

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
DOUTORADO EM SAÚDE PÚBLICA

LÍLIAN MARIA LAPA MONTENEGRO

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA EM  
REGIÃO PROMOTORA DE GENES DAS CITOCINAS FATOR DE NECROSE  
TUMORAL (TNF) E INTERLEUCINA-10 (IL-10) COM A SUSCEPTIBILIDADE OU  
RESISTÊNCIA A TUBERCULOSE PULMONAR

Recife

2013

**LÍLIAN MARIA LAPA MONTENEGRO**

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA EM  
REGIÃO PROMOTORA DE GENES DAS CITOCINAS FATOR DE NECROSE  
TUMORAL (TNF) E INTERLEUCINA-10 (IL-10) COM A SUSCEPTIBILIDADE OU  
RESISTÊNCIA A TUBERCULOSE PULMONAR**

Tese apresentada ao curso de doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/Fiocruz, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientadores:

Dra. Haiana Charifker Schindler

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Morais

**Recife**

**2013**

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- M777a Montenegro, Lílian Maria Lapa.  
Avaliação da associação de polimorfismos de base única em região promotora de genes das citocinas fator de necrose tumoral alpha (TNF-alfa) e Interleucina-10 (IL-10) com a susceptibilidade ou resistência a tuberculose pulmonar / Lílian Maria Lapa Montenegro. - Recife: s.n, 2013.  
110 p. : ilus., tab., graf.  
Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.  
Orientadores: Haiana Charifker Schindler, Clarice Neuenschwander Lins de Morais.
1. Tuberculose Pulmonar – imunologia. 2. Fator de Necrose Tumoral alfa. 3. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. 4. Interleucina-10. I. Schindler, Haiana Charifker. ths. II. Morais, Clarice Neuenschwander Lins de. ths. III. Título.

**LÍLIAN MARIA LAPA MONTENEGRO**

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA EM  
REGIÃO PROMOTORA DE GENES DAS CITOCINAS FATOR DE NECROSE  
TUMORAL (TNF $\alpha$ ) E INTERLEUCINA-10 (IL-10) COM A SUSCEPTIBILIDADE OU  
RESISTÊNCIA A TUBERCULOSE PULMONAR**

Aprovado em: 07/07/2013

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em  
Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu  
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a  
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Haiana Charifker Schindler, PhD  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz, PE  
(Membro Titular Interno - Orientadora)

---

Dr. Valdir de Queiroz Balbino, PhD  
Universidade Federal de Pernambuco, PE  
(Membro Titular Externo)

---

Dr. Sérgio Crovella, PhD  
Universidade Federal de Pernambuco, PE  
(Membro Titular Externo)

---

Dr. Fábio Lopes de Melo, PhD  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz, PE  
(Membro Titular Interno)

---

Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira, PhD  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz, PE  
(Membro Titular Interno)

**Dedico este trabalho  
aos meus pais  
Lourdes e Montenegro,  
meu marido Fernando e  
minha filha Gabriela  
que são minha eterna  
fonte de inspiração.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, da esperança e do amor, por estar sempre presente em minha vida e por acreditar que através da fé, tudo é possível acontecer. A sua providência estende-se a tudo e todos.

Aos meus pais, Montenegro e Lourdes, pelo amor e dedicação, ensinando sempre o caminho da integridade e perseverança, estando presentes nos momentos bons e difíceis de minha vida, mas principalmente demonstrando que a educação é a maior herança que os pais transmitem aos filhos. O meu eterno agradecimento e amor!

Aos grandes amores da minha vida, meu marido Fernandinho e minha filha Gabriela, por me fazerem extremamente feliz, por mostrarem que o amor incondicional existe, por estarem sempre presentes, proporcionando-me extenso carinho e amor. Com vocês sempre ao meu lado, eu consigo superar qualquer obstáculo. Para vocês eu entrego o meu mais sublime amor!

À minha orientadora, Dra. Haiana Charifker Schindler, que me deu a oportunidade de iniciar na vida acadêmica e por me orientar em todas as etapas da minha formação acadêmica. Agradeço também pela amizade, dedicação, confiança e respeito que se formou e construiu durante todos esses anos de convivência e pelo grande apoio no desenvolvimento deste trabalho. Saiba que a admiro pela sua competência profissional. Meus sinceros agradecimentos!

À minha orientadora, Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes, pela orientação em todas as etapas no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade que se formou ao longo destes anos e que apesar de ser uma pesquisadora nova, sempre demonstrou dedicação ao trabalho acadêmico.

A toda minha família, pelo amor, apoio e incentivo nas minhas decisões pessoais e profissionais e pela demonstração de união familiar, vencendo juntos todos os obstáculos.

Aos meus colegas, André e Romero, que me ajudaram a executar todas as etapas de desenvolvimento desta pesquisa, sejam nas atividades de campo, laboratorial e de análise dos resultados. Agradeço também pela grande amizade, dedicação e respeito que se formou nesse período e que levarei por toda a minha vida.

À minha amiga e companheira Rosana Montenegro, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pela antiga e eterna amizade, pelo convívio diário de alegria e acima de tudo pelo profissionalismo. Meus sinceros agradecimentos!

A brilhante “Equipe das Tuberculetes” que compõe o Laboratório de Imunoepidemiologia: Andrea Santos Lima, Fabiana Fulco, Gabriela Guedes, Heidi Lacerda, Juliana Figueirêdo, Klarissa Guarines, Laís Lira, Márcia Schneider, Aline e Marcela Salazar na execução das técnicas laboratoriais, bem como as amigas Kaly e Bruna. Saibam que o apoio, o carinho, a amizade e os momentos de descontração que todas vocês me transmitiram foram fundamentais para a finalização desta pesquisa e que carregarei vocês para sempre no meu coração. Minha eterna gratidão!

A minha amiga Edeneide Xavier, inicialmente pela formatação da tese. Mas, principalmente por estar sempre presente em todas as fases da minha vida, me dando apoio, carinho, atenção e sempre me fazendo refletir nas grandes questões relacionadas à vida.

Aos médicos pneumologistas das unidades de saúde participantes do estudo, mas principalmente aos médicos Dr. Gaspar, Dr. Amaro, Dr. Gildo, a auxiliar de enfermagem Anatália e ao enfermeiro Ricardo, pela colaboração na seleção dos pacientes, por terem disponibilizado toda a infra-estrutura dos seus ambulatórios e pela amizade que se construiu. Agradeço ainda, a toda a equipe de agente de saúde da família, principalmente à Cristina, fundamental na busca ativa dos pacientes;

A todos os pacientes que voluntariamente contribuíram para a realização desta tese, em busca de uma melhoria da qualidade de vida e no avanço da ciência;

Agradeço em especial aos membros da banca examinadora, Valdir Balbino, Sérgio Crovella, Valéria Pereira, Fábio Melo, Virgínia Lorena e Rosana Montenegro, pela disposição em contribuir para a melhoria do trabalho.

A Marcus Cardoso e George Tadeu, pela assistência na área estatística e por disponibilizar o tempo para atender com atenção e profissionalismo.

À amiga e secretária do Departamento de Imunologia Simone Santos pela sua ajuda em todos os momentos que precisei com os procedimentos burocráticos do CPqAM.

A todos os colegas do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ, Sinval, Eduardo Henrique, Filipe, Dra. Yara, Edileuza, Milena, Carlos Gustavo, Roberto, Sheila, Fred, Silvia, Neidinha, Rone, Mineo, Leonardo, Vladimir pelo apoio profissional, força e amizade.

A todos os colegas da turma do doutorado em Saúde Pública do CPqAM/Fiocruz (2009-2013), principalmente a Andréia, Daniele, Marcelinho, Ana Maria, Paul, Aletéia, Luiz Griz.

À coordenadora do curso de doutorado em Saúde Pública do CPqAM, Eduarda Cesse, pelas resoluções burocráticas.

A todos que compõe a Secretaria Acadêmica do CPqAM/Fiocruz, principalmente Rivaldete, Adriana e Vângela.

Aos funcionários da Biblioteca do CPqAM, em especial Mégine, Adagilson e Márcia pelo apoio e colaboração.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), pela infra-estrutura e pelo suporte financeiro indispensáveis para realização deste pesquisa.

Às pessoas que me apoiaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.



Tuberculose.  
Doença ou Praga?  
Morte ou Vida?  
Não sei bem o que é!  
Só sei que devasta e dizima populações a milhões de anos.  
Sim! Seres, Seres Humanos.  
Seres com sonhos, sentimentos e esperanças!  
Muitas vezes...  
Sonhos sem esperança,  
Sentimentos de tristeza,  
Esperança...  
Que esperança?  
Pode ser considerada sinônimo do preconceito, discriminação de muitos, muitos e muitos.  
Muito mais do que podemos imaginar.  
Doença negligenciada?  
Sim! Doença muito antiga!  
Patrocinada por representantes poderosos e gananciosos do Brasil!  
Que melhores condições de vida não oferecem ou proporcionam!  
Foi uma doença de boêmios e artistas.  
É uma doença dos esquecidos!  
Mas, muitas vezes a força da vida consegue ser vitoriosa!  
E com muito amor, fé, união e esperança se consegue superar qualquer desafio.  
Até esse!

**Lílian Maria Lapa Montenegro**

MONTENEGRO, L. M. L. **Avaliação da associação de polimorfismos de base única em região promotora de genes das citocinas fator de necrose tumoral alpha (TNF) e Interleucina-10 (IL-10) com a susceptibilidade ou resistência a tuberculose pulmonar.** 2013. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

### RESUMO

Polimorfismos de base única (SNPs) em regiões promotoras de genes das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 influenciam a resposta imunológica e podem estar envolvidos na resistência ou susceptibilidade a tuberculose. Este trabalho objetivou avaliar a associação entre os SNPs funcionais dos genes das citocinas TNF- $\alpha$  (-308G/A) e IL-10 (-1082A/G) com a resistência ou susceptibilidade a tuberculose pulmonar ativa em pacientes oriundos do estado de Pernambuco. Participaram 282 indivíduos, distribuídos em grupos de estudo de acordo com achados clínicos, radiológicos e exames laboratoriais. O grupo caso foi formado por 71 pacientes com tuberculose pulmonar ativa; controle 1: 53 pacientes sintomáticos respiratórios com tuberculose latente; controle 2: 57 pacientes sintomáticos respiratórios portadores de infecções pulmonares inespecíficas e o controle 3 por 101 indivíduos clinicamente saudáveis, de serviços públicos de saúde. Foram coletados 5-10mL de escarro e 4,5mL de sangue periférico, realizada extração de DNA genômico e determinação do polimorfismo genético através de qPCR. A análise polimórfica comparativa entre os grupos de estudo demonstrou que o alelo mutante -1082G [ $p < 0.0001$ ; OR=3.90 [2.45- 6.59] e os genótipos -1082GA [ $p < 0.0001$ ; OR=2.90 [1.42- 5.95] e -1082GG [ $p < 0.0001$ ; OR=15.50 [5.18- 1.62] estava associado com o risco de desenvolvimento da tuberculose pulmonar quando o grupo caso foi comparado com o controle 3. O genótipo heterozigoto -308AG [ $p = 0.005$ ; OR=0.374 [0.17- 0.76] apresentou associação estatística significativa entre o grupo caso e o controle 3. Não houve diferença estatística significativa na análise de associação dos SNP's -308G/A e -1082A/G na comparação entre o grupo caso e os controles 1 e 2. Portanto, portadores do alelo mutante -1082G, equivalente a níveis protéicos aumentados de IL-10 podem estar influenciando a resposta imune contra o *M. tuberculosis*. Entretanto, portadores do genótipo heterozigoto -308GA, demonstrou um fator de proteção ao desenvolvimento da doença. O estudo demonstrou que os SNPs apresentaram um importante papel na susceptibilidade ou resistência a tuberculose pulmonar na população pernambucana estudada.

**Palavras Chaves:** Tuberculose pulmonar, Polimorfismo de base única, TNF- $\alpha$  (-308G/A), IL-10 (-1082A/G)

MONTENEGRO, L. M. L. **Evaluation of the association of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of genes of cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF) and interleukin-10 (IL-10) with susceptibility or resistance to pulmonary tuberculosis.** 2013. Thesis (Doctorate in Public Health) –Aggeu Magalhães Research Center, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

### ABSTRACT

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes promoter regions of the cytokines TNF- $\alpha$  and IL-10 influence of the immune response and may be involved in resistance or susceptibility to tuberculosis. This study aimed to evaluate the association between SNPs of genes functional cytokine TNF- $\alpha$  (-308G/A) and IL-10 (-1082A/G) with resistance or susceptibility to active pulmonary tuberculosis in patients from the state of Pernambuco. Participated 282 individuals, divided into study groups according to clinical, radiological and laboratory tests. The case group consisted of 71 patients with active pulmonary tuberculosis, control 1: 53 patients with respiratory symptoms and latent tuberculosis, control 2: 57 patients with respiratory symptoms bearers of nonspecific lung infections and control 3 of 101 clinically healthy individuals, from of public health services. Were collected 5-10mL of sputum and 4.5 mL of peripheral blood, performed genomic DNA extraction and determination of genetic polymorphism using Real-time PCR. Analysis polymorphic comparative study groups showed that the mutant allele-1082G [p <0.0001, OR = 3.90 [2:45-6:59] and genotypes-1082GA [p <0.0001, OR = 2.90 [1:42-5.95] e-1082GG [p <0.0001, OR = 15:50 [5:18-1.62] was associated with the risk of developing pulmonary tuberculosis when the case group was compared with control 3. The genotype -308AG [p = 0.005, OR = 0.374 [0.17-0.76] showed a statistically significant association between the case group and control 3. There was no statistically significant difference in the association analysis of SNPs-308G/A and-1082A/G in the comparison between the case group and controls 1 and 2. Thus, mutant allele-1082G carriers, equivalent to increased protein levels of IL-10 may influence the immune response against *M. tuberculosis*. However, carriers of the-308GA genotype showed a protective factor for disease development. The study demonstrated that the SNPs has an important role in susceptibility or resistance to pulmonary tuberculosis in the Pernambuco population studied.

**Keywords:** Pulmonary tuberculosis, Single nucleotide polymorphisms, TNF- $\alpha$  (-308G/A), IL-10 (-1082A/G)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Incidência global de tuberculose.	21
<b>Figura 2</b> - Percentual de casos bacíferos notificados por região.	23
<b>Figura 3</b> - Microscopia eletrônica do bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	25
<b>Figura 4</b> - A transmissão aerógena da tuberculose pulmonar.	27
<b>Figura 5</b> - A resposta imune celular na tuberculose.	39
<b>Figura 6</b> - Localização do gene do TNF no complexo principal de histocompatibilidade de classe III.	43
<b>Figura 7</b> - Estrutura e localização de SNPs funcionais (-1082G/A; -819C/T; -592C/A) do gene da IL-10.	44
<b>Figura 8</b> - Fluxograma de investigação de infecção respiratória aguda e crônica, a partir de casos sintomáticos respiratórios.	52
<b>Figura 9</b> - Curva de amplificação de DNA para o SNP -1082A/G do gene da IL-10.	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características clínicas e demográficas dos pacientes sintomáticos respiratórios provenientes de unidades de saúde da cidade do Recife-PE.	60
<b>Tabela 2</b> - Características laboratoriais dos pacientes sintomáticos respiratórios participantes do estudo.	61
<b>Tabela 3</b> - Análise das frequências alélicas e genotípicas de SNPs dos genes da <i>IL-10</i> (-1082) and <i>TNF</i> (-308) dos pacientes e indivíduos participantes do estudo e associação com a tuberculose pulmonar ativa.	66
<b>Tabela 4</b> - Análise da frequência do SNP -1082A/G referência do gene da <i>IL-10</i> na população mundial.	67
<b>Tabela 5</b> - Análise da frequência do SNP referência -308G/A do gene do <i>TNF-<math>\alpha</math></i> na população mundial.	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
a.C.	Antes de Cristo
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATA	Associação Torácica Americana
B7-1 e B7-2	Molécula glicoprotéica
BACTEC	Sistema Automatizado de Hemocultura
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
C	Citosina
CBA/J	Linhagem de camundongo
CCL2	Quimiocina
CD	Receptores de superfície celular
CDC	Centro de Controlde de Doenças
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Ct	Ciclo “ <i>threshold</i> ”
DM	Diabetes mellitus
DOTS	Tratamento Diretamente Observado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FcRs	Receptores para a porção Fc de anticorpos
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FoxP3	Fator de transcrição FoxP3
G	Guanina
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HC	Hospital das Clínicas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígenos de Leucócitos Humanos
H37Rv	Cepa de referência virulenta de <i>M. tuberculosis</i>
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon gama

IUATLD	União Internacional contra a tuberculose e Doenças do Pulmão
kDa	kilodalton
LIE	Laboratório de Imunoepidemiologia
Log	Logarítmo
MBL	Lectina ligadora de manose
MGB	Minor groove binder
MGIT	Tubo indicador de crescimento de Micobactéria
MHC	Molécula de histocompatibilidade principal
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MS	Ministério da Saúde
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK	Célula natural killer
NOS2A	Síntase do óxido nítrico
NPT	Núcleo de Plataforma Tecnológica
NRAMP1	Resistência natural associada à proteína 1 do macrófago
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
PAL	Abordagem Sistematizada do Sintomático Respiratório
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Pernambuco
pH	Potencial hidrogeniônico
PNB	Ácido para-nitrobenzóico
PPD	Derivado Protéico Purificado
PT	Prova tuberculínica
PSF	Postos de Saúde da Família
qPCR	PCR em Tempo Real
Raio-X	Radiografia do tórax
Ref	Referência
RNA	Àcido Ribonucléico

RNTA	Associação Real Holandesa de Tuberculose
rpm	Rotação por minuto
SNP	Polimorfismo de base única
SR	Sintomático respiratório
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina
TB	Tuberculose
TCH	Hidrazida do ácido 2 carboxílico
TLR	Receptor do tipo Toll
Th1	Célula T helper 1
Th2	Célula T helper 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Célula T regulatória
TT	Teste tuberculínico
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UT	Unidade de tuberculina
VDR	Receptor de vitamina D
WHO	Organização Mundial de Saúde
ZN	Ziehl-Nielsen



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	19
<b>2.1 Visão Histórica da tuberculose</b>	19
<b>2.2 Epidemiologia da tuberculose</b>	20
2.2.1 A Tuberculose no mundo	20
2.2.2 A tuberculose no Brasil	22
2.2.3 A Tuberculose em Pernambuco	23
<b>2.3 O Agente etiológico – <i>M. tuberculosis</i></b>	24
<b>2.4 Mecanismos de transmissão</b>	25
<b>2.5 Métodos diagnósticos e tratamento</b>	27
2.5.1 Exame Radiológico	28
2.5.2 Prova Tuberculínica	29
2.5.3 Exame microscópico direto – Baciloscopia Direta	30
2.5.4 Cultura microbiológica para Micobactéria	30
2.5.5 Métodos Moleculares	31
2.5.6 Tratamento da tuberculose	32
<b>2.6 Mecanismos de proteção imunológica e imunopatogênese da tuberculose</b>	32
2.6.1 Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) na tuberculose	39
2.6.2 Interleucina 10 (IL-10) na tuberculose	40
<b>2.7 Polimorfismos Genéticos</b>	41
2.7.1 SNPs na tuberculose	42
2.7.2 Genotipagem por PCR em tempo real (qPCR)	45
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	47
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b>	48
<b>5 HIPÓTESE</b>	49
<b>6 OBJETIVOS</b>	50
<b>6.1 Objetivo Geral</b>	50
<b>6.2 Objetivos Específicos</b>	50
<b>7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b>	51
<b>7.1 População da pesquisa</b>	51
<b>7.2 Local do estudo</b>	52

<b>7.3 Desenho do estudo</b>	53
<b>7.4 Tipo e tamanho da amostragem</b>	53
<b>7.5 Critérios de Inclusão</b>	53
<b>7.6 Critérios de Exclusão</b>	54
<b>7.7 Critérios de definição de co-morbidades e covariáveis utilizados no estudo</b>	54
<b>7.8 Aspectos Éticos</b>	54
<b>7.9 Técnicas laboratoriais</b>	55
7.9.1 Teste Tuberculínico	55
7.9.2 Teste rápido para a detecção do HIV 1 e 2	55
7.9.3 Método de coleta de sangue periférico e obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	55
7.9.4 Método de coleta e descontaminação do escarro	56
7.9.5 Baciloscopia do escarro	56
7.9.6 Cultura por Löwestein-Jensen e Identificação de micobactérias em amostra de escarro	56
7.9.7 Extração e purificação de DNA genômico de PBMC	57
7.9.8 Determinação do Polimorfismo Genético	57
<b>7.10 Análise comparativa das frequências dos SNPs -308G/A e -1082A/G</b>	58
<b>7.11 Análise Estatística</b>	59
<b>8 RESULTADOS</b>	60
<b>8.1 Características clínicas, demográficas e laboratoriais dos pacientes participantes do estudo</b>	60
<b>8.2 Distribuição da frequência alélica e genotípica do SNP na posição -1082A/G do gene da IL-10 na população estudada e sua associação com o desenvolvimento da tuberculose pulmonar ativa</b>	64
<b>8.3 Distribuição da frequência alélica e genotípica do SNP na posição -308G/A do gene do TNF-<math>\alpha</math> na população estudada e sua associação com o desenvolvimento da tuberculose pulmonar ativa</b>	66
<b>8.4 Análise comparativa das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs estudados na população mundial</b>	67
<b>9 DISCUSSÃO</b>	68
<b>10 CONCLUSÕES</b>	79
<b>11 PERSPECTIVAS</b>	80

<b>REFERÊNCIAS</b>	81
<b>APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	95
<b>APÊNDICE B - PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE</b>	97
<b>ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS</b>	104

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento. No entanto, a incidência da doença tem aumentado nos países desenvolvidos. Um terço da população mundial está infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, mas apenas cerca de 5% dos indivíduos desenvolvem a doença ativa no primeiro ano de infecção (TB primária) e outros 5% em alguma fase de sua vida (TB reativação) (ORAL et al., 2006). Nesses indivíduos, o risco de adoecimento dependerá da capacidade do seu sistema imunológico em controlar a multiplicação do bacilo. A principal forma clínica da tuberculose é caracterizada pelo comprometimento pulmonar, acometendo 80-85% dos casos (PANDOLFI et al., 2007).

A tuberculose é uma doença granulomatosa crônica, causada pelo *M. tuberculosis* (*Mtb*). Vários fatores estão envolvidos na sua patogênese, tais como, ambientais, sociais e os componentes genéticos dos indivíduos (CORREA et al., 2004). A transmissão da tuberculose ocorre por via aérea e logo após o estabelecimento da infecção, os macrófagos alveolares do hospedeiro fagocitam as micobactérias, onde citocinas pró-inflamatórias são sintetizadas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), desempenhando um papel fundamental na resposta imune de resistência contra o bacilo (HENAO et al., 2006).

Citocinas produzidas no pulmão, principalmente do tipo 1, após interações entre linfócitos T e macrófagos infectados são essenciais no controle da tuberculose. Estudos demonstraram que fatores genéticos do hospedeiro desempenham um importante papel na susceptibilidade/resistência à tuberculose pulmonar (BELLAMY, 2005; MERZA et al., 2009). Portanto, a identificação de genes do hospedeiro responsáveis pela suscetibilidade e resistência a TB deverá fornecer uma contribuição significativa para o entendimento da imunopatogênese, podendo levar ao desenvolvimento de medidas profiláticas e estratégias de tratamento (LEANDRO et al., 2009; ORAL et al., 2006).

O curso da infecção pelo *M. tuberculosis* é regulado por dois distintos padrões de citocinas produzidas e secretadas por células T. As células T helper 1 (Th1), produtoras das citocinas INF- $\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  estão associadas à resistência à infecção. Estas citocinas desempenham um papel importante da resposta inflamatória contra o *Mtb*, ativando os mecanismos microbicidas do macrófago e participando da formação do granuloma tuberculoso. O TNF- $\alpha$  está envolvido na organização e controle do granuloma e em sinergismo com o IFN- $\gamma$ , induz a expressão de uma enzima que estimula a produção de óxido nítrico, um potente agente antimicobacteriano. Além disso, o TNF- $\alpha$  pode estimular a migração celular, a

expressão de moléculas de adesão e quimiocinas (DLUGOVITZKY et al., 1997). Por sua vez, as citocinas produzidas por células Th2, IL-4, IL-10 e IL-13, inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias através da sua ação sobre as células Th1 e macrófagos (HASAN et al., 2008). É importante que respostas pro-inflamatórias sejam controladas ou reprimidas para minimizar o dano tecidual na TB (OH et al., 2007). A Interleucina 10 (IL-10) é uma citocina reguladora, que atua inibindo as respostas inflamatórias tipo 1. Esta citocina desempenha um papel central durante a fase latente/crônica da tuberculose pulmonar, e o seu aumento, tem sido associado com a promoção da reativação da tuberculose (TSO et al., 2005).

Diferenças na produção de citocinas durante a resposta imune do hospedeiro contra o *Mtb* podem exercer um desequilíbrio no balanço Th1/Th2, associado com o desenvolvimento da doença ativa (TRAJKOV et al., 2009). Diversos trabalhos têm indicado o importante papel das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 na imunopatogênese da tuberculose (ATES et al., 2008; OH et al., 2007). Esses estudos tem demonstrado que polimorfismos de base única (SNPs) em regiões promotoras de genes de citocinas influenciam a natureza da resposta imunológica, com variações interindividuais e que podem estar envolvidos na susceptibilidade, gravidade e evolução clínica da tuberculose em diferentes grupos étnicos. Diversos SNPs localizados em regiões promotoras de genes que codificam diferentes proteínas, em particular os genes do TNF- $\alpha$  e IL-10, têm sido descritos (DELGADO et al., 2002; LARCOMBE et al., 2008; MERZA et al., 2009). Estudos genéticos demonstraram uma significativa variação do componente genético na resposta imunológica contra o *Mtb*, onde há evidências conflitantes da associação de polimorfismos para TNF- $\alpha$  e IL-10 com tuberculose pulmonar ativa em pacientes de diferentes grupos étnicos (HENAO et al., 2006; BEN-SELMA et al., 2011).

