	Sim	Não	Total	Valor de	OR	IC (95%)
Variáveis	n=105	n=241				
Sexo						
Masculino	74 ^(31,9%)	164	238	1		
Feminino	31 ^(28,7%)	77	108	0,654	1,12	(0,66-1,90)
Idade (anos)						
≤ 29	29 ^(34,9%)	54 ^(65,1%)	83			
30-49	60 ^(34,7%)	113 ^(65,3%)	173			
≥ 50	15 ^(12,3%)	67 ^(87,7%)	82	0,0019*		
Ignorado	1 ^(12,5%)	7 ^(87,5%)	8	-		
Status						
HIV+	5 ^(16,7%)	25 ^(83,3%)	30	1		
HIV-	97 ^(34,2%)	187 ^(65,8%)	284	0,08*	0,39	(0,13-1,10)
Ignorado	3 ^(9,4%)	29 ^(90,6%)	32	-		
Total			346			

** - Qui quadrado para tendência/ Não Incluído pacientes com informações ignoradas.

6.3. Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos TNF- α -238G/A na população geral estudada:

Em 346 (238 homens) pacientes foi realizada a identificação de SNPs presentes na posição -238 do gene que codifica para o TNF- α , e observou-se uma frequência alélica de 0,14 para o alelo mutante. A distribuição genotípica e alélica das mutações em questão está representada nos gráficos 1A

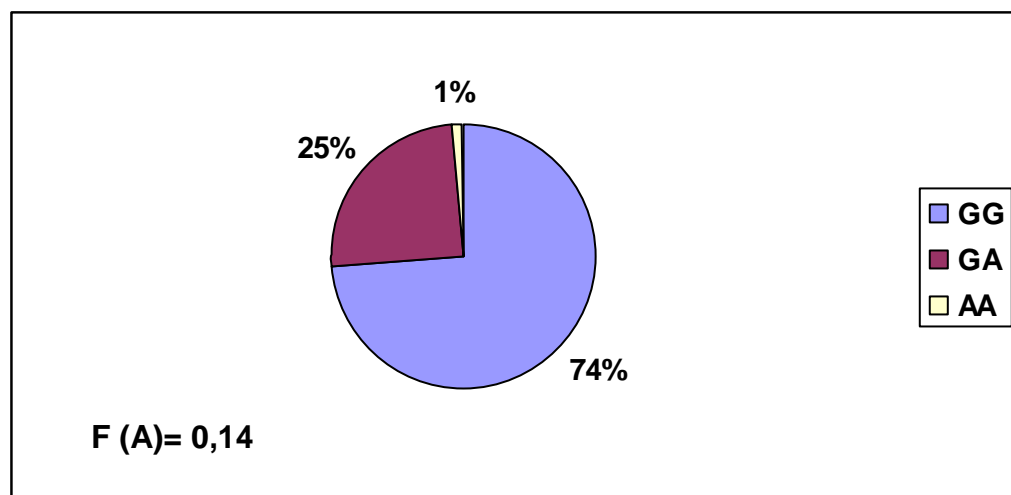


Gráfico 1A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -238 do gene de TNF- α entre pacientes com TB.

6.4. Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos IL-1 β -35T/C na população geral estudada:

Em 340 (234 homens) pacientes com TB foi realizada a identificação de polimorfismos na região promotora do gene de IL-1 na posição -35 onde se

observou uma frequência alélica de 0,45 para o alelo mutante. A distribuição genotípica é mostrada respectivamente nos gráficos 2A.

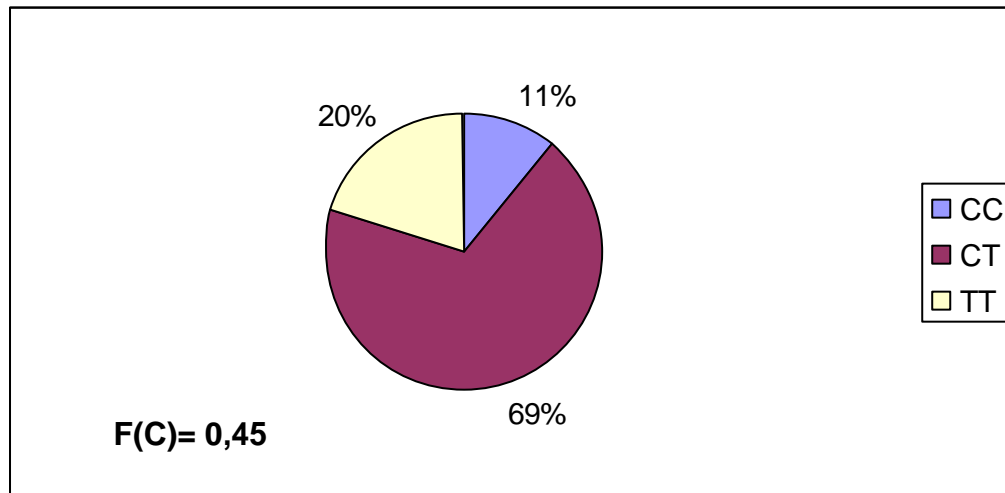


Gráfico 2A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -35 do gene de IL-1 entre pacientes TB.

6.5. Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos IL-10 -1082G/A, -819C/T e -592C/A na população geral estudada:

A identificação de mutações na região promotora do gene de IL-10 nas posições -1082, -819 e -592 foram realizadas respectivamente em 343 (236 homens), 345 (237 homens) e 341 (234 homens) pacientes com TB. A distribuição genotípica para os três SNPs estudados é mostrada respectivamente nos gráficos 3A, 3B e 3C.

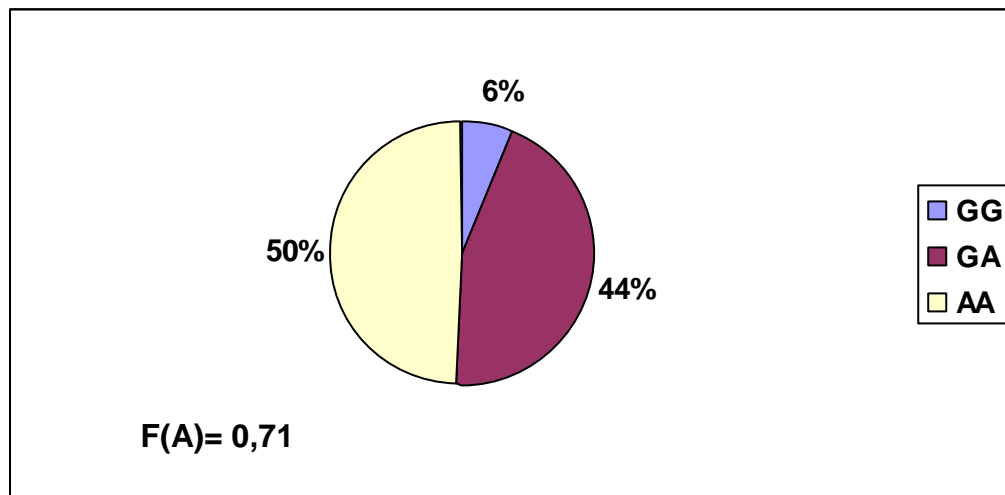


Gráfico 3A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -1082 do gene de IL-10 entre pacientes TB.

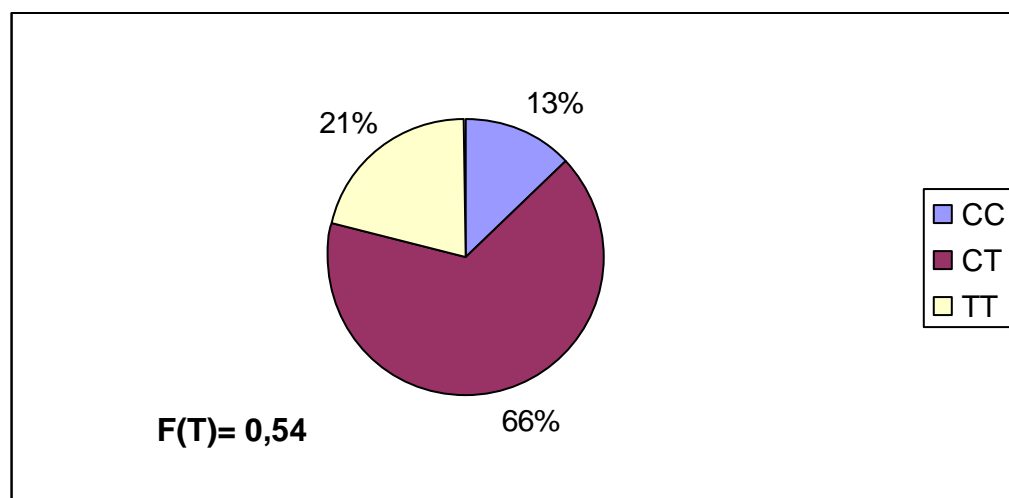


Gráfico 3B. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -819 do gene de IL-10 entre pacientes TB.

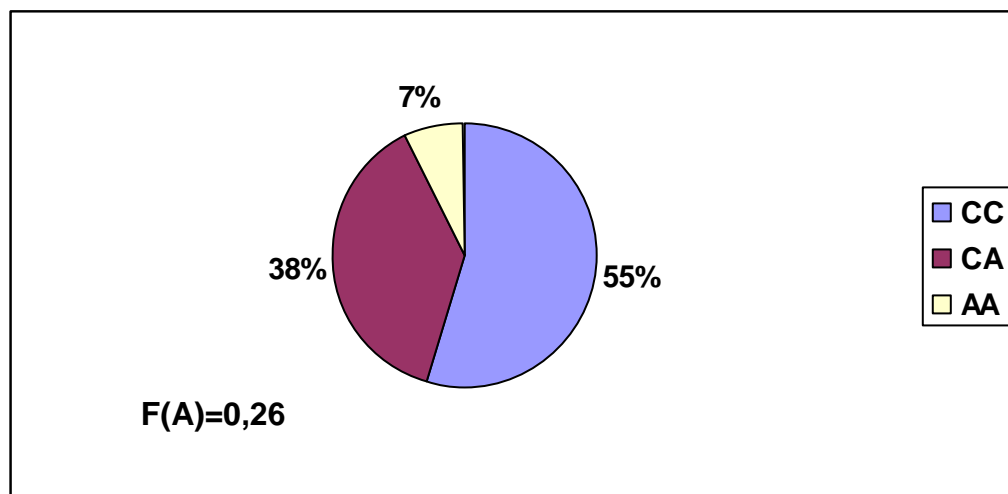


Gráfico 3C. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -592 do gene de IL-10 entre pacientes TB.

6.7. Características gerais da população estudada oriunda nos centros de tratamento no Brasil:

6.6.1. Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos -238G/A na população brasileira:

Entre 188 (134 homens) pacientes com TB avaliados, observou-se uma frequência de 19% do alelo mutante para a mutação na posição -238 do gene que codifica para o TNF- α (gráfico 4a).

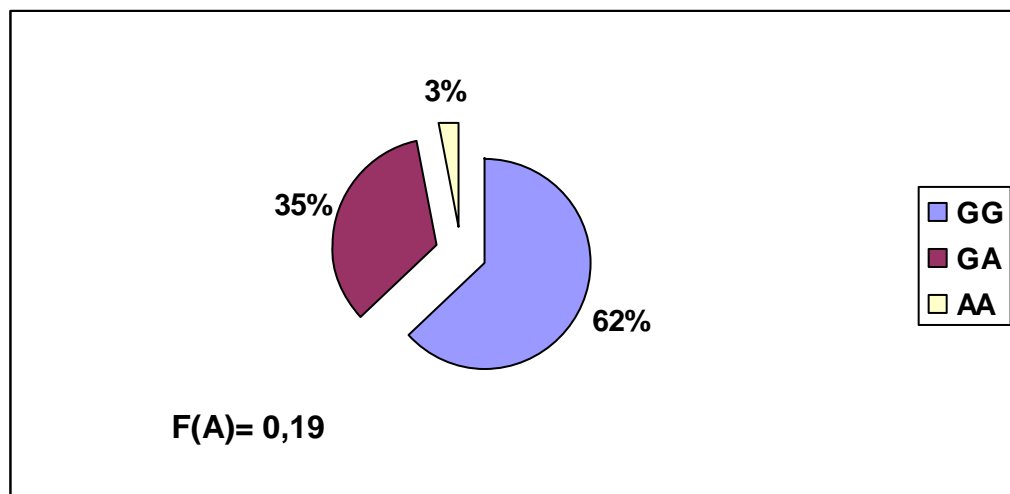


Gráfico 4A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -238 do gene de TNF- α entre pacientes brasileiros com TB.

6.6.2. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -238 do TNF- α entre os pacientes do Brasil de acordo com o sexo ou *status* do HIV:

Em relação ao sexo, não foi observada diferença significativa entre a ocorrência de genótipos ou frequência alélica na posição -238. Para a avaliação de *status* de HIV observamos um aumento significativo na frequência do genótipo heterozigoto entre indivíduos HIV- ($p=0,004$; OR=0,24; IC=0,08-0,72), inversamente, a frequência do homozigoto mutante estava significativamente aumenta no grupo de HIV+ ($p=0,002$; OR=13,89; IC=1,21-360,81). Não observamos diferença na frequência alélica. (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -238 do TNF- α entre os pacientes do Brasil de acordo com o sexo e *status* do HIV:

	Masculino n=134	Feminino n=54	Valor de p	OR	IC (95%)
GG	82 ^(61,2%)	36 ^(66,7%)	ref	1	-
GA	48 ^(35,8%)	17 ^(31,5%)	0,57	1,21	0,59-2,52
AA	4 ^(3%)	1 ^(1,8%)	0,55	1,63	,17-3,22
f(A)=	0,20	0,17	0,46	1,24	0,67-2,30

	HIV+ n=30	HIV- n=126	Valor de p	OR	IC (95%)
GG	22 ^(73,3%)	68 ^(54%)	ref	1	-
GA	5 ^(16,7%)	57 ^(45%)	0,004*	0,24	0,08-0,72
AA	3 ^(10%)	1 ^(1%)	0,02*	13,89	1,21-360,81
f(A)=	0,17	0,23	0,39	0,73	0,34-1,57

n= Total do genótipo estudado; *valor de p* = valor de p ; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f()= Frequência alélica; GG= genótipo homozigoto selvagem; GA= genótipo heterozigoto; AA= genótipo homozigoto mutante.

6.6.3. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -238 do TNF- α entre os pacientes do Brasil de acordo com o critério de Gravidade:

A análise dos pacientes com TB de acordo com a gravidade mostrou um aumento significativo do genótipo homozigoto mutante assim como da frequência alélica nos pacientes com formas graves quando comparados as formas Não-Graves ($p=0,0001$; $p=0,0004$, respectivamente). (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição genotípica do polimorfismo do gene TNF- α -238 entre os pacientes do Brasil de acordo com a Gravidade:

	Grave	Não Grave	Valor de p	OR	IC (95%)
	n=15	N=173			
GG	7 ^(46,6%)	111 ^(64,2%)	ref	1	-
GA	4 ^(26,7%)	61 ^(35,2%)	0,50	0,67	0,17-2,40
AA	4 ^(26,7%)	1 ^(0,6%)	0,0001*	62,55	5,69-1.608,77
f(A)=	0,4	0,18	0,004*	2,95	1,26-6,84

n= Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de p ; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f()= Frequência alélica; GG= genótipo homozigoto selvagem; GA= genótipo heterozigoto; AA= genótipo homozigoto mutante.