O presente trabalho visa determinar uma possível associação entre os polimorfismos funcionais dos genes de citocinas TNF- $\alpha$  (-308G/A) e IL-10 (-1082A/G) com a suscetibilidade ou resistência a tuberculose pulmonar ativa em pacientes oriundos do estado de Pernambuco. A resposta imune, protetora ou não, ao desenvolvimento da tuberculose está ligada a uma rede de citocinas que são produzidas durante o curso da infecção. Desta forma, reconhecer os mecanismos moleculares que antecedem a produção destas citocinas, além de fornecer um maior conhecimento da relação entre o bacilo e o hospedeiro, representa um poderoso campo a ser explorado para investimentos em pesquisas de novas vacinas, imunoterapia e tratamento medicamentoso.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Visão Histórica da tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa crônica que possui como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Acredita-se que esta micobactéria, também conhecida como bacilo de Koch, seja anterior ao próprio homem, sucedendo formas mais elementares da vida microscópica (BERTOLLI-FILHO, 2001). Os primeiros registros a cerca de casos da doença remetem ao período neolítico (7.000-3.000 a.C.) no Egito, Índia e China, respectivamente (DANIEL, 1997), incluindo casos de tuberculose vertebral, intestinal e pulmonar (HASS; HASS, 1996).

Apesar de ter sido descrita, pela primeira vez, em textos indianos, a TB pulmonar é conhecida no antigo Egito desde o tempo de Hipócrates, que impressionado pelo emagrecimento progressivo e debilitação do doente, designava a moléstia por tísica (phtisis, em grego) que significa consumpção (BERTOLLI-FILHO, 2001). Os egípcios, considerados um dos povos mais sadios da Antiguidade, já nesta época, percebendo a progressão em cadeia da tuberculose, mantinham seus doentes em isolamento e acreditavam que a possibilidade de cura da doença era através do repouso e de lugares de montanhas (DANIEL, 1997).

Nos pulmões do ser humano, o *M. tuberculosis* encontrou um micro-ecossistema favorável à sua sobrevivência, favorecido pela possibilidade de reprodução em um ambiente ao mesmo tempo quente e úmido, arejado e sombrio. Com a proliferação bacilar em forma de colônias, usualmente há migração dos bacilos para outras regiões do aparelho respiratório, por meio das vias bronco-gênica, linfática e hematogênica, disseminando-se por todo o organismo, enquanto que outra parte é expelida pelas vias aéreas, permanecendo em suspensão no ar (BERTOLLI-FILHO, 2001).

Um dos grandes trabalhos sobre TB foi realizado em 1882, por Robert Koch, um renomado cientista da época, que conseguiu isolar e cultivar o *M. tuberculosis* de tubérculos macerados. Seus experimentos identificaram a micobactéria como o agente etiológico da doença, (BLOOM; MURRAY, 1992; DANIEL, 1997). Posteriormente, em 1890, Koch anunciou a descoberta de um líquido específico, nomeado tuberculina, que poderia ser utilizado como uma ferramenta de diagnóstico para detectar a doença, devido à intensidade da reação em animais doentes quando inoculados com esta substância. Este conceito perpetuou-se por vários anos até descobrirem que animais saudáveis também poderiam reagir à tuberculina. Como resultado, ficou estabelecido que animais infectados pelo *M. tuberculosis*

reagiriam à tuberculina, enquanto que os não-infectados não reagiriam. Dessa forma, a prova tuberculínica tornou-se a principal ferramenta para diagnosticar casos de infecção pelo *M. tuberculosis* (DUCATI, 2006). No mesmo período, Koch desenvolveu outros métodos para coloração do bacilo, sendo estas técnicas, posteriormente melhoradas pelo médico e bacteriologista alemão, Paul Ehrlich. Desta forma, o método de detecção desenvolvido específico para o bacilo proporcionou a base para a coloração de Ziel-Nielsen, a qual, ainda hoje, é uma importante ferramenta no diagnóstico da TB pulmonar (DUCATI, 2006).

No Brasil, acredita-se que a doença foi introduzida pelos portugueses e missionários jesuítas desde 1500. A vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin) foi implantada em 1973, logo se tornando obrigatória para os menores de um ano. A mortalidade por tuberculose, que secularmente vinha diminuindo, sofreu importante impacto positivo com a introdução da quimioterapia de curta duração, chegando a diminuir 50%, da década de 70 para a de 80 (DUCATI, 2006; RUFFINO-NETO, 2002).

## **2.2 Epidemiologia da tuberculose**

### **2.2.1 A Tuberculose no mundo**

Em virtude das taxas de incidência e mortalidade ocasionadas pela tuberculose no mundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou, em 1993, a situação da TB como estado de emergência global. Esta própria instituição se deu conta de que, sozinha, não conseguiria controlar a doença. Criou-se, então, o programa "STOP TB" que reúne instituições de alto nível científico e/ou poder econômico, tais como: a própria Organização Mundial da Saúde, o Banco Mundial, o Centers for Disease Control (CDC), a International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), a Royal Netherlands Tuberculosis Association (RNTA) e a American Thoracic Association (ATA) (RUFFINO-NETO, 2002).

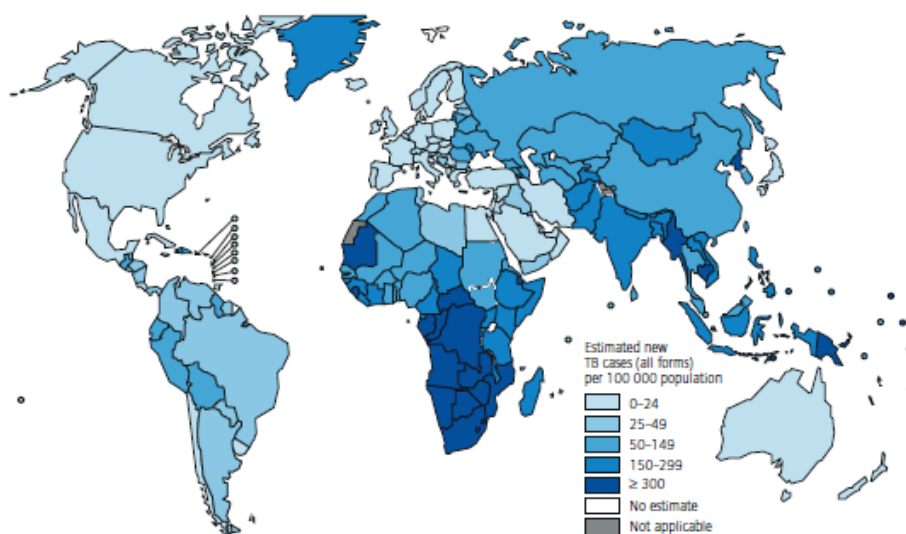
O ressurgimento da TB pode ser atribuído a vários fatores, tais como: o aumento na resistência às drogas tuberculostáticas; pandemia do Vírus da Imunodeficiência Humana/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV/AIDS) no início dos anos 80; a elevada taxa de abandono de tratamento; o aumento do uso de drogas injetáveis; a desigualdade social; o aumento do número de imigrantes de altas taxas de prevalência para países desenvolvidos, o envelhecimento da população mundial; a transmissão ativa nos ambientes de aglomeração humana (prisões, hospitais, abrigos de moradores de rua) e a

degradação dos sistemas públicos de saúde (BLOOM; MURRAY, 1992; FATKENHEUER et al., 1999).

A maioria dos casos de TB ocorridos em 2010 está em países localizados na Ásia (59%) e África (26%); menores proporções de casos ocorreram na região leste do mediterrâneo (7%), Europa (5%) e na América Latina (3%) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012). Desde o ano de 2000, 22 nações têm recebido uma atenção especial, pois, estas, respondem por 81% dos casos estimados no mundo inteiro. Índia, China, África do Sul, Indonésia e Paquistão ocupam, respectivamente, as primeiras posições em números de casos da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012) (Figura 1).

A TB permanece ainda neste milênio, como a doença infecciosa que mais mata no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2012), cerca de um terço da população mundial estava infectada pelo *M. tuberculosis* no ano de 2011. Nesse mesmo ano, ocorreram cerca de 8,7 milhões de casos em todo o mundo (125/100.000 habitantes), resultando em 1,1 milhões de mortes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

**Figura 1-** Incidência global de tuberculose.



**Fonte:** Organização Mundial de Saúde (2012)

**Nota:** Número de novos casos da doença por 100.000 habitantes em 2011



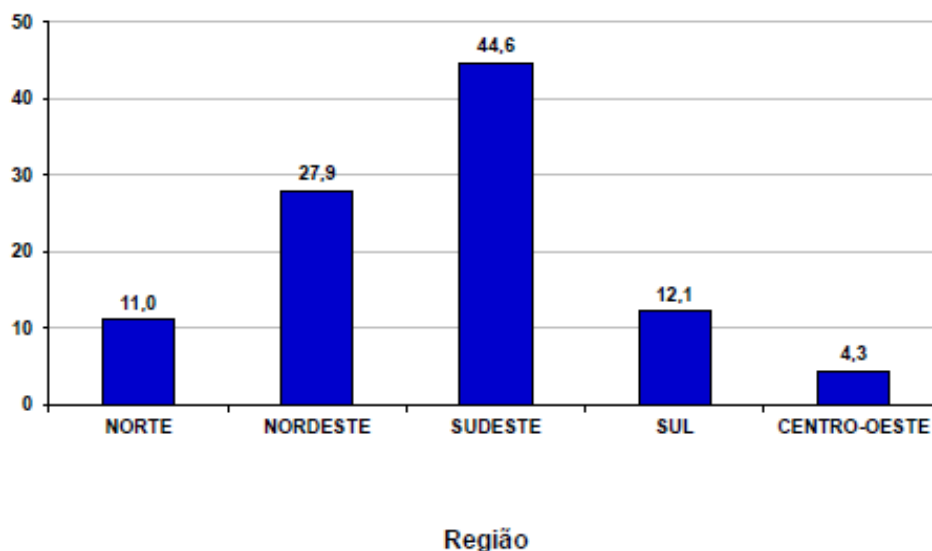
### 2.2.2. A tuberculose no Brasil

A tuberculose é uma doença que está intimamente ligada com a miséria e com a exclusão social. No Brasil, é uma doença que afeta, principalmente, as periferias urbanas ou aglomerados urbanos denominados de favelas e, geralmente, está associada às más condições de moradia e alimentação, à falta de saneamento básico, ao abuso do álcool, tabaco e de outras drogas (BRASIL, 2012a).

O Brasil é um dos 22 países priorizados pela OMS que abrangem 82% dos casos de tuberculose no mundo. Atualmente, o país está em 17º lugar, já tendo ocupado o 14º em 2004 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011). Contudo, ainda é o único país da América Latina entre as 22 nações com o maior percentual de indivíduos tuberculosos. Desde 1990, se observou que a taxa de incidência de TB no Brasil vem apresentando uma queda de 1,4% ao ano, resultando em uma diminuição de 26% nessas duas últimas décadas. Estima-se, porém, que em 2011, ocorreram cerca de 90.000 casos novos da doença, entretanto devido às falhas nos serviços de saúde só foram notificados 78% destes, revelando um número de, aproximadamente, 71.000 casos novos da doença, (85% da forma pulmonar) apresentando uma taxa de incidência de 37 para cada grupo de 100.000 habitantes. Além disso, a TB tem sido relacionada como a 4ª causa de morte por doenças infecciosas, sendo a 1ª causa entre os indivíduos portadores de AIDS (BRASIL, 2012a).

Apesar dos esforços que tem sido empregado para o controle, sobretudo, da TB pulmonar no Brasil, os números de casos da doença, ainda, são extremamente preocupantes, seja considerando a situação do país como um todo ou apenas por regiões. Em 2011, do total de casos bacilíferos notificados, 44,6% concentraram-se na região Sudeste, 27,9% no Nordeste, 12,1% no Sul, 11% no Norte e 4,3% na região Centro-Oeste (Figura 2). Os estados responsáveis pelas maiores taxas de incidência da doença foram: Rio de Janeiro (62,7%) Amazonas (61%), Pará (48%) e Pernambuco (47%) (BRASIL, 2012b).

O Ministério da Saúde (MS) define a tuberculose como prioridade entre as políticas governamentais de saúde, estabelecendo diretrizes para as ações e fixando metas para o alcance de seus objetivos. As ações para o controle da tuberculose no Brasil têm como meta diagnosticar pelo menos 90% dos casos esperados e curar pelo menos 85% dos casos diagnosticados. A expansão das ações de controle para 100% dos municípios complementa o conjunto de metas a serem alcançadas (BRASIL, 2002).

**Figura 2** - Percentual de casos novos bacilíferos de TB notificados por região.

SVS Secretaria de Vigilância em Saúde  
 Fonte: MS/Sinan. \* Dados preliminares sujeitos a revisão

Ministério da Saúde  
**BRASIL**  
 PAÍS RICO E PAÍS SEM POBREZA

Fonte: Brasil (2011)

### 2.2.3. A Tuberculose em Pernambuco

A Região Nordeste, segundo o Ministério da Saúde, apresenta a terceira maior taxa de incidência de tuberculose, com 36,3 casos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2012a). No estado de Pernambuco foram notificados, no ano de 2011, 4.096 casos da doença, sendo cerca de 3910 casos de TB pulmonar (86% dos casos) (BRASIL, 2012). Atualmente, o estado ocupa a 4ª posição em incidência e o 2º em mortalidade entre os estados brasileiros (BRASIL, 2012a).

Os esforços para o combate à tuberculose datam de 1849, quando o médico Joaquim de Aquino Fonseca, dirigente do Conselho Geral de Salubridade da Província de Pernambuco, alertou o governo sobre o aumento dos casos de tuberculose. Neste mesmo ano, o médico Octávio de Freitas voltou-se inteiramente para o enfrentamento dessa doença, do qual resultou a criação da Liga Pernambucana contra a Tuberculose, inaugurada em julho de 1900 no Teatro Santa Isabel (BRASIL, 2012b).

Atualmente, o governo brasileiro considera Recife uma das cidades brasileiras com maior prioridade para a execução de medidas de controle para a TB. Além disso, a população carcerária pernambucana é uma das mais afetadas pela doença, tendo sido registrados em 2010, 1.517 casos nos presídios do Estado (BRASIL, 2012b).

### 2.3 O Agente etiológico – *M. tuberculosis*

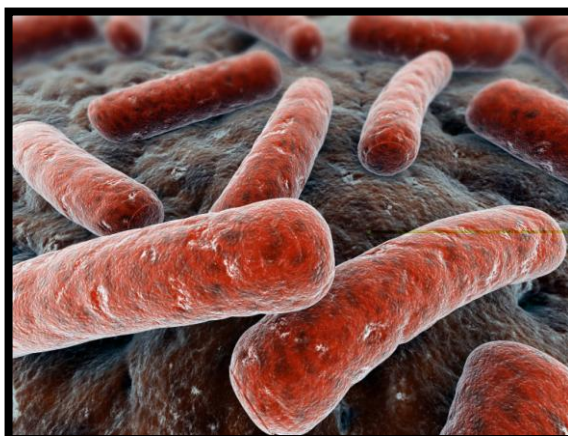
Atualmente, são reconhecidas 120 diferentes espécies de micobactérias. Estas espécies estão incluídas no gênero *Mycobacterium*, no qual pertence à família *Mycobacteriaceae* que juntamente com as famílias *Actinomycetaceae*, *Nocardiaceae*, *Streptomyetaceae* e outras famílias bacterianas compõem a ordem Actinomycetales (TORTORA, 2005).

Foram identificadas 60 espécies do gênero *Mycobacterium*, sendo a maioria bactérias saprófitas do solo e a minoria patogênica ao ser humano, causando a tuberculose (*M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*) e hanseníase (*M. leprae*) (DUCATI et al., 2006).

O *M. tuberculosis* é o principal agente etiológico da tuberculose em humanos. É um bacilo imóvel, ligeiramente encurvado de 1,0 a 4,0 µm de comprimento e 0,3 a 0,6 µm de diâmetro, não esporulado e que não produz toxinas (Figura 3). É uma espécie aeróbica estrita, cujo único reservatório é o ser humano, necessitando de oxigênio para crescer e se multiplicar (KRITSKI et al., 2000). É um parasita intracelular facultativo, podendo viver no interior de células fagocitárias, estabelecendo sua infecção, preferencialmente, no sistema pulmonar, onde normalmente condiciona-se em um estado de latência enquanto o sistema imunológico do hospedeiro prevalece e mantém a infecção sob controle (DUCATI et al., 2006).

É considerada, também, uma micobactéria do tipo álcool-ácido resistente, de crescimento lento, com tempo de geração de, aproximadamente, 24 horas, tanto em meio artificial quanto em organismos animais, dependendo da oferta de oxigênio, de nutrientes e do pH do meio, sendo necessárias várias semanas para que as colônias tornem-se visíveis no meio de cultura (DUCATI et al., 2006; KRITSKI et al., 2000;). Muitas das características dessas micobactérias, como sua coloração álcool-ácido resistente, a resistência a drogas, sua patogenicidade e a taxa de crescimento lento, estão relacionadas à estrutura lipídica, distinta, de sua parede celular. Essa parede é formada, em sua porção externa, por ácido micólico, que forma uma camada cerosa, resistente à água. Devido às características de sua parede celular, as micobactérias conseguem resistir a situações adversas como ao ressecamento e algumas drogas antimicrobianas (TORTORA et al., 2005). O crescimento lento desse gênero de bactérias deve-se à dificuldade em que os nutrientes têm de atravessar sua parede celular. Normalmente, levam-se de 4 a 8 semanas para que se consiga visualizar uma colônia crescida em meio de cultura específico para as micobactérias (TORTORA et al., 2005).

**Figura 3** - Microscopia eletrônica do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*.



Fonte: Elawad (2013)

## 2.4 Mecanismos de transmissão

Apesar de um terço da população mundial está infectada com o *Mtb*, nem todos os indivíduos infectados desenvolvem a doença ativa. Observa-se uma grande variabilidade nas taxas de infecção entre os indivíduos expostos a diferentes fontes de infecção, entre 10-30% se tornam infectadas, e entre os infectados, cerca de 90% nunca irão desenvolver a doença. A probabilidade de um indivíduo imunocompetente infectado desenvolver a forma ativa da tuberculose é de cerca de 5% no primeiro ano e de 10% durante toda a vida e está associada a fatores ambientais, do hospedeiro e do próprio microorganismo como a concentração de bacilos eliminados no ambiente, período de tempo de exposição, virulência da cepa e a imunidade do indivíduo exposto (DUCATI et al., 2006; JABADO; GROS, 2005; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011).

A infecção pelo bacilo da tuberculose pode ocorrer em qualquer idade, mas geralmente acontece na infância. As vias respiratórias são a principal porta de entrada do *M. tuberculosis*, onde uma vez inalados, os bacilos fixam-se na árvore traqueobrônquica, sendo eliminados, na maioria das vezes, pelo sistema de defesa mucociliar. A infecção se estabelece comumente nos pulmões, ocasionando a forma pulmonar da doença, mas o bacilo é capaz de acometer diferentes sítios do organismo humano, desenvolvendo a forma extrapulmonar (DUCATI et al., 2006).

Em circunstâncias naturais, o *M. tuberculosis* é transmitido de indivíduo infectado para um não infectado através da fala, tosse ou espirro (KRITSKI et al., 2000). Os bacilos presentes na secreção pulmonar são atomizados em gotículas microscópicas (gotículas de Pflugge) e após sofrerem evaporação, permanecem em suspensão no ar, na forma de um

núcleo infeccioso composto de um a dois bacilos (núcleos de Wells). Estes núcleos, com diâmetro de até 5 µm, podem ser inalados por um indivíduo sadio e, posteriormente, atingir os bronquíolos e alvéolos, iniciando-se, dessa forma, a multiplicação bacilar no interior do pulmão do novo hospedeiro (BLOOM; MURRAY, 1992; CLARK-CURTISS; HAYDEL, 2003). As gotículas, contendo o bacilo, quando inaladas podem ficar no trato respiratório superior (nariz e/ou garganta), onde a infecção é improvável de acontecer, contudo, quando os bacilos atingem os alvéolos a infecção pode se iniciar (BRASIL, 2002) (Figura 4).

A tuberculose inicia como um processo inflamatório do tipo exsudativo com característica pneumônica. Com a progressão, os sintomas clássicos, como expectoração, tosse, febre, sudorese noturna, anorexia e perda de peso corporal podem aparecer. Caseificação e cavitação podem estar presentes, principalmente nos lobos superiores. Por outro lado, se a infiltração inicial progride para a cronicidade, o processo pode estabilizar com o desenvolvimento de fibrose (SMALL; FUJIWARA, 2001).

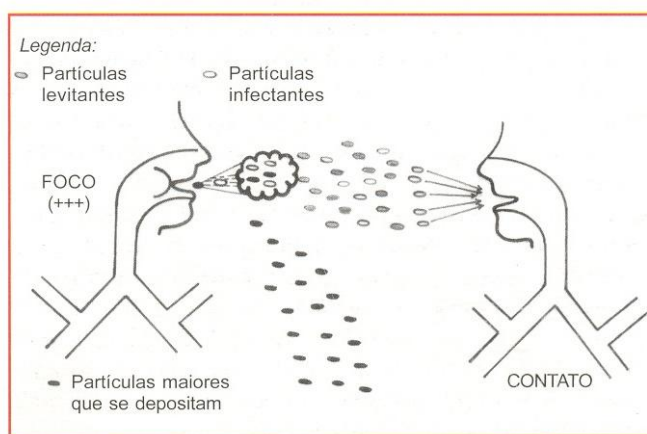
A possibilidade de instalação de uma lesão progressiva é diretamente proporcional ao número de bacilos inalados e à virulência destes é inversamente proporcional à resistência natural e adquirida do hospedeiro. Macrófagos alveolares, responsáveis pela defesa da mucosa alveolar, englobam os bacilos, e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

Em indivíduos imunocompetentes suscetíveis, a doença envolve exclusivamente o pulmão em 85% dos casos. Nos indivíduos imunocomprometidos, como aqueles infectados com HIV, a TB pode, freqüentemente, tornar-se uma doença disseminada, havendo maior freqüência de localizações extra-pulmonares (TEIXEIRA et al., 2007).

Os doentes bacilíferos, aqueles cuja baciloscopia de escarro é positiva, são a principal fonte de infecção. Pacientes com tuberculose pulmonar cuja baciloscopia seja negativa, mesmo que tenham resultado positivo na cultura, são muito menos eficientes como fontes de transmissão, embora possa ocorrer. As formas exclusivamente extrapulmonares não transmitem a doença (BRASIL, 2011).

Mesmo sendo a TB uma doença contagiosa, não é fácil para o bacilo encontrar condições favoráveis (intrínsecas ao hospedeiro ou ao ambiente) para invadir o organismo e estabelecer a doença ativa (STEIN, 2011). É importante enfatizar que a prevenção contra tuberculose através da vacinação com a BCG só é eficaz para proteger os indivíduos das formas mais graves da doença, evitando a sua disseminação e evolução para as formas extrapulmonares (PALOMINO, 2007).

**Figura 4 -** A transmissão aerógena da tuberculose pulmonar.



**Fonte:** Veronesi (2005)

## 2.5 Métodos diagnósticos e tratamento

Diagnosticar e tratar corretamente os casos de TB pulmonar são as principais medidas para o controle da doença. Neste contexto, esforços devem ser realizados no sentido de identificar precocemente a doença para oferecer tratamento adequado e, sobretudo interromper a cadeia de transmissão. A TB na forma pulmonar, por ser bacilífera além de ser mais freqüente, é também a mais relevante para a saúde pública, sendo responsável pela transmissão da doença (BRASIL, 2011).

Sendo assim, a busca ativa de pessoas com tosse prolongada deve ser uma estratégia priorizada nos serviços de saúde, visto que, cerca de 90% dos casos de TB são da forma pulmonar e, destes, 60% são bacilíferos (BRASIL, 2011).

A tuberculose pode ter várias formas de apresentação clínica, de acordo com o órgão acometido. Desta forma, outros sinais e sintomas, além da tosse prolongada, podem ocorrer e devem ser valorizados na investigação individualizada, sobretudo em regiões onde a doença é endêmica (CONDE; SOUZA, 2009; BRASIL 2011). Os sintomas clássicos da tuberculose

pulmonar são tosse persistente, produtiva ou não (com muco e eventualmente sangue), febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento (BRASIL, 2011).

Os métodos de diagnóstico, atualmente usados, como a baciloscopia, a cultura microbiológica, a radiografia de tórax, e o teste intradérmico realizado com o PPD (*purified protein derivative*) ou teste tuberculínico, não têm tido o sucesso desejado para diminuir a incidência da TB de forma significativa (FRIEDEN et al., 2003).

A pesquisa bacteriológica é o método prioritário para o diagnóstico e o controle do tratamento da tuberculose, uma vez que permite a identificação da fonte de transmissão da infecção (indivíduo bacilífero). Neste contexto, a descoberta precoce dos casos, o diagnóstico correto e o tratamento completo dos doentes com baciloscopia positiva constituem uma das principais medidas de controle da TB (BRASIL, 2012b).