6.6.4. Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos -35T/C na população brasileira:

Entre 182 pacientes (130 homens) com TB avaliados, observou-se uma frequência de 44% do alelo mutante alelo para a mutação na região promotora do gene de IL-1 na posição -35 (Gráfico 5A).

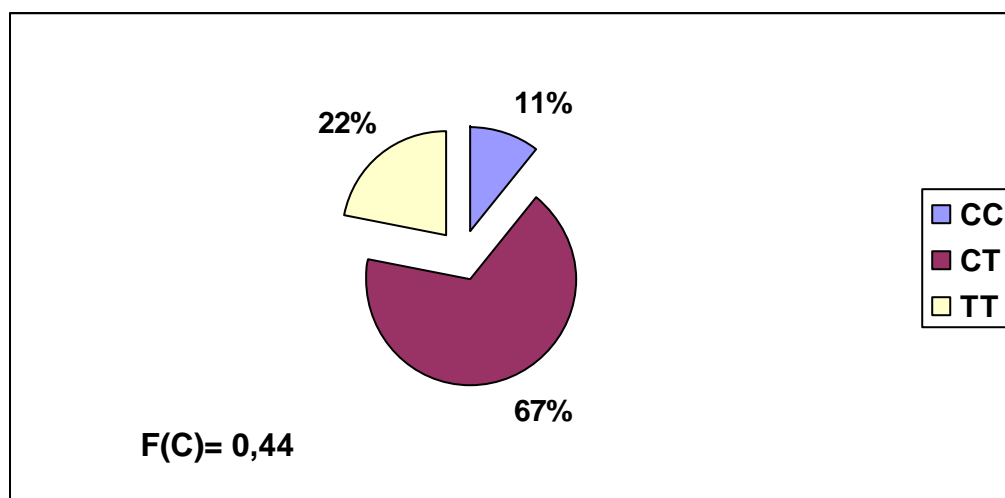


Gráfico 5A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -35 do gene de IL-1 entre pacientes brasileiros com TB.

6.6.7. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -35 do IL-1 β entre os pacientes do Brasil de acordo com o sexo ou *status* do HIV:

Nenhuma diferença significativa em relação à mutação no gene IL-1 β foi observada tanto nas freqüências genotípicas quanto alélicas quando os indivíduos foram comparados em relação ao sexo ou *status* do HIV (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -35 do IL-1 β entre os pacientes do Brasil de acordo com o com o sexo ou *status* do HIV:

	Masculino n=130	Feminino n=52	Valor de p	OR	IC (95%)
TT	31 ^(24%)	9 ^(17,3%)	ref	1	-
CT	83 ^(64%)	39 ^(75%)	0,14	0,59	0,27-1,28
CC	16 ^(12%)	4 ^(7,7%)	0,36	0,51,689	0,48-6,31
F(C)=	0,44	0,45	0,86	0,96	0,59-1,56

	HIV- n=123	HIV+ n=27	Valor de p	OR	IC (95%)
TT	32 ^(26%)	5 ^(18,5%)	ref	1	-
CT	78 ^(63,4%)	19 ^(70,4%)	0,49	0,73	0,27-1,95
CC	13 ^(10,6%)	3 ^(11,1%)	0,58	0,95	0,23-4,55
F(C)=	0,42	0,46	0,58	0,85	0,45-1,60

n=Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de *p*; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f()= Freqüência alélica; TT= genótipo homocigoto selvagem; CT= genótipo heterocigoto; CC= genótipo homocigoto mutante.

6.6.8. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -35 do IL-1 β entre os pacientes do Brasil de acordo com a Gravidade:

Um aumento significativo na frequência do genótipo heterozigoto no grupo Não-Grave quando comparado ao grupo Grave ($p=0,005$; OR=4,68; IC=1,38-16,70, respectivamente) foi observado. Observamos um aumento do genótipo homozigoto mutante entre os indivíduos com formas graves apresentando uma significância “boderline” ($p=0,05$); OR: 3,78; IC: 0,88-15,34) (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição genotípica do polimorfismo do gene -35 do IL-1 β entre os pacientes do Brasil de acordo com a Gravidade:

	Grave n=15	Não Grave n=167	Valor de p	OR	IC (95%)
TT	6 ^(40%)	34 ^(20,3%)	ref	1	-
CT	5 ^(33,3%)	117 ^(70,1%)	0,005*	0,21	0,06-0,76
CC	4 ^(26,7%)	16 ^(9,6%)	0,05	3,78	0,88-15,34
f(C)=	0,43	0,44	0,89	0,95	0,42-2,14

n= Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de p ; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f()= Frequência alélica; TT= genótipo homozigoto selvagem; CT= genótipo heterozigoto; CC= genótipo homozigoto mutante.

6.6.9. Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos -1082G/A, -819C/T e -592C/A na população brasileira:

A identificação de mutações na região promotora do gene de IL-10 nas posições -1082, -819 e -592 foi realizada respectivamente em 186 (132 homens), 188 (134 homens) e 183 (130 homens) pacientes com TB. A distribuição genotípica para os três SNPs estudados é mostrada respectivamente nos gráficos 6A, 6B e 6C.

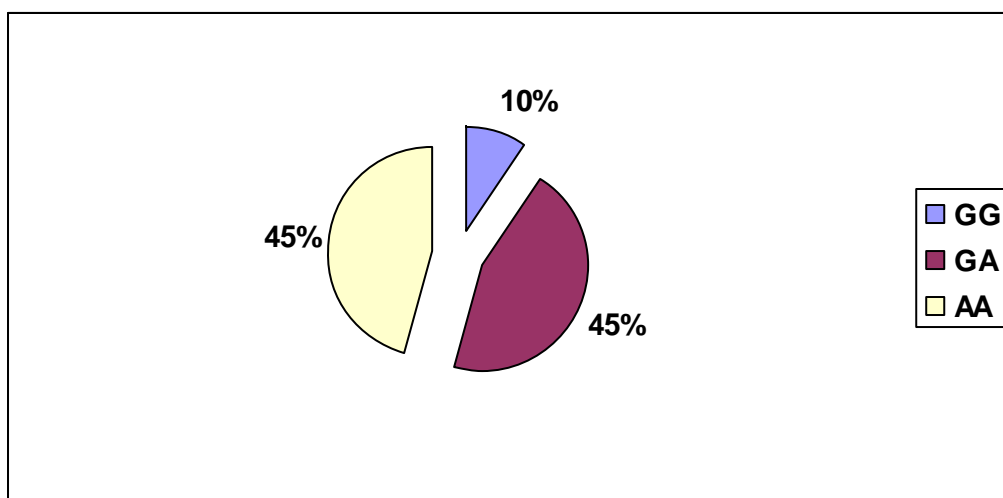


Gráfico 6A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -1082 do gene de IL-10 entre pacientes brasileiros com TB.

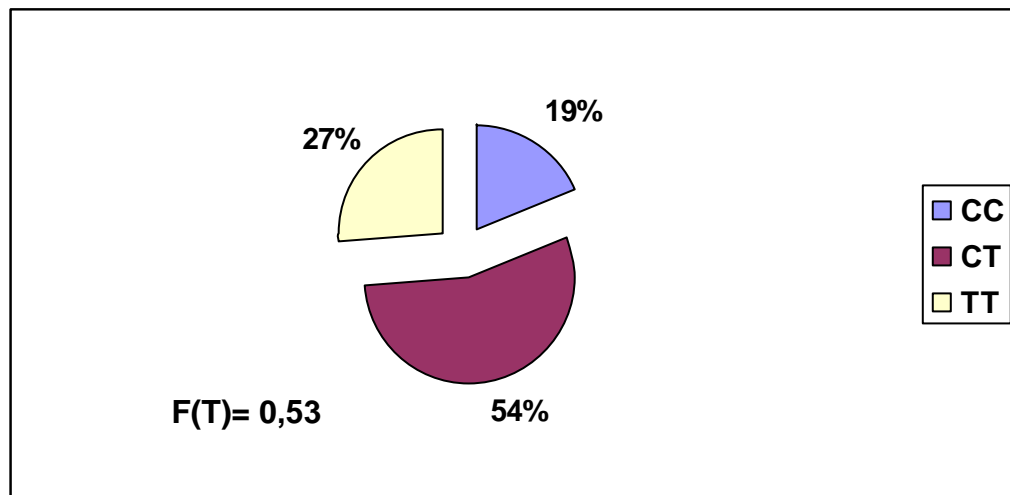


Gráfico 6B. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -819 do gene de IL-10 entre pacientes brasileiros com TB.

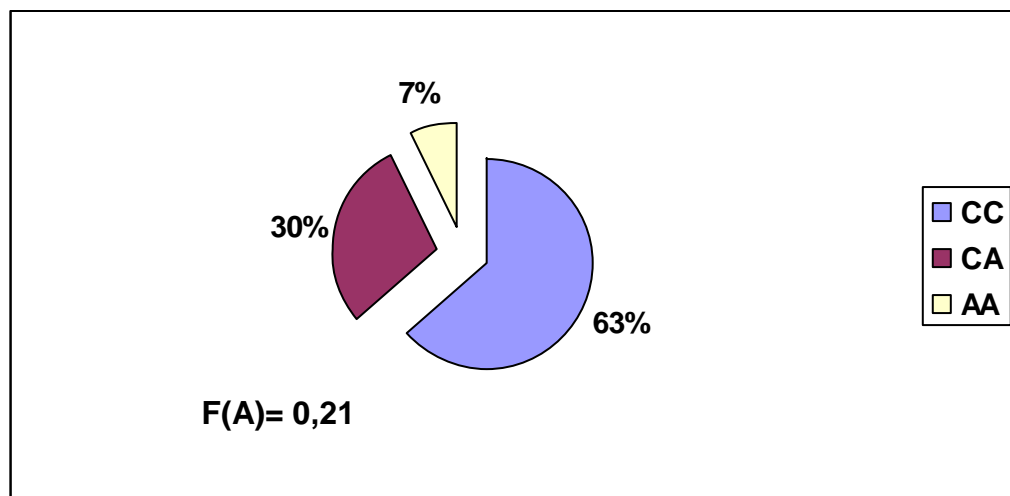


Gráfico 6C. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -592 do gene de IL-10 entre pacientes brasileiros com TB.

6.6.10. Distribuição genotípica dos polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 do IL-10 entre os pacientes do Brasil de acordo com o sexo ou com *status* do HIV:

Na análise das mutações estudadas no IL-10, observou-se que não houve diferenças significativas na frequência do alelo mutante ou de nenhum dos genótipos possíveis quando analisado de acordo com o sexo ou com o com *Status* do HIV (Tabelas 10 e11, respectivamente).

Tabela 10. Distribuição genotípica dos polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 do IL-10 entre os pacientes do Brasil de acordo com o sexo:

	Masculino	Feminino	Valor de p	OR	IC (95%)
	n=132	n=54			
-1082					
GG	13 ^(10%)	5 ^(9,3%)	ref	1	-
GA	56 ^(42%)	27 ^(50%)	0,34	0,74	0,37-1,46
AA	63 ^(48%)	22 ^(40,7%)	0,38	1,38	0,67-2,65
f(A)=	0,68	0,65	0,54	1,16	0,70-1,91
	n=134	n=54			
-819					
CC	25 ^(18,6%)	11 ^(20,3%)	ref	1	-
CT	73 ^(54,4%)	29 ^(53,7%)	0,92	1,03	0,52-2,04
TT	36 ^(27%)	14 ^(26%)	0,89	1,05	0,48-2,29
f(T)=	0,54	0,52	0,81	1,05	0,66-1,69
	n=130	n=53			
-592					
CC	78 ^(60%)	38 ^(72%)	ref	1	-
CA	43 ^(33%)	11 ^(21%)	0,09	1,89	0,84-4,33
AA	9 ^(7%)	4 ^(7%)	0,55	0,91	0,24-3,71
f(A)=	0,23	0,17	0,24	1,40	0,76-2,60

n= Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de *p*; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f()= Frequência alélica; GG/CC/CC= genótipo homocigoto selvagem; GA/CA/CT= genótipo heterocigoto; AA/TT/AA= genótipo homocigoto mutante.

Tabela 11. Distribuição genotípica dos polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 do IL-10 entre os pacientes do Brasil de acordo com o *status* do HIV:

	HIV	HIV Positivo	Valor de <i>p</i>	OR	IC (95%)
	n=124	n=30			
-1082					
GG	13 ^(10,5%)	4 ^(13,4%)	ref	1	-
GA	57 ^(46%)	16 ^(53,3%)	0,46	0,74	0,31-1,78
AA	54 ^(43,5%)	10 ^(33,3%)	0,30	1,54	0,62-3,88
f(A)=	0,66	0,60	0,34	1,33	0,71-2,46
	n=126	n =30			
-819					
CC	28 ^(22%)	4 ^(13,3%)	ref	1	-
CT	68 ^(54%)	17 ^(56,7%)	0,79	0,90	0,37-2,15
TT	30 ^(24%)	9 ^(30%)	0,48	0,73	0,28-1,93
f(T)=	0,50	0,44	0,29	0,74	0,40-1,35
	n=123	n=28			
-592					
CC	78 ^(63%)	20 ^(71,4%)	ref	1	-
CA	33 ^(27%)	7 ^(25%)	0,84	1,10	0,40-3,16
AA	12 ^(10%)	1 ^(3,6%)	0,26	2,92	0,37-62,64
f(A)=	0,23	0,16	0,24	1,57	0,69-3,68

n= Total do genótipo estudado; ING= Ignorado; GG/CC/CC= genótipo homocigoto selvagem; GA/CA/CT= genótipo heterocigoto; AA/TT/AA= genótipo homocigoto mutante.

6.6.11. Distribuição genotípica do polimorfismo nas posições -1082, -819 e -592 no gene do IL-10 entre os pacientes do Brasil de acordo com a Gravidade:

Na análise das mutações estudadas no IL-10, observou-se que não houve diferenças significativas na frequência do alelo mutante ou de nenhum dos genótipos possíveis quando analisados de acordo com gravidade da TB para as mutações na posição -1082 e -819. Para a mutação na posição -592 observamos uma aumento na frequência do alelo mutante entre o grupo Não grave ($p=0,03$; $OR=0,24$; $IC=0,04-1,05$). (tabela 12)

Tabela 12. Distribuição genotípica do polimorfismo nas posições -1082, -819 e -592 no gene do IL-10 entre os pacientes do Brasil de acordo com a Gravidade:

	Grave	Não Grave	Valor de p	OR	IC (95%)
	n=15	n=171			
-1082					
GG	1 ^(6,7%)	17 ^(10%)	ref	1	-
GA	6 ^(40%)	77 ^(45%)	0,70	0,81	0,24-2,64
AA	8 ^(53,3%)	77 ^(45%)	0,53	1,40	0,44-4,51
f(A)=	0,26	0,22	0,51	1,32	0,54-3,34
	n=15	n= 173			
-819					
CC	4 ^(26,7%)	32 ^(18%)	ref	1	-
CT	9 ^(60%)	93 ^(54%)	0,64	1,29	0,40-1,29
TT	2 ^(13,3%)	48 ^(28%)	0,18	0,40	0,06-1,97
f(T)=	0,43	0,54	0,23	0,64	0,28-1,43
	n=15	n=168			
-592					
CC	13 ^{86,7%}	103 ^(61,3%)	ref	1	-
CA	2 ^(13,3%)	52 ^(31%)	0,09	0,32	0,05-1,55
AA	1*	13 ^(7,7%)	0,65	0,79	-
f(A)=	0,06	0,23	0,03	0,24	0,04-1,05

n= Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de *p*; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f()= Frequência alélica; GG/CC/CC= genótipo homocigoto selvagem; GA/CA/CT= genótipo heterocigoto; AA/TT/AA= genótipo homocigoto mutante.

6.7. Características gerais da população estudada oriunda do centro de tratamento na Itália:

6.7.1. Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos -238G/A na população da Itália:

Entre 158 (104 homens) pacientes com TB avaliados, observou-se uma frequência de 6% do alelo mutante para a mutação na posição -238 gene que codifica para o TNF- α (gráfico 7a).

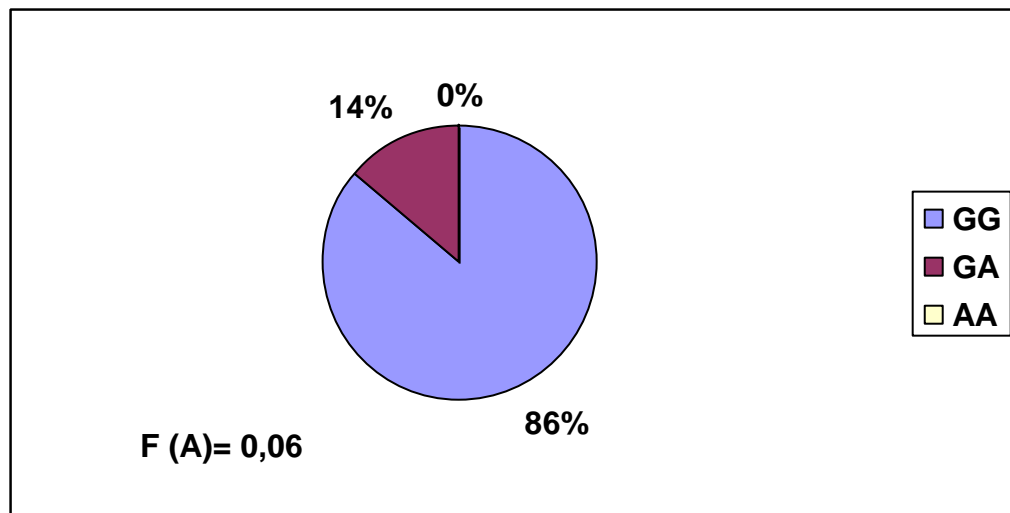


Gráfico 7A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -238 do gene de TNF- α entre pacientes com TB na Itália.

6.7.2. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -238 do TNF- α entre os pacientes da Itália de acordo com o sexo:

Não foi observada associação significativa entre a frequência alélica ou na frequência dos possíveis genótipos na posição -238 do TNF- α em relação ao sexo. (Tabela 13).

Tabela 13. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -238 do TNF- α entre os pacientes da Itália de acordo com o sexo:

	Sexo	Sexo			
	Masculino	Feminino	Valor de p	OR	IC (95%)
	n=104	n=54			
GG	91 ^(87,5%)	45 ^(83,3%)	ref	1	-
GA	13 ^(12,5%)	9 ^(16,7%)	0,48	0,71	0,26-1,98
AA	1	1	0,58	0,54	0,01-20,13
F(A)=	0,06	0,08	0,37	0,769	0,29-1,68

n= Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de p ; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f()= Frequência alélica; GG= genótipo homocigoto selvagem; GA= genótipo heterocigoto; AA= genótipo homocigoto mutante.

6.7.3. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -238 do TNF- α entre os pacientes da Itália de acordo com a Gravidade:

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes tanto na análise comparativa do genótipo quanto alélica em relação à gravidade da TB para o polimorfismo na posição -238 do TNF- α . (Tabela 14).

Tabela 14. Distribuição genotípica do polimorfismo do gene TNF- α -238 entre os pacientes da Itália de acordo com a Gravidade:

	Grave	Não Grave	Valor de p	OR	IC (95%)
	n=90	n=68			
GG	77 ^(85,6%)	59 ^(86,8%)	ref	1	-
GA	13 ^(14,4%)	9 ^(13,2%)	0,82	1,11	0,41-3,45
AA	1	1	0,67	0,76	0,02-28,21
F(A)=	0,07	0,06	0,93	1,04	0,43-2,51

n= Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de p ; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f(=) Freqüência alélica; GG= genótipo homocigoto selvagem; GA= genótipo heterocigoto; AA= genótipo homocigoto mutante.

6.7.4. Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos -35T/C na população da Itália:

Entre 158 (104 homens) pacientes com TB avaliados, observou-se que 11% deles apresentaram genótipo homozigoto mutante na região promotora do gene de IL-1 na posição -35. A distribuição genotípica é mostrada respectivamente nos gráficos 8A.

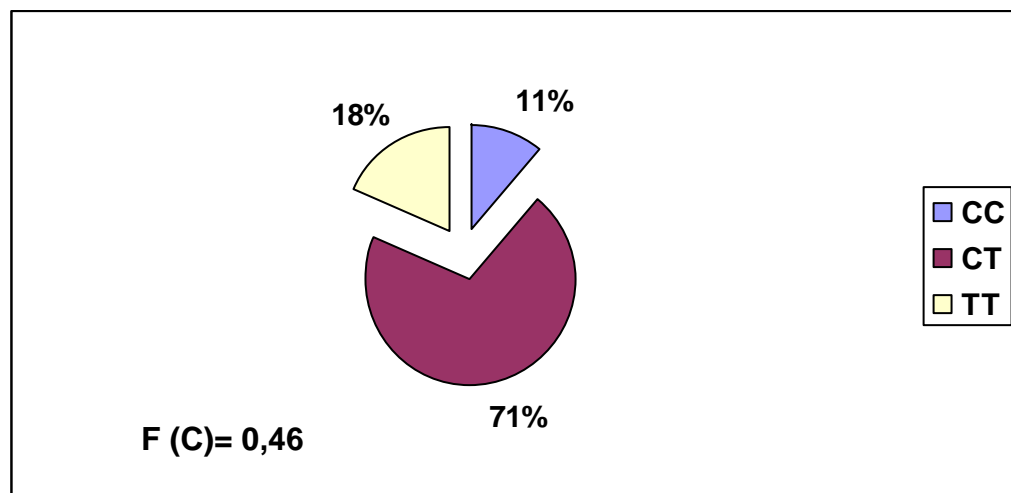


Gráfico 8A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -35 do gene de IL-1 entre pacientes com TB na Itália.

6.7.4. Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo na posição -35 do IL-1 β entre os pacientes da Itália de acordo com o sexo:

Na tabela 15 são mostradas as freqüências genotípicas e alélicas nos grupos comparados quanto ao sexo. Não foram observadas diferenças significantes nas freqüências genotípicas e alélicas para mutação nesta posição.

Tabela 15. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -35 do IL-1 β entre os pacientes da Itália de acordo com o sexo:

	Masculino	Feminino	Valor de p	OR	IC (95%)
	n=104	n= 54			
TT	17 ^(16,3%)	12 ^(22,2%)	ref	1	-
CT	74 ^(71,2%)	37 ^(68,5%)	0,73	1,13	0,52-2,45
CC	13 ^(12,5%)	5 ^(9,3%)	0,54	1,40	0,43-4,81
F(C)=	0,48	0,43	0,44	1,20	0,73-1,97

n= Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de p ; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f()= Freqüência alélica; TT= genótipo homocigoto selvagem; CT= genótipo heterocigoto; CC= genótipo homocigoto mutante.

6.7.5. Distribuição genotípica do polimorfismo na posição -35 do IL-1 β entre os pacientes da Itália de acordo com a Gravidade:

Quando os grupos Graves e Não-Graves foram comparados em relação à análise da presença do polimorfismo na posição -35 do IL-1 β não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quanto a diferenças genotípicas e alélicas (Tabela 16).

Tabela 16. Distribuição genotípica do polimorfismo do gene -35 do IL-1 β entre os pacientes da Itália de acordo com a Gravidade:

	Grave	Não Grave	Valor de p	OR	IC (95%)
	n= 90	n= 68			
TT	15 ^(16,7%)	14 ^(20,6%)	ref	1	-
CT	64 ^(71,1%)	47 ^(69,1%)	0,78	1,10	0,52-2,31
CC	11 ^(12,2%)	7 ^(10,3%)	0,70	1,21	0,40-3,71
f(C)=	0,47	0,44	0,6	1,12	0,70-1,80

n= Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de *p*; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f()= Freqüência alélica; CC= genótipo homocigoto selvagem; CT= genótipo heterocigoto; TT= genótipo homocigoto mutante.

6.7.6. Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos -1082G/A, -819C/T e -592C/A na região promotora do gene que codifica para a IL-10 na população da Itália:

A identificação de mutações na região promotora do gene de IL-10 nas posições -1082, -819 e -592 foram realizadas respectivamente em 157 (104 homens), 156 (103 homens) e 158 (104 homens) pacientes com TB. A distribuição genotípica para os três SNPs estudados é mostrada respectivamente nos gráficos 9A, 9B e 9C.

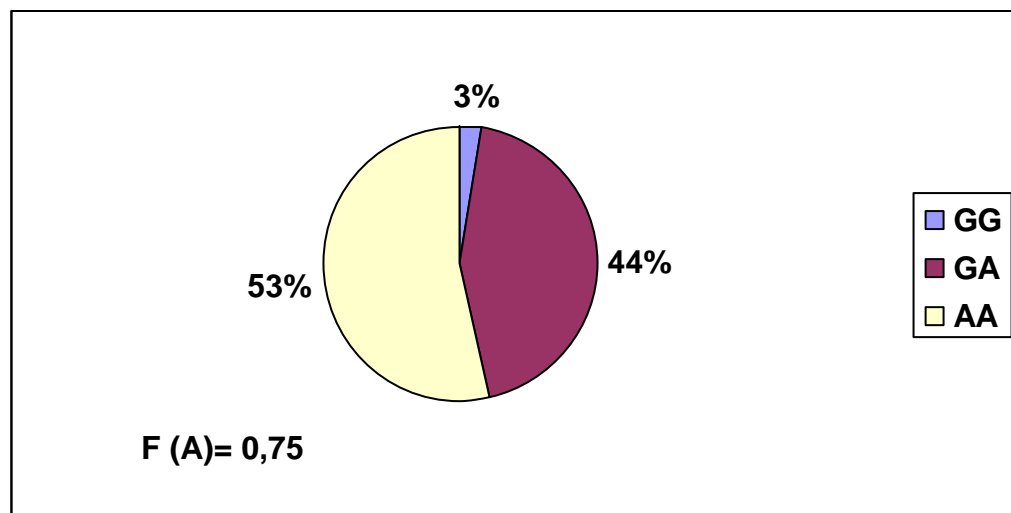


Gráfico 9A. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -1082 do gene de IL-10 entre pacientes com TB na Itália.

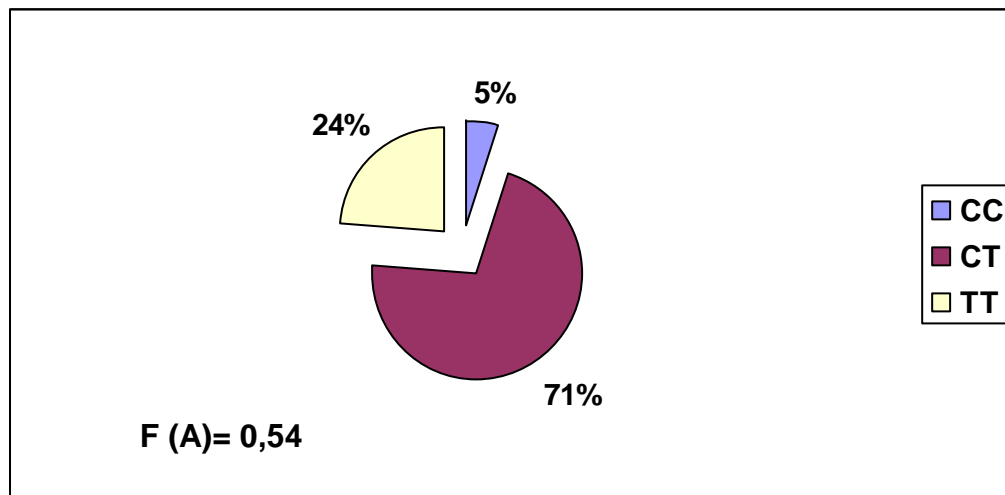


Gráfico 9B. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -819 do gene de IL-10 entre pacientes com TB na Itália.

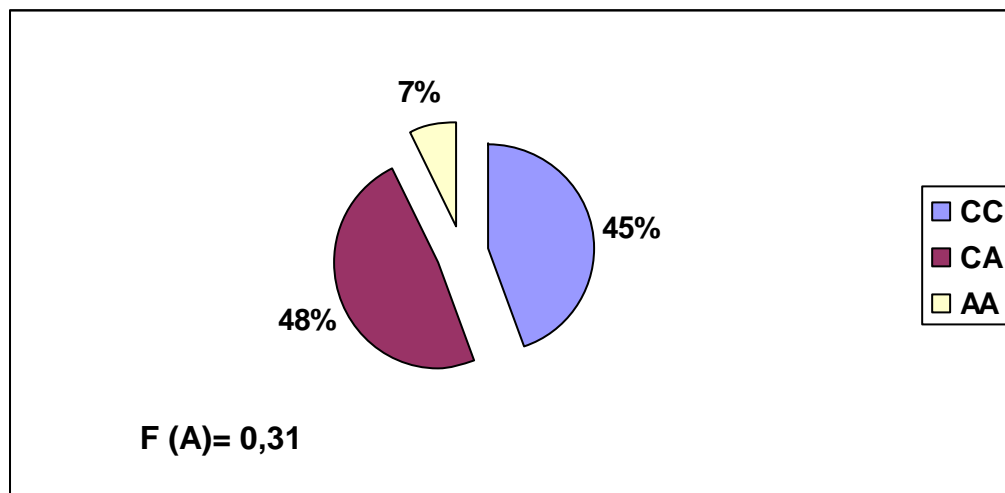


Gráfico 9C. Representação gráfica da distribuição genotípica para mutação na posição -592 do gene de IL-10 entre pacientes com TB na Itália.

6.7.7. Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 no gene do IL-10 entre os pacientes da Itália de acordo com o sexo:

Na análise individual das mutações nas posições -1082, -819 e -592 observou-se que não houve diferenças significativas na distribuição genotípica, ou mesmo alélica, para nenhuma das mutações estudadas no gene do IL-10 entre homens e mulheres (Tabela 17).