### 2.5.1 Exame Radiológico

A radiografia de tórax é um método diagnóstico de grande importância na investigação da tuberculose (BURRIL, 2007; DALEY et al., 2009). Baseia-se na presença de opacidades radiológicas características, tendo utilidade no diagnóstico da tuberculose pulmonar primária (opacidade mais homogênea e aumento no volume dos linfonodos regionais) e secundária (opacidade heterogênea, presença de cavidades e nódulos. Diferentes achados radiológicos apontam para a suspeita de doença em atividade ou doença no passado, além do tipo e extensão do comprometimento pulmonar (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004).

Deve ser solicitada para todo o paciente com suspeita clínica de TB pulmonar. No entanto, até 15% dos casos de TB pulmonar não apresentam alterações radiológicas, principalmente nos pacientes imunodeprimidos. Nos pacientes com suspeita clínica, o exame radiológico permite a diferenciação de imagens sugestivas de tuberculose ou de outra doença, sendo indispensável submetê-los a exame bacteriológico. Em suspeitos radiológicos de tuberculose pulmonar com baciloscopia direta negativa, deve-se afastar a possibilidade de outras doenças, recomendando-se a cultura para micobactéria (BRASIL, 2011).

O estudo radiológico tem, ainda, importante papel na diferenciação de formas de tuberculose de apresentação atípica e no diagnóstico de outras pneumopatias no paciente portador de HIV/AIDS ou de outras situações de imunodepressão. Em pacientes com baciloscopia positiva, o exame radiológico tem como função principal a exclusão de doença pulmonar associada (por exemplo, câncer de pulmão em fumantes com alta carga de

tabagismo com idade superior a 40 anos) que necessite de tratamento concomitante, além de permitir avaliação da evolução radiológica dos pacientes, sobretudo naqueles que não respondem ao tratamento anti-TB (BRASIL, 2011).

A tomografia computadorizada do tórax é um método radiológico de alta resolução e mais sensível do que a radiografia de tórax, mas apresenta alto custo, só estando disponível em centros de referência (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004).

### 2.5.2 Prova tuberculínica

A prova tuberculínica (PT) existe a mais de cem anos e permanece inalterada por mais de sessenta anos. A PT tem sido utilizada como ferramenta auxiliar no diagnóstico da TB, pois apresenta uma alta positividade em indivíduos com a doença. Todavia, uma reação positiva não é suficiente para diagnosticar a TB como doença. Todas as pessoas com infecção anterior pelo *M. tuberculosis* podem apresentar uma resposta imune às proteínas contidas no bacilo (BRASIL, 2011).

No Brasil, a tuberculina utilizada é o Derivado Protéico Purificado (PPD RT-23), aplicada por via intradérmica no terço médio da face anterior do braço esquerdo do paciente, na dose de 0,1 mL, equivalente a 2UT (unidades de tuberculina). Quando conservada em temperatura entre 4°C e 8°C, a tuberculina mantém-se viva por seis meses. Não se deve, entretanto, ser congelada, nem exposta à luz solar direta. Esse método é caracterizado por uma reação celular desenvolvida na pele 24 a 72 horas após a inoculação intradérmica de um derivado protéico do *M. tuberculosis* (PPD) (BRASIL, 2011).

A técnica de aplicação e o material utilizado são padronizados pela Organização Mundial de Saúde e têm especificações semelhantes às usadas para a vacinação BCG. A injeção do líquido faz parecer uma área de limites precisos, pálida e de aspecto pontilhado como casca de laranja (BRASIL, 2011).

A resposta ao teste é classificada segundo o tamanho do nódulo e a graduação da reação cutânea é utilizada para aumentar a especificidade do resultado, sendo os valores: reator forte ( $\geq 10$  mm de endureção) - indicativos de infecção prévia pelo bacilo; reator fraco (5 a 9 mm de endureção) - decorrentes geralmente de infecções pelo *M. tuberculosis* ou por micobactérias não tuberculosas, como também pela vacinação prévia pelo BCG; e não reator (0 a 4 mm) - indicativo de indivíduos não infectados pelo bacilo. Cerca 70 a 80% dos



portadores de TB pulmonar em atividade apresentam a prova tuberculínica  $\geq 10$  mm de endureção (BETHLEM et al., 2000).

### 2.5.3 Exame microscópico direto – Baciloscopia Direta

A baciloscopia direta do escarro é o principal método no diagnóstico da TB pulmonar. Trata-se de um método rápido, de simples execução e de baixo custo que permite a visualização microscópica do bacilo através da coloração específica pelo Ziehl-Nielsen (ZN) (CAMPOS, 2006). No entanto só é positiva quando há grande concentração de bacilos no material examinado (5.000 – 10.000/mL de amostra). Dessa forma, apenas cerca de 60 a 80% dos doentes são positivos à baciloscopia (BRASIL, 2011).

O método Ziehl-Nielsen se baseia na coloração a quente com fucsina fenicada, seguida de descoloração com álcool-ácido, fazendo com que somente as micobactérias mantenham a coloração vermelha, por serem ácido-resistentes. Outra técnica utilizada é a fluorescência com auramina, apresenta a mesma acurácia do Ziehl-Nielsen, com tempo de leitura menor, mas é pouco empregada, pois exige pessoal treinado e tem custo mais elevado. Além disso, as lâminas positivas pela técnica de fluorescência precisam ser confirmadas pelo Ziehl-Nielsen (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004).

### 2.5.4 Cultura microbiológica para Micobactéria

O isolamento e a identificação do *M. tuberculosis* através da cultura é a metodologia que permite a confirmação da TB, sendo considerada, atualmente o padrão-ouro para o diagnóstico da doença, responsável pela identificação do bacilo em mais de 80% dos pacientes doentes e com especificidade acima de 98% (ARNOLD, 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011). É o método de referência (padrão-ouro) para avaliar um novo método diagnóstico (BRASIL, 2008).

Apesar de ser um método mais caro que a baciloscopia, a cultura apresenta inúmeras vantagens como maior sensibilidade, necessitando de uma carga bacilífera menor (10-100 bacilos/mL no espécime clínico) quando comparada a baciloscopia direta. Ao mesmo tempo, permite a identificação das espécies que estão envolvidas na infecção e promoção da TB, além de caracterizar a susceptibilidade das cepas aos medicamentos antitubercúlicos (CAMPOS, 2006). Contudo, devido ao crescimento lento, peculiar das micobactérias, a obtenção dos resultados por meio da cultura pode levar cerca de 4 a 8 semanas, retardando a

confirmação diagnóstica. Nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, a cultura pode aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico da doença (BRASIL, 2011).

Desde a década de 50, os métodos clássicos de cultura de micobactérias utilizados no laboratório são manuais. Os métodos clássicos utilizam a semeadura da amostra em meios de cultura sólidos. Os meios mais comumente utilizados são os sólidos à base de ovo, Lowestein-Jensen e Ogawa-Kudoh. Têm a vantagem de serem os de menor custo e de apresentarem um índice de contaminação menor. A desvantagem do meio sólido é o tempo de detecção do crescimento bacteriano que varia de 14 a 30 dias, podendo se estender até oito semanas (BRASIL, 2011).

A partir de 1980, os métodos de cultura tiveram avanços tecnológicos com o desenvolvimento de sistemas comerciais. Os sistemas automatizados para detecção de micobactérias como o BACTEC 460 TB®, BACTEC 9000® e o MGIT® são promissores, utilizam meios enriquecidos que promovem a aceleração do crescimento bacteriano, mas podem também indicar resultados falso-positivos devido à contaminação por outras bactérias (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2004). Esses sistemas utilizam um método de processamento e semeadura de amostras muito similar aos clássicos, de maneira que não diminui o trabalho prévio, assim o que acelera é a leitura, pois a incubação é monitorada por sistema informatizado (BRASIL, 2008).

### 2.5.5 Métodos moleculares

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

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

### 2.5.6 Tratamento da tuberculose

Apesar de ser uma doença grave e contagiosa, a TB é altamente curável em praticamente 100% dos casos novos, sensíveis aos medicamentos anti-TB, desde que obedecidos os princípios básicos da terapia medicamentosa e a adequada operacionalização do tratamento (BRASIL, 2011).

O tratamento preconizado, atualmente pela OMS consiste na administração de drogas como a isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol nos dois primeiros meses (fase de ataque) seguido pela combinação de rifampicina e isoniazida nos quatro meses seguintes (fase de manutenção) (BRASIL, 2011). Contudo, o longo tratamento promove reações adversas indesejáveis levando o paciente ao abandono da quimioterapia e ao possível surgimento de cepas resistentes ao tuberculostáticos. A não adesão ao tratamento tem levado a OMS a investir em uma estratégia global, conhecida como Tratamento Diretamente Observado (DOTS), no qual Agentes Comunitários de Saúde aconselham os doentes, realizam a vigilância progressiva e certificam que cada medicamento seja tomado na dose correta (DUCATI et al., 2006).

## 2.6 Mecanismos de proteção imunológica e imunopatogênese da tuberculose

A história natural da TB mostra que a maioria dos indivíduos é resistente à infecção, provavelmente, devido à capacidade de gerarem uma eficiente resposta imune contra o *M. tuberculosis* (NORTH; JUNG, 2004). A infecção pelo *M. tuberculosis* pode estar relacionada a três mecanismos fisiopatológicos: controle na porta de entrada (imunidade inata), tuberculose latente ou doença ativa. A evolução da doença depende também do indivíduo estar sendo infectado pela primeira vez (primo-infecção) ou re-infectado (LAPA E SILVA; BOÉCHAT, 2004).

A resposta imune inata precoce contra o *M. tuberculosis* é caracterizada pelo progressivo acúmulo de neutrófilos, monócitos, macrófagos inflamatórios intersticiais e células dendríticas nos pulmões. Como essas células são recrutadas, se tornam infectadas pela população de micobactérias em expansão, estabelecendo o granuloma inicial (KHADER, 2011).

Em indivíduos com o sistema imunológico eficiente, o bacilo aprisionado dentro do macrófago, pode permanecer latente por toda a vida, sem manifestar a doença. A disseminação linfática e hematogênica ocorre antes do desenvolvimento de uma resposta imune efetiva,

constituindo novos focos no organismo. Esta infecção denomina-se tuberculose primária e é, geralmente, assintomática. Nos casos em que a resposta imune é inadequada, a doença se desenvolve acompanhada de sintomas pulmonares. Nas infecções primárias, encontram-se lesões mínimas dos tecidos pulmonares (granulomas) associadas a uma adenopatia hilar, constituindo o Complexo de Gohn (ANDREOLI et al., 1997). A tuberculose pós-primária ocorre quando os mecanismos de defesa do organismo tornam-se comprometidos, reativando os sítios com bacilos viáveis que estavam em latência. Quando o indivíduo sofre a segunda infecção, a partir do contato com pessoas doentes, desenvolve a doença, com reativação endógena (CAMPOS; PIANTA, 2001). Em muitos casos de tuberculose ativa, uma imunodeficiência não foi encontrada. No entanto, a infecção com o vírus da imunodeficiência humana, o tratamento com corticosteróides, envelhecimento e abuso de álcool ou de drogas aumentam o potencial de reativação da tuberculose latente (FRIEDEN et al., 2003).

Logo após a infecção primária, os macrófagos alveolares e as células dendríticas que fagocitaram o *M. tuberculosis* migram através do sistema linfático em direção ao linfonodo regional e formam o complexo de Ghon. Ao mesmo tempo as células fagocíticas podem penetrar no parênquima pulmonar, iniciando um foco inflamatório ao redor do microorganismo, levando à formação do granuloma num processo coordenado por linfócitos T (TEIXEIRA et al., 2007).

Estudos envolvendo a análise da interação entre *M. tuberculosis* e células apresentadoras de antígeno demonstrou que as células dendríticas não permitem o crescimento intracelular de *M. tuberculosis*, ao contrário do que é observado em macrófagos (HERMANN et al., 2006). Nos macrófagos, a micobactéria reside nos fagossomas iniciais e escapa do sistema imune por inibir a maturação dos fagossomas e a fusão com os lisossomas (RUSSELL, 2007). O *M. tuberculosis* produz lipídios que mimetizam os fosfatidilinosítóis de mamíferos e com isso inibe as vias dependentes de fosfatidilinositol 3-fosfato em macrófagos infectados (VERGNE et al., 2004).

Além dos macrófagos alveolares, as células epiteliais das vias aéreas são outra população celular que interage muito precocemente com o *M. tuberculosis*. De fato, o número de células epiteliais nos alvéolos é 30 vezes maior do que o número de macrófagos e, portanto, com maior probabilidade de serem as primeiras células expostas ao bacilo infeccioso. A primeira indicação do envolvimento das células epiteliais foi derivada a partir de um estudo em que a presença do DNA micobacteriano foi detectada em amostras de necropsia de indivíduos que tinham morrido de outras doenças que não a tuberculose (HERNANDEZ-PANDO et al., 2009).

O granuloma tuberculoso tem sido classicamente considerado como um mecanismo que limita a difusão micobacteriana. É caracterizado pela presença de necrose caseosa central, com infiltrado periférico de macrófagos modificados (células epitelióides e gigantes), células T, células B e fibroblastos. A célula gigante tipo Langhans, formada pela fusão de macrófagos, apresenta citoplasma amplo e núcleos distribuídos na periferia celular em forma de ferradura (FERRAZ, et al., 2006). Em infecções latentes, o estado das bactérias dentro do granuloma ou tubérculo, não é conhecido. A infecção primária é frequentemente abortada, nesta fase, ainda que alguns bacilos persistam nos tecidos por meses ou décadas, sem crescimento, mas ainda viáveis, uma característica chamada "persistência não-replicativa". Em casos de tuberculose latente, o hospedeiro monta uma forte resposta imunológica, que contém, mas não elimina a infecção. O dano decorrente dessas infecções deve-se em menor proporção, aos efeitos diretos da bactéria nos tecidos do hospedeiro e em grande parte às reações de hipersensibilidade do hospedeiro agora sensível aos produtos da bactéria. Falha do mecanismo de resistência imunológica pode levar a reativação da doença (FERRAZ et al., 2006; FLYNN, 2004; OTTENHOFF et al., 2005).

Com relação à resposta imune inata, os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a localizar-se no sítio de multiplicação do bacilo, seguidas das células natural killer (NK) e macrófagos (Figura 5). As células NK podem destruir os patógenos diretamente, ou os monócitos infectados, e ativar células fagocíticas no sítio da infecção. O reconhecimento e a fagocitose de bactérias por células da imunidade inata (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) se dão via receptores de reconhecimento, como o receptor para manose, receptores para a porção Fc de anticorpos (FcRs), e receptores para produtos de ativação do sistema complemento, entre outros (NORTH & JUNG, 2004). A ativação de receptores do tipo Toll (Toll-like Receptors, TLRs), conduz a uma importante ligação entre a resposta imune inata e a adquirida (HERNANDEZ-PANDO et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2007).

O reconhecimento de micobactérias através de receptores Fc de macrófagos permite a fusão dos fagossomas contendo as bactérias com os lisossomas, aumentando a produção de intermediários reativos de oxigênio, ocasionando assim a morte bacteriana pela ação do óxido nítrico e enzimas lisossômicas. Ocorre também o recrutamento de células do sistema imunológico para a resposta inflamatória local e a apresentação de antígenos por moléculas de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, para o desenvolvimento da imunidade adquirida. Estas células desempenham um papel importante

na resposta protetora contra a *M. tuberculosis*, e quando eles estão ausentes, o crescimento do bacilo não pode ser controlado (RAJA, 2004).

A ativação dos linfócitos CD4<sup>+</sup> envolve o reconhecimento do peptídeo ligado ao MHC de classe II e a interação entre moléculas co-estimuladoras, como a interação CD80/CD86-CD28. Além disso, citocinas produzidas pelas células apresentadoras de antígenos, como a interleucina (IL)-12, e citocinas produzidas pelos linfócitos T ativados, como a IL-2, estão envolvidas na ativação e proliferação dos linfócitos T. Desta forma, antígenos específicos das micobactérias interagem com TLRs e outros receptores presentes na superfície de macrófagos e células dendríticas, induzindo, assim, uma resposta imune celular predominantemente pró-inflamatória (HERNANDEZ-PANDO et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2007).

O reconhecimento da micobactéria e posterior secreção de IL-12 por macrófagos são processos iniciados antes da apresentação de antígenos do *M. tuberculosis* aos linfócitos T. A IL-12 induz a produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) em células NK, na fase inicial da resposta imune, e também induz a ativação, diferenciação, produção de IFN- $\gamma$  e expansão de células Th1 antígeno-específicas (OTTENHOFF et al., 2005).

Além da importante função de células T CD4<sup>+</sup> na produção de citocinas, como o IFN- $\gamma$ , que ativa macrófagos e promove a destruição de bacilos, podem também participar na indução de apoptose de células infectadas (ODDO et al., 1998). Outra função tem sido atribuída a essas células, ou seja, ajudar a desenvolver uma resposta mediada por células T CD8<sup>+</sup> (SERBINA et al., 2001). Os mecanismos utilizados pelas células T CD8<sup>+</sup> para o controle da TB parecem ser principalmente a produção de citocinas e a função citolítica. Células T CD8<sup>+</sup> são capazes de secretar IFN- $\gamma$  através da ativação do receptor de células T ou através da interação com as células dendríticas infectadas (SERBINA; FLYNN, 1999).

Estudos indicam que o *M. tuberculosis* desenvolveu vários mecanismos para manipular seus habitats celulares em seu próprio benefício, como por exemplo modulando o tráfico e maturação dos fagossomos, permitindo-lhes fugir de mecanismos lisossomais de morte, restrição e degradação, o uso de mecanismos de virulência para otimizar a sua propagação de célula a célula, promovendo a morte necrótica de células infectadas e o recrutamento de macrófagos, além de possuir múltiplos mecanismos para inibir a célula hospedeira a apoptose, tal inibição permite a sobrevivência prolongada de células infectadas com um maior número de bactérias acumuladas, ou também podem escapar dos fagossomos e entram no citoplasma das células infectadas. Embora o *M. tuberculosis* possui claramente distintos mecanismos para regular a morte celular por apoptose e necrose, permanece a ser

determinada como esses mecanismos são regulados e como se manifestam durante várias fases da infecção (BLOMGRAN et al., 2012; ERNST, 2012).

Logo quando as bactérias são depositadas nos pulmões, passam por um período de 3 dias sem crescimento. Posteriormente, crescem com uma média de tempo de duplicação de 28h e atingem cerca de 5 logs em 20 dias. A interrupção do crescimento bacteriano está relacionada com a produção do IFN- $\gamma$  produzida por células T. Uma vez que o crescimento bacteriano parou, a resposta imune mantém as bactérias em estado de latência por um período de tempo prolongado; o recrescimento bacteriano pode ocorrer se os inibidores de imunidade são ativados. Estes inibidores incluem anticorpo anti-CD4 de células T, anticorpo anti-fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) e os inibidores da síntese do óxido nítrico (COOPER; KHADER, 2008)

A resposta imune de resistência contra a TB pode ser definida como do tipo 1 (Figura 5), com a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, presentes e importantes no controle da doença em animais e humanos (AMIM et al., 2008; AMIRZARGAR et al., 2006; FLYNN & CHAN, 2001;). A capacidade dos macrófagos alveolares em destruir o *Mtb* ou inibir o seu crescimento depende de sua ativação pelo IFN- $\gamma$  e abrange mecanismos moleculares complexos, tais como a produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , óxido nítrico e quimiocinas. Além disso, dependendo também do número e da virulência do bacilo fagocitado (ATES et al., 2008; VALLINOTO et al., 2010).

A capacidade bactericida do macrófago frente ao *M. tuberculosis* necessita ser previamente ativada. O IFN- $\gamma$  é o principal e mais potente mediador desse processo, produzida por célula Th1, durante sua interação com o macrófago através da interação CD40 expresso pela célula Th1 com o CD40L no macrófago (SALGAME, 2005; TEIXEIRA et al., 2007). O IFN- $\gamma$  é capaz de incrementar a expressão de diversos genes nos macrófagos, induzir um aumento na expressão do MHC (aumento na apresentação de antígenos) e de receptores para imunoglobulinas (FcRs; maior capacidade de fagocitose), recrutar linfócitos T que participam da destruição bacteriana e participar da produção de óxido nítrico. Embora a produção de IFN- $\gamma$  isolada seja insuficiente para o controle do bacilo, é um dos componentes cruciais para a resposta protetora contra o patógeno. O IFN- $\gamma$ , em sinergia com o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) ativa macrófagos infectados, iniciando um importante mecanismo efetor da imunidade mediada por células (O'GARRA et al., 2013).

Após três semanas de infecção, a resposta imune Th1 desenvolvida frente aos componentes antigênicos do *Mtb* é responsável pela destruição e inibição da multiplicação dos bacilos no interior dos macrófagos ativados via estresse oxidativo, exercendo e promovendo

uma ação antimicobacteriana, através do desenvolvimento do granuloma (COLLIN; KAUFMANN, 2001). As citocinas Th2, principalmente a IL-4 e a IL-10, atuam como reguladoras da resposta macrofágica através da modulação negativa da resposta Th1 e da produção de mediadores da resposta inflamatória (ATES et al., 2008; SELVARAJ et al., 2008). As diferentes manifestações clínicas que ocorrem na tuberculose refletem o desequilíbrio entre a capacidade de virulência do bacilo e os mecanismos de defesa do hospedeiro, relacionados ao desequilíbrio do balanço Th1/Th2 (HERNANDEZ-PANDO et al., 2009; VAN CREVEL et al., 2000).

Sendo assim, o subtipo Th2 de células T CD4<sup>+</sup> pode inibir os mecanismos microbicidas dos macrófagos, neutralizar as citocinas do subtipo Th1 e dissolver o granuloma tuberculoso, sendo então responsável pelo escape e disseminação do *Mtb*, contribuindo com o desenvolvimento da doença ativa (ATES et al., 2008; MOSSAD et al., 2010). Este perfil de citocinas tem sido relacionado por vários autores com a tuberculose ativa (AMIM et al., 2008; MOSSAD et al., 2010; VALLINOTO et al., 2010).

Diversos estudos têm indicado o importante papel das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 na patogênese da tuberculose (ATES et al., 2008; BEN-SELMA et al., 2011; MOSSAD et al., 2010; VALLINOTO et al., 2010). O TNF- $\alpha$  é uma potente citocina pró-inflamatória que desempenha um papel fundamental na iniciação, regulação e perpetuação da resposta inflamatória. A IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias através da sua ação sobre as células Th1 e macrófagos (ATES et al., 2008; TRAJKOV et al., 2009), sendo importante no controle da exacerbação das respostas pro-inflamatórias, minimizando o dano tecidual na TB (OH et al., 2007).

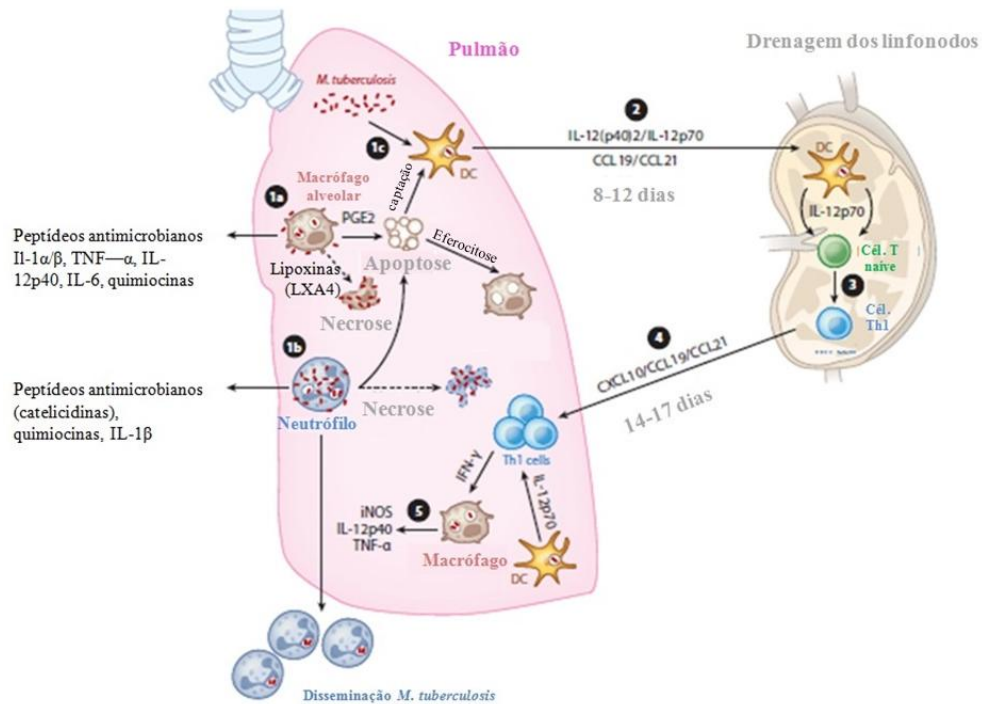
Um subtipo de células T CD4<sup>+</sup> que co-expressam CD25 e fator de transcrição Foxp3, conhecidas como células T regulatórias (Treg), com propriedades imunomoduladoras, tem sido descrita. Estas células ocorrem naturalmente em ratos e humanos, em torno de 5-10% de células T CD4<sup>+</sup> circulantes em indivíduos saudáveis (O'GARRA; VIEIRA, 2004). O equilíbrio entre os diferentes tipos de resposta de células T é controlado, em parte, pela ação das células Treg e estão envolvidos na regulação da Th1 e Th2 e de ambos os mecanismos de proteção e imunopatológicos. Pacientes com tuberculose ativa tem uma população expandida de células Treg no sangue e no local da infecção, e parece que estas células ativamente suprimem as células Th1 e na produção de IFN- $\gamma$  (RIBEIRO-RODRIGUEZ et al., 2006). Assim, células Treg podem também participar na supressão de células Th1, favorecendo a progressão da doença. (HERNANDEZ-PANDO et al., 2009).