Tabela 17. Distribuição genotípica dos polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 do IL-10 entre os pacientes da Itália de acordo com o sexo:

	Masculino	Feminino	Valor de p	OR	IC (95%)
	n=104	n= 53			
-1082					
GG	4 ^(4%)	1	ref	1	-
GA	43 ^(41%)	26 ^(49%)	0,35	0,73	0,36-1,50
AA	57 ^(55%)	27 ^(51%)	0,49	1,26	0,61-2,61
f(A)=	0,75	0,75	0,99	1,00	0,56-1,79
	n=103	n= 54			
-819					
CC	8 ^(7,8%)	1 ^(2%)	ref	1	-
CT	79 ^(76,7%)	46 ^(85%)	0,21	0,57	0,22-1,48
TT	16 ^(15,5%)	7 ^(13%)	0,66	1,23	0,44-3,59
f(T)=	0,53	0,55	0,77	0,93	0,57-1,53
	n=104	n= 54			
-592					
CC	46 ^(44%)	24 ^(44,4%)	ref	1	-
CA	52 ^(50%)	24 ^(44,4%)	0,43	1,30	0,64-2,66
AA	6 ^(6%)	6 ^(11,2%)	0,18	0,49	0,13-1,83
f(A)=	0,30	0,33	0,64	0,89	0,53-1,51

n= Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de *p*; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f()= Freqüência alélica; GG/CC/CC= genótipo homocigoto selvagem; GA/CA/CT= genótipo heterocigoto; AA/TT/AA= genótipo homocigoto mutante.

6.7.8. Distribuição genotípica do polimorfismo nas posições -1082, -819 e -592 do IL-10 entre os pacientes da Itália de acordo com a Gravidade:

Na análise da distribuição genotípica do polimorfismo nas posições -1082 e -819 do IL-10 com relação a gravidade, não foram identificadas diferenças significativas tanto nas análises genotípicas quanto nas análises alélicas. Em relação à análise comparativa da distribuição genotípica do polimorfismo na posição -592, observou-se uma tendência na maior frequência do alelo A entre pacientes com TB Grave ($p=0,02$). (Tabela 18).

Tabela 18. Distribuição genotípica do polimorfismo nas posições -1082, -819 e -592 do IL-10 entre os pacientes da Itália de acordo com a Gravidade:

	Grave	Não Grave	Valor de <i>p</i>	OR	IC (95%)
-1082	n=90	n= 67			
GG	3 ^(3,3%)	1 ^(1,5%)	ref	1	-
GA	37 ^(41,1%)	32 ^(47,8%)	0,40	0,76	0,38-1,52
AA	50 ^(55,6%)	34 ^(50,7%)	0,55	1,21	0,61-2,40
f(A)=	0,76	0,74	0,64	1,13	0,65-1,96
-819	n=90	n=67			
CC	5 ^(5,6%)	4 ^(6,0%)	ref	1	-
CT	73 ^(81,1%)	52 ^(77,6%)	0,59	1,24	0,53-2,89
TT	12 ^(13,3%)	11 ^(16,4%)	0,58	0,78	0,30-2,07
f(T)=	0,53	0,55	0,27	1,30	0,79-2,14
-592	n=90	n=68			
CC	34 ^(37,8%)	36 ^(54%)	ref	1	-
CA	46 ^(51,1%)	30 ^(45%)	0,38	1,32	0,67-2,62
AA	10 ^(11,1%)	2 ^(3%)	0,05	4,13	0,81-28,31
f(A)=	0,36	0,25	0,02*	1,74	1,03-2,93

n= Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de *p*; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f()= Frequência alélica; GG/CC/CC= genótipo homocigoto selvagem; GA/CA/CT= genótipo heterocigoto; AA/TT/AA= genótipo homocigoto mutante.

6.8. Análise comparativa da distribuição dos polimorfismos que codifica para TNF- α na posição -238 entre os pacientes da Itália e do Brasil:

Ao avaliar a possível associação entre o polimorfismo na posição -238 e a susceptibilidade a TB entre nas populações estudadas procedeu-se à comparação entre as freqüências genóticas e alélicas da mutação entre os entre os pacientes do IDITUB e a pacientes do Brasil. Observamos um aumento significativo do genótipo heterozigoto assim como na freqüência alélica entre os indivíduos do Brasil ($p < 0,001$; OR=0,31; IC=0,17-0,54) e ($p < 0,001$; OR=0,30; IC=0,18-0,51) respectivamente. (Tabela 19).

Tabela 19. Análise comparativa da distribuição dos polimorfismos que codifica para TNF- α na posição -238 entre os pacientes da Itália e do Brasil:

TNF -238	IDITUB n=158	Brasil n=188	Valor de p	OR	IC (95%)
GG	136 ^(86,1%)	118 ^(62,8%)	ref	1	-
GA	22 ^(13,9%)	65 ^(16%)	$p < 0,0001^*$	0,31	0,17-0,54
AA	1	5 ^(1,1%)	0,15	0,23	0,01-2,06
f (A)=	0,06	0,19	$p < 0,001^*$	0,30	0,18-0,51

n= Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de p ; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f(=) Freqüência alélica; GG= genótipo homozigoto selvagem; GA= genótipo heterozigoto; AA= genótipo homozigoto mutante.

6.9. Análise comparativa da distribuição dos polimorfismos que codifica para IL-1 β na posição -35 entre os pacientes da Itália e do Brasil:

Na análise comparativa entre os pacientes oriundos da Itália e pacientes brasileiros, não se observou nenhuma diferença, genotípica ou alélica, entre as freqüências genotípicas e alélicas da mutação na posição -35 (Tabela 20).

Tabela 20. Análise comparativa da distribuição dos polimorfismos que codifica para IL-1 β na posição -35 entre os pacientes da Itália e do Brasil:

Genótipos					
IL-1β	IDITUB	Brasil	Valor de p	OR	IC (95%)
-35	n=158	n= 182			
TT	29 ^(18,4%)	40 ^(22%)	ref	1	-
CT	111 ^(70,2%)	122 ^(67%)	0,52	0,16	0,71-1,89
CC	18 ^(11,4%)	20 ^(11%)	0,85	1,07	0,52-2,20
f (C)=	0,46	0,44	0,59	1,08	0,79-1,49

n= Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de p ; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f()= Freqüência alélica; CC= genótipo homocigoto selvagem; CT= genótipo heterocigoto; TT= genótipo homocigoto mutante.

6.10. Análise comparativa da distribuição dos polimorfismos que codifica para IL-10 nas posições -1082, -819 e -592 entre os pacientes da Itália e do Brasil:

Ao estudarmos a possível associação entre o polimorfismo na posição -1082, -819 e -592 e a susceptibilidade, gravidade ou proteção a TB foi realizada a comparação entre as freqüências genotípicas e alélicas da mutação entre os entre os pacientes do IDITUB e a pacientes brasileiros.

A análise da distribuição do polimorfismo na posição -1082 revelou um aumento significativo na freqüência alélica no grupo de pacientes italianos ($p=0,03$). Para análise da mutação na posição -819, observamos um aumento significativo do genótipo heterozigoto entre os pacientes do IDITUB ($p<0,001$; OR=3,29; IC=1,98-5,50 e um aumento do homozigoto mutante na população do Brasil ($p=0,006$; OR=2,11; IC=1,18-3,79).

Para mutação na posição -592 um aumento significativo do genótipo heterozigoto assim como da freqüência alélica entre os pacientes do IDITUB ($p=0,0004$; OR=2,21; IC=1,38-3,54) e ($p<0,003$; OR=1,66; IC=1,16-2,37) respectivamente. (Tabela 21).

Tabela 21. Análise comparativa da distribuição dos polimorfismos que codifica para IL-10 nas posições -1082, -819 e -592 entre pacientes da Itália e do Brasil:

IL-10	IDITUB	Brasil			
-1082	n=157	n= 186	Valor de p	OR	IC (95%)
GG	4 ^(2,5%)	18 ^(9,7%)	ref	1	-
GA	69 ^(44%)	83 ^(44,6%)	0,9	1,03	0,65-1,61
AA	84 ^(53,5%)	85 ^(45,7%)	0,15	1,37	0,87-2,14
f (A)=	0,75	0,68	0,03*	1,45	1,01-2,06
-819	(157)	(188)			
CC	9 ^(5,8%)	36 ^(19%)	ref	1	-
CT	125 ^(79,6%)	102 ^(54%)	p<0,001*	3,29	1,98-5,50
TT	23 ^(14,6%)	50 ^(27%)	0,006*	0,47	0,26-0,85
f (T)=	0,54	0,54	0,84	1,03	0,75-1,41
-592	(158)	(183)			
CC	70 ^(44%)	116 ^(63,4%)	ref	1	-
CA	76 ^(48%)	54 ^(29,5%)	0,0004*	2,21	1,38-3,54
AA	12 ^(8%)	13 ^(7,1%)	0,86	1,07	0,44-2,60
f (A)=	0,32	0,21	0,003*	1,66	1,16-2,37

n= Total do genótipo estudado; *valor de p*= valor de *p*; OR= *odds ratio*; IC= Intervalo de confiança; f()= Freqüência alélica; GG/CC/CC= genótipo homocigoto selvagem; GA/CA/CT= genótipo heterocigoto; AA/TT/AA= genótipo homocigoto mutante.

CAPÍTULO V

7. DISCUSSÃO

A TB é a principal causa de morte por doença infecciosa em todo mundo sendo considerado um dos principais problemas de saúde pública (TEIXEIRA e cols, 2007). A maioria dos indivíduos infectados por *M. tb* é resistente à infecção, como mostra a história natural da doença, pois são capazes de desenvolver uma resposta imune eficiente contra o bacilo (ZAHRT, 2003; FLYNN & CHAN, 2001). Contudo, em alguns indivíduos imunocompetentes expostos ao bacilo da TB (5 a 10%), a infecção torna-se progressiva e o indivíduo manifesta a doença clinicamente (NORTH & JUNG, 2004; FLYNN & CHAN, 2001).

No presente estudo investigamos a possível associação entre a presença de polimorfismos de base única (SNPs) na região promotora dos genes que codificam para TNF- α na posição -238, IL-10 nas posições -1082, -819 e -592 e IL-1 β na posição -35 em pacientes não-brancos internados com TB no Brasil e na Itália. Avaliamos também, a associação de tais polimorfismos, de forma isolada ou combinada, em relação à gravidade da forma clínica, sexo, e co-infecção por HIV.

Ressaltamos que uma grande parcela dos estudos disponíveis na literatura observa associação entre o componente genético e sua influência na infecção por TB em populações etnicamente fechadas (ORAL e cols, 2006; HENAO e cols, 2006; VEJBAESYA e cols, 2007). Este trabalho teve por objetivo elucidar os mecanismos que compõem a resposta imune do hospedeiro, do ponto de vista genético, em duas populações distintas: na

população brasileira, que apresenta características étnico-raciais complexas, e na população originária de uma província da Itália composta de indivíduos com diferentes nacionalidades, contudo, oriundos de populações etnicamente fechadas.

7.1. Impacto da Imunogenética na Susceptibilidade e Proteção a Tuberculose na população estudada do Brasil e da Itália:

As citocinas são mediadores biológicos importantes que regulam a resposta imune e inflamatória, são produzidas localmente e que atuam em um sistema complexo para modular processos fisiológicos (BARNES e cols, 1993). Diversas citocinas são produzidas durante a infecção por TB (FLYNN & CHAN, 2001). Elas exercem importantes papéis no controle ou agravamento da TB e uma melhor compreensão da atuação das mesmas, durante o progresso da doença, pode ser útil na explicação sobre a patogênese da doença.

A análise de polimorfismo na posição -238 na região promotora do gene TNF- α mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas e alélicas quanto ao sexo e infecção por HIV no grupo de pacientes no Brasil e na Itália. Os resultados do nosso trabalho sugerem que os pacientes do Brasil que carregam o genótipo -238AA são mais susceptíveis as formas mais graves de TB, ou seja, as formas extrapulmonares e disseminadas. Estes resultados corroboram os dados descritos na literatura (KALUZA e cols, 2000; FONSECA e cols, 2007; FERGUSON e cols, 2008, Oliveira 2004). A presença do alelo A associado à regulação negativa do gene e a diminuição da produção da citocina foi evidenciada em trabalhos como o de

Kaluza e cols. (2008). Mohan e cols. (2001) em um estudo com modelo murino ao examinarem os efeitos do TNF- α na resposta imunológica durante as fases crônicas e de reativação da infecção, mostraram que a neutralização do TNF- α conduziu a reativação fatal da infecção e grave deteriorização histopatológica. Embora nenhuma análise funcional tenha sido realizada no presente estudo, nossos resultados foram similares aqueles relatados por Oliveira e cols. (2004) em nosso meio. Estes autores também observaram que o alelo -238A esteve associado com susceptibilidade à ocorrência da TB e gravidade das formas clínicas. Na Colômbia, HENAO e cols (2006), ao analisarem pacientes com diferentes formas clínicas da TB: forma pulmonar, pleural e miliar, não observaram associação entre a presença de SNP no TNF- α e a gravidade da TB.

Em nossa casuística não observamos associação entre a presença de polimorfismo na região -238 do gene do TNF- α e a gravidade da TB nos pacientes tratados na Itália. Ao compararmos a frequência da mutação na posição -238 entre os pacientes do IDITUB, Itália, e do Brasil observamos um aumento significativo da frequência do genótipo homozigoto selvagem nos pacientes do IDITUB, e, inversamente, um aumento da frequência do heterozigoto nos pacientes do Brasil. A frequência alélica, associada a maior susceptibilidade a gravidade, também foi significativamente maior nos pacientes do Brasil em relação aos pacientes do IDITUB. Tais resultados foram inesperados, visto que o percentual de formas graves de TB foi maior nos pacientes oriundos da Itália que no Brasil. Tal observação sugere que outros fatores genéticos, microbiológicos ou ambientais podem estar influenciando a gravidade desses pacientes na Itália.

Em nosso estudo ao avaliarmos possível associação entre polimorfismos na região promotora do gene do IL-1 β na posição -35 e sua associação à infecção e gravidade da doença ou proteção não observamos diferenças significantes em relação ao sexo ou infecção por HIV no grupo de pacientes oriundos do Brasil e Itália. Entretanto, em relação à gravidade observamos que no grupo de pacientes do Brasil, a frequência do genótipo -35CT foi significativamente maior no grupo dos pacientes que apresentam a forma Não-Grave (Pulmonar) quando comparados ao grupo de pacientes que apresentam as formas Graves (Extrapulmonar e Disseminada). Nossos resultados sugerem que a presença do alelo T possa estar associada à proteção uma vez que a frequência do genótipo encontra-se maior no grupo Não-Grave, embora não seja significativa para o genótipo homocigoto TT. Tais observações foram sugeridas por Kimura e cols. (2004) que observaram uma forte associação entre a presença do genótipo TT na posição -35 e do genótipo CC na posição -511 e o aumento da expressão do IL-1 β mRNA seguida da secreção aumentada da proteína e maior proteção. Tais resultados também corroboram os achados por Wen e cols. (2006) que, ao compararem a presença de polimorfismos no gene do IL-1 β na população chinesa observaram que o genótipo TT na posição -35 e do genótipo CC na posição -511 do IL-1 influenciaram a expressão e a atividade transcriptional do gene IL-1 e que *up regulation* do IL-1 foi fortemente associada à secreção da proteína do IL-1 e maior proteção.