A contribuição do componente genético do hospedeiro na resistência e susceptibilidade à infecção inicial e progressão do estado latente para a doença ativa tem sido demonstrado tanto em modelo animal (FLYNN et al., 1995) como em humanos (BELLAMY, 2005; STEAD, 2001). Estudos têm demonstrado que a infecção tuberculosa está relacionada com deficiências imunológicas de origem genética, diminuindo a atividade de células T e macrófagos, e gerando falhas na produção de citocinas (HENAO et al., 2006; SELVARAJ et al., 2008; TRAJKOV et al., 2009; VALLINOTO et al., 2010).

Sabe-se que a resposta imune protetora do hospedeiro contra este microorganismo é mediada pela imunidade celular, em que determinadas citocinas e células T tem uma importante função (CAVALCANTI et al., 2012). Fatores genéticos, principalmente polimorfismos de base única em diferentes genes da imunidade, têm sido descritos e associados com a tuberculose, podendo desempenhar um importante papel na susceptibilidade à doença (OLIVEIRA et al., 2004). Assim, a compreensão e o entendimento dos mecanismos envolvidos nessa resposta e, em particular a participação das citocinas envolvidas é de importância significativa para o desenvolvimento de um controle eficaz e preventivo da doença.

**Figura 5** - A resposta imune celular na tuberculose.



**Fonte:** O'garra et al. (2013)

**Nota:** Infecção por aerossol com o *Mycobacterium tuberculosis*, onde macrófagos alveolares localizados no pulmão, neutrófilos e células dendríticas tornam-se infectadas.

**Legenda:** Macrófagos alveolares (1a), neutrófilos (1b), células dendríticas DC (1c). Migração de DC infectadas para linfonodos através de citocinas e quimiocinas (2). Diferenciação de células T para tipo Th1 (3). Células Th1 antígeno-específica retornam ao pulmão após a infecção inicial (4). Produção de IFN-γ por Th1 para ativação de macrófagos, produção de citocinas, indução de fatores microbicidas incluindo óxido nítrico induzível (iNOS) (5) para o controle micobacteriano.

### 2.6.1 Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α) na tuberculose

O TNF-α é uma proteína não glicosilada de 17 kD, apresentando uma cadeia polipeptídica de 157 aminoácidos. O gene que codifica o TNF-α está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.31) imerso no complexo principal de histocompatibilidade de classe III (Figura 6). Este gene é regulado a nível transcricional e pós transcricional (MERZA et al., 2009).

O TNF-α é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica que exerce múltiplos efeitos biológicos. A sua expressão é rigorosamente controlada, e a superprodução pode causar efeitos prejudiciais encontrados no choque séptico, tais como hipotensão arterial, coagulação vascular disseminada e hipoglicemia letal. No processo de controle de infecção por micobactérias, o TNF-α parece ter um papel primordial, atuando sobre uma grande variedade de células (CAVALCANTI et al., 2012).

É secretada por monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos T, principalmente CD4+, e também células natural killer (NK). Atua recrutando neutrófilos e monócitos aos locais de inflamação para eliminar agentes microbianos através da estimulação das células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, facilitando o tráfico dessas células, também estimula a secreção de quimiocinas e induz apoptose na célula-alvo. Esta citocina intervém na formação, organização e controle do granuloma tuberculoso e em sinergismo com o IFN- $\gamma$  induz a produção de óxido nítrico, um dos principais agentes microbicidas para as micobactérias (CORREA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004).

Estudos demonstram que o bloqueio do TNF- $\alpha$  tem grandes efeitos na progressão da tuberculose em modelos experimentais. A neutralização do TNF- $\alpha$  em modelos murino resulta no agravamento da tuberculose ou reativação (FLYNN et al., 1995). Estudo também tem revelado que o TNF- $\alpha$  é expresso em tecidos infectados com MTB durante a fase latente da infecção, o que sugere uma contribuição com outras citocinas, como o IFN- $\gamma$ , no controle da multiplicação do bacilo (CAVALCANTI et al., 2012; SCANGA et al., 2000).

Por outro lado, existem também evidências demonstrando que o TNF- $\alpha$  pode estar associado com respostas imunopatológicas na tuberculose, atuando como mediador na destruição do tecido pulmonar. Os níveis elevados de TNF- $\alpha$  estão relacionados com uma excessiva inflamação com necrose e caquexia (CAVALCANTI et al., 2012).

A importância do TNF- $\alpha$  na formação do granuloma micobacteriano é explicada, em parte, pela reativação da tuberculose em pacientes com artrite reumatóide e doença de Crohn, tratados com agentes biológicos, inibidores do TNF- $\alpha$  (GÓMEZ-REINO et al., 2003). A expressão do TNF- $\alpha$  na tuberculose, assim como em outras patologias infecciosas pode variar de um indivíduo a outro e entre populações. Certas mutações pontuais na região promotora do gene pode promover uma alteração na síntese protéica (diminuição ou aumento de produção), um fenômeno que tem sido associado à várias doenças infecciosas, inclusive a tuberculose (CORREA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004).

### 2.6.2 Interleucina 10 (IL-10) na tuberculose

Dentre as várias citocinas envolvidas na imunopatogenia da tuberculose, a interleucina 10 (IL-10) tem apresentado uma importância relevante. O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1q31-32 (SHIN et al., 2005).

Estudos têm demonstrado a presença de níveis elevados desta citocina em pacientes com TB pulmonar ativa (ANSARI et al., 2009; SELVARAJ et al., 2008). Macrófagos de

pacientes com tuberculose encontram-se suprimidos *in vitro*, e a inibição de IL-10 reverte parcialmente esta supressão (FLYNN, CHAN, 2001). Em outro estudo, a IL-10 foi capaz de inibir diretamente as respostas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de doadores com tuberculose latente e também reduziu a expressão de MHC de classe I e II, CD40, B7-1 e B7-2 de monócitos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (ROJAS et al., 1999). A diminuição na resposta imune celular protetora é o objetivo do *M. tuberculosis* para a sobrevivência no hospedeiro, induzindo a produção de IL-10 e outros mediadores inibitórios da resposta inflamatória, sendo detectados em amostras de escarro de pacientes com tuberculose (CAVALCANTI et al., 2012).

Polimorfismos na região promotora do gene da IL-10 estão associados com várias doenças, autoimunes e infecciosas (TURNER et al., 1997). Sabe-se que polimorfismo na posição -1082, dentro da região promotora do gene da IL-10 apresenta alteração nos níveis plasmáticos. Estes achados quanto à expressão diferencial desta citocina nos pacientes com TB pulmonar ativa tornaram alvo de estudos de polimorfismo genético (LÓPEZ-MADERELO et al., 2003; CHIACCHIO et al., 2009).

## 2.7 Polimorfismos Genéticos

Um polimorfismo genético é definido quando existe a ocorrência de mais de um alelo em um gene, no qual pelo menos dois alelos aparecem com frequências superiores a 1% na população. A presença de polimorfismos em um determinado gene pode ou não acarretar alterações fenotípicas (NUSSBAUM et al., 2002).

Os estudos de polimorfismos genéticos mais frequentemente realizados envolvem a análise da frequência de polimorfismos de um único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism* – SNP), onde uma única base nitrogenada do DNA é substituída por outra (NUSSBAUM et al., 2002). Estas variações estão normalmente associadas à diversidade populacional, individualidade, susceptibilidade a doenças e resposta individual a medicamentos. Dentro de uma população, a frequência de um alelo pode ser atribuída à relação entre os SNPs que a população carrega, sendo a variante mais comum presente em maior frequência do que as variantes raras. É importante notar que existem diferenças acentuadas entre as populações humanas em termos de distribuição das variantes. Por esta razão, um alelo comum em um grupo geográfico ou étnico pode ser raro em outros grupos (KUBISTOVA et al., 2009).

SNPs encontrados em regiões gênicas não-codificantes (íntrons) ou em regiões reguladoras/promotoras de um gene não acarretam mudanças na sequência de aminoácidos da

proteína, no entanto, podem alterar a capacidade de transcrição gênica e, conseqüentemente sua produção local ou sistêmica. Este tipo de polimorfismo é denominado funcional por conferir diferenças inter-individuais na síntese e secreção de proteínas e são os mais utilizados em estudos de associação de doenças, por evidenciarem geneticamente a produção diferencial de certas moléculas entre os indivíduos afetados (OLLIER, 2004).

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

No caso dos estudos de associação, a frequência de um alelo específico é comparada entre a população de indivíduos afetados (casos) e a de não-afetados (controle), quando estas populações encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (LANDER; SCHORK, 1994). Estudos de associação baseados em populações caso-controle podem detectar pequenos efeitos de determinados genes e muitos destes estudos foram capazes de validar a associação entre genes com padrões de susceptibilidade/resistência ou de detectar caminhos novos, envolvidos na patogênese de inúmeras doenças (MAARTENS; WILKINSON, 2007).

Os resultados encontrados na investigação de susceptibilidade do organismo à tuberculose têm sido obtidos através de estudos de associação, devido ao poder de detecção de pequenos efeitos gênicos quando comparado aos estudos de ligação, desde que o tamanho da amostra analisada seja adequado (RISCH; MERIKANGAS, 1996).

### 2.7.1 SNPs na tuberculose

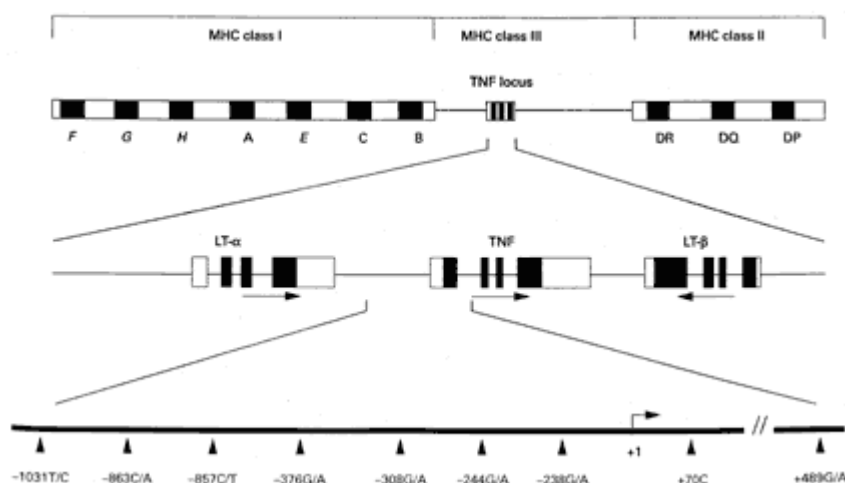
Os componentes genéticos de susceptibilidade a tuberculose encontram-se distribuídos entre inúmeros genes, tendo sido estudados extensivamente nos últimos anos, resultando em uma grande quantidade de informação. Vários genes, como o HLA (Antígenos de Leucócitos Humanos), NRAMP1 (2q35), IFN- $\gamma$  (12q14), NOS2A (17q11.2-12), CCL2 (17q11.2-q12), MBL2 (10q11.2-q21), CD209 (19q13), VDR (12q13.11) e TLR (Receptores de homologia-Toll), têm sido associados com a tuberculose, alguns repetidamente, enquanto outros apresentam padrões de susceptibilidade diferenciada de acordo com a população étnica

examinada (BURGNER et al., 2006), enfatizando a complexidade que caracteriza a susceptibilidade do hospedeiro segundo a origem da população (ARDLIE et al., 2002).

Polimorfismos em genes de citocinas, que podem confirmar diferenças interindividuais na síntese e secreção destas, têm sido associados a doenças que têm uma patogênese inflamatória (SANTOS et al., 2002; SELVARAJ et al., 2008). SNPs localizados em regiões promotoras de genes que codificam diferentes proteínas, em particular os genes do TNF- $\alpha$  e IL-10, têm sido associados com a susceptibilidade e/ou resistência à tuberculose em diferentes grupos étnicos (LARCOMBE et al., 2008; MERZA et al., 2009).

Estudos têm investigado o efeito de SNPs de região promotora do gene do TNF- $\alpha$  (AMIRZAGAR et al., 2006; DESHPANDE et al., 2005; SANTOS et al., 2002). O gene do TNF- $\alpha$  contém vários SNPs, dos quais dois são os mais estudados (Figura 6). O primeiro está localizado na posição -238 e o segundo na posição -308, ambos em relação ao sítio de início da transcrição, onde a presença de guanina (G) define o alelo de tipo selvagem (isto é, o alelo mais comum). Tem sido demonstrado para ambas as posições que a presença de adenina (A) resulta em uma transcrição duas vezes maior, com implicações funcionais (KUMAR et al., 2008; MERZA et al., 2009; WILSON et al., 1997). Níveis alterados de TNF- $\alpha$  podem estar influenciando a resposta imune contra o *M. tuberculosis* e contribuindo para uma suscetibilidade individual a tuberculose (DESHPANDE et al., 2005).

**Figura 6** - Localização do gene do TNF no complexo principal de histocompatibilidade de classe III.



**Fonte:** Verweij (1999)

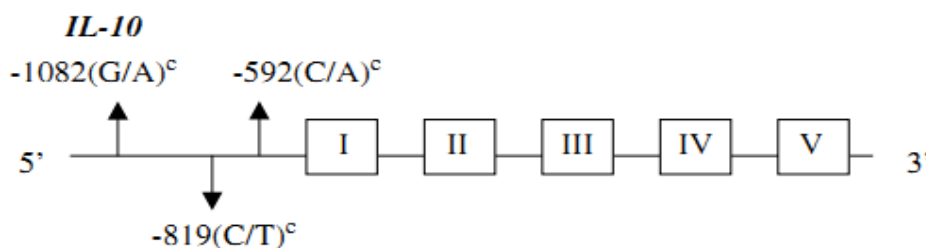
**Legenda:** A posição dos SNPs está indicada por setas localizadas na última linha

Polimorfismos no gene do TNF- $\alpha$  na posição -308 foram investigados por Bikmaeva et al. (2002) na população da Bashkorstan na Rússia, em um grupo de pacientes com tuberculose e encontraram uma frequência significativamente maior ( $p=0,001$ ) do alelo A (alto produtor) nos pacientes doentes em comparação com os controles saudáveis. A frequência de polimorfismos funcionais no gene do TNF- $\alpha$  na posição -308 em um grupo de pacientes da Sicília com tuberculose pulmonar crônica também foi investigada por Scola et al. (2003), que demonstraram uma redução do genótipo homocigótico G/G (baixo produtor) nos indivíduos com tuberculose. Em outro estudo, realizado por Correa et al. (2004) verificou o referido polimorfismo em diferentes grupos de pacientes da Colômbia com doença autoimune e tuberculose. Concluíram que o alelo A é um fator de risco para doença auto-imune, mas possui um efeito protetor para a tuberculose, enquanto que o alelo G se mostrou um fator de risco para a doença.

Na região promotora do gene da IL-10 podem ser encontrados três polimorfismos de base única (SNP), localizados nas posições -1082 (G/A), -819 (C/T) e -592 (A/C) (TURNER et al., 1997) (Figura 7). Os genótipos -1082: GG, GA e AA, correspondem aos fenótipos alto, intermediário e baixo produtor desta citocina, respectivamente, independente das variações nucleotídicas presentes nas posições -819 e -592 do gene da IL-10 (TAMBUR et al., 2001).

Delgado et al. (2002) avaliou a frequência dos genótipos da região promotora do gene da IL-10 na posição -1082 em pacientes do Camboja, tendo encontrado uma maior frequência de indivíduos heterocigotos entre os pacientes com TB pulmonar ativa. Estudando pacientes italianos, Scola et al. (2003) observaram uma tendência de diminuição do alelo A nos pacientes com TB pulmonar ativa. Um estudo mais recente, realizado na Turquia por Ates et al. (2008) demonstrou uma maior frequência do alelo G na posição -1082 nos pacientes com TB pulmonar ativa, em relação a indivíduos sem histórico ou evidência radiológica de TB.

**Figura 7** - Estrutura e localização de SNPs funcionais (-1082G/A; -819C/T; -592C/A) do gene da IL-10.



**Fonte:** Tso et al. (1999)

### 2.7.2 Genotipagem por PCR em tempo real (qPCR)

A quantidade de métodos para genotipagem de SNPs tem crescido nos últimos anos e muitos destes já se encontram atualmente disponíveis, revolucionando a área da genética molecular humana e contribuindo nos estudos de investigação de fenótipos complexos, medicina legal e testes diagnósticos (TWYMANT; PRIMROSE, 2003).

Com o aparecimento da PCR em Tempo Real (qPCR), em 1992, por Higuchi e colaboradores, o monitoramento da amplificação de fragmentos de DNA e RNA em tempo real foi possível (DUSSAULT et al., 2006; KUBISTA et al., 2006). De fato, a qPCR realiza a quantificação dos ácidos nucleicos de maneira precisa e altamente reproduzível, pois determina seus valores durante a fase exponencial da reação (NOVAIS et al., 2005). A técnica da qPCR baseia-se na detecção de moléculas fluorescentes que aumentam a emissão da fluorescência quando o produto de amplificação acumula-se em cada ciclo da reação (DUSSAULT et al., 2006), de forma que tal emissão é gravada durante cada ciclo e representa a quantidade do produto amplificado. A plataforma da qPCR requer um sistema óptico para excitação da fluorescência e outro para a captação da emissão. As informações adquiridas são transmitidas para softwares que analisam e calculam os dados finais da reação (NOVAIS et al., 2005).

Existem dois tipos principais de químicas fluorescentes utilizados na PCR em tempo real: o TaqMan® e o SYBR® Green. O SYBR® Green, com excitação e emissão máxima de 494nm e 521nm (DUSSAULT et al., 2006), se intercala na dupla fita de DNA e após a excitação pela luz emite uma fluorescência verde que é detectada pelo sistema de recepção do equipamento (NOVAIS et al., 2005). Outra forma de gerar fluorescência é através do uso de uma sonda, dirigida especificamente a uma região interna da sequência que se deseja amplificar, sendo um exemplo destas a TaqMan®. Esta possui um marcador fluorescente *reporter* na extremidade 5', capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original. Entretanto, na sua posição nativa, toda a luz emitida por esse fluoróforo é absorvida por outro marcador, o *quencher*, presente na extremidade 3' da sonda (NOVAIS et al., 2005).

Dessa forma, o sistema óptico do equipamento não é capaz de detectar fluorescência no tubo de reação, mas, durante a amplificação, a sonda que se hibridizou ao produto-alvo será clivada pela atividade da exonuclease da enzima Taq DNA polimerase. Como consequência, essa sonda será degradada e o fluoróforo ficará distante do *quencher* que agora



não mais será capaz de absorver a luz emitida. Assim, ocorrerá um aumento na intensidade de fluorescência, permitindo a quantificação do alvo (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2001).

A curva de quantificação de DNA através da PCR em tempo real é um dos dados gerados durante a amplificação do material genético, e consiste de três fases distintas: uma fase *log* inicial, no qual os produtos ainda não podem ser mensurados, uma fase exponencial, onde a detecção da fluorescência é alcançada e uma fase platô (DUSSAULT et al., 2006). O ponto na curva, dentro da fase exponencial, no qual a quantidade de fluorescência ultrapassa o sinal da linha basal é chamado de valor do ciclo “*threshold*” (Ct). Este ponto é de crucial importância, pois, determina o sucesso da amplificação, permite quantificar a concentração de DNA com maior acurácia e pode ser utilizado para a genotipagem de diferentes alelos (GRAY et al., 2000; WILHELM et al., 2003).

### 3 JUSTIFICATIVA

Diante da magnitude da TB no Brasil e no mundo, que apresenta elevadas taxas de morbidade e mortalidade, é de grande importância do ponto de vista clínico, epidemiológico e de saúde pública, a execução de estudos que visem compreender melhor os fatores responsáveis pelo desenvolvimento da tuberculose pulmonar (LEANDRO et al., 2009).

Na imunologia, um destes fatores são as citocinas anti-inflamatórias que são provavelmente produzidas em maior quantidade, com o intuito de proteger contra danos teciduais, mas a consequência desta resposta é um declínio na imunidade protetora, o que facilita o crescimento do bacilo e a progressão da doença (HERNANDEZ-PANDO; AGUILAR, 2009).

Avanços recentes na genética molecular abrem novas perspectivas no estudo da patogênese da tuberculose. Estudos apontam para a importância da constituição genética do indivíduo no desenvolvimento da TB pulmonar ativa (BIRD, 2010; PACHECO et al., 2008). Diversos trabalhos descrevem genes cuja expressão de proteínas estão provavelmente envolvidos com o processo de susceptibilidade e/ou resistência a tuberculose em diferentes populações mundiais (MOSSAD et al., 2010; VALLINOTO et al., 2010). Polimorfismos genéticos associados à susceptibilidade têm sido propostos para explicar diferenças no processo de desenvolvimento da tuberculose pulmonar ativa em diferentes populações (LARCOMBE et al., 2008; MERZA et al., 2009; STEIN; BAKER, 2011).

Assim, o presente trabalho propôs investigar uma provável associação dos SNPs funcionais localizados em regiões promotoras dos genes das citocinas TNF- $\alpha$  (-308G/A) e IL-10 (-1082A/G) com a susceptibilidade ou resistência a tuberculose pulmonar ativa em pacientes oriundos do estado de Pernambuco, Brasil.

O desafio real da pesquisa é tentar associar os polimorfismos de um único nucleotídeo de região promotora de genes de citocinas com os dados epidemiológicos da tuberculose, em que apenas 10% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma ativa da doença. Até o presente momento, nenhum estudo com o objetivo de relacionar polimorfismos genéticos do TNF- $\alpha$  e IL-10 com a susceptibilidade ou resistência à TB pulmonar foi realizado no Nordeste do Brasil. Assim, o interesse em compreender melhor o papel que os fatores genéticos desempenham na resposta imune contra a tuberculose, com a definição de perfis gênicos de susceptibilidade ou resistência é de fundamental importância para a geração de conhecimentos para futuros estudos de imunoprofilaxias ou imunoterapias.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

Existe uma associação entre polimorfismos de base única localizados em regiões promotoras dos genes das citocinas TNF- $\alpha$  (-308G/A) e IL-10 (-1082A/G) com o risco de desenvolvimento da tuberculose pulmonar ativa na população do estado de Pernambuco?

## **5 HIPÓTESE**

Variações genéticas específicas em regiões promotoras dos genes das citocinas TNF- $\alpha$  (-308G/A) e IL-10 (-1082A/G) influenciam a imunidade do hospedeiro na tuberculose pulmonar ativa.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo Geral

Analisar a associação entre polimorfismos de base única de regiões promotoras dos genes das citocinas TNF- $\alpha$  (SNP -308G/A – rs1800629) e IL-10 (SNP -1082A/G - rs1800896) com a resistência ou susceptibilidade a tuberculose pulmonar ativa em pacientes oriundos do estado de Pernambuco.

### 6.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar o perfil clínico, epidemiológico e laboratorial dos pacientes sintomáticos respiratórios participantes do estudo;
- b) Determinar a frequência alélica e genotípica dos SNPs da posição -308G/A do gene do TNF- $\alpha$  e -1082A/G do gene da IL-10 dos pacientes com tuberculose pulmonar ativa, tuberculose latente, pacientes portadores de outras patologias respiratórias e indivíduos clinicamente saudáveis;
- c) Avaliar o risco e/ou proteção de desenvolvimento da tuberculose pulmonar ativa nos pacientes participantes do estudo em relação ao perfil alélico e genotípico dos SNPs dos genes TNF- $\alpha$  (-308 G/A) e IL-10 (-1082A/G);
- d) Avaliar o risco de desenvolvimento da tuberculose pulmonar ativa com as comorbidades (hipertensão e diabetes) e co-variáveis (idade, sexo, etilismo e tabagismo) em relação ao perfil alélico e genotípico dos SNPs dos genes TNF- $\alpha$  (-308 G/A) e IL-10 (-1082A/G).

## 7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 7.1 População da pesquisa

Inicialmente foram incluídos pacientes sintomáticos respiratórios, ou seja, com tosse por mais de três semanas (BRASIL, 2011), suspeitos de tuberculose pulmonar, de idades variadas, ambos os sexos, que produzissem escarro, provenientes de unidades públicas de saúde do estado de Pernambuco, no período de fevereiro a dezembro de 2012 (Figura 8).

Posteriormente, os pacientes foram caracterizados de acordo com a definição diagnóstica feita pelo médico pneumologista acompanhante do serviço de saúde, baseados nos sintomas clínicos, achados radiológicos e exames laboratoriais:

**Grupo Caso:** pacientes sintomáticos respiratórios com diagnóstico de tuberculose pulmonar ativa, comprovado através de achados clínicos e exames laboratoriais, tais como exame radiológico (raio-x alterado), resultado de baciloscopia e/ou cultura positivos na detecção do *M. tuberculosis* e resposta terapêutica anti-TB (BRASIL, 2011).