Embora em nosso estudo não tenha sido realizada análise acerca do papel funcional deste alelo na regulação do gene IL-1, os resultados sugerem que a presença do polimorfismo na região promotora do gene induza ao

aumento da expressão gênica e, posteriormente, ao aumento dos níveis de citocina o que confere a esses indivíduos um maior grau de proteção.

Por outro lado, entre os grupos de pacientes do IDITUB não observamos diferença significativa em relação à frequência genotípica e alélica e a ocorrência de TB grave. Ressaltamos que a maioria dos trabalhos que identificaram polimorfismos no gene IL-1, incluíram dados sobre a presença de polimorfismos tanto na região promotora quanto na região do éxon, além de descreverem sua função individual em seqüências haplotípicas predominantes nas populações. Consideramos, portanto, como uma limitação deste trabalho, o fato de não termos realizado um estudo de associação entre polimorfismo na região estudada e em outras já mencionadas na literatura, impossibilitando o conhecimento de sua influência na questão do haplótipo.

No presente trabalho, o objetivo era investigar a possível associação entre três polimorfismos bialélicos na região promotora do gene do IL-10 em relação ao local inicial de transcrição nas posições -1082,-819 e -592, substituições G/A, C/T, e C/A, respectivamente, com susceptibilidade, gravidade ou proteção a TB. Não observamos diferenças nas frequências alélicas e genotípicas para nenhuma das mutações estudadas no grupo de pacientes oriundos do Brasil e da Itália quando analisadas e relação ao sexo, e co-infecção pelo HIV. Entretanto, observamos que houve maior frequência do alelo -592A no grupo TB grave nos pacientes oriundos da Itália. Contrariamente aos nossos resultados, Shin e cols. (2005) mostraram que a presença do polimorfismo nesta posição pode estar significativamente associada ao risco diminuído de manifestação da TB. Uma possível explicação para a ausência do genótipo -592AA no grupo grave dos pacientes do Brasil se dá através do viés

de seleção visto que possa ter ocorrido devido durante o processo aleatório de seleção da amostra sendo este um fator de confundimento. Ates e cols. (2008) sugeriram uma significativa associação entre a TB doença e a presença do alelo-1082A em um estudo na população da Turquia, no entanto, nenhuma associação entre a doença e a presença de polimorfismo nas regiões -819 e -592 foi observada.

A comparação das freqüências das mutações nas posições -1082, -819 e -592 entre os pacientes do IDITUB e os pacientes do Brasil revelou um aumento significativo do alelo -1082AA e no -592AA nos pacientes do IDITUB, Itália. Observamos também um aumento significativo do homozigoto mutante na posição -819TT nos pacientes do Brasil

Os resultados apresentados neste estudo mostram que a susceptibilidade, gravidade ou proteção a TB está ligada por meio de uma complexa rede de produção/ inibição de citocinas produzidas durante a infecção. A citocina TNF- α , juntamente com a citocina IL-1, na fase inicial da infecção é crucial a progressão da doença assim como a citocina IL-10 é importante para manter o equilíbrio da resposta imune ao bacilo. Uma possível explicação para as estas diferenças em nossos resultados pode estar associada às variações genéticas relacionadas às diferenças étnicas que influenciam na composição da resposta imune a micobactéria, e, portanto, diferentes graus de susceptibilidade seriam observados de acordo com a população estudada.

7.2. Fatores Não-genéticos associados à Susceptibilidade e Proteção a Tuberculose na população do Brasil e na população da Itália estudada:

Entre os indivíduos expostos ao contato com a micobactéria o risco de infectar-se é determinado, fundamentalmente, pela combinação de três fatores: a virulência da cepa, o grau de exposição e o grau de susceptibilidade a infecção (LIENHARDT, 2001). Poucos estudos têm sido realizados com a finalidade de investigar os fatores de risco para TB nos países com alta incidência de TB. Este trabalho teve como objetivo elucidar os possíveis fatores que possam estar associados a atuando, em combinação ou não com os fatores genéticos, como determinantes na susceptibilidade ou proteção a TB.

Lienhardt e al. (2003) mostraram uma maior associação entre o risco de infecção da TB entre contatos de origem familiar e a intensidade da exposição desse contato ao caso-índice. O risco elevado de TB ativa entre contatos sintomáticos também foi constatado por Becerra e cols. (2005) na população de Lima, Peru. Tais relatos devem ser considerados, pois à medida que o indivíduo mantém uma proximidade social ao caso-índice compartilhando um mesmo espaço aéreo o risco de infecção é maior. É comum para os indivíduos imigrantes se estabelecerem em comunidades formadas por indivíduos da mesma nacionalidade pela finalidade da cultura e facilidade da língua do país de origem. Nossa hipótese é que nesses grupos a relação de proximidade favoreça a transmissão da micobactéria.

Lienhardt e cols. (2003) também observaram que houve a predominância da sensibilidade a prova tuberculínica entre indivíduos do sexo

masculino adultos possivelmente por causa do papel social e atividades econômicas ou por refletir uma diferença genuína na susceptibilidade à infecção da TB. Em ambos os grupos estudados neste trabalho foi observado que o sexo predominante é o masculino similar ao descrito na literatura. Observamos que pacientes da Itália apresentaram mediana de idade significativamente menor do que pacientes do Brasil. Tais dados corroboram com os de outros autores que observaram que a migração de indivíduos de países que apresentam altas taxas de prevalência de TB envolve indivíduos mais jovens (HELDAL e cols, 2003; WOLLESWINKEL-VAN e cols, 2002).

Segundo Heldal e cols. (2003), nas últimas décadas, houve um aumento da imigração oriunda de países com uma predominância elevada da TB. Na Noruega, segundo relato de Farah e cols. (2003) a proporção de casos da TB aumentou de 4% em meados dos anos 70 para 66% no final da década de 90, do século passado, visto que a proporção de descendentes de imigrantes na população total era 6% em 1999. Nesse estudo os autores (Farah e cols, 2003) avaliaram aproximadamente 1.500 imigrantes cuja grande parcela era oriunda da África e Ásia (619 e 642, respectivamente) e mostraram que o risco de TB era elevado nos primeiros anos pós-migração para todos os grupos imigrantes. Em concordância com os dados descritos na literatura, nossos resultados mostram que a grande parcela dos pacientes com TB oriundos da Itália são de nacionalidade africana. Laifer e cols. (2007) em um estudo de coorte na Suíça com recentes imigrantes e descendentes de imigrantes observaram que a taxa de TB foi maior em recentes imigrantes, e, embora os mesmos durante o programa de *screening* do estudo apresentem-se, freqüentemente, assintomáticos nos testes laboratoriais em relação aos

sintomas clínicos da doença. Assim como Laifer e cols. (2007), outros autores também relataram que a taxa de TB em países de baixa incidência da doença mostra-se alta principalmente entre imigrantes (FARAH e cols, 2005; WOLLESWINKEL-VAN e cols, 2002; LILLEBAEK e cols, 2001). A maioria dos imigrantes apresenta elevada proporção de prova tuberculínica positiva ao ingressarem no novo país (SCOLARI e cols, 1999; EL-HAMAD e cols, 2001). Portanto, espera-se que a TB ativa que ocorre nos imigrantes seja também resultante de reativação endógena devido ao enfrentamento do novo ambiente. Codecasas e cols (1999) ao descrever os padrões epidemiológicos e clínicos de TB entre imigrantes de países em desenvolvimento na Província de Milão observaram que os imigrantes representaram 22,8% (596) de todos os casos de TB. Destes, 251 indivíduos (42,1%) eram oriundos da África (104 indivíduos de países árabes). Neste estudo, a tipagem molecular das cepas de *M.tuberculosis* por meio Polimorfismo de Fragmento de Restrição (RFLP) observou-se que o percentual de cepas *clusters* (sugestivo de infecção recente) isolados nesse grupo foi significativamente menor entre imigrantes do que italianos, sugerindo maior proporção de reativação endógena entre imigrantes. Os fatores de risco associados a doenças causadas por *cluster* de *M.tb.* como indicador de transmissão recente da doença foi estudada por Matteelli e cols. (2003) em uma pequena área urbana de Brescia, Itália. Das 195 cepas analisadas pela técnica de RFLP 137 (70%), representaram indivíduos italianos, 32 (17%) representaram indivíduos senegaleses e 26 (13%) outras nacionalidades observando-se maior freqüência significativa de *cluster* entre imigrantes do Senegal. Por outro lado, Scolari e cols. (1999) relataram a incidência da TB em uma comunidade fechada de imigrantes

senegaleses (328 indivíduos) no Nordeste de Itália que residiam na Itália há mais de três anos. Dez casos de TB ativa, foram detectados entre esses indivíduos. No grupo estudado a incidência de TB foi semelhante entre indivíduos com prova tuberculínica positiva (12.3/1000) em relação aos indivíduos com uma prova tuberculínica negativa (12.5/1000). Esses resultados sugerem que a TB ativa pode decorrer de reativação endógena ou infecção exógena recente. Apesar de não dispormos de tipagem molecular das cepas de *M.tb.* isoladas de pacientes incluídos em nosso estudo, é esperado que a proporção de casos de reativação endógena tenha sido maior entre pacientes imigrantes da Itália do que os pacientes oriundos do Brasil.

CAPÍTULO VI

8. CONCLUSÕES

Dos 346 pacientes portadores de TB, não-brancos, internados em hospitais do Rio de Janeiro/Brasil e Brescia, noroeste da Itália observamos que:

a) Na identificação de SNPs presentes na posição -238 do gene que codifica para o TNF- α houve uma frequência genotípica de 74% para o genótipo homozigoto selvagem, 25% para o heterozigoto e 1% para o genótipo homozigoto mutante com uma frequência alélica de 0,14 para o gene mutante;

b) Na identificação de SNPs presentes na posição -35 do gene que codifica para o IL-1 β houve uma frequência genotípica de 20% para o genótipo homozigoto selvagem, 69% para o heterozigoto e 11% para o genótipo homozigoto mutante com uma frequência alélica de 0,45 para o gene mutante;

c) Na identificação de SNPs presentes na posição -1082 do gene que codifica para o IL-10 houve uma frequência genotípica de 6% para o genótipo homozigoto selvagem, 44% para o heterozigoto e 50% para o genótipo homozigoto mutante com uma frequência alélica de 0,71 para o gene mutante;

d) Na identificação de SNPs presentes na posição -819 do gene que codifica para o IL-10 houve uma frequência genotípica de 13% para o genótipo homozigoto selvagem, 66% para o heterozigoto e 21% para o genótipo homozigoto mutante com uma frequência alélica de 0,54 para o gene mutante;

e) Na identificação de SNPs presentes na posição -592 do gene que codifica para o IL-10 houve uma frequência genotípica de 55% para o genótipo

homozigoto selvagem, 38% para o heterozigoto e 7% para o genótipo homozigoto mutante com uma freqüência alélica de 0,26 para o gene mutante;

f) Os pacientes do Brasil que carregam o genótipo -238AA foram mais susceptíveis as formas mais graves de TB. Não houve associação entre a presença de polimorfismo na região -238 do gene do TNF- α e a Gravidade da TB nos pacientes tratados na Itália;

g) Não houve diferenças estatisticamente significantes na comparação entre a freqüência genotípica e alélica do polimorfismo na região promotora do gene IL-1 β nos dois grupos de pacientes estudados;

h) A presença do alelo -35T esteve associada à proteção entre os pacientes com TB no Brasil uma vez que a freqüência do genótipo encontra-se maior no grupo Não-Grave;

i) A distribuição do polimorfismo na posição -1082 do gene IL-10 revelou um aumento significativo da freqüência alélica no grupo de pacientes do IDITUB;

j) A análise da mutação na posição -819 mostrou um aumento significativo do genótipo homozigoto selvagem e mutante na população de pacientes do Brasil e, paralelamente, aumento significativo do genótipo heterozigoto no grupo de pacientes da Itália. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na freqüência alélicas;

l) A análise da mutação na posição na posição -592 mostrou um aumento significativo do genótipo heterozigoto e do alelo mutante no grupo de pacientes da Itália.

m) A presença do polimorfismo na posição -592 mostrou uma maior frequência do alelo -592A entre pacientes da Itália com TB Grave;

n) Em relação às frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos nas posições -1082 e -819, não se observou associação com a ocorrência de TB grave em ambos os grupos estudados.

Ao final deste trabalho podemos concluir que as variações genéticas encontradas nas populações estudadas (pacientes internados portadores de TB de cor de não-branca internados em um hospital em Brescia, Itália, e em três hospitais no Rio de Janeiro, Brasil, apresentaram uma associação diferenciada em relação à TB (susceptibilidade ou proteção), quando avaliadas independentemente. Mesmo na ausência de testes moleculares e imunológicos para a avaliação funcional das variantes alélicas, foi possível mostrar a associação das variantes na regulação da expressão gênica das citocinas estudadas e a gravidade da TB.

9. LIMITAÇÕES

- a) Houve seleção de pacientes cujas amostras clínicas estavam disponíveis, pode ter ocorrido viés de seleção;
- b) Não foram coletadas outras informações sobre variáveis potencialmente associados à Gravidade tais como grau de exposição ao bacilo no ambiente, tabagismo e outras co-morbidades;
- c) Não foi realizado um estudo funcional que avaliasse a presença do polimorfismo, expressão do RNAm e produção da proteína para as citocinas estudadas;
- d) Número limitado de citocinas avaliadas uma vez que a resposta imunológica funciona em rede integrada onde diversas outras citocinas participam;
- e) Não foi realizada a tipagem molecular ou estudos de virulência das cepas dos pacientes estudados.

10. PERSPECTIVAS

Torna-se necessário a realização de estudos clínicos, genéticos e funcionais longitudinais que incluam informações sócio-demográficas padronizadas e outros genes alvos associados à modulação da resposta imunológica, tais como TLR, TGF- β e IFN- γ com o intuito de melhorar a compreensão sobre a evolução da resposta imune e inflamatória em diferentes populações de pacientes com TB.

CAPÍTULO VII

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL,B.;THIEBLEMONT,N.;QUESNIAUX,V.J.;BROWN,N.;MPAGI,J.;MIYAKE,K.;BIHL,F.;RYFFEL,B. **Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice.** J Immunol, v. 169, n. 6, p. 3155-3162, Sep/2002.

AISU,T.;RAVIGLIONE,M.C.;VAN,P.E.;ERIKI,P.;NARAIN,J.P.;BARUGAHARE,L.;TEMBO,G.;MCFARLAND,D.;ENGWAU,F.A. **Preventive chemotherapy for HIV-associated tuberculosis in Uganda: an operational assessment at a voluntary counselling and testing centre.** AIDS, v. 9, n. 3, p. 267-273, Mar/1995.

ATES,O.;MUSELLIM,B.;ONGEN,G.;TOPAL-SARIKAYA,A. **Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in tuberculosis.** J Clin Immunol, v. 28, n. 3, p. 232-236, May/2008.

BALKWILL,F. **Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?** Cytokine Growth Factor Rev, v. 13, n. 2, p. 135-141, Apr/2002.

BARNES,P.F.;LU,S.;ABRAMS,J.S.;WANG,E.;YAMAMURA,M.;MODLIN,R.L. **Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis.** Infect Immun, v. 61, n. 8, p. 3482-3489, Aug/1993.

BAUSSANO,I.;BUGIANI,M.;GREGORI,D.;PASQUALINI,C.;DEMICHELI,V.;MERLETTI,F. **Impact of immigration and HIV infection on tuberculosis incidence in an area of low tuberculosis prevalence.** Epidemiol Infect, v. 134, n. 6, p. 1353-1359, Dec/2006.

BECERRA, M. C.;PACHAO-TORREBLANCA, I. F.;BAYONA, J.; CELI, R.; SHIN,S. S.; KIM, J. Y.; FARMER,P.E;MURRAY,M. **Expanding tuberculosis case detection by screening household contacts.** Public Health Rep, v. 120, n. 3, p. 271-277, May/2005.

BELLAMY,R. **Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics.** Genes Immun. V. 4, n. 1, p.4-11, 2003.

BELLAMY,R.;RUWENDE,C.;CORRAH,T.;MCADAM,K.P.;WHITTLE,H.C.;HILL,A.V. **Assessment of the interleukin 1 gene cluster and other candidate gene polymorphisms in host susceptibility to tuberculosis.** Tuber Lung Dis, v. 79, n. 2, p. 83-89, 1998.

BERRINGTON,W.R. e HAWN,T.R. **Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter?** Immunol Rev, v. 219, p. 167-186, Oct/2007.

BIDWELL,J.;KEEN,L.;GALLAGHER,G.;KIMBERLY,R.;HUIZINGA,T.;MCDERMOTT,M.F.;OKSENBERG,J.;MCNICHOLL,J.;POCIOT,F.;HARDT,C.;D'ALFONSO,S. **Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases.** Genes Immun, v. 1, n. 1, p. 3-19, Sep/1999.

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

Boletim Eletrônico da Secretária Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, 2007. **BOLETIM INFORMATIVO DO PROGRAMA DE CONTROLE DE TUBERCULOSE DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO, 2007.** Disponível em: <www.saude.rio.rj.gov.br/media/BoletimEpidemiologicoTBMJRJ2001_2006.pdf>. Acessado em: ago., 2008.

BUSKIN,S.E.;GALE,J.L.;WEISS,N.S.;NOLAN,C.M. **Tuberculosis risk factors in adults in King County, Washington, 1988 through 1990.** Am J Public Health, v. 84, n. 11, p. 1750-1756, Nov/1994.

CAIN,K.P.;BENOIT,S.R.;WINSTON,C.A.;MAC KENZIE,W.R. **Tuberculosis among foreign-born persons in the United States.** JAMA, v. 300, n. 4, p. 405-412, Jul/2008.

CARVALHO, A. C.; SALERI, N.; EL HAMAD, I.; TEDOLDI, S.; CAPONE, S.; PEZZOLI, M. C.; ZACCARIA, M.; PIZZOCOLO, A.; SCARCELLA, C.; MATTEELLI, A. **Completion of screening for latent tuberculosis infection among immigrants.** Epidemiol Infect, v. 133, n. 1, p. 179-185, Feb/2005.

CHEN, H.; WILKINS, L. M.; AZIZ, N.; CANNINGS, C.; WYLLIE, D. H.; BINGLE, C.; ROGUS, J.; BECK, J. D.; OFFENBACHER, S.; CORK, M. J.; RAFIE-KOLPIN, M.; HSIEH, C. M.; KORNMAN, K. S.; DUFF, G. W. **Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context.** Hum Mol Genet, v. 15, n. 4, p. 519-529, Feb/2006.

CODECASA,L.R.;PORRETTA,A.D.;GORI,A.;FRANZETTI,F.;DEGLI,E.A.;LIZIOLI,A.;CARRERI,V.;DI PROIETTO,M.C.;PEROZZIELLO,F.;BESOZZI,G. **Tuberculosis among immigrants from developing countries in the province of Milan, 1993-1996.** Int J Tuberc Lung Dis, v. 3, n. 7, p. 589-595, Jul/1999.

COOKE, G. S.; CAMPBELL, S. J.; SILLAH, J.; GUSTAFSON, P.; BAH, B.; SIRUGO, G.; BENNETT, S.; MCADAM, K. P.; SOW, O.; LIENHARDT, C.; HILL, A. V. **Polymorphism within the interferon-gamma/receptor complex is associated with pulmonary tuberculosis.** *Am J Respir Crit Care Med*, v. 174, n. 3, p. 339-343, Aug/2006.

CRAWLEY, E.; KAY, R.; SILLIBOURNE, J.; PATEL, P.; HUTCHINSON, I.; WOO, P. **Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum*, v. 42, n. 6, p. 1101-1108, Jun/1999.

DELGADO, J. C.; BAENA, A.; THIM, S.; GOLDFELD, A. E. **Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis.** *J Infect Dis*, v. 186, n. 10, p. 1463-1468, Nov/2002.

DORRONSORO, I. e TORROBA, L. **Microbiology of tuberculosis.** *An Sist Sanit Navar*, v. 30 Suppl 2, p. 67-85, 2007.

DOS, V. T.; MESTRE, O.; RAUZIER, J.; GOLEC, M.; RASTOGI, N.; RASOLOFO, V.; TONJUM, T.; SOLA, C.; MATIC, I.; GICQUEL, B. **Evolution and diversity of clonal bacteria: the paradigm of Mycobacterium tuberculosis.** *PLoS ONE*, v. 3, n. 2, p. e1538-2008.

DOSSIER STATISTICO IMMIGRAZIONE 2007. **CARITAS/MIGRANTES 2007.** Disponível em:
<http://www.db.caritas.glauco.it/caritastest/informiamoci/Riviste_e_publicazioni/Sussidi2007/Libri/dossierimmigrazione2007/materiale/immigrazione_inglese.pdf>. Acesso em: ago. 2008.

EDWARDS-SMITH, C. J.; JONSSON, J. R.; PURDIE, D. M.; BANSAL, A.; SHORTHOUSE, C.; POWELL, E. E. **Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa.** *Hepatology*, v. 30, n. 2, p. 526-530, Aug/1999.

EL HAMAD, I.; CASALINI, C.; MATTEELLI, A.; CASARI, S.; BUGIANI, M.; CAPUTO, M.; BOMBANA, E.; SCOLARI, C.; MOIOLI, R.; SCARCELLA, C.; CAROSI, G. **Screening for tuberculosis and latent tuberculosis infection among undocumented immigrants at an unspecialised health service unit.** *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 5, n. 8, p. 712-716, Aug/2001.

ERNST, J. D.; TREVEJO-NUNEZ, G.; BANAIEE, N. **Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis.** *J Clin Invest*, v. 117, n. 7, p. 1738-1745, Jul/2007.

ESKDALE, J.; GALLAGHER, G.; VERWEIJ, C.L.; KEIJERS, V.; WESTENDORP, R. G.; HUIZINGA, T.W. **Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes**. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 95, n. 16, p. 9465-9470, Aug/1998.

FARAH, M.G.; MEYER, H.E.; SELMER, R.; HELDAL, E.; BJUNE, G. **Long-term risk of tuberculosis among immigrants in Norway**. Int J Epidemiol, v. 34, n. 5, p. 1005-1011, Oct/2005.

FERGUSON, L.R.; HUEBNER, C.; PETERMANN, I.; GEARRY, R.B.; BARCLAY, M.L.; DEMMERS, P.; MCCULLOCH, A.; HAN, D.Y. **Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk**. World J Gastroenterol, v. 14, n. 29, p. 4652-4661, Aug/2008.

FERGUSON, L.R.; HUEBNER, C.; PETERMANN, I.; GEARRY, R.B.; BARCLAY, M.L.; DEMMERS, P.; MCCULLOCH, A.; HAN, D.Y. **Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk**. World J Gastroenterol, v. 14, n. 29, p. 4652-4661, Aug/2008.

FITNESS, J.; FLOYD, S.; WARNDORFF, D.K.; SICHALI, L.; MALEMA, S.; CRAMPIN, A.C.; FINE, P.E.; HILL, A.V. **Large-scale candidate gene study of tuberculosis susceptibility in the Karonga district of northern Malawi**. Am J Trop Med Hyg, v. 71, n. 3, p. 341-349, Sep/2004.

FLYNN, J.L. e CHAN, J. **Immunology of tuberculosis**. Annu Rev Immunol, v. 19, p. 93-129, 2001.

FONSECA, J. E.; CAVALEIRO, J.; TELES, J.; SOUSA, E.; ANDREOZZI, V. L.; ANTUNES, M.; AMARAL-TURKMAN, M. A.; CANHAO, H.; MOURAO, A. F.; LOPES, J.; CAETANO-LOPES, J.; WEINMANN, P.; SOBRAL, M.; NERO, P.; SAAVEDRA, M.J.; MALCATA, A.; CRUZ, M.; MELO, R.; BRANA, A.; MIRANDA, L.; PATTO, J. V.; BARCELOS, A.; DA SILVA, J. C.; SANTOS, L. M.; FIGUEIREDO, G.; RODRIGUES, M.; JESUS, H.; QUINTAL, A.; CARVALHO, T.; DA SILVA, J. A.; BRANCO, J.; QUEIROZ, M. V. **Contribution for new genetic markers of rheumatoid arthritis activity and severity: sequencing of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter**. Arthritis Res Ther, v. 9, n. 2, p. R37-2007.

GAO, P.S.; FUJISHIMA, S.; MAO, X.Q.; REMUS, N.; KANDA, M.; ENOMOTO, T.; DAK E, Y.; BOTTINI, N.; TABUCHI, M.; HASEGAWA, N.; YAMAGUCHI, K.; TIEMESSEN, C.; HOPKIN, J.M.; SHIRAKAWA, T.; KISHI, F. **Genetic variants of NRAMP1 and active tuberculosis in Japanese populations**. International Tuberculosis Genetics Team. Clin Genet, v. 58, n. 1, p. 74-76, Jul/2000.

GERALDES, S.M.L.; SANTOS, M.L.; FIGUEIREDO, V.S.H.; GAZETTA, C.E.; CRUZ O.S.A.; SCATENA, V.T.C. **Poverty: socioeconomic characterization at**

tuberculosis. Rev Latino-am Enfermagem, V.15 (número especial), P.762-7 set-out/2007.

GOLDFELD,A.E.;DELGADO,J.C.;THIM,S.;BOZON,M.V.;UGLIALORO,A.M.;TURBAY,D.;COHEN,C.;YUNIS,E.J. **Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis.** JAMA, v. 279, n. 3, p. 226-228, Jan/1998.

GOMEZ-REINO,J.J.;CARMONA,L.;ANGEL,D.M. **Risk of tuberculosis in patients treated with tumor necrosis factor antagonists due to incomplete prevention of reactivation of latent infection.** Arthritis Rheum, v. 57, n. 5, p. 756-761, Jun/2007.

GREENWOOD,C.M.;FUJIWARA,T.M.;BOOTHROYD,L.J.;MILLER,M.A.;FRAPPIER,D.;FANNING,E.A.;SCHURR,E.;MORGAN,K. **Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family.** Am J Hum Genet, v. 67, n. 2, p. 405-416, Aug/2000.

HAJEER,A.H. e HUTCHINSON,I.V. **Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease.** Hum Immunol, v. 62, n. 11, p. 1191-1199, Nov/2001.

HELDAL,E.;DAHLE,U.R.;SANDVEN,P.;CAUGANT,D.A.;BRATTAAS,N.;WAALER,H.T.;ENARSON,D.A.;TVERDAL,A.;KONGERUD,J. **Risk factors for recent transmission of Mycobacterium tuberculosis.** Eur Respir J, v. 22, n. 4, p. 637-642, Oct/2003.

HENAO,M.I.;MONTES,C.;PARIS,S.C.;GARCIA,L.F. **Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis.** Tuberculosis (Edinb), v. 86, n. 1, p. 11-19, Jan/2006.

HIJJAR, M.A.; GERHARDT, G.; TEIXEIRA, G M e PROCOPIO, M.J..

Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. Rev. Saúde Pública, vol. 41, supl. 1, pp. 50-57, 2007.

HILL,A.V. **The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility.** Annu Rev Genomics Hum Genet, v. 2, p. 373-400, 2001.

HILL,A.V. **The immunogenetics of human infectious diseases.** Annu Rev Immunol, v. 16, p. 593-617, 1998.

HOHLER,T.;KRUGER,A.;GERKEN,G.;SCHNEIDER,P.M.;MEYER ZUM BUSCHENEFELDE,K.H.;RITTNER,C. **A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection.** Clin Exp Immunol, v. 111, n. 3, p. 579-582, Mar/1998.

HSU, Y.H.; CHEN, C.W.; SUN, H.S.; JOU, R.; LEE, J.J.; SU, I.J. **Association of NRAMP 1 gene polymorphism with susceptibility to tuberculosis in Taiwanese aboriginals.** J Formos Med Assoc, v. 105, n. 5, p. 363-369, May/2006.

JANG, S.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.; SALGAME, P. **IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to Mycobacterium tuberculosis is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition.** J Immunol, v. 173, n. 5, p. 3392-3397, Sep/2004.

KALUZA, W.; REUSS, E.; GROSSMANN, S.; HUG, R.; SCHOPF, R.E.; GALLE, P.R.; MAERKER-HERMANN, E.; HOEHLER, T. **Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism.** J Invest Dermatol, v. 114, n. 6, p. 1180-1183, Jun/2000.

KARYADI, E.; SCHULTINK, W.; NELWAN, R.H.; GROSS, R.; AMIN, Z.; DOLMANS, W.M.; VAN DER MEER, J.W.; HAUTVAST, J.G.; WEST, C.E. **Poor micronutrient status of active pulmonary tuberculosis patients in Indonesia.** J Nutr, v. 130, n. 12, p. 2953-2958, Dec/2000.

KIMURA, R.; NISHIOKA, T.; SOEMANTRI, A.; ISHIDA, T. **Cis-acting effect of the IL1B C-31T polymorphism on IL-1 beta mRNA expression.** Genes Immun, v. 5, n. 7, p. 572-575, Nov/2004.

KNIGHT, J. **Polymorphisms in Tumor Necrosis Factor and Other Cytokines As Risks for Infectious Diseases and the Septic Syndrome.** Curr Infect Dis Rep, v. 3, n. 5, p. 427-439, Oct/2001.

KRITSKI, A. L.; SOUZA, G. R. M.; CONDE, M. B.; MELLO, F. C. Q.; LINHARES, C. G. P.; GONÇAVES, M. L. C. **Manual de Normas de Controle da Tuberculose Hospitalar.** Rio de Janeiro, Gráfica do Hospital Clementino Fraga Filho, 2000.

KROEGER, K.M.; CARVILLE, K.S.; ABRAHAM, L.J. **The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription.** Mol Immunol, v. 34, n. 5, p. 391-399, Apr/1997.

KUSNER, D.J. **Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis.** Clin Immunol, v. 114, n. 3, p. 239-247, Mar/2005.

LAIFER, G.; WIDMER, A.F.; SIMCOCK, M.; BASSETTI, S.; TRAMPUZ, A.; FREI, R.; TAMM, M.; BATTEGAY, M.; FLUCKIGER, U. **TB in a low-incidence country: differences between new immigrants, foreign-born residents and native residents.** Am J Med, v. 120, n. 4, p. 350-356, Apr/2007.