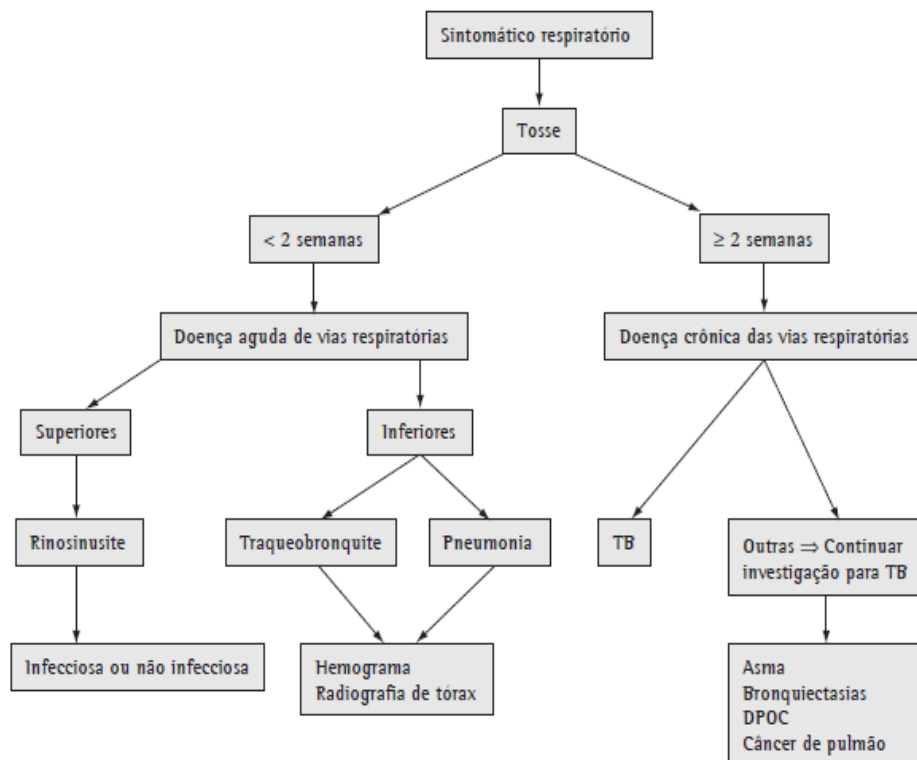
O grupo “controle” foi formado por dois subgrupos de sintomáticos respiratórios:

- 1) **Sintomático respiratório/TB latente (controle 1):** indivíduos sintomáticos respiratórios que apresentaram teste tuberculínico (TT) reator (>10mm), com achados radiológicos normais, com contato domiciliar com indivíduos com TB pulmonar ativa, com exames laboratoriais de baciloscopia e cultura negativos na detecção do *M. tuberculosis* e com diagnóstico final de TB latente (BRASIL, 2011).
- 2) **Sintomático respiratório/Não TB (controle 2):** indivíduos sintomáticos respiratórios com TT não-reator (<10mm), com achados radiológicos normais, com exames laboratoriais de baciloscopia e cultura negativos para a detecção do *M. tuberculosis* e portador de outra patologia respiratória.

Além dos dois grupos controles formados por sintomáticos respiratórios sem TB pulmonar, também foi incluído um terceiro formado por:

- 3) **Indivíduos clinicamente saudáveis (controle 3):** sem história prévia de clínica e tratamento para tuberculose, que procuraram espontaneamente os serviços de saúde para realização de exames de rotina e que realizaram o teste tuberculínico para triagem.

**Figura 8.** Fluxograma de investigação de infecção respiratória aguda e crônica, a partir de casos sintomáticos respiratórios.



Fonte: Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (2009)

## 7.2 Local do estudo

O estudo foi realizado na cidade do Recife, Pernambuco, com seleção dos pacientes nos seguintes serviços de saúde: Hospital das Clínicas (HC/UFPE) e Hospital Otávio de Freitas (HGOF/SUS), referências no diagnóstico e tratamento da tuberculose em Pernambuco; e nos Postos de Saúde da Família (PSF) Joaquim Cavalcanti, Policlínica Lessa de Andrade, ambos do Distrito Sanitário IV, e a Policlínica Albert Sabin, do Distrito Sanitário II.

Nos Laboratórios de Imunoepidemiologia (LIE) e Núcleo de Plataforma Tecnológica (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/Fiocruz) foram realizados os exames laboratoriais de cultura em meio específico e os testes de genotipagem por PCR em tempo real. Os exames de imagem solicitados pelo médico e teste tuberculínico foram realizados na rede pública de saúde e o exame de baciloscopia no Laboratório Municipal do Recife.

### 7.3 Desenho do estudo

O desenho do estudo foi do tipo caso-controle que visou avaliar a associação entre polimorfismos de base única (SNP) localizados em regiões promotoras dos genes das citocinas TNF- $\alpha$  (-308G/A) e IL-10 (-1082A/G) entre os pacientes com tuberculose pulmonar ativa, pacientes infectados com TB latente, pacientes portadores de infecções pulmonares inespecíficas e indivíduos clinicamente saudáveis.

### 7.4 Tipo e tamanho da amostragem

Foram adotados os seguintes parâmetros para o cálculo amostral realizado no programa STATCALC do software Epi-Info 6.04:

- Erro:  $\alpha = 5\%$  e Poder do teste = 80%
- Frequência esperada de 50% (estimativa)
- *Odds Ratio* = 3 – Baseado no estudo de ATES *et al.*, 2008, BEN-SELMA *et al.*, 2011 e AFZAL *et al.*, 2011.

Dado que é interesse no estudo comparar as frequências de polimorfismo entre os casos de tuberculose pulmonar ativa com os casos sintomáticos respiratórios com (controle 1) e sem infecção (controle 2) pelo *M. tuberculosis* e com os indivíduos saudáveis, foram portanto, adotados três grupos controles (vide item 7.1). Dessa forma, foi calculada uma amostragem total de 260 indivíduos para serem distribuídos 65 em cada grupo. Porém, nos grupos controles formados por indivíduos sintomáticos respiratórios com e sem infecção pelo *M. tuberculosis*, só foram possíveis serem alocados 53 e 57, respectivamente. Por outro lado, os grupos formados por pacientes com tuberculose ativa e por indivíduos clinicamente saudáveis conseguiu-se 71 e 101, respectivamente, sendo, portanto selecionados um total de 282 participantes.

### 7.5 Critérios de Inclusão

Pacientes que chegaram aos serviços públicos de saúde de Pernambuco, com sintomas respiratórios, suspeitos ou não de TB e indivíduos sem sintomas respiratórios, considerados clinicamente saudáveis, de faixa etária variada, de ambos os sexos e não portadores do vírus HIV.



## 7.6 Critérios de Exclusão

Como o estudo visa avaliar fatores de risco ou de proteção imunogenéticos no desenvolvimento da tuberculose pulmonar, sendo a infecção pelo vírus HIV considerada um importante fator de risco para a doença, com alta taxa de prevalência, foram excluídos os pacientes sabidamente soropositivos.

## 7.7 Critérios de definição de co-morbidades e co-variáveis utilizados no estudo

- a) **Diabetes mellitus e hipertensão arterial:** confirmação da presença através de diagnóstico feito pelo médico acompanhante e que estavam em uso de tratamento específico;
- b) **Fumante:** indivíduo que fumou mais de 100 cigarros ou 5 maços de cigarros, em toda a sua vida e/ou fuma atualmente (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 1995);
- c) **Alcoolista:** indivíduos que apresentaram pelo menos algum dos seguintes critérios:
  - **Compulsão:** uma necessidade forte ou desejo incontrolável de beber;
  - **Perda de controle:** a incapacidade freqüente de parar de beber uma vez que a pessoa já começou;
  - **Dependência física:** a ocorrência de sintomas de abstinência, como náusea, suor, tremores e ansiedade, quando se pára de beber após um período contínuo de uso de bebida. Tais sintomas são aliviados bebendo álcool ou tomando outra droga sedativa;
  - **Tolerância:** a necessidade de aumentar as quantidades de álcool (BRASIL, 2013).

## 7.8 Aspectos Éticos

Os participantes da pesquisa ou os responsáveis foram informados verbalmente do projeto e após a concordância, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A). Em seguida, foi preenchido um questionário clínico-epidemiológico padronizado, onde constou: identificação e procedência do paciente, principais queixas clínicas e tempo de duração, história de tratamento prévio de tuberculose, histórico de doença pré-existente, exames físicos e laboratoriais e posteriormente o diagnóstico clínico (Apêndice

B). As entrevistas foram realizadas pela pesquisadora principal do projeto com auxílio do médico assistente do serviço de saúde.

O presente projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisas do CPqAM/Fiocruz, onde recebeu o parecer favorável ao seu desenvolvimento (Registro CAAE: 0056.0.095.000-11) (Anexo A). Seguiu o descrito pela Resolução 196/96, que apresenta as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

## **7.9 Técnicas laboratoriais**

### **7.9.1 Teste Tuberculínico**

Para classificação dos grupos de estudo, os pacientes participantes realizaram o teste tuberculínico, de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). Para triagem, 0,1 mL (duas unidades de tuberculina) de derivado protéico purificado (PPD-Rt 23) foi injetado intradermicamente no antebraço esquerdo e após 72h avaliado endurecimento através do método de Mantoux (BRASIL, 2001). A leitura do teste foi realizada por profissionais treinados e experientes dos serviços públicos de saúde. Os pacientes foram classificados como reatores, ou seja, teste tuberculínico positivo, quando apresentavam a região de endurecimento com a medida  $\geq 10\text{mm}$  (BRASIL, 2011).

### **7.9.2 Teste rápido para a detecção do HIV 1 e 2**

Foi utilizado kit comercial (BioPix – HIV 1 & 2) para determinação qualitativa de anticorpos anti-HIV1 e anti-HIV2 por método imunocromatográfico, de acordo com protocolo indicado pelo fabricante em todos os indivíduos participantes da pesquisa (protocolo de rotina para os pacientes com suspeita de tuberculose, realizado por profissional capacitado do serviço de saúde).

### **7.9.3 Método de coleta de sangue periférico e obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)**

Foram coletados 4,5mL de sangue periférico do paciente em um tubo (Vacutainer®, Becton and Dickson, England) contendo EDTA, mantido à temperatura ambiente (25 a 30°C) por até 4h até o seu processamento. Após a coleta, o sangue foi diluído em 4mL de solução

PBS pH 7,2 em um tubo Falcon de 15mL, previamente identificado com os dados do paciente. Foi colocado em outro tubo Falcon, 3mL de Ficoll Histopaque gelado. Após essa etapa, o sangue homogeneizado com solução PBS foi adicionado ao tubo com Ficoll-Histopaque, lentamente pela parede do tubo, tendo o cuidado para não misturar. O tubo foi centrifugado por 30 minutos a 2000 rpm. Após a centrifugação, foram retiradas as células PBMC e armazenadas em tubo rosqueado, devidamente identificado e mantido a -70°C.

As células PBMC foram utilizadas para extração do DNA genômico e amplificação por PCR em tempo real para determinação dos polimorfismos genéticos.

#### 7.9.4 Método de coleta e descontaminação do escarro

De cada paciente foi coletado de 5 a 10 mL de escarro por eliminação espontânea, em tubo seco rosqueado e estéril, com o paciente em jejum, ao acordar. As amostras coletadas foram estocadas entre 4 a 8° C por até 4 horas e transportadas para o CPqAM para serem processadas. A descontaminação foi realizada seguindo o protocolo do Método de Petroff (NaOH 4%) (BARRETO, 1994; BRASIL, 2008).

#### 7.9.5 Baciloscopia do escarro

O protocolo de coloração pelo método de Ziehl-Neelsen para a identificação e quantificação dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) foi realizado pelos técnicos do Laboratório Municipal do Recife, de acordo com as normas técnicas do Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008).

#### 7.9.6 Cultura por Löwestein-Jensen e Identificação de micobactérias em amostra de escarro

Após descontaminação, 0,2mL do sedimento de escarro foi semeado em três tubos, um contendo apenas o meio Löwenstein-Jensen (simples), um tubo com o meio Löwenstein-Jensen e o ácido para-nitrobenzóico (PNB) e mais outro tubo com o meio Löwenstein-Jensen e a Hidrazida do ácido 2 carboxílico (TCH). Os tubos foram colocados em estufa a 37°C onde foram lidos uma vez por semana até a 8ª semana, ou antes, assim que foi observado o crescimento de colônias. Todos os meios preparados passaram por testes de esterilidade (estufa a 37°C sem inoculação de amostra) e controle de qualidade do meio (inoculação de cepa de referência H37Rv de *M. tuberculosis*), seguindo o Manual Nacional de Vigilância da

Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008). Todos os testes de cultura e identificação foram realizados pelo Laboratório de Imunoepidemiologia do CPqAM/FIOCRUZ.

#### 7.9.7 Extração e purificação de DNA genômico de PBMC

A extração de DNA foi efetuada com o *kit* QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, foram adicionados 20µL de proteinase K a uma alíquota de 200µL de PBMC e em seguida 200 µL do Buffer AL à amostra e homogeneizada no vórtex por 15 segundos, sendo então incubada em banho-maria a 56°C por 10 minutos. Posteriormente, foi submetida à centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação, adicionou-se 200µL de etanol a 100% à amostra e mixada no vórtex por 15 segundos, sendo novamente centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto. A amostra foi transferida para a coluna específica do *kit*, e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor e o tubo descartado contendo o filtrado. Adicionou-se à coluna 500 µL do Buffer AW1. Realizou-se a centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, a coluna foi colocada em um novo tubo coletor e foi descartado o tubo contendo o filtrado da centrifugação. Adicionou-se o Buffer AW2 e a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 3 minutos. Em seguida, a coluna foi colocada em um novo tubo coletor e descartado o tubo anterior contendo o filtrado. Novamente centrifugou-se a amostra a 14.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi colocada em um tubo cônico de polipropileno (1,5mL) previamente identificado. Adicionou-se 200 µL do Buffer AE na coluna contendo a amostra. Após esta etapa, a amostra foi deixada em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente para melhor concentração do DNA. Por último, foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto, sendo descartada a coluna e acondicionado o tubo contendo o DNA genômico.

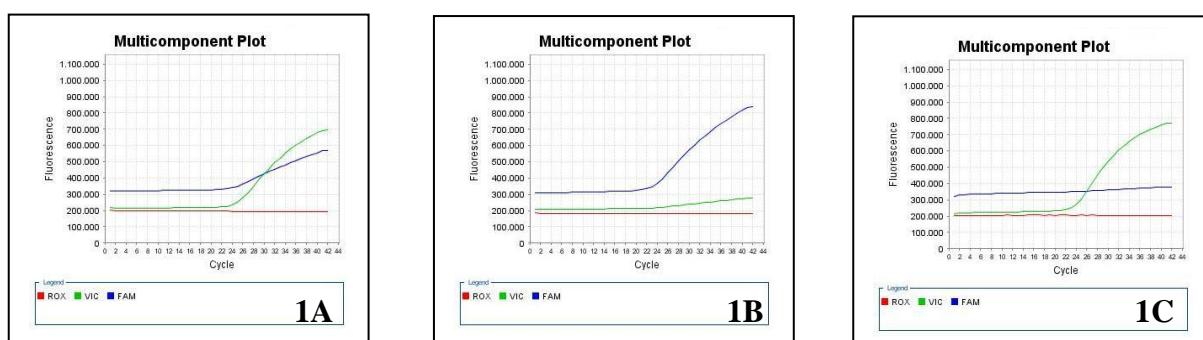
#### 7.9.8 Determinação do Polimorfismo Genético

Foi utilizada a técnica de discriminação alélica pelo sistema TaqMan com sondas MGB através de PCR em tempo real. Foram utilizados os ensaios comerciais da Applied Biosystems, que emprega um conjunto de *primers* e sondas específicas para o SNP da posição -1082(A/G) da IL-10 (rs1800896) (C\_1747360\_10) e para a posição -308(G/A) do TNF-α (rs1800629) (C\_7514879\_10), utilizando condições universais de reação de amplificação. A

amplificação foi realizada no equipamento de PCR em tempo real ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 repetições de 92°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. A reação de PCR foi realizada com um volume total de 12,5 µL contendo 6,25 µL de master mix universal para o sistema TaqMan (contendo tampão, referência passiva dye ROX, deoxinucleotídeos, uridina, uracil-N-glicosilase e DNA polimerase ampliAq Gold – Applied Biosystems), 0,625 µL do conjunto primer/sonda (TaqMan SNP Genotyping Assay Mix) a 1X e 5,625 µL da amostra de DNA diluída em água.

A técnica de discriminação alélica consistiu na utilização de um conjunto combinado de duas sondas TaqMan® alelo-específicas, marcadas com diferentes fluoróforos, uma complementar para cada um dos alelos (selvagem e mutante) e um par de primers. A sonda se ligou ao seu alelo específico e a fluorescência foi lida para o alelo presente na amostra. Caso os dois alelos estejam presentes, foram lidos os dois tipos de fluorescência (Figura 9).

**Figura 9** - Curva de amplificação de DNA para o SNP -1082A/G do gene da IL-10.



**Fonte:** Elaborada pela autora

**Legenda:** A figura **1A** representa a amplificação de um indivíduo heterozigoto, **1B** homozigoto AA e **1C**, homozigoto GG

### 7.10 Análise comparativa das frequências dos SNPs -308G/A e -1082A/G

Foi realizada uma análise comparativa das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs -308G/A do gene do TNF- $\alpha$  e -1082A/G do gene da IL-10 da população mundial (europeus, africanos, caucasianos, entre outros), a partir do banco genético “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), com as frequências de estudos científicos da população brasileira (MORAES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004) e resultados do presente estudo.

### 7.11 Análise Estatística

A análise estatística dos dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais foi realizada utilizando-se os programas (Epi-Info 6.04 e SPSS). As tabelas foram construídas utilizando-se o programa *Microsoft Word*. A análise da frequência genética e de associação na comparação entre os grupos de estudo foi realizada através do programa UNPHASED v.3.121 (DUDBRIDGE, 2008) e a análise de associação entre esses grupos e os fatores de risco foi realizada através do SNPStats (SOLE et al., 2006). Este programa implementa um teste de probabilidade retrospectivo (a probabilidade de observar genótipos dados fenótipos), utilizando um modelo de regressão logística multinomial. As associações foram estimadas em risco relativo (RR) e *odds ratio* (OR), usando 95% de intervalo de confiança (CIs). O teste  $X^2$  foi utilizado para comparar as frequências entre os grupos estudados. A diferença entre os resultados obtidos foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . Foi testado se a população estudada estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Características clínicas, demográficas e laboratoriais dos pacientes participantes do estudo

Os dados clínicos, demográficos e laboratoriais dos pacientes sintomáticos respiratórios participantes do estudo estão demonstrados na Tabela 1.

No estudo foi incluído um total de 282 indivíduos, sendo 181 pacientes sintomáticos respiratórios, classificados nos seguintes grupos de estudo de acordo com o diagnóstico médico final: 71 pacientes com tuberculose pulmonar ativa, 53 pacientes com tuberculose latente e 57 portadores de patologias pulmonares inespecíficas, além de 101 indivíduos clinicamente saudáveis.

Nos grupos de pacientes sintomáticos respiratórios participantes dos grupos controles 1 e 2, o diagnóstico final estabelecido foi asma brônquica (12%), bronquiectasia (3%), bronquite (3%), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (7%), pneumonia (3%), virose (4%) e outros (3%). Apesar de terem a hipótese diagnóstica de TB pulmonar descartada pelo médico do serviço de saúde, 65% dos pacientes permaneceu ainda sem definição diagnóstica, ou seja, como sintomáticos respiratórios sem etiologia definida.

Na análise da variável idade, a média dos pacientes com TB pulmonar foi  $43 \pm 15.2$  anos e nos controles 1 e 2 foi  $48 \pm 20.2$  e  $51 \pm 16.8$  anos, respectivamente. Entre os pacientes com TB pulmonar ativa e tuberculose latente (controle 1), 64,8% e 51% eram do sexo masculino, respectivamente e 78,8% e 62,2% tinham faixa etária entre 20-59 anos, respectivamente. Quanto ao perfil dos pacientes classificados no grupo controle 2, 59,7% eram do sexo feminino e 61,4% pertenciam à faixa etária entre 20-59 anos (Tabela 1). No grupo controle 3, a média de idade foi  $37 \pm 16.3$  anos, onde prevaleceu o sexo feminino (82%) e a maioria dos indivíduos mostraram-se reatores ao teste tuberculínico (63%). Os valores de  $p$  e  $\chi^2$  foram calculados para as variáveis: gênero ( $p=0,021$  e  $\chi^2=7,713$ ), idade ( $p=0,11$  e  $\chi^2=7,4$ ), obtendo significância estatística na variável gênero.

No presente estudo, ao analisar as variáveis relacionadas ao hábito de fumar, uso excessivo de álcool e presença de comorbidades, verificou-se que dos 181 pacientes sintomáticos respiratórios: 66,2% não possuíam o hábito de fumar, porém o grupo com tuberculose latente (controle 1) apresentou o maior número de fumantes (30%), seguido do grupo controle 2 (21%) e do grupo com tuberculose pulmonar (17%). Em relação ao uso excessivo de álcool, a maioria dos pacientes (76,2%) declarou não ser alcoolista, porém em

14% dos casos de tuberculose pulmonar e 19% dos pacientes com TB infecção latente declararam possuir o hábito. Podemos observar que 19 pacientes do total de 71 do grupo caso, não responderam as variáveis, hábito de fumar e uso excessivo de álcool (Tabela 1).

Quanto à análise da variável portadores de comorbidades, 11,1% e 8,3% dos pacientes sintomáticos respiratórios eram portadores de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e Diabetes Mellitus (DM), respectivamente (Tabela 1). Os valores de  $p$  e  $\chi^2$  foram calculados no grupo de sintomático respiratório, para as variáveis: tabagismo ( $p=0,43$ ;  $\chi^2=1,7$ ), alcoolismo ( $p=0,026$ ;  $\chi^2=7,3$ ) e comorbidades ( $p=0,97$ ;  $\chi^2=0,055$  para DM e  $p=0,77$ ;  $\chi^2=0,52$  para HAS), obtendo significância estatística apenas na variável relacionada com o uso excessivo de álcool.

Analisando os dados referentes aos tipos de exames laboratoriais realizados pelos pacientes, verificou-se que, apenas, 34,8% dos pacientes realizaram a sorologia para a detecção do vírus HIV pelo serviço de saúde. Também se pode observar uma baixa frequência de solicitação do teste rápido entre os pacientes portadores de TB pulmonar (33,8%). Os métodos de diagnóstico utilizados foram, o exame de Raio-X, realizado em 73% dos pacientes sintomáticos respiratórios, onde 37% apresentaram algum tipo de alteração na imagem radiográfica, sendo 64,8% específica para tuberculose e 31,3% inespecífica, não sendo compatível com tuberculose (controles 1 e 2). A baciloscopia foi realizada em 84,5% (32% de positividade) e a cultura para o *Mycobacterium tuberculosis* em 87% dos pacientes sintomáticos respiratórios, com 26% de positividade, utilizados como critério de definição de caso de tuberculose pulmonar ativa (Tabela 2).



**Tabela 1** - Características clínicas e demográficas dos pacientes sintomáticos respiratórios provenientes de unidades de saúde da cidade do Recife-PE.

	<b>TB pulmonar</b> <b>n (%)</b>	<b>Controle 1</b> <b>n (%)</b>	<b>Controle 2</b> <b>n (%)</b>	<b>Total</b> <b>n (%)</b>
<b>Sexo</b>				
Masculino	46 (64,8)	27 (51)	23 (40,3)	96 (53)
Feminino	25 (35,2)	26 (49)	34 (59,7)	85 (47)
<b>Total</b>	71 (100)	53 (100)	57 (100)	181 (100)
<b>Idade (em anos)</b>				
≤ 19 anos	05 (7)	03 (5,6)	04 (7)	12 (6,6)
20-59 anos	56 (78,8)	33 (62,2)	35 (61,4)	124 (68,4)
≥ 60 anos	10 (14,2)	17 (32,2)	18 (31,6)	45 (25)
<b>Total</b>	71 (100)	53 (100)	57 (100)	181 (100)
<b>Hábito de fumar</b>				
Sim	12 (17)	16 (30)	12 (21)	40 (22,2)
Não	40 (56,3)	35 (66)	45 (79)	120 (66,2)
Ignorado	19 (26,7)	02 (4)	0 (0)	21 (11,6)
<b>Total</b>	71 (100)	53 (100)	57 (100)	181 (100)
<b>Uso excessivo de álcool</b>				
Sim	10 (14)	10 (19)	2 (3,5)	22 (12,2)
Não	42 (59,2)	41 (77,3)	55 (96,5)	138 (76,2)
Ignorado	19 (26,8)	02 (3,7)	0 (0)	21 (11,6)
<b>Total</b>	71 (100)	53 (100)	57 (100)	181 (100)
<b>Portador de HAS*</b>				
Sim	5 (7,5)	7 (13,2)	8 (14)	20 (11,1)
Não	45 (63)	43 (81,1)	48 (84,2)	136 (75,1)
Ignorado	21 (29,5)	3 (5,7)	1 (1,8)	25 (13,8)
<b>Total</b>	71 (100)	53 (100)	57 (100)	181 (100)
<b>Portador de DM**</b>				
Sim	05 (7,2)	05 (9,4)	05 (9)	15 (8,3)
Não	45 (63,3)	46 (87)	52 (91)	143 (79)
Ignorado	21 (29,5)	2 (3,6)	0 (0)	23 (12,7)
<b>Total</b>	71 (100)	53 (100)	57 (100)	181 (100)

**Fonte:** Elaborada pela autora

**Legenda:** HAS\*: Hipertensão Arterial Sistêmica; DM\*\*: Diabetes Mellitus

**Tabela 2** - Características laboratoriais dos pacientes sintomáticos respiratórios participantes do estudo.

<b>Exames laboratoriais</b>	<b>TB pulmonar n (%)</b>	<b>Controle 1 n (%)</b>	<b>Controle 2 n (%)</b>	<b>Total n (%)</b>
<b>Realização da sorologia para o vírus HIV pelo serviço de saúde</b>				
Sim	24 (33,8)	18 (34)	21 (37)	63 (34,8)
Não	28 (39,5)	35 (66)	36 (63)	99 (54,7)
Ignorado	19 (26,7)	0 (0)	0 (0)	19 (10,5)
<b>Total</b>	<b>71 (100)</b>	<b>53 (100)</b>	<b>57 (100)</b>	<b>181 (100)</b>
<b>Teste Tuberculínico</b>				
Não reator	8 (11)	0 (0)	57 (100)	65 (36)
Reator	49 (69)	53 (100)	0 (0)	102 (56,3)
Ignorado	14 (20)	0 (0)	0 (0)	14 (7,7)
<b>Total</b>	<b>71 (100)</b>	<b>53 (100)</b>	<b>57 (100)</b>	<b>181 (100)</b>
<b>Raio-X</b>				
Normal	2 (2,8)	32 (60,4)	31 (54,4)	65 (36)
Alterado	46 (64,8)	11 (20,8)	10 (17,5)	67 (37)
Ignorado	23 (32,4)	10 (18,8)	16 (28,1)	39 (27)
<b>Total</b>	<b>71 (100)</b>	<b>53 (100)</b>	<b>57 (100)</b>	<b>181 (100)</b>
<b>Baciloscopia</b>				
Positiva	58 (82)	0 (0)	0 (0)	58 (32)
Negativa	10 (14)	40 (75,5)	45 (79)	95 (52,5)
Ignorado	3 (4)	13 (24,5)	12 (21)	28 (15,5)
<b>Total</b>	<b>71 (100)</b>	<b>53 (100)</b>	<b>57 (100)</b>	<b>181 (100)</b>
<b>Cultura para o <i>M. tuberculosis</i></b>				
Positiva	47 (66,2)	0 (0)	0 (0)	47 (26)
Negativa	0 (0)	53 (100)	57 (100)	110 (61)
Ignorado	24 (33,8)	0 (0)	0 (0)	24 (13)
<b>Total</b>	<b>71 (100)</b>	<b>53 (100)</b>	<b>57 (100)</b>	<b>181 (100)</b>

**Fonte:** Elaborada pela autora

## 8.2 Distribuição da frequência alélica e genotípica do SNP na posição -1082A/G do gene da IL-10 na população estudada e sua associação com o desenvolvimento da tuberculose pulmonar ativa

O presente estudo realizou a determinação da frequência alélica e genotípica do SNP na posição -1082A/G do gene da IL-10 em 277 indivíduos distribuídos nos quatro grupos de estudos (Tabela 3).