- LEVINSON, W & JAWETZ., E. 2005. **Micobactérias. Em: Microbiologia médica e Imunologia**, ARTMED, Porto Alegre, RS, p.154-158.
- LIENHARDT,C.;FIELDING,K.;SILLAH,J.S.;BAH,B.;GUSTAFSON,P.;WARNDORFF,D.;PALAYEW,M.;LISSE,I.;DONKOR,S.;DIALLO,S.;MANNEH,K.;ADEGBOLA,R.;AABY,P.;BAH-SOW,O.;BENNETT,S.;MCADAM,K. **Investigation of the risk factors for tuberculosis: a case-control study in three countries in West Africa**. Int J Epidemiol, v. 34, n. 4, p. 914-923, Aug/2005.
- LIENHARDT,C.;SILLAH,J.;FIELDING,K.;DONKOR,S.;MANNEH,K.;WARNDORFF,D.;BENNETT,S.;MCADAM,K. **Risk factors for tuberculosis infection in children in contact with infectious tuberculosis cases in the Gambia, West Africa**. Pediatrics, v. 111, n. 5 Pt 1, p. e608-e614, May/2003(a).
- LIENHARDT,C.;FIELDING,K.;SILLAH,J.;TUNKARA,A.;DONKOR,S.;MANNEH,K.;WARNDORFF,D.;MCADAM,K.P.;BENNETT,S. **Risk factors for tuberculosis infection in sub-Saharan Africa: a contact study in The Gambia**. Am J Respir Crit Care Med, v. 168, n. 4, p. 448-455, Aug/2003(b).
- LIENHARDT,C. **From exposure to disease: the role of environmental factors in susceptibility to and development of tuberculosis**. Epidemiol Rev, v. 23, n. 2, p. 288-301, 2001.
- LILLEBAEK,T.;ANDERSEN,A.B.;BAUER,J.;DIRKSEN,A.;GLISMANN,S.;DE HAAS,P.;KOK-JENSEN,A. **Risk of Mycobacterium tuberculosis transmission in a low-incidence country due to immigration from high-incidence areas**. J Clin Microbiol, v. 39, n. 3, p. 855-861, Mar/2001.
- LIU,J.;FUJIWARA,T.M.;BUU,N.T.;SANCHEZ,F.O.;CELLIER,M.;PARADIS,A.J.;FRAPPIER,D.;SKAMENE,E.;GROS,P.;MORGAN,K. **Identification of polymorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene**. Am J Hum Genet, v. 56, n. 4, p. 845-853, Apr/1995.
- LOPEZ-MADERUELO, D.; ARNALICH, F.; SERANTES, R.; GONZALEZ, A.; CODOCEO, R.; MADERO, R.; VAZQUEZ, J. J.; MONTIEL,C. **Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis**. Am J Respir Crit Care Med, v. 167, n. 7, p. 970-975, Apr/2003.
- MARQUET,S. e SCHURR,E. **Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples**. Drug Metab Dispos, v. 29, n. 4 Pt 2, p. 479-483, Apr/2001.
- MATTEELLI, A.; GORI, A.; PINSI, G.; EL HAMAD, I.; BOMBANA, E.; MASTAGLIA, F.; DEGLI, E. A.; BANDERA, A.; TEDOLDI, S.; CASALINI, C.; SCOLARI, C.; CARVALHO, A. C.; CAROSI, G. **Clustering of tuberculosis**

among senegalese immigrants in Italy. Int J Tuberc Lung Dis, v. 7, n. 10, p. 967-972, Oct/2003.

MATTEELLI,A.;CASALINI,C.;RAVIGLIONE,M.C.;EL HAMAD, I.; SCOLARI, C.; BOMBANA, E.; BUGIANI, M.; CAPUTO, M.; SCARCELLA, C.; CAROSI, G. **Supervised preventive therapy for latent tuberculosis infection in illegal immigrants in Italy.** Am J Respir Crit Care Med, v. 162, n. 5, p. 1653-1655, Nov/2000.

MENEZES, M;LEMONS, S; OLIVEIRA,K.;PALMA,E. **Incidência e fatores de risco para tuberculose em Pelotas, uma cidade do sul do país.** Ver Bras Epidemiol, v. 1, n. 1 p. 50-60, 1998.

METCALFE N. **A study of tuberculosis, malnutrition and gender in Sri Lanka.** Trans R Soc Trop Med Hyg. V. 2, n99, p.115-9, 2005.

METCALFE,N. **A study of tuberculosis, malnutrition and gender in Sri Lanka.** Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 99, n. 2, p. 115-119, Feb/2005.

MOHAN,V.P.;SCANGA,C.A.;YU,K.;SCOTT,H.M.;TANAKA,K.E.;TSANG,E.;TSAI,M.M.;FLYNN,J.L.;CHAN,J. **Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology.** Infect Immun, v. 69, n. 3, p. 1847-1855, Mar/2001.

MURRAY,J.F. **A century of tuberculosis.** Am J Respir Crit Care Med, v. 169, n. 11, p. 1181-1186, Jun/2004.

NARAIN,J.P.;RAVIGLIONE,M.C.;KOCHI,A. **HIV-associated tuberculosis in developing countries: epidemiology and strategies for prevention.** Tuber Lung Dis, v. 73, n. 6, p. 311-321, Dec/1992.

NORTH,R.J. e JUNG,Y.J. **Immunity to tuberculosis** . Annu Rev Immunol, v. 22, p. 599-623, 2004.

OH,J.H.;YANG,C.S.;NOH,Y.K.;KWEON,Y.M.;JUNG,S.S.;SON,J.W.;KONG,S.J.;YOON,J.U.;LEE,J.S.;KIM,H.J.;PARK,J.K.;JO,E.K.;SONG,C.H. **Polymorphisms of interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis.** Respirology, v. 12, n. 4, p. 594-598, Jul/2007.

OLIVEIRA,M.M.;SILVA,J.C.S.;COSTA,J.F.;AMIM,L.H.;LOREDO,C.C.S.;MELO, H.;QUEIROZ,L.F.;MELLO,F.C.Q.;LAPA,S.J.;KRITSKI,A.L.;SANTOS,A.R. **Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the TNF-a (-238/-308) gene among TB and non TB patients: Susceptibility markers of TB occurrence?** Brazilian Journal of Pulmonology, n.30, p. 461-67, 2004.

ORAL,H.B.;BUDAK,F.;UZASLAN,E.K.;BASTURK,B.;BEKAR,A.;AKALIN,H.;EGE,E.;ENER,B.;GORAL,G. **Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis.** Cytokine, v. 35, n. 3-4, p. 143-147, Aug/2006.

PASARE,C. e MEDZHITOV,R. **Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity.** Microbes Infect, v. 6, n. 15, p. 1382-1387, Dec/2004.

PATEL,S.;PARSYAN,A.E.;GUNN,J.;BARRY,M.A.;REED,C.;SHARNPRAPAI,S.;HORSBURGH,C.R., JR. **Risk of progression to active tuberculosis among foreign-born persons with latent tuberculosis.** Chest, v. 131, n. 6, p. 1811-1816, Jun/2007.

PONTICIELLO,A.;STURKENBOOM,M.C.;SIMONETTI,A.;ORTOLANI,R.;MALE RBA,M.;SANDUZZI,A. **Deprivation, immigration and tuberculosis incidence in Naples, 1996-2000.** Eur J Epidemiol, v. 20, n. 8, p. 729-734, 2005.

PRABHU,A.S.;SELVARAJ,P.;JAWAHAR,M.S.;ADHILAKSHMI,A.R.;NARAYANAN,P.R. **Interleukin-12B & interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis.** Indian J Med Res, v. 126, n. 2, p. 135-138, Aug/2007.

PYO,C.W.;HUR,S.S.;KIM,Y.K.;CHOI,H.B.;HONG,Y.S.;KIM,D.W.;KIM,C.C.;KIM,H.K.;KIM,T.G. **Polymorphisms of IL-1B, IL-1RN, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IFN-gamma genes in the Korean population.** Hum Immunol, v. 64, n. 10, p. 979-989, Oct/2003.

RAJA,A. **Immunology of tuberculosis.** Indian J Med Res, v. 120, n. 4, p. 213-232, Oct/2004.

RAVIKUMAR,M.;DHEENADHAYALAN,V.;RAJARAM,K.;LAKSHMI,S.S.;KUMARAN,P.P.;PARAMASIVAN,C.N.;BALAKRISHNAN,K.;PITCHAPPAN,R.M. **Associations of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 alleles with pulmonary tuberculosis in south India .** Tuber Lung Dis, v. 79, n. 5, p. 309-317, 1999.

ROCKETT,K.A.;BROOKES,R.;UDALOVA,I.;VIDAL,V.;HILL,A.V.;KWIATKOWSKI,D. **1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of Mycobacterium tuberculosis in a human macrophage-like cell line.** Infect Immun, v. 66, n. 11, p. 5314-5321, Nov/1998.

ROOK,G.A.;TAVERNE,J.;LEVETON,C.;STEELE,J. **The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis.** Immunology, v. 62, n. 2, p. 229-234, Oct/1987.

RUFFINO-NETTO, A. **Tuberculosis: the neglected calamity**. Rev Soc Bras Med Trop, v. 35, n. 1, p. 51-8. Jan-Feb/2002.

SANTOS,A.R.;SUFFYS,P.N.;VANDERBORGHT,P.R.;MORAES,M.O.;VIEIRA,L.M.;CABELLO,P.H.;BAKKER,A.M.;MATOS,H.J.;HUIZINGA,T.W.;OTTENHOFF,T.H.;SAMPAIO,E.P.;SARNO,E.N. **Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy**. J Infect Dis, v. 186, n. 11, p. 1687-1691, Dec/2002.

SCOLA,L.;CRIVELLO,A.;MARINO,V.;GIOIA,V.;SERAUTO,A.;CANDORE,G.;COLONNA-ROMANO,G.;CARUSO,C.;LIO,D. **IL-10 and TNF-alpha polymorphisms in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis: implication for ageing and life span expectancy**. Mech Ageing Dev, v. 124, n. 4, p. 569-572, Apr/2003.

SCOLARI, C.; EL HAMAD, I.; MATTEELLI, A.; SIGNORINI, L.; BOMBANA, E.; MOIOLI, R.; DE LEONARDIS, C.; NAVA, A. M.; CAROSI, G. **Incidence of tuberculosis in a community of Senegalese immigrants in Northern Italy**. Int J Tuberc Lung Dis, v. 3, n. 1, p. 18-22, Jan/1999.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 6^o Edição, Brasília, DF, p. 816 2005.

SECRETARIA EM VILÂNCIA EM SAÚDE. **MANUAL DE BACTERIOLOGIA DA TUBERCULOSE**. Ministério da Saúde. Centro de Referencia Professor Hélio Fraga. Disponível em: http://www.saude.rj.gov.br/tuberculose/Artigos/Manual_de_BacteriologiaTub_Final_Rev02P.pdf. Acesso em: jun. 2008.

SELVARAJ,P.;ALAGARASU,K.;HARISHANKAR,M.;VIDYARANI,M.;NARAYANAN,P.R. **Regulatory region polymorphisms of vitamin D receptor gene in pulmonary tuberculosis patients and normal healthy subjects of south India**. Int J Immunogenet, v. 35, n. 3, p. 251-254, Jun/2008.

SELVARAJ,P.;NARAYANAN,P.R.;REETHA,A.M. **Association of functional mutant homozygotes of the mannose binding protein gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis in India**. Tuber Lung Dis, v. 79, n. 4, p. 221-227, 1999.

SELVARAJ,P.;SRIRAM,U.;MATHAN,K.S.;REETHA,A.M.;NARAYANAN,P.R. **Tumour necrosis factor alpha (-238 and -308) and beta gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis: haplotype analysis with HLA-A, B and DR genes**. Tuberculosis (Edinb), v. 81, n. 5-6, p. 335-341, 2001.

SHAW, M.A.; COLLINS, A.; PEACOCK, C. S.; MILLER, E. N.; BLACK, G. F.; SIBTHORPE, D.; LINS-LAINSON, Z.; SHAW, J. J.; RAMOS, F.; SILVEIRA, F.;

BLACKWELL, J. M. **Evidence that genetic susceptibility to Mycobacterium tuberculosis in a Brazilian population is under oligogenic control: linkage study of the candidate genes NRAMP1 and TNFA.** Tuber Lung Dis, v. 78, n. 1, p. 35-45, 1997.

SHIN,H.D.;PARK,B.L.;KIM,Y.H.;CHEONG,H.S.;LEE,I.H.;PARK,S.K. **Common interleukin 10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis.** Exp Mol Med, v. 37, n. 2, p. 128-132, Apr/2005.

SINAN. Boletim do Sistema de Informação de Agravos Notificados, 2006. **BOLETIM DO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS NOTIFICADOS 2006.** Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>. Acesso em: jul. 2008.

SKAMENE,E.;GROS,P.;FORGET,A.;KONGSHAVN,P.A.;ST CHARLES,C.;TAYLOR,B.A. **Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens.** Nature, v. 297, n. 5866, p. 506-509, Jun/1982.

SMITH,I. **Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence.** Clin Microbiol Rev, v. 16, n. 3, p. 463-496, Jul/2003.

SOBORG, C.; MADSEN, H. O.; ANDERSEN, A. B.; LILLEBAEK, T.; KOK-JENSEN, A.; GARRED, P. **Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis.** J Infect Dis, v. 188, n. 5, p. 777-782, Sep/2003.

TAMBUR, A. R.; ORTEGEL, J. W.; BEN ARI, Z.; SHABTAI, E.; KLEIN, T.; MICHOWIZ, R.; TUR-KASPA, R.; MOR, E. **Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients.** Transplantation, v. 71, n. 10, p. 1475-1480, May/2001.

TEXEIRA,H.C.;ABRAMO,C.;MUNK,M.E. **Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso.** J Bras Pneumol, v. 33, n.3, p. 323-334, 2007.

TOCQUE,K.;REGAN,M.;REMMINGTON,T.;BEECHING,N.J.;JAMIESON,I.;SYE D,Q.;DAVIES,P.D. **Social factors associated with increases in tuberculosis notifications.** Eur Respir J, v. 13, n. 3, p. 541-545, Mar/1999.

VAN CREVEL,R.;OTTENHOFF,T.H.;VAN DER MEER,J.W. **Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis.** Adv Exp Med Biol, v. 531, p. 241-247, 2003.

VAN DEVENTER,S.J. **Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease.** Intensive Care Med, v. 26 Suppl 1, p. S98-102, 2000.

VEJBAESYA,S.;CHIERAKUL,N.;LUANGTRAKOOL,P.;SERMDUANGPRATEE P,C. **NRAMP1 and TNF-alpha polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Thais.** *Respirology*, v. 12, n. 2, p. 202-206, Mar/2007.

VENDRAMINI,S.H.; SANTOS,M.L.; GAZETTA,C.E.; CHIARAVALLOTI-NETO,F.; RUFFINO-NETTO,A.; VILLA,T.C. **Tuberculosis risks and socio-economic level: a case study of a city in the Brazilian south-east, 1998-2004.** *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 10, n. 11, p. 1231-1235, Nov/2006.

VERONESI. **Tuberculose, Clínica e Diagnóstico. Em: Tratado de Infectologia.** 3º Edição, São Paulo, SP, Editora Atheneu, p.1139; 1158-1160. 2005.

VIDYARANI,M.;SELVARAJ,P.;PRABHU,A.S.;JAWAHAR,M.S.;ADHILAKSHMI, A.R.;NARAYANAN,P.R. **Interferon gamma (IFNgamma) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis.** *Indian J Med Res*, v. 124, n. 4, p. 403-410, Oct/2006.

WATTAVIDANAGE,J.;CARTER,R.;PERERA,K.L.;MUNASINGHA,A.;BANDARA ,S.;MCGUINNESS,D.;WICKRAMASINGHE,A.R.;ALLES,H.K.;MENDIS,K.N.;PREMAWANSA,S. **TNFalpha*2 marks high risk of severe disease during Plasmodium falciparum malaria and other infections in Sri Lankans.** *Clin Exp Immunol*, v. 115, n. 2, p. 350-355, Feb/1999.

WEN,A.Q.;WANG,J.;FENG,K.;ZHU,P.F.;WANG,Z.G.;JIANG,J.X. **Effects of haplotypes in the interleukin 1beta promoter on lipopolysaccharide-induced interleukin 1beta expression.** *Shock*, v. 26, n. 1, p. 25-30, Jul/2006.

WESTENDORP,R.G.;LANGERMANS,J.A.;HUIZINGA,T.W.;ELOUALI,A.H.;VERWEIJ,C.L.;BOOMSMA,D.I.;VANDENBROUCKE,J.P. **Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease.** *Lancet*, v. 349, n. 9046, p. 170-173, Jan/1997.

WIELAND,C.W.;FLORQUIN,S.;PATER,J.M.;WEIJER,S.;VAN DER,P.T. **Interleukin-1 contributes to an effective clearance of Mycobacterium kansasii from the respiratory tract.** *Microbes Infect*, v. 8, n. 9-10, p. 2409-2413, Aug/2006.

WILKINSON,R.J.;LLEWELYN,M.;TOOSSI,Z.;PATEL,P.;PASVOL,G.;LALVANI, A.;WRIGHT,D.;LATIF,M.;DAVIDSON,R.N. **Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study.** *Lancet*, v. 355, n. 9204, p. 618-621, Feb/2000.

WILKINSON,R.J.;PATEL,P.;LLEWELYN,M.;HIRSCH,C.S.;PASVOL,G.;SNOUNOU,G.;DAVIDSON,R.N.;TOOSSI,Z. **Influence of polymorphism in the genes**

for the interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1beta on tuberculosis .
J Exp Med, v. 189, n. 12, p. 1863-1874, Jun/1999.

WOLLESWINKEL,V.;NAGELKERKE,N.J.;BROEKMANS,J.F.;BORGDORFF,M.
W. **The impact of immigration on the elimination of tuberculosis in The Netherlands: a model based approach.** Int J Tuberc Lung Dis, v. 6, n. 2, p. 130-136, Feb/2002.

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

ZAHRT,T.C. **Molecular mechanisms regulating persistent Mycobacterium tuberculosis infection.** Microbes Infect, v. 5, n. 2, p. 159-167, Feb/2003.

CAPÍTULO VIII

10. ANEXOS

Anexo 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO DE POLIMORFISMO EM BASE ÚNICA NA REGIÃO PROMOTORA DE GENES DE CITOCINA E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM TUBERCULOSE PULMONAR.

Nos próximos meses será realizado um estudo em pacientes com tuberculose, infectados ou não pelo vírus da AIDS (HIV), que tenham iniciado tratamento medicamentoso anti-tuberculose. Neste estudo, pretende-se descrever a presença de polimorfismos na região promotora de genes de citocinas e sua possível associação com tuberculose pulmonar. Este estudo será coordenado pelo pesquisadores principais: Dra. Martha Oliveira, Dr. Afrânio Kritski, Dr. Paulo Albuquerque Costa, Dra. Maria Armanda Monteiro da Silva Vieira, Dra. Rejane Andréa Ramalho Nunes da Silva e outros profissionais em atividades no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ, e no No Centro de Saúde de Guadalupe. Este termo de consentimento explica as várias etapas do estudo. Perguntarei o que julgar necessário. Durante o estudo serei esclarecido quanto aos eventos que possam alterar a minha permanência no estudo.

1) Procedimentos

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

Serão coletados 5ml de sangue do 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 códigos.

2) Local do estudo

Estes procedimentos laboratoriais serão realizados no prédio do 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 prédio do HUCFF/UFRJ.

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 ao qual eu irei me submeter ajudará no entendimento do desenvolvimento da tuberculose nas pessoas. Com isso, espera-se que mais conhecimentos científicos sejam obtidos que possibilite estabelecer melhor quais os mecanismos que definem quem irá se infectar e/ou adoecer por tuberculose, em nosso meio. .

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 principais 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 Dra. Fernanda Mello, Dr Afrânio Kritski ou Dra Martha Oliveira, Dr. Antônio Cláudio Goulart Duarte.

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.

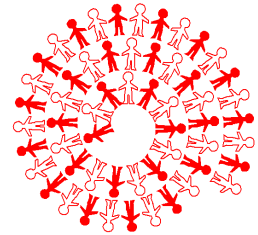
Assinatura do voluntário
Nº do prontuário
(ou responsável legal)

Nome completo

Assinatura do entrevistador
Data

Nome do entrevistador

Anexo 2. Prontuário para Coleta de Informações – Pacientes Itália.



**Gruppo Infezioni di Comunità
Istituto di Malattie Infettive e Tropicali
Spedali Civili di Brescia**

Archivio

n°

COGNOME _____

NOME _____

Data di Nascita _____

Luogo di nascita

Nazionalità _____

In Italia da anni

Stato Civile _____

Figli

Scolarità _____

Professione

Indirizzo

Residenza

Telefono

Tessera sanitaria n° _____ Scadenza:
 ___/___/___

Codice STP: _____ Scadenza:
 ___/___/___

Esenzione ticket n°: _____ Scadenza:
 ___/___/___

Notifica di malattia eseguita il: ___/___/___ Presso:

Assistenza INPS: no

sì : modulo compilato per i mesi di: GEN - FEB -
 MAR - APR - MAG - GIU - LUG - AGO - SET- OTT - NOV -
 DIC - Conclusione terapia - _____

Arruolamento protocollo TB:

no sì: data prelievi: 1° _____ 2° _____ 3° _____
 4° _____

STORIA TUBERCOLOSI**FATTORI DI RISCHIO TB:**

- Nessuno
- Immigrato

- Età > 75 anni
- Alcoolista
- HIV positivo
- Contatto
- Senza tetto
- Tumore
- Linfoma
- LES
- IRC
- Cirrosi

TEST HIV (data: _____): Non eseguito;
 Negativo; Positivo; STADIO HIV/AIDS (CD'93): _____

CD4= _____ (Data _____) HIV-RNA= _____
 (Data _____)

REGIME

TARV:

DATA INIZIO TARV: _____ DATA FINE TARV: _____

FATTORI DI RISCHIO HIV:

- eterosessuale
- omo-bisessuale
- tossicodipendente attivo
- ex-tossicodipendente
- prostituzione
- trasfusioni
- emofilia

PRECEDENTE EPISODIO TB: No; Sì

PRECEDENTE DIAGNOSI DI TB:

DATA INIZIO E FINE PRECEDENTE TERAPIA ANTI-TB: dal _____ al _____

PRECEDENTE CONTATTO CON CASO INDICE DI TB: No; Sì
(Data: _____)

PRECEDENTE PROFILASSI ANTI -TB: No; Sì (dal: _____ al _____)

PRECEDENTE ESECUZIONE MANTOUX: No; Sì: data: _____ mm = _____)

DIAGNOSI DI TUBERCOLOSI Certa Probabile POLMONARE BACILLIFERA POLMONARE NON BACILLIFERA EXTRAPOLMONARE (specificare la sede:
_____) POLMONARE ED EXTRAPOLMONARE (specificare la sede:
_____) DISSEMINATA (specificare la sede:
_____)**PATOLOGIE ASSOCIATE E/O PREGRESSE:**

MANTOUX ESEGUITA: No Sì (Data: _____; mm
= _____)

TIPO DI TUBERCOLOSI: Nuovo episodio Recidiva Trattamento fallito Trattamento interrotto Cronicizzazione

DATA DIAGNOSI DI TUBERCOLOSI:

SEDE ISOLAMENTO MICOBATTERI:
 _____ Es.diretto _____

Es.colturale _____ (Data: _____)

ANTIBIOGRAMMA MICOBATTERI:

Sensibile a: Resistente a:

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| <input type="checkbox"/> INH | <input type="checkbox"/> INH |
| <input type="checkbox"/> RMP | <input type="checkbox"/> RMP |
| <input type="checkbox"/> ETB | <input type="checkbox"/> ETB |
| <input type="checkbox"/> PZA | <input type="checkbox"/> PZA |
| <input type="checkbox"/> SM | <input type="checkbox"/> SM |

DATA INIZIO TERAPIA ANTITUBERCOLARE:

TIPO DI TERAPIA:

- INH, dose quotidiana mg _____
- RMP, dose quotidiana mg _____
- ETB, dose quotidiana mg _____
- PZA, dose quotidiana mg _____
- SM dose quotidiana mg _____
- Altro _____

DATA INIZIO TERAPIA DI MANTENIMENTO:

TIPO DI TERAPIA:

Altro:	Dir etto								
	Co lturale								

ESAMI STRUMENTALI:

ESAME	Da	Da	Data	Data	Data
RX TORACE					
A BRONCOSCOPI					
BIOPSIA					
RX					
TAC					
RMN					
ECOGRAFIA					
Altro					

.....					
-------	--	--	--	--	--

RACCORDO ANAMNESTICO:

Anexo 3. Prontuário para Coleta de Informações – Pacientes Brasil.

QUESTIONÁRIO PARA ESTUDO DE POLIMORFISMO

Nome				Completo:
<hr/>				
1) Tuberculose anterior	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
2) Desnutrição grave (< 15%)	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
3) Diabete melitus insulina dependente	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
4) Psoríase	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
5) Artrite reumatóide	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
6) Espondilite anquilosante	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
7) Esclerose múltipla	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
8) Lupus eritematoso sistêmico	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
9) Dengue (qualquer forma)	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
10) Malária:	Qual:	()	()	()
<hr/>		Sim	Não	IGN
11) Hepatite C crônica ativa	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
12) Hepatite B crônica ativa	()	()	()	()

	Sim	Não	IGN	
13) Pneumoconiose	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
14) Hepatite auto-imune:	Qual:	()	()	()
_____	Sim	Não	IGN	
15) Leishmaniose mucocutânea	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
16) Hanseníase (qualquer forma)	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
17) HTLV-1	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
18) Cirrose biliar		()	()	()
		Não	IGN	
19) Asma brônquica	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
20) Atopia (qualquer manifestação)	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
21) Sarcoidose:	Qual:	()	()	()
_____	Sim	Não	IGN	
—				
22) Doença de Crohn	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
23) Miastenia grave	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
24) Dermatite herpetiforme	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
25) Doença de Boweel	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
26) Nefropatia epidêmica	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
27) Obesidade	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
28) Tracoma scarring	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
29) Choque séptico (Sepsis)	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	

30) Retocolite ulcerativa	()	()	()
Sim	Não	IGN	
31) Rejeição transplante renal e/ou cardíaco	()	()	()
Sim	Não	IGN	
32) Mononucleose (Epsteinbar Vírus)	()	()	()
Sim	Não	IGN	
33) Auto-imunidade contra <i>Mycobacterium avium</i>	()	()	()
Sim	Não	IGN	

QUESTIONÁRIO PARA ESTUDO DE POLIMORFISMO

Nome _____

Completo: _____

34) Tuberculose anterior	()	()	()
Sim	Não	IGN	
35) Desnutrição grave (< 15%)	()	()	()
Sim	Não	IGN	
36) Diabetes melitus insulina dependente	()	()	()
Sim	Não	IGN	
37) Psoríase	()	()	()
Sim	Não	IGN	
38) Artrite reumatóide	()	()	()
Sim	Não	IGN	
39) Espondilite anquilosante	()	()	()
Sim	Não	IGN	
40) Esclerose múltipla	()	()	()
Sim	Não	IGN	
41) Lupus eritematoso sistêmico	()	()	()
Sim	Não	IGN	
42) Dengue (qualquer forma)	()	()	()
Sim	Não	IGN	
43) Malária:	Qual:	()	()

_____	Sim	Não	IGN	
—				
44) Hepatite C crônica ativa	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
45) Hepatite B crônica ativa	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
46) Pneumoconiose	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
47) Hepatite auto-imune:	Qual:	()	()	()
_____	Sim	Não	IGN	
48) Leishmaniose mucocutânea	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
49) Hanseníase (qualquer forma)	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
50) HTLV-1	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
51) Cirrose biliar	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
52) Asma brônquica	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
53) Atopia (qualquer manifestação)	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
54) Sarcoidose:	Qual:	()	()	()
_____	Sim	Não	IGN	
—				
55) Doença de Crohn	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
56) Miastenia grave	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
57) Dermatite herpetiforme	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
58) Doença de Boweel	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
59) Nefropatia epidêmica	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
60) Obesidade	()	()	()	()

	Sim	Não	IGN	
61) Tracoma scarring	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
62) Choque séptico (Sepsis)	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
63) Retocolite ulcerativa	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
64) Rejeição transplante renal e/ou cardíaco	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
65) Mononucleose (Epsteinbar Vírus)	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	
66) Auto-imunidade contra <i>Mycobacterium avium</i>	()	()	()	()
	Sim	Não	IGN	

Anexo 4. Seqüência dos Primers utilizados neste Estudo:**1) TNF- α -238:**

ALELO A SENSE 5'-GCCCCTCCCAGTTCTAGTTCTATC3'

ALELO A Anti-SENSE 5`CACACTCCCATCCTCCCTGGTCT3`

ALELO G SENSE 5`- AGACCCCCCTCGGAATCG3`

ALELO G Anti-SENSE 5` CCGGATCATGCTTTTCAGTGC3`

CONTROLE INTERNO SENSE 5`GCCCCTCCAGTTCTAGTTCTATC3`

CONTROLE INTERNO Anti-SENSE 5`CCGGATCATGCTTTTCAGTGC3`

2) IL-1 β -35:

GENÉRICO 5`TAGCACCTAGTTGTAAGGAAGA3`

ALELO C 5`CCTACTTCTGCTTTTGAAAGCC3`

ALELO T 5`CCTACTTCTGTCTTTGAAAGCT3`

CONTROLE INTERNO 63 5`TGCCAAGTGGAGCACCCAA3`

CONTROLE INTERNO 64 5`GCATCTTGCTCTGTGCAGAT3`

3) IL-10 -592:

SENSE 5`CTCAGTTAGCACTGGTGTAC3`

AntiSENSE 5`TGTTCCCTAGGTCACAGTGAC3`

4) IL-10 -819:

SENSE 5`CCAAGACAACACTACTAAGGCTTCTTG*A*GGA3`

AntiSENSE 5`AGGTAGTGCTCACCATGACC3`

OBS.: G* e A* pares de bases modificados – na seqüência original TG.

5) IL-10 -1082:

SENSE 5`CCAAGACAACACTACTAAGGCTTCTTG*A*GGA3`

AntiSENSE 5`AGGTAGTGCTCACCATGACC3`

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](#)