Foram encontrados três genótipos na posição -1082: G/G, G/A e A/A. O alelo A e o genótipo AA foram considerados de referência na análise de associação relativa da doença no modelo codominante, expressa pelo cálculo do *odds ratio* (OR) e seu IC (95%). As frequências do polimorfismo -1082A/G do gene da IL-10 nos grupos estudados encontram-se em equilíbrio Hardy-Weinberg ( $p < 0.05$ ).

Nos 277 indivíduos participantes do estudo, a frequência do alelo selvagem -1082A (58,5%) foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao -1082G (41,5%) e as frequências genotípicas encontradas foram 40% e 23% para os homozigotos -1082AA e -1082GG, respectivamente e 37% para o heterozigoto -1082GA, com significância estatística ( $p < 0.0001$ ). Podemos observar uma maior frequência tanto do alelo selvagem -1082A quanto do genótipo -1082AA na população geral estudada.

Ao avaliar os resultados através da estratificação dos pacientes nos grupos de estudo, observou-se que no grupo com tuberculose pulmonar comparado com os controles 1 e 2, a frequência do alelo mutante -1082G não apresentou diferença estatística significativa ( $p = 0,70$ ;  $p = 1$ , respectivamente). Por sua vez, nos pacientes do grupo controle 3, a frequência do alelo mutante -1082G (22%) foi significativamente menor ( $p < 0.0001$ ), quando comparado com o grupo caso (54%) (Tabela 3).

A análise da frequência genotípica -1082GA e -1082GG entre os grupos de estudo, não encontrou diferença estatística significativa entre o grupo de pacientes com tuberculose pulmonar e os pacientes dos grupos controle 1 ( $p = 0,65$ ;  $p = 0,81$ ) e 2 ( $p = 0,64$ ;  $p = 1$ ), respectivamente. O genótipo -1082GG (32%) apresentou uma frequência significativamente maior ( $p < 0.0001$ ) no grupo caso quando comparado ao grupo controle 3 (5%). Na análise do genótipo heterozigoto -1082GA, foi observada uma frequência significativamente maior ( $p < 0.0001$ ) no grupo caso (42%) quando se comparou com o grupo controle 3 (35%) (Tabela 3). Entre os grupos de estudo, o genótipo selvagem -1082AA (60%) apresentou maior frequência apenas no grupo controle 3.

O estudo avaliou o SNP -1082A/G do gene da IL-10 com o risco de desenvolvimento da tuberculose pulmonar nos diferentes grupos de estudo no modelo codominante. O grupo caso formado por pacientes com tuberculose pulmonar foi avaliado comparando-se com os grupos controles 1 ( $p=0,65$ ;  $p=0,81$ ) e 2 ( $p=0,64$ ;  $p=1$ ), não encontrando resultado de associação através da análise alélica e genotípica. Quando o grupo caso foi comparado com o grupo controle 3, observou-se uma diferença estatística significativa, tanto da presença do alelo mutante -1082G [ $p<0.0001$ ; 3.90 [2.45- 6.59], quanto dos genótipos -1082AG [ $p<0.0001$ ; 2.90 [1.42- 5.95] e -1082GG [ $p<0.0001$ ; 15.50 [5.18- 1.62], com uma associação de risco ao desenvolvimento da forma pulmonar da doença, demonstrando que os indivíduos portadores do alelo G mostraram ter um grande efeito de risco para a tuberculose, pois estavam em maior frequência nos indivíduos do grupo com tuberculose pulmonar. Um resultado de associação com significância estatística da presença do alelo mutante -1082G [ $p=0.001$ ; 1.92 [1.28 – 2.90] e dos genótipos -1082AG [ $p=0.03$ ; 2.06 [1.02 - 4.29] e -1082GG [ $p=0.004$ ; 2.92 [1.34 – 6.44] também foi encontrado entre o grupo caso e todos os indivíduos dos grupos controles (1, 2 e 3) analisados conjuntamente (Tabela 3).

Foi também realizada uma análise de associação relativa do SNP -1082A/G com a tuberculose nos seguintes modelos genéticos: dominante, -1082G/A-GG [ $p<0.0001$ ; OR= 4.49 (2.30-8.75)] e no recessivo -1082GG [ $p<0.0001$ ; OR= 9.20 (3.29-25.70)], encontrando também efeito de risco para a tuberculose pulmonar. O modelo sobredominante não apresentou significância estatística ( $p=0.31$ ).

A análise de regressão logística multivariada não demonstrou diferença estatística significativa das frequências alélicas e genotípicas para o SNP -1082G/A, utilizando as co-variáveis: sexo, idade, hábito de fumar e beber e portadores de diabetes mellitus e hipertensão arterial sistêmica ( $p=0.3$ ;  $p=0.47$ ;  $p=0.67$ ;  $p=0.56$ ;  $p=0.42$ ;  $p=0.38$ , respectivamente)

### 8.3 Distribuição da frequência alélica e genotípica do SNP na posição -308G/A do gene do TNF- $\alpha$ na população estudada e sua associação com o desenvolvimento da tuberculose pulmonar ativa

Foram encontrados três genótipos na posição -308: G/G, G/A e A/A. O alelo G e o genótipo GG foram considerados de referência na análise de associação relativa da doença no modelo codominante, expressa pelo cálculo do *odds ratio* (OR) e seu IC (95%). As frequências do polimorfismo -308G/A do gene do TNF- $\alpha$  nos grupos estudados encontram-se em equilíbrio Hardy-Weinberg ( $p < 0.05$ ).

A frequência do alelo selvagem -308G (72%) foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) em todos os 282 indivíduos participantes do estudo quando comparado com o alelo -308A (28%). Quanto à distribuição da frequência genotípica, o homozigoto -308GG (53,5%) foi significativamente ( $p < 0,0001$ ) mais freqüente na população geral estudada, quando comparado com o -308AA (9,5%) e o heterozigoto -308GA (37%).

A frequência alélica e genotípica do SNP -308G/A foi avaliada entre os grupos de estudo. Não houve diferença estatística significativa da frequência do alelo mutante -308A entre o grupo caso e os controles 1 ( $p = 0.75$ ), 2 ( $p = 0.53$ ) e 3 ( $p = 0.18$ ). Quanto à análise da frequência do genótipo homozigoto mutante -308AA (alto produtor de TNF- $\alpha$ ) também não foi observada diferença estatística significativa entre o grupo caso e os controles 1, 2 e 3 ( $p = 1$ ;  $p = 0.78$ ;  $p = 0.77$ , respectivamente). Por sua vez, o genótipo heterozigoto -308GA (50%) foi significativamente maior ( $p = 0.005$ ) no grupo de indivíduos saudáveis (controle 3) quando comparado com os pacientes com tuberculose pulmonar (27%). Nos demais controles 1 ( $p = 0.68$ ) e 2 ( $p = 0.54$ ) não foi observada diferença significativa para o genótipo heterozigoto -308GA. Foi observada baixa frequência do genótipo -308AA em todos os grupos estudados comparado com os genótipos -308AG e -308GG (Tabela 3).

O estudo avaliou o SNP -308G/A do gene do TNF- $\alpha$  com o risco de desenvolvimento da tuberculose pulmonar entre os diferentes grupos de estudo. O grupo caso formado por pacientes com tuberculose pulmonar foi avaliado comparando-se com os grupos controles: 1 ( $p = 0.751$ ;  $p = 0.684$ ;  $p = 1$ ) e 2 ( $p = 0.535$ ;  $p = 0.549$ ;  $p = 0.781$ ), não encontrando diferença estatística significativa entre os alelos e genótipos. Como pode ser observado, o grupo caso quando comparado com o grupo controle 3 apresentou associação estatística significativa [ $p = 0.005$ ; OR=0.374 (0.17–0.76)] para o genótipo heterozigoto -308GA, demonstrando uma associação de proteção ao desenvolvimento da tuberculose pulmonar, pois apresentou maior frequência no grupo clinicamente saudável (Tabela 3). No modelo genético dominante -

308G/A-AA foram encontrados os seguintes resultados: [ $p=0.017$ ; OR= 0.47 (0.25-0.88)], no sobredominante -308GA [ $p=0.0016$ ; OR= 0.36 (0.19-0.69)]. O modelo recessivo não apresentou significância estatística ( $p=0.21$ ) (Tabela 3).

A análise de regressão logística multivariada não demonstrou diferença estatística significativa das frequências alélicas e genóticas para o SNP -308G/A, utilizando as co-variáveis: sexo, hábito de fumar e beber e portadores de diabetes mellitus e hipertensão arterial sistêmica ( $p=0.7$ ;  $p=0.06$ ;  $p=0.04$ ;  $p=0.16$ ;  $p=0.15$ , respectivamente). Na análise entre os grupos caso e controle 2, utilizando a co-variável idade, foi detectado sinal de associação, com significância estatística, com o genótipo -308GG, no grupo menores de 50 anos e a doença em estudo comparado aos maiores de 50 anos [ $p = 0,034$ ; OR= 3.64 (1.36-9.73)].

**Tabela 3** - Análise das frequências alélicas e genóticas de SNPs dos genes da *IL-10* (-1082) e *TNF- $\alpha$*  (-308) dos pacientes e indivíduos participantes do estudo e associação com a tuberculose pulmonar ativa.

	TB pulmonar		Controles		<i>p</i> -value; OR* [95% C.I.**]			
Polimorfismo	Total (n=71)	Controle 1 (n=53)	Controle 2 (n=52)	Controle 3 (n=101)	TB vs. Controle 1	TB vs. Controle 2	TB vs. Controle 3	TB vs. Controles
<i>IL10</i> (-1082)								
<b>Alelos</b>								
A	66 (0.46)	52 (0.49)	49 (0.47)	157 (0.78)	<b>Ref</b>	<b>Ref</b>	<b>Ref</b>	<b>Ref</b>
G	76 (0.54)	54 (0.51)	55 (0.53)	45 (0.22)	0.707; 1.10 [0.64 – 1.89]	1; 1.02 [0.59 – 1.75]	<b>&lt;0.0001; 3.90</b> [2.45- 6.59]	<b>0.001; 1.92</b> [1.28 – 2.90]
<b>Genótipos</b>								
AA	18 (0.25)	16 (0.30)	15 (0.28)	61 (0.60)	<b>Ref</b>	<b>Ref</b>	<b>Ref</b>	<b>Ref</b>
AG	30 (0.42)	20 (0.38)	19 (0.37)	35 (0.35)	0.653; 1.32 [0.50 - 3.51]	0.648; 1.31 [0.48 - 3.52]	<b>&lt;0.0001; 2.90</b> [1.42- 5.95]	<b>0.03; 2.06</b> [1.02 - 4.29]
GG	23 (0.32)	17 (0.32)	18 (0.35)	5 (0.05)	0.81; 1.19 [0.43 - 3.33]	1; 1.06 [0.38 – 2.95]	<b>&lt;0.0001; 15.50</b> [5.18- 1.62]	<b>0.004; 2.92</b> [1.34 – 6.44]
<i>TNF</i> (-308)								
<b>Alelos</b>	<b>Total (n=71)</b>	<b>Controle 1 (n=53)</b>	<b>Controle 2 (n=57)</b>	<b>Controle 3 (n=101)</b>	<b>TB vs. Controle 1</b>	<b>TB vs. Controle 2</b>	<b>TB vs. Controle 3</b>	<b>TB vs. Controles</b>
G	107 (0.75)	78 (0.74)	82 (0.72)	139 (0.75)	<b>Ref</b>	<b>Ref</b>	<b>Ref</b>	<b>Ref</b>
A	35 (0.25)	28 (0.26)	32 (0.28)	63 (0.25)	0.751; 0.911 [0.51- 1.62]	0.535; 0.838 [047 - 1.46]	0.186; 0.721 [0.44-1.71]	0.331; 0.795 [0.49 – 1.24]
<b>Genótipos</b>								
GG	44 (0.62)	31 (0.58)	32 (0.56)	44 (0.44)	<b>Ref</b>	<b>Ref</b>	<b>Ref</b>	<b>Ref</b>
AG	19 (0.27)	16 (0.3)	18 (0.32)	51 (0.5)	0.684; 0.838 [0.34-2.04]	0.549; 0.769 [0.32-1.82]	<b>0.005; 0.374</b> [0.17-0.76]	0.06; 0.544 [0.27-1.03]
AA	8 (0.11)	6 (0.11)	7 (0.12)	6 (0.06)	1; 0.940 [0.25-3.64]	0.781; 0.832 [0.23-3.00]	0.775; 1.32 [0.34-5.06]	1; 0.102 [0.35 – 2.67]

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: OR\*: Odds Ratio; C.I.\*\*: Intervalo de confiança

#### 8.4 Análise comparativa das frequências alélicas e genótípicas dos SNPs estudados na população mundial

A análise da distribuição das frequências alélicas e genótípicas dos SNPs dos genes da IL-10 (-1082A/G) e TNF- $\alpha$  (-308G/A) da população mundial (Referência: Homo sapiens) foi comparada com estudos científicos publicados na população brasileira e na população do estudo, demonstrada nas tabelas 4 e 5.

**Tabela 4** - Análise da frequência do SNP -1082A/G referência do gene da IL-10 na população mundial.

População	Amostragem Grupo Individual	Genótipo			Alelo	
		A/A	A/G	GG	A	G
CEU	Europeu	-----	-----	1.000	-----	1.000
HapMap-CEU	Europeu	0.212	0.513	0.274	0.469	0.531
HapMap-YRI	Sub-Sahara Africano	0.531	0.389	0.080	0.726	0.274
D-0	Africano Americano	0.333	0.524	0.143	0.595	0.405
CABG_Northamerican	Norte americano	0.294	0.502	0.204	0.545	0.455
CAUC1	Caucasiano	0.387	0.419	0.194	0.597	0.403
HAPMAP-MEX	Mexicano	0.440	0.480	0.080	0.680	0.320
Brasil	Rio de Janeiro	0.433	0.509	0.058	0.680	0.320
Pernambucana	População geral do estudo	0.40	0.37	0.23	0.585	0.415
Pernambucana	TB pulmonar do estudo	0.253	0.423	0.324	0.46	0.54
Pernambucana	Indivíduos clinicamente saudáveis do estudo	0.60	0.35	0.05	0.78	0.22

**Fonte:** National Center for Biotechnology Information, 2013b

**Legenda:** SNP referência: Homo sapiens; Cluster Report: rs1800896; Tipo molecular: genômico



**Tabela 5** - Análise da frequência do SNP referência -308G/A do gene do TNF- $\alpha$  na população mundial.

População	Amostragem Grupo Individual	Genótipo			Alelo	
		A/A	A/G	GG	A	G
HapMap-CEU	Europeu	0.018	0.31	0.673	0.173	0.827
CEU	Europeu	-----	0.433	0.567	0.217	0.783
HapMap-YRI	Sub-Sahara Africano	0.009	0.159	0.832	0.088	0.912
YRI	Sub- Sahara Africano	-----	0.123	0.877	0.061	0.939
PGA-African-Panel	Africano Americano	0.045	0.318	0.636	0.205	0.795
AAM-Geno-Panel	Africano Americano	0.018	0.211	0.772	0.123	0.877
PDR90	Global	0.023	0.126	0.851	0.086	0.914
PDR90	Global	0.025	0.100	0.875	0.075	0.925
CAUC1	Caucasiano	-----	0.333	0.667	0.167	0.833
Brasil	Rio de Janeiro	0.053	0.440	0.903	0.084	0.916
Pernambucana	População geral do estudo	0.095	0.37	0.535	0.28	0.72
Pernambucana	TB pulmonar do estudo	0.11	0.27	0.62	0.25	0.75
Pernambuco	Indivíduos clinicamente saudáveis do estudo	0.06	0.50	0.44	0.25	0.75

**Fonte:** National Center for Biotechnology Information, 2013a

**Legenda:** SNP referência: Homo sapiens; Cluster Report: rs1800629; Tipo molecular: genômico

## 9 DISCUSSÃO

A tuberculose, embora seja uma doença curável, ainda permanece como a principal causa de morbimortalidade em todo o mundo (O’GARRA et al., 2013; ZEMBRZUSKI et al., 2010). O controle dessa epidemia global tem sido prejudicado, principalmente, pela falta de uma vacina eficaz e de métodos diagnósticos sensíveis e rápidos, como também pelo surgimento de formas resistentes de *M. tuberculosis* as drogas específicas. Além disso, a resposta imune contra o *M. tuberculosis* é complexa e não completamente bem caracterizada, o que dificulta as tentativas de desenvolver novos testes, vacinas e tratamentos (O’GARRA et al., 2013).

O desenvolvimento da tuberculose ativa resulta de interações entre o ambiente, o hospedeiro, o patógeno e os fatores de risco conhecidos tais como a co-infecção pelo vírus HIV, a imunodeficiência em geral, diabetes mellitus, a superlotação em ambientes pequenos e mal arejados, a desnutrição bem como a pobreza. Embora seja evidente que células T CD4+ e citocinas sejam fundamentais no controle da infecção pelo *M. tuberculosis*, ainda não estão claros quais os fatores do hospedeiro que determinam por que alguns indivíduos são protegidos da infecção pelo *M. tuberculosis*, enquanto outros passam a desenvolver a doença (YOUNG et al., 2002).

Diferentes taxas de incidência da tuberculose pulmonar ocorrem entre as raças, etnias, países e famílias, indicando uma predisposição genética na susceptibilidade a doença. Os fatores genéticos do hospedeiro podem, em parte, explicar porque algumas pessoas são mais ou menos susceptíveis à infecção. Diversas linhas de evidência, incluindo os estudos com gêmeos e estudos de associação do genoma completo, têm demonstrado que a genética do hospedeiro influencia fortemente a susceptibilidade à TB. No entanto, o real entendimento das variações genéticas específicas (polimorfismos) do genoma humano na susceptibilidade ou resistência a tuberculose continua a ser um desafio (AZAD et al., 2012; MOLLER; HOAL, 2010).

A infecção pelo *M. tuberculosis* por períodos prolongados sugere a existência de uma pressão de seleção evolutiva nas interações entre os genomas do patógeno e do hospedeiro (AZAD et al., 2012; GAGNEUX et al., 2012). Estudos epidemiológicos incluindo, estudos genéticos do tipo caso-controle têm sido realizados com várias famílias de genes humanos para avaliar os seus envolvimento na patogenia da tuberculose (TRAJKOV et al., 2009; VAN DE VEERDONK et al., 2010; ZHANG et al., 2011). Sendo assim, o presente estudo propôs investigar uma provável associação dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) funcionais localizados em regiões promotoras dos genes das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 com a

susceptibilidade ou resistência a tuberculose pulmonar ativa em pacientes procedentes do estado de Pernambuco.

Como o principal objetivo da pesquisa foi avaliar o risco de desenvolvimento da tuberculose pulmonar em uma população procedente do nordeste do Brasil, a partir da análise de SNPs funcionais, foi realizado um estudo genético-epidemiológico do tipo caso-controle em uma região endêmica de tuberculose. Sendo assim, os controles selecionados foram compostos por pacientes sintomáticos respiratórios com suspeita clínica inicial de tuberculose, tendo sido posteriormente descartada, e diagnosticados como portadores de outra patologia pulmonar, além do grupo composto por indivíduos clinicamente saudáveis. Portanto, tanto os pacientes com tuberculose pulmonar como dois dos grupos controles apresentaram o mesmo critério clínico de inclusão na pesquisa, fazendo com que a população estudada de doentes apresentasse uma uniformidade maior na seleção.

A OMS sugere que a abordagem dos casos sintomáticos respiratórios (SR) seja sistematizada e inclua a investigação de outras doenças, como infecção respiratória aguda, asma e DPOC, além da tuberculose. Essa estratégia, conhecida como estratégia PAL, visa fortalecer o sistema de saúde através da conexão entre as atividades de controle da tuberculose e os serviços de saúde. Como o sintoma mais comum na tuberculose pulmonar é a tosse, para fins de busca de casos, foram considerados casos sintomáticos respiratórios os indivíduos com tosse por mais de 3 semanas (ZHANG, 2009).

Os controles referentes aos sintomáticos respiratórios foram ainda avaliados quanto à exposição ao bacilo através dos achados clínico, epidemiológico e laboratorial, sendo classificados entre infectados (controle 1) e não infectados (controle 2) pelo *Mycobacterium tuberculosis*, além do grupo de indivíduos saudáveis. Além dos critérios acima descritos para seleção dos controles, todos os indivíduos participantes foram provenientes do estado de Pernambuco, uma região considerada com altos índices da doença. O estudo pode ser considerado pioneiro na análise de polimorfismos genéticos na tuberculose pulmonar com a população do nordeste do país, como também na seleção de três diferentes grupos controles.

A população de estudo foi selecionada, levando em consideração as observações feitas por Pacheco e Moraes (2009) que avaliam e discutem os principais problemas na realização de estudos clássicos do tipo caso-controle, sobretudo com relação à hanseníase e tuberculose. Os autores apontam que a correta seleção de controles é uma questão raramente discutida na literatura, em que é muito comum os trabalhos selecionarem controles entre doadores de bancos de sangue ou outros voluntários saudáveis, onde os indivíduos não são avaliados quanto à exposição à infecção. Outro problema assinalado pelos autores seria o cálculo do

tamanho adequado da amostra para detectar diferenças clínicas ou biológicas significativas entre os casos e controles.

Inicialmente a pesquisa realizou uma análise de múltiplos fatores desta população de importância clínica, epidemiológica e laboratorial. Os resultados do estudo apontaram uma diferença significativa para o maior número de casos de tuberculose ocorrer no gênero masculino ( $p=0.021$ ), o que concorda com a maioria dos trabalhos. Possível explicação pode estar relacionada a fatores biológicos intrínsecos ao gênero, como hábitos e estilo de vida, favorecendo uma maior exposição ao bacilo, elevando, portanto, os dados de incidência da doença nos homens (COUTINHO et al., 2012; VENDRAMINI et al., 2005). Quanto à faixa etária, observou-se uma maior frequência dos pacientes do grupo caso na faixa entre 20-59 anos, bem como nos controles 1 e 2, apesar de não apresentar diferença estatística entre os grupos. Os dados obtidos corroboram com a literatura nacional, no qual demonstra que nos países em desenvolvimento, como no caso do Brasil, 80% dos indivíduos com tuberculose ativa encontram-se na faixa etária entre 15-59 anos, ou seja, na faixa de maior produtividade social, causando um grande prejuízo sócio-econômico ao país (COELHO et al., 2010; VENDRAMINI et al., 2005).

A tuberculose pulmonar apresenta vários fatores de risco para o seu desenvolvimento, como os relacionados ao aspecto sócio-econômico, comportamental e biológico. No estudo foram avaliadas as co-variáveis como: hábito de fumar, uso excessivo de álcool e a presença de co-morbidades como diabetes mellitus e hipertensão arterial sistêmica entre os pacientes sintomáticos respiratórios. O estudo verificou que a maioria dos pacientes sintomáticos respiratórios declarou não possuir o hábito de fumar (66,2%), nem fazia uso excessivo de bebida alcoólica (76,2%), não encontrando associação com a tuberculose, apesar da literatura apontar como importantes fatores de risco para o desenvolvimento da doença (NARASIMHAN et al., 2013). No entanto, foi observado que o grupo de pacientes infectados pelo *Mtb* (controle 1) apresentou o maior percentual de fumantes (30%) e que faziam uso abusivo do álcool (19%), sendo esta com significância estatística ( $p=0,026$ ). Lin et al. (2007) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise, onde examinaram a reatividade a tuberculínica entre os fumantes e concluíram uma ligação causal entre exposição ao fumo, bem como para o álcool e o aumento do risco para a tuberculose latente, doença e risco de morte. Outra revisão sistemática concluiu que o risco de tuberculose é substancialmente elevado entre os indivíduos que bebem mais do que 40g de álcool por dia e/ou tem o uso do álcool desordenado (LONNROTH et al., 2008). O consumo excessivo de álcool leva à queda da imunidade, desnutrição e fragilidade social, além da exposição a situações de risco (CALIARI et al., 2007). Razões para o aumento do risco incluem alteração do sistema imune,

especificamente modificando as moléculas de sinalização responsável pela produção de citocinas (NARASIMHAN *et al.*, 2013).

A análise dos dados relacionados à presença de comorbidades não demonstrou diferença estatística significativa entre pacientes sintomáticos respiratórios participantes do estudo. Dentre as comorbidades identificadas no estudo, chamamos a atenção para a diabetes e a hipertensão arterial sistêmica, presentes em 11,1% e 8,3% da população estudada, respectivamente. Vários estudos de caso-controle demonstram o risco aumentado em cerca de 3 vezes de pacientes diabéticos em desenvolver a tuberculose, comparados sem a doença, bem como risco de morte (NARASIMHAN *et al.*, 2013). Quanto à análise da hipertensão arterial sistêmica como fator de risco para a tuberculose, nenhum trabalho relacionado com esta associação foi encontrado na literatura.

Quanto aos métodos diagnósticos para tuberculose pulmonar realizados, verificou-se que foram utilizados os tradicionais, ou seja, as técnicas de baciloscopia, cultura e raio-X em 84,5%, 87% e 73% dos indivíduos sintomáticos respiratórios, respectivamente. Neste contexto, a pesquisa bacteriológica apresenta-se como método importante, tanto para a elucidação diagnóstica, tratamento, quanto para o controle da doença em adultos (MS, 2011).

O teste tuberculínico é o método rotineiramente utilizado para identificar indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis* através da resposta imune celular, sendo utilizado no presente estudo na detecção da forma latente nos indivíduos participantes, segundo normas do Ministério da Saúde (2011). No grupo com TB ativa, pode-se observar que 11% não reagiram ao teste tuberculínico. Alguns indivíduos podem ser anérgicos ao teste (ausência de endurecimento após injeção do PPD), devido a estado imunológico que interfere na resposta celular de hipersensibilidade do tipo tardia (ZEMBRZUSKI *et al.*, 2010).

A radiografia do tórax é o método diagnóstico auxiliar na investigação da TB. Sua solicitação deve ser realizada para todo indivíduo com suspeita clínica da doença para que possa diferenciar imagens sugestivas de TB pulmonar de outras doenças respiratórias (BRASIL, 2011). No estudo verificou-se que 73% dos indivíduos investigados apresentaram resultados da radiografia pulmonar em seus prontuários, onde a maioria dos pacientes com tuberculose pulmonar (64,8%) apresentou o resultado alterado, demonstrando ser um bom método utilizado na definição diagnóstica.

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a associação entre genes relacionados à resposta imunológica do hospedeiro com a susceptibilidade ou resistência a tuberculose latente ou doença ativa, incluindo a análise de polimorfismos de base única de regiões promotoras de genes de citocinas (BEM-SELMA *et al.*, 2011; MORRIS *et al.*, 2011; STEIN *et al.*, 2007). O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina que atua na defesa contra

o *M. tuberculosis*. Níveis alterados de TNF- $\alpha$  podem estar influenciando a resposta imune contra o *M. tuberculosis* e contribuindo para a susceptibilidade a tuberculose (OLIVEIRA et al., 2004). A IL-10 é uma citocina imunorregulatória que tem papel crucial durante a fase latente/crônica da TB (ZHANG et al., 2011). A alta produção de IL-10 pode estar relacionada com a susceptibilidade e reativação da doença (TURNER et al., 1997). A associação de SNPs de regiões promotoras dos genes TNF- $\alpha$  (-308G/A) e IL-10 (-1082A/G) com a susceptibilidade e/ou resistência à tuberculose têm sido investigada em diferentes populações mundiais, porém os resultados ainda continuam controversos (ATES et al., 2008; BEMSELMA et al., 2011; OH et al., 2007; SCOLA et al., 2003)

O Brasil possui um território de tamanho continental, o quinto maior do mundo, dividido em cinco regiões geográficas, apresentando diversas histórias de colonização da população. Neste contexto, o Norte teve um grande influência da raiz indígena, o Nordeste teve uma história de forte presença africana devido à escravidão e o Sul foi principalmente colonizada por imigrantes europeus. Portanto, a população brasileira foi formada por uma extensa mistura a partir de três diferentes raízes ancestrais: ameríndios, europeus e africanos, resultando em uma grande variabilidade genética (PENA et al., 2011).

A origem étnica é um importante componente para várias doenças mediadas pelo sistema imunológico, inclusive a tuberculose, e essas informações na população brasileira são muito restritas (MORAES et al., 2003), sobretudo no nordeste do país. O presente estudo investigou a frequência de SNPs localizados em regiões promotoras dos genes do TNF- $\alpha$  (-308G/A) e IL-10 (-1082A/G) e sua associação com a susceptibilidade ou resistência à TB pulmonar em uma população do nordeste do Brasil. O estudo das frequências alélicas e genotípicas de regiões promotoras dos genes do TNF- $\alpha$  e IL-10 em diferentes populações tem demonstrado que esses polimorfismos exibem um diferente perfil de distribuição de acordo com etnia (AMIRZARGAR et al., 2006; DELGADO et al., 2002; KUMAR et al., 2008; ZHANG et al., 2011).

O estudo realizou uma análise comparativa das frequências alélicas e genotípicas dos referidos SNPs na população mundial e observou como era esperado, que se tratando de populações geneticamente heterogêneas, foram encontrados resultados concordantes e discordantes. Estes dados provavelmente servirão para futuras comparações de frequências alélicas e genotípicas, assim como para o estudo da genética de populações (BAENA et al., 2007).

O estudo também realizou uma análise comparativa da frequência dos SNPs estudados com outros trabalhos científicos realizados na população brasileira. Na análise da frequência do SNP -1082A/G, no presente estudo, encontrou que o alelo selvagem -1082A foi predominante

tanto na população geral (58,5%) como no grupo controle 3 (78%), formados por indivíduos clinicamente saudáveis, procedentes do estado de Pernambuco. O trabalho de Moraes et al. (2003), também demonstraram a alta representação do alelo A do mesmo SNP (68%) em 293 indivíduos saudáveis procedentes da cidade do Rio de Janeiro/RJ, concordando com os nossos resultados. Quanto à análise dos genótipos -1082AA e -1082GA, o estudo encontrou frequências discordantes, de 60% e 35% no grupo controle 3, respectivamente, quando comparado com os achados de Moraes et al. (2003) (43,3% e 50,9%, respectivamente) entre as populações da cidade do Recife/PE e Rio de Janeiro/RJ.

Quanto à análise do SNP -308G/A do gene do TNF- $\alpha$ , o presente trabalho encontrou uma predominância da presença do alelo selvagem -308G (74% e 72%) nos grupos controles 1 e 2, respectivamente. O trabalho realizado por Oliveira et al. (2004), avaliou o mesmo SNP em pacientes portadores de outras pneumopatias, procedentes da cidade do Rio de Janeiro, encontrando também uma alta frequência do alelo selvagem -308G (91%). Em relação ao genótipo selvagem -308GG, observou-se resultados discordantes, com frequência de 58% e 56% nos controles 1 e 2 no presente estudo, respectivamente, e 90% no trabalho de Oliveira et al. (2004). O estudo de Angelo et al. (2012) avaliaram o SNP (-308G/A) de pacientes com Lupus eritematoso sistêmico e indivíduos saudáveis provenientes do hospital das clínicas de Pernambuco. Verificaram no grupo de indivíduos saudáveis, uma maior frequência do alelo -308G (90,1%), bem como do genótipo -308GG (80,2%). Na literatura, há poucos trabalhos realizados com a população brasileira que avaliem a frequência do SNP -308G/A, não possibilitando uma melhor análise comparativa.

No estudo, não foi encontrada diferença estatística significativa nas frequências alélicas e genótípicas dos SNPs estudados entre os pacientes com tuberculose pulmonar ativa e os grupos controles 1 e 2. Oliveira et al. (2004), estudando a relação entre a frequência do SNP -308G/A e o risco de desenvolvimento da tuberculose pulmonar e extrapulmonar na população da cidade do Rio de Janeiro comparado com controles doentes também não encontrou diferença significativa nas diferentes formas de apresentação clínica da tuberculose.

Entretanto, quando foi avaliada a distribuição da frequência genotípica do SNP -308G/A do gene do TNF- $\alpha$ , observou-se um aumento significativo do genótipo heterozigoto -308GA no grupo controle 3 comparado com o grupo caso ( $p=0.005$ ), demonstrando um fator de proteção ao desenvolvimento da tuberculose nesse grupo ( $OR=0.374$  [0.17-0.76]). Scola et al. (2003) discutem que o efeito do alelo é largamente dependente do status do genótipo, podendo ser composto por homozigose ou heterozigose. Não foi observada diferença significativa na análise das frequências alélica e genotípica do mutante -308AA, entre os grupos caso e controle 3, bem como nos três grupos de controles analisados conjuntamente.

Porém, observou-se uma leve tendência do aumento do genótipo -308AA no grupo caso (11%) em relação ao controle 3 (6%), sem significância estatística, provavelmente pelo baixo número amostral utilizado no estudo.

O TNF- $\alpha$  possui um papel importante na defesa e resposta imune da tuberculose, agindo sinergicamente com o interferon-gamma na ativação de macrófagos e na formação do granuloma em indivíduos infectados. A falha na organização do granuloma resulta na disseminação do *M. tuberculosis* e se não controlada poderá causar a morte do hospedeiro (SCOLA et al., 2003). Polimorfismos dentro de regiões regulatórias do gene têm um efeito significativo na transcrição, onde a presença do alelo mutante -308A resulta no aumento da produção do TNF- $\alpha$  (WILSON et al., 1997). A sua produção, regulada por um circuito complexo de interações moleculares, deverá ser equilibrada, pois o seu excesso leva a um acúmulo celular, comprometendo a função do órgão e exarcebando o dano tecidual. *In vivo ou in vitro*, a expressão de TNF- $\alpha$  ativa a produção de IL-10 e a interação entre os níveis de IL-10 e TNF- $\alpha$  pode influenciar o desenvolvimento da tuberculose (ORAL et al., 2006; SCOLA et al., 2003).

Estudos indicam que polimorfismos em regiões promotoras do gene da IL-10 influenciam a síntese protéica (TURNER et al., 1997), podendo estar envolvidos na progressão da tuberculose pulmonar. O alelo -1082G e haplótipos tem sido associados com alta produção, enquanto que o alelo -1082A e haplótipos com a baixa produção da IL-10 (ATES et al., 2008). Beamer et al. (2008) demonstraram que o bloqueio da ação da IL-10 *in vivo* durante a infecção crônica, estabilizou a carga bacteriana pulmonar, levando a sobrevivência dos camundongos CBA/J. Além disso, os resultados também indicaram o recrutamento de células T para os pulmões, bem como a produção de IFN- $\gamma$ , concluindo que a IL-10 promoveu a progressão da tuberculose.

Na análise dos resultados do SNP -1082A/G do gene da IL-10, observou-se um aumento significativo do alelo mutante -1082G [ $p < 0.0001$ ; OR=3.90 [2.45- 6.59] e dos genótipos -1082AG [ $p < 0.0001$ ; OR=2.90 [1.42- 5.95] e -1082GG [ $p < 0.0001$ ; OR=15.50 [5.18- 1.62], no grupo caso comparado com o controle 3, demonstrando uma associação de risco ao desenvolvimento da tuberculose pulmonar. O estudo também encontrou uma associação estatística significativa do alelo mutante -1082G [ $p = 0.001$ ; OR=1.92 [1.28 – 2.90] e dos genótipos -1082AG [ $p = 0.03$ ; OR=2.06 [1.02 - 4.29] e -1082GG [ $p = 0.004$ ; OR=2.92 [1.34 – 6.44] quando o grupo caso foi comparado com os todos os controles (analisados conjuntamente). Os resultados destas análises indicaram um risco aumentado (cerca de 3.9 vezes para portadores do alelo mutante -1082G) ao desenvolvimento da forma pulmonar no grupo caso comparado ao controle 3, o qual foi observada uma predominância do alelo



mutante -1082G, que de acordo com a literatura está relacionado com alta produção da citocina (TURNER et al., 1997).

Quanto a análise da frequência alélica e genotípica do SNP -1082A/G entre os grupos caso e controles 1 e 2, não foi encontrada associação estatística significativa, observando uma distribuição similar das frequências alélicas e genotípicas entre esses grupos. Uma possível explicação seria a definição do critério clínico para inclusão de doentes no estudo, ou seja, pacientes sintomáticos respiratórios, portadores de enfermidades pulmonares inespecíficas crônicas, que também podem estar com a produção alterada da citocina. Posteriormente, o estudo realizará uma análise estatística com este grupo de doentes sintomáticos respiratórios comparados com os controles saudáveis, para verificar se o SNP investigado também possui uma possível associação com o desenvolvimento de doenças crônicas pulmonares.

O estudo não encontrou diferença estatística significativa na análise de possível associação de risco da tuberculose pulmonar com os SNPs -308G/A e -1082A/G relacionados com às co-variáveis clínicas e demográficas dos pacientes sintomáticos respiratórios. Isto ocorreu provavelmente por causa do número insuficiente de pacientes quando se estratificou nos subgrupos de estudo para a realização da análise de regressão logística multivariada. Porém, foi encontrada uma associação significativa do genótipo -308GG e a doença em estudo na co-variável idade, demonstrando que os pacientes com TB pulmonar na faixa etária produtiva (<50 anos) quando comparado ao controle 2, apresentaram maior risco de exposição ao bacilo, tornando-os mais susceptíveis a doença, quando se comparou ao grupo de >50 anos.

Os resultados do estudo demonstraram a análise das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs e sua associação com a tuberculose pulmonar. Observou-se que o SNP -1082A/G mostrou ser bom marcador para a tuberculose, considerando que para existir uma associação do SNP com a doença em estudo, o nível de significância deve ser de 5%, ou seja, o valor de  $p < 0,05$ .

Vários estudos realizados em populações mundiais avaliaram a frequência de SNPs funcionais dos genes do TNF- $\alpha$  (-308G/A) e IL-10 (-1082A/G) e sua associação com a tuberculose. O trabalho de Scola et al. (2003), realizado na cidade da Sicília/Itália, demonstraram um aumento significativo da frequência do alelo -308A do TNF- $\alpha$  nos pacientes com tuberculose pulmonar comparado com controles saudáveis e não encontrou diferença significativa na análise do SNP -1082G/A. Na análise dos genótipos, ambos -308GG e carreadores do IL-10A/\* foram significativamente diminuídos nos pacientes com tuberculose pulmonar.

Oh et al. (2007), também investigaram os mesmos SNPs na população da Korea, não encontrando diferença estatística na frequência alélica e genotípica do SNP -308G/A entre os casos pulmonares e os controles saudáveis. Porém foi verificada uma associação significativa do alelo -1082A da IL-10 e do genótipo -1082AA no grupo com tuberculose comparados aos controles, onde concluíram que a presença do alelo -1082A homozigoto demonstrou risco aumentado comparado com o -1082G.

O estudo realizado por Henao et al. (2006) utilizou além dos pacientes doentes com várias formas clínicas (pulmonar, pleural e miliar), indivíduos reatores e não reatores ao teste tuberculínico e indicou o papel do polimorfismo referente ao baixo produtor de IL-10 (-1082A) na tuberculose, porém não encontraram associação significativa com o TNF- $\alpha$ . Amirzargar et al. (2006) estudaram a possível associação de polimorfismos funcionais com a tuberculose em pacientes iranianos e não encontraram diferença significativa entre pacientes pulmonares e controles para os SNPs -308G/A e -1082A/G.

O resultado do presente trabalho discorda com os estudos de Scola et al. (2003), Oh et al. (2007), Henao et al. (2006) e Amirzargar et al. (2006) na análise da associação dos referidos SNPs com o desenvolvimento da tuberculose. Embora seja difícil detectar as discrepâncias entre os estudos, possíveis explicações podem estar relacionadas aos diferentes tamanhos amostrais (estudos de caso e controle) utilizado em cada população ou ainda variações genéticas étnicas específicas entre as diferentes populações investigadas.

Oral et al. (2006), na população da Turquia, avaliaram as frequências dos SNPs em diferentes formas clínicas da doença da população da Turquia, demonstrando que o alelo -1082G foi significativamente mais freqüente nos pacientes do que nos controles saudáveis, porém não encontrou para o SNP -308G/A do TNF- $\alpha$ . Ates et al. (2008), também na Turquia, em seu trabalho demonstraram uma associação significativa entre TB e a frequência aumentada do alelo -1082G comparado aos controles, mas sem associação significativa com o SNP -308G/A, como também nas diferentes formas clínicas da tuberculose. Trajkov et al. (2009) estudaram a possível associação de polimorfismos com a tuberculose na Macedônia e demonstraram que os pacientes com genótipo -1082GG tiveram 2.5 vezes mais risco de desenvolver a tuberculose, enquanto que para o SNP -308 TNF- $\alpha$  não acharam associação.

O presente estudo concorda com os trabalhos de Oral et al. (2006), Ates et al. (2008) e Trajkov et al. (2009), onde encontrou uma frequência significativamente aumentada do alelo mutante -1082G nos pacientes do grupo com tuberculose pulmonar (54%) comparado com o grupo controle 3 (22%), relacionado com o alelo de alta produção da IL-10, ocasionando um desequilíbrio na resposta imune celular do tipo Th1/Th2, resultando no desenvolvimento da forma ativa da doença (KIDD et al., 2003).

Ben-Selma et al. (2011) também estudaram os SNPs TNF- $\alpha$  (-308G/A) e IL-10 (-1082A/G) na população da Tunísia e observaram que o alelo -308A bem como o genótipo -1082 AG estavam associado com o risco para TB extrapulmonar. No trabalho, indicaram a associação do genótipo -1082AA com resistência a TB pulmonar, concordando com os nossos achados. Sugeriram que a combinação de genótipos TNF- $\alpha$ /IL-10 de baixa produção pareceu ter efeito protetor na TB pulmonar.

Polimorfismo no gene da IL-10 (-1082) e a associação com a tuberculose foram investigados por Tso et al. (2005), Shim et al. (2005), Anand et al. (2007) e Selvaraj et al. (2008) e não encontraram resultados de associação, discordando dos nossos resultados. Delgado et al. (2002) realizaram o estudo em 358 pacientes soro-negativos com tuberculose pulmonar e controles saudáveis procedentes do Camboja com diferentes polimorfismos e encontraram uma associação significativa do genótipo heterozigoto SNP -1082G/A com a tuberculose doença.

Polimorfismo no gene do TNF- $\alpha$  (-308) e a associação com a tuberculose também foram investigados por Kumar et al. (2008) e Vejbaesya et al. (2007) e não encontraram resultados de associação com a susceptibilidade ou resistência a tuberculose, discordando dos nossos achados.

Oliveira et al. (2004) estudaram pacientes da cidade do Rio de Janeiro e encontraram que a frequência do homozigoto mutante -308A e AA foi significativamente maior no grupo de pacientes com TB (OR= 1,94 [IC=1,07-3,58] e OR=2,48 [IC=0,93-0,97]). Explicaram que possivelmente este grupo de pacientes sejam funcionalmente mais hábeis em produzir TNF- $\alpha$ , mas também carregassem mutações em outros genes regulatórios da imunidade a tuberculose (IFN- $\gamma$ ), não permitindo que esta citocina exerça seu papel inflamatório, favorecendo o desenvolvimento da doença.

Resultado contrário foi obtido no estudo de Correa et al. (2004) na população da Colômbia, onde encontraram uma associação de risco da presença do alelo -308G com a tuberculose e indicaram que a presença do alelo -308A resulta no efeito protetor. Ainda demonstraram a presença do genótipo heterozigoto (-308GA) como fator de proteção para a tuberculose, concordando com os resultados obtidos do presente estudo. Os dados sugerem a presença de uma seleção genética na população estudada. Correa et al. (2004) discutem ainda que possivelmente exista uma dominância na seleção, ou seja, vantagem de heterozigose, na qual os heterozigotos para um determinado alelo são resistentes a uma enfermidade (tuberculose), mas susceptíveis a outras (autoimunidade).

A grande diversidade genética, assim como a distribuição de frequências alélicas observadas na maioria dos genes polimórficos, é influenciada e gerada por forças seletivas

próprias do ambiente em que se desenvolvem as espécies, tais como agentes infecciosos, sobrevivência e dominância genética, entre outros. Neste contexto, se tem postulado a teoria da “vantagem de heterozigose” em humanos e “vigor híbrido” em plantas e algumas espécies animais (HEDRICK et al., 1990). Esta teoria propõe que os indivíduos heterozigotos são capazes de responder de maneira mais eficiente as exigências do meio, já que possuem uma maior variedade genética que lhes permite se adaptar as condições adversas, em particular, ao ataque de diversos microorganismos (COOKE; HILL, 2001). Esta teoria parece estar sustentada pela co-evolução entre patógenos e hospedeiros, na qual existe uma seleção positiva para aqueles genes envolvidos na interação hospedeiro-parasita (HEDRICK et al., 1990; SCHLIEKELMAN et al., 2001).

Embora mecanismos associados com polimorfismos que levam a alterações na expressão gênica sejam ainda pouco compreendidos, é bem conhecido que a tuberculose é parcialmente dependente de um controle poligênico (SHAW et al., 1997). Os componentes genéticos que participam da defesa do hospedeiro contra a tuberculose, não deverão ser os únicos fatores, mas também deve ser considerada a interação gene-ambiente. Também não é muito conhecido se o polimorfismo por si só contribui para a susceptibilidade e/ou proteção para a TB ou devido a existência de um desequilíbrio entre alelos susceptíveis a uma doença. Muitos desses polimorfismos ocorrem em padrões étnicos específicos. Portanto, a identificação desses genes e de suas interações é de grande importância no entendimento do papel dos fatores genéticos na patogênese da tuberculose, podendo levar a novos caminhos de tratamento ou profilaxia.

## 10 CONCLUSÕES

- O genótipo heterozigoto -308GA demonstrou ser um fator de proteção ao desenvolvimento da tuberculose pulmonar;
- O alelo mutante -1082G demonstrou associação de risco ao desenvolvimento da tuberculose pulmonar;
- O SNP -1082A/G mostrou ser bom marcador para a tuberculose pulmonar;
- O grupo caso e os controles doentes apresentaram distribuição similar das frequências alélicas e genóticas dos SNPs -308G/A e -1082A/G;
- Os SNPs -308G/A e -1082A/G não demonstraram associação com o desenvolvimento da tuberculose pulmonar na população estudada com às covariáveis sexo, hábito de fumar e beber e portadores de diabetes mellitus e hipertensão arterial sistêmica;
- O genótipo -308GG no grupo com <50 anos demonstrou ser um fator de risco ao desenvolvimento da tuberculose pulmonar;

## **11 PERSPECTIVAS**

- Estudos futuros deverão ser realizados com uma maior casuística de indivíduos do nordeste do Brasil para uma melhor caracterização alélica e genotípica dos alvos moleculares investigados;
- Correlacionar os SNPs estudados com os níveis de citocinas expressos, para o real entendimento do papel dos fatores genéticos na patogênese da tuberculose em populações com diferentes etnias.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.
- ABHIMANYU, et al. Differential serum cytokine levels are associated with cytokine gene polymorphisms in north Indians with active pulmonary tuberculosis. **Infection, genetics and evolution**, Amsterdam, v.11, p. 1015-1022, 2011.
- AFZAL, M. S et al. Interleukin gene promoter polymorphism as a potential host susceptibility factor in Pakistani patients with pulmonary tuberculosis. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.10, n.66, p 14706-14710, 2011.
- ALAMELU, R. Immunology of tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, p. 213-232 Oct. 2004.
- AMIM, L. H. L. V. et al. Role of IFN- $\gamma$  +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. **Molecular Biology Reports**, Basel,v. 35, p. 563–566, 2008.
- AMIRZARGAR, A. A. et al. Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. **European cytokine network**, Montrouge, v.17, n.2, p. 84-89, 2006.
- ANAND, S. P. et al. Interleukin-12B & interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 126, p.135-138, 2007.
- ANDREOLI, T. et al. **Infections of the lower respiratory tract: cecil essentials of medicine**. 4th. ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 699-707.1997.
- ANSARI, A. et al. Cytokine gene polymorphisms across tuberculosis clinical spectrum in Pakistani patients. **Plos One**, San Francisco, v.4, n.3, p. 1-7, 2009.
- ARDLIE, K, et al. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. **Nature Reviews Genetics**, London, n.3, p. 299–309, 2002.
- ARNOLD, C. Molecular evolution of Mycobacterium tuberculosis. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 13, n. 2, p 120-128, 2007.
- ASSIS, N.C.S. et al. Diagnóstico da tuberculose pulmonar, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2007.
- ATES, Ö. et al. A. Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene Polymorphisms in Tuberculosis. **Journal of Clinical Immunology**, New York, v. 28, p. 32–236, 2008.
- AZAD, A. K. et al. Innate Immune Gene Polymorphisms in Tuberculosis. **Infection and Immunity**, Washington. v.80, n. 10, p. 3343, 2012.

BAENA, A. et al. TNF $\alpha$  promoter single nucleotide polymorphisms are markers of human ancestry. **Genes & Immunity**, New York, v. 3, p. 482-487, 2002.

BARRETO, A. M. W. et al. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**, 2. ed. Brasília, Ministério da Saúde, 1994.

BEAMER, G. L. et al. Interleukin-10 Promotes *Mycobacterium tuberculosis* Disease Progression in CBA/J Mice. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 181, n. 8, p. 5545–5550, 2008.

BETHLEM, N. **Pneumologia: tuberculose**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000.

BELLAMY, R. Genetic susceptibility to tuberculosis. **Clinics in Chest Medicine**, Philadelphia, v. 26, n.2, p. 233-46, 2005.

BEN-SELMA, W. et al. Association of TNF- $\alpha$  and IL-10 polymorphisms with tuberculosis in Tunisian populations. **Microbes and Infection**, Paris, n. 13, p. 837-843, 2011.

BERTOLLI-FILHO, C. **História Social da Tuberculose e do Tuberculoso: 1900-1950**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2001.

BIKMAEVA, A. R. et al. Polymorphism of the tumor necrosis alpha gene in patients with infiltrative tuberculosis and from the Bashkorstan populations. **Molecular Biology**, Moscou, v. 36, n. 5, p. 784-7, 2002.

BIRD, L. The tuberculosis signature. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 10. Oct. p.677, 2010.

BLACKWELL, J. et al. Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. **Molecular Medicine**, St. Louis, v. 1, p. 194–205, 2004.

BLOMGRAN, R. et al. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. **Cell Host Microbe**, Cambridge, v. 11, p. 81–90, 2012.

BLOOM, B. R.; MURRAY. C. J. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. **Science**, Washington, v. 257, p. 1055-64, 1992.

BONECINI-ALMEIDA, M. G. Down-modulation of lung immune responses by interleukin-10 and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and analysis of receptor I and II in active tuberculosis. **Infection and Immunity**, Washington, v.72, n.5, p. 2628-2634, 2004.

BOUSSIOTIS, V. A. et al. IL-10-producing T cell suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. **The journal of clinical investigation**, Ann Arbor, v. 105, p. 1317-1325, 2000.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico: especial tuberculose**. 2012a. Disponível em:  
<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bolepi\\_v43\\_especial\\_tb\\_correto.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bolepi_v43_especial_tb_correto.pdf)>. Acesso em: 4 nov. 2012.



\_\_\_\_\_. **Indicadores de Morbidade e Fatores de Risco.** Taxa de Incidência de Tuberculose. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

\_\_\_\_\_. **Informe técnico de tuberculose.** Brasília: Ministério da Saúde, 2010b. Disponível em:<  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_tb\\_julho10\\_certo\\_22\\_07\\_2010.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tb_julho10_certo_22_07_2010.pdf)>  
Acesso em: 5 abr 2013.

\_\_\_\_\_. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias.** 3. ed. Brasília, DF, 2008.

\_\_\_\_\_. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose.** Brasília: Ministério da Saúde , 2012b. Disponível em:  
<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ap\\_5\\_encontro\\_final\\_site.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ap_5_encontro_final_site.pdf)> Acesso em: 04 nov. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde . **Álcool - da diversão ao vício.** Disponível em: <  
[http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=557](http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=557)  
> Acesso em: 7 abr. 2013.

\_\_\_\_\_. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em:  
<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_de\\_recomendacoes\\_tb.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_tb.pdf)> Acesso em: 4 de nov. 2012.

BURGNER, D. et al. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? **Lancet Infectious Disease**, New York, v. 6, p.653–663, 2006.

BURRIL, J. Tuberculosis: A radiologic review. **Radiographics**, Easton, v. 27, p.1255-1273, 2007.

BUSTIN, S. A. Real-Time PCR. Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics. New York, Taylor & Francis, e-Library, 2006.

CALIARI, J. S.; FIGUEIREDO, R. M. Perfil de pacientes com tuberculose internados em um hospital especializado no Brasil. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v.9, n.4, p. 30-35, 2007.

CAMPOS, H. Diagnóstico da tuberculose. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v.15, n.2, p. 92-99, 2006.

CAMPOS, R.; PIANTA. C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunológica, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999. Rio Grande do Sul Brasil. **Boletim da Saúde Porto Alegre**, v. 15, n. 1, p. 61-71, 2001.

CARVALHO, C. N. et al. Subnotificação da comorbidade tuberculose AIDS: uma aplicação do método linkage. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.45, n.3, p. 548-555, 2011.

CAVALCANTI, Y. V. N. et al. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. **Hindawi Publishing Corporation Pulmonary Medicine**. v. 2012, p. 10. 2012

CHEN, X. et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. **Clinical Immunology**, Orlando, v.123, n.1, p. 50-59, 2007.

CHIACCHIO, T. et al. Characterization of regulatory T cells identified as CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD39<sup>+</sup> in patients with active tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 156, n.3, p. 463-470, 2009.

CLARK-CURTISS, J. E.; HAYDEL, S. E. Molecular Genetics of *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.57, p.517–549, 2003.

COÊLHO, D. M. M. et al. Perfil epidemiológico da tuberculose no município de Teresina-PI, no período de 1999 a 2005. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v.19, n.1, p. 33-42, 2010.

COLE, S. et al. Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, London, v. 393, p.537-544, 1998.

COLLIN, H. L. S.; KAUFMANN, S. H. E. The many faces of host responses to tuberculosis. **Immunology**, Oxford, v. 03, n.1, p.1–9, 2001.

COMSTOCK, G. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Prophit survey. **American Review of Respiratory Disease**, New York, v. 117, n.4, p. 621–624, 1978.

CONDE, M. B.; SOUZA, M. G. R. **Pneumologia e fisiologia: uma abordagem prática**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

COOKE G.S.; HILL A.V. Genetics of susceptibility to human infectious disease. **Nature Reviews**, London, v. 2, p. 967-77, 2001.

COOPER, A. M.; KHADER, S, A. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 226, p. 191–204, 2008.

COOPER, A. M. et al. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 186, n.1, p. 39-45, 1997.

CORBETT, E. L. et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 163, n. 9, p. 1009–1021, 2003.

CORREA, P. A. et al. Polimorfismo del TNF-a en autoinmunidad y tuberculosis. **Biomédica**, Bogotá, v. 24, suppl. 1, p. 43-51, 2004.

COUTINHO, L. S. A. et al. Perfil epidemiológico da tuberculose no município de João Pessoa. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, São Caetano do Sul, v. 16, n.1, p. 35-42, 2012.

DALEY, C.L. et al. **Radiographic manifestations of tuberculosis: A primer for clinicians**. San Francisco: Francis J. Curry National Tuberculosis Center, 2009.

DANIEL, T. M. Captain of Death: The story of tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v 339, n 18, p. 1335-1338, 1997.

DELGADO, J. C. et al.. Ethnic-Specific Genetic Associations with Pulmonary Tuberculosis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, p. 1463–8, 2002.

DESHPANDE, A. et al. TNF- $\alpha$  Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Human Papillomavirus 16–Associated Cervical Cancer. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 191, n.6. p. 969–76, 2005.

DE VALLIERE, S. et al. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, p. 6711–6720, 2005.

DLUGOVITZKY, D. et al. O. Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement. **FEMS Immunology And Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 18, p. 203-207, 1997.

DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101 suppl. 7, p. 697-714, 2006.

DUDBRIDGE, F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing Genotype Data. **Human heredity**, Basel, v. 66, p. 87–98, 2008.

DUSSAULT, A. A; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological Procedures Online**, Waterloo, v.8 n. 1, p. 1-10, 2006.

ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Immunology**, Oxford, v.12, p. 581-591, Aug. 2012.

FÄTKENHEUER, G. et al. The return of tuberculosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 34, p. 139-146, 1999.

FERGUSON, L. R. et al. Genes, diet and inflammatory bowel disease. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 622, p. 70-83, 2007.

FERRAZ, J. C. et al. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 39, p. 1387-1397, 2006.

FLYNN, J. L. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. **Tuberculosis**, Montevideo, v. 84, p. 93-101, 2004.

FLYNN J. L.; CHAN J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 19, p. 93–129, 2001.

- FLYNN, J. L. et al. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 178, n. 6, p. 2249-2254, 1993.
- FLYNN, J. L. et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**, Cambridge, v.2, no. 6, p. 561-572, jun. 1995.
- FRIEDEN T.R. et al. Tuberculosis, **The Lancet**, London, v. 362, n. 9387, p. 887–899, 2003.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE (Brasil). **Controle da tuberculose: Uma proposta de integração ensino-serviço**. 5. ed. Rio de Janeiro, 2002.
- GAGNEUX, S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. **Biological Sciences**, Sagamihara, n. 367, p.850–859, 2012.
- GLICKMAN, M. S.; JACOBS, W. R. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a discipline. **Cell**, Cambridge, v.104, p. 477-485, 2001.
- GOMEZ-REINO, J. J. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v. 48, p. 2122–7, 2003.
- GRAÇA, E. S. **Caracterização dos níveis plasmáticos e do polimorfismo +874T/A no gene IFN- $\gamma$  em pacientes com diferentes formas clínicas da tuberculose**. Belém, 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.
- GRAY, I. C. et al. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 9 n. 16, p. 2403-2408, 2000.
- GUYOT-REVOL, V. et al. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 173 n. 7, p. 803-810, 2006.
- HASAN, Z. et al. Relationship between Circulating Levels of IFN- $\gamma$ , IL-10, CXL9 and CCL2 in Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis is Dependent on Disease Severity. **Scandinavian Journal of Immunology**, Malden, v. 69, p. 259-267, 2008.
- HASS, F.; HASS, S. S. The origins of *Mycobacterium tuberculosis* and the notion of its contagiousness. **Tuberculosis**, Montevideo, v. 7, p.3-19, 1996.
- HEDRICK PW. Evolution at HLA: possible explanations for the deficiency of homozygotes in two populations. **Human heredity**, Basel, v. 40, p. 213-30, 1990.
- HENAO, M.I et al. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. **Tuberculosis**, Montevideo, v. 86. p. 11–9. 2006.
- HERNANDEZ-PANDO, R. et al. Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Wroclaw, v. 57, n.5, p. 355–367, 2009.

HERRMANN, J.L. et al. The role of human dendritic cells in tuberculosis: protector or non-protector? **Revue des Maladies Respiratoires**, Paris, v.23, p.6S21-6S28, 2006.

HUIZINGA, T. W. J. et al. Are differences in Interleukin 10 production associated with joint damage? **Rheumatology**, Basel, v.39, p. 1180-1188, 2000.

KHADER, S. A. Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. **PLoS ONE**, San Francisco, v.6, p.16161, 2011.

KHADER, S. A. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4<sup>+</sup> T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. **Nature Immunology**, New York, v.8, n.4, p. 369-377, 2007.

KIDD P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, Saindpoint, v. 8, p. 223–246, 2003.

KINHIKAR, A. G. et al. Potencial role for ESAT6 in dissemination of *M. tuberculosis* via human lung epithelial cells. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 75, n. 1, p. 92-106, 2010.

KLOTMAN, M. E. et al. Defensins in innate antiviral immunity. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 6, p. 447-456, 2006.

KRITSKI, A. L. et al. **Tuberculose**: do ambulatório à enfermaria. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000.

KRUTZIK, S. R.; MODLIN, R. L. The role of Toll-Like receptors in combating mycobacteria. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 16, p. 35-41, 2004.

KUBE, D. et al. Structural characterization of the distal 5' flanking region of the human interleukin-10 gene. **Genes and Immunity**, Basingstoke, v. 2, p.181-190, 2001.

KUBISTA, M, et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, New York, v. 27, p. 95–125, 2006.

KUBISTOVA, Z. et al. Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. **Biomedical papers of the medical Faculty of the University Palacky, Olomouc**, Czech Republic, v. 153, n. 2, p. 93-102, 2009.

KUMAR, V. et al. Differential association of tumour necrosis factor- $\alpha$  single nucleotide polymorphism (–308) with tuberculosis and bronchial asthma. **National Medical Journal of India**, New Delhi, v. 21, n. 3, p. 120-122, 2008.

JABADO, N. ; GROS, P. The genetics of vulnerability. **Nature**, London, v. 434, n. 7034, p. 709-711, 2005.

LAGO, P. M, et al. Interleukin-10 and Interferon-gamma patterns during tuberculosis treatment: possible association with recurrence. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v.16, n.5, p. 656-659, 2012.

LANDER, E.; SCHORK, N. Genetic dissection of complex traits. **Science**, Washington, v. 265, p. 2037–2048, 1994.

LAPA E SILVA, J. R.; BOÉCHAT, N. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 478-484, 2004.

LARCOMBE, L. A. et al. Functional Gene Polymorphisms in Canadian Aboriginal Populations with High Rates of Tuberculosis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 198, p.1175–9, 2008.

LEANDRO, A. C. C. S. et al. Genetic polymorphisms in vitamin D receptor, vitamin D-binding protein, Toll-like receptor 2, nitric oxide synthase 2, and interferon- $\gamma$  genes and its association with susceptibility to tuberculosis. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 42, p. 312-322, 2009.

LEMAÎTRE, N. et al. Comparison of the Real-Time PCR Method and the Gen Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Pulmonary and Nonpulmonary Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 9, p. 4307-4309, 2004.

LIN, H. H. et al. Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: a systematic review and metaanalysis. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 4, n. 1, p. 0173-0189, 2007. Disponível em <  
<http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.0040020>>  
Acesso : 4 de abr de 2013.

LONNROTH, K. et al. Alcohol use as a risk factor for tuberculosis-a systematic review. **BMC Public Health**, London, vol. 8, article 289, 2008.

LOPEZ-MADERUELO, D. et al. Interferon- $\gamma$  and Interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v.167, p. 970-975, 2003.

MAARTENS, G.; WILKINSON, R. J. Tuberculosis. **Lancet Infectious Disease**, New York, v. 370, p. 2030-2043, 2007.

MERZA, M. et al. S. The NRAMPI, VDR and TNF- $\alpha$  Gene Polymorphisms in Iranian Tuberculosis Patients: The Study on Host Susceptibility. **Brazilian Journal of Medical And Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 4, p. 252-256, 2009.

MOLLER, M. et al. Past, present and future directions in humangenetic susceptibility to tuberculosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 58, p. 3-26, 2009.

MORAES, M. O. et al. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. **Immunogenetics**. v. 54, n. 12, p. 896-9, 2003.

MORRIS, G. A, et al. Interleukin 12B (IL12B) genetic variation and pulmonary tuberculosis: a study of cohorts from The Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, p. 1-6, 2011. Disponível em : <

<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0016656&representation=PDF>> Acesso em: 10 de abr de 2013.

MOSAAD, Y. M. et al. Interferon-gamma +874 T/A and Interleukin-10 -1082 A/G single nucleotide polymorphism in Egyptian children with tuberculosis. **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, v.72, p. 358-364, 2010.

MOUTINHO, I. L. D. Tuberculosis immunological aspects in the infection and disease. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.21, n.1, p.42-48, 2011.

MURRAY, P. J.; YOUNG, R. A. Increased Antimycobacterial Immunity in Interleukin-10-Deficient-Mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n.6, p. 3087-3095, 1999.

NARASIMHAN, P. et al. Risk Factors for Tuberculosis. **Clinical pulmonary medicine**, Baltimore, v. 103, p. 1-11, 2013.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Quantitative molecular methods for infectious diseases: proposed guidelines. v. 23, n. 28, p. 6-8. 2001

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Análise da frequência do SNP referência TNF- $\alpha$  (-308G/A)**. Disponível em :  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1800629](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1800629)> Acesso em: 13 abr. 2013a.

\_\_\_\_\_ **Análise da frequência do SNP referência IL-10 (-1082A/G)**. Disponível em :  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1800896](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1800896)> Acesso 13 abr. 2013b.

NORTH, R. J; JUNG, Y. J. Immunity to Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 22, p. 599-623, 2004.

NOVAIS, C. M; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. **Biotecnologia Ciência & desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p. 10-13, 2005.

NUSSBAUM, R. L. et al. Variação Genética em Indivíduos: Mutação e Polimorfismo. In: NUSSBAUM R. L. et al. **Genética Médica** 6. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.

ODDO, M. et al. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Immunology**, Baltimore v. 160, p. 5448–5454, 1998.

O´GARRA, A. et al. The immune response in tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 31, p. 475-527, 2013.

O´GARRA, A.; VIEIRA, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nature Medicine**, New York, v. 10, p. 801–805, 2004.

OH, J. H. et al. Polymorphisms of interleukin-10 and tumour necrosis factor- $\alpha$  genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis. **Respirology**, Carlton, v.12, p. 594-598, 2007.

OLIVEIRA, M. M. et al. Distribuição de Polimorfismos de Base única (SNPs) no gene de TNF-alfa (-238/-308) entre pacientes com TB e outras pneumopatias: marcadores genéticos de susceptibilidade a ocorrência de TB? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 371-377, 2004.

OLLIER, W. E. R. Cytokine genes and disease susceptibility. **Cytokine**, San Diego, v. 28, p. 174-8, 2004.

OPDAL, S. H. IL-10 gene polymorphisms in infectious disease and SIDS. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 42, p.48-52, 2004.

ORAL, H. B. Interleukin-10 (il-10) Gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. **Cytokine**, San Diego, v. 35, p. 143-147, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. World Report** . Geneva, 2009. Disponível em: <[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2009/pdf/chapter1.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/chapter1.pdf)> Acesso em: 1 abr 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children**. Geneva, 2006. Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/2006/tb\\_factsheet\\_2006\\_1\\_en.pdf](http://www.who.int/tb/publications/2006/tb_factsheet_2006_1_en.pdf). Acesso em: 10 jan 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Tuberculosis notification update: December 1994. **Bolletín of The World Health Organization**, Geneva,1994. p. 213-220.1994.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD OPAS. **Guías para el Control y Monitoreo de la Epidemia Tabaquica**, Washington, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAUDE. **Global Tuberculosis Control**, Geneva, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAUDE. **Global tuberculosis report. World report 2012**. Geneva, 2012. Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) Acesso em: 26 de novembro de 2012.

OTTENHOFF, T. H. et al. Control of human host immunity to mycobacteria. **Tuberculosis**, Montevideo, v. 85, p. 53-64, 2005.

PACHECO, A. G. *IFNG* +874T/A, *IL10* -1082G/A and *TNF* -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **Human Genetics**, Berlin, v. 123, p. 477-484, 2008.

PACHECO, A. G; MORAES, M. O. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-controls studies. **Disease markers**, Chichester, v.27, p. 173-186, 2009.

PIETERS, J.; GATFIELD, J. Hijacking the host: survival of pathogenic mycobacteria inside macrophages. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 142-146, 2002.

PALOMINO, J. C. et al. **Tuberculosis**. From basic science to patient care. Belgica. Textbook online, 2007.



PANDOLFI, J. R. et al. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n.3, p. 251-257, 2007.

PENA, S. D. J. et al. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **PLoS ONE**. San Francisco, v. 6, n. 2, p.17063, 2011.

PONTES, A. P. M ; OLIVEIRA, D. C. O princípio da universalidade do acesso aos serviços de saúde: O que pensam os usuários? **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, Rio de Janeiro, v.13, n.3, p. 500-507, 2009.

RAGNO, S. et al. Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. **Immunology**, Oxford, v. 104 p. 99-108, sept. 2001.

RAJA, A. Immunology of Tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 120, p. 213-232, 2004.

RIBEIRO-RODRIGUEZ, R. et al. A role for CD4+ CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, London, v. 44, p. 25–34, 2006.

RISCH, N.; MERIKANGAS, K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science**, Washington, v. 273, p.1516–1517, 1996.

ROCHA-RAMIREZ, L. M. et al. Mycobacterium tuberculosis lipids regulates cytokines, TLR-2/4 and MHC class II expression in human macrophages. **Tuberculosis**, Montevideu, v. 88, p. 212-220, 2008.

ROJAS, R. E. et al. Regulation of human CD4+ $\alpha\beta$  T-cell-receptor-positive (TCR+) and  $\gamma\delta$  TCR+ T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor  $\beta$ . **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 12, p. 6461–6472, 1999.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.35, n.1 p. 51-58, 2002

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature Reviews Microbiology**, London, v.5, p. 39-47, 2007.

SAITA, N. M.; OLIVEIRA, H. B. Tuberculosis, AIDS, and tuberculose-AIDS co-infection Iná large city. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v.20, n.4, p. 769-777, 2012.

SALGAME, P. Host innate and th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 17, n. 4, p. 374-380, 2005.

SANTOS, A. R. et al. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and inteleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, p. 1687-1691, 2002.

SANTOS, J. S; BECK, S. T. A coinfeção tuberculose e HIV: um importante desafio – Artigo de revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v.41, n.3, p. 209-215, 2009.

SANTOS, T. M. M. G. et al. Caracterização dos casos de tuberculose notificados em um município prioritário do Brasil. **Revista de Enfermagem da Universidade Federal do Pauí, Teresina**, v.1, n.1 p. 8-13, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA . II Consenso Brasileiro de tuberculose. Diretrizes brasileiras para tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 30, suppl. 1, p. S1-S55, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. III diretrizes para tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 35, suppl. 1, p. 1018-1048, 2009.

SCANGA, C. A. et al. “Depletion of CD4+ T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon  $\gamma$  and nitric oxide synthase 2. **Journal of Experimental Medicine**, New York , v. 192, n. 3, p. 347–358, 2000.

SCHLIEKELMAN, P. et al. Natural selection and resistance to HIV. **Nature**, London, v. 411, p. 545-546. 2001.

SCOLA, L. et al. IL-10 and TNF- $\alpha$  polymorphisms in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis: implication for ageing and life span expectancy. **Mechanisms of Ageing and Development**, Oxford v. 124, p. 569-572, 2003.

SELVARAJ, P. et al. Cytokine gene polimorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. **Cytokine**, Oxford, v.43, p. 26-33, 2008.

SERBINA, N. V.; FLYNN, J. L. Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice. **Infection and Immunity** , Washington, v. 67, p. 3980–3988, 1999.

SERBINA, N. V, et al. CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 167, p. 6991–7000, 2001.

SHASTRY, B. S. SNP alleles in human disease and evolution. **Journal of Human Genetics**, Tokyo, v. 47, p.561–566, 2002.

SHAW, M. A. et al. Evidence that genetic susceptibility to Mycobacterium tuberculosis in a Brazilian population is under oligogenic control: linkage study of the candidate genes NRAMP1 and TNFA. **Tubercle and lung disease**, Edinburgh, v. 78, n. 1, p. 35-45, 1997.

SHIN, H. D. et al. Common interleukin 10 polymorphism associated with decreasead risk of tuberculosis. **Experimental and Molecular Medicine**, Seoul, v.37, n.2, p. 128-132, 2005.

SILVA, H. O; GONÇALVES, M. C. G. Coinfeção tuberculose/HIV nas capitais brasileiras: Observações a partir dos dados do sistema de informação de agravos de notificação. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, Fortaleza, v.22, n.3, p. 172-178, 2009.

- SIMONDS, B. **Tuberculosis in Twins**. London: Pitman Medical Publishing Company, 1963.
- SMALL, P.M.; FUJIWARA, P. I. Management of tuberculosis in the United States. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 345, p. 189-200, 2001.
- SOLE, X, et al. V: SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. **Bioinformatics**, v. 22, suppl. 15, p. 1928-1929, 2006.
- SORENSEN, I. A.T. et al. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.318, p. 727-732, 1988.
- STEAD, W. W. et al. Mecânica pulmonar. In: FISHMAN, A. P. **Diagnóstico das doenças pulmonares**. São Paulo: Manole, 2001. cap. 9, p.179-192.
- STEAD, W.W. Variation in vulnerability to tuberculosis in America today: random, or legacies of different ancestral epidemics? **International journal of tuberculosis and lung disease**, Paris, v. 5, p. 807-814, 2001.
- STEIN, C. M. Genetic Epidemiology of Tuberculosis Susceptibility: Impact of Study Design. **PLoS Pathog**, San Diego, v.7, n.1, 2011.
- STEIN, C. M.; BAKER, A. R. Tuberculosis as a complex trait: impact of genetic epidemiological study design. **Mammalian Genome**, New York, v. 22, p. 91-99, 2011.
- TAMBUR, A. R. et al. Cytokine gene polymorphism in patients with graft-versus-host disease. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 33, p. 502-503, 2001.
- TEIXEIRA, H, C. et al. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília,v. 33, n. 3, p. 323-334, 2007.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- TRAJKOV, D. et al. Association of 22 cytokine gene polymorphisms with tuberculosis in macedonians. **Indian Journal of Tuberculosis**, New Delhi, v. 56. p. 117-131, 2009.
- TSO, H.W. et al. Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. **Genes Immun**, Basingstoke; v.6, n. 358-363, 2005.
- TURNER D.M. et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 24, p. 1-8, 1997.
- TWYMAN, R. M.; PRIMROSE, S. B. Techniques patents for SNP genotyping. **Pharmacogenomics**, London, v. 4, p. 67-79, 2003.
- VALLINOTO, A. C. R. et al. IFNG \_874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection and clinical manifestation of tuberculosis. **Human Immunology**, New York, v. 71, p, 692-696, 2010.

- VAN, C. R. et al. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 181, n. 3, p. 1194-1197, mar. 2000.
- VAN DE VEERDONK, F.L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* induces IL-17A responses through TLR4 and dectin-1 and is critically dependent on endogenous IL-1. **Journal of Leukocyte Biology**, Winston-Salem, v. 88, p. 227–232, 2010.
- VEJBAESYA, S. et al. NRAMPI and TNFalpha polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Thais. **Respirology**, Carlton, v. 12, n. 2, p. 202-206, 2007.
- VENDRAMINI, S. H. F et al. Tuberculose em município de porte médio do sudeste do Brasil: indicadores de morbidade e mortalidade, de 1985 a 2003. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v.31, n.3, p. 237-243, 2005.
- VERGNE, I. et al. Cell biology of Mycobacterium tuberculosis phagosome. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 20, p. 367-394, 2004.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tuberculose Tratado de Infectologia**. 3rd ed. São Paulo: Atheneu; 2005.
- VERWEIJ, C.L. Tumor necrosis factor gene polymorphism as severity marker in rheumatoid arthritis. **Annals Rheumatic Diseases**, London ,v. 58, Suppl 1, p. 120-126, 1999.
- WILLIAMS, A. et al. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. **Immunology**, Oxford, v. 111, p. 328–333, 2004.
- WILHELM, J.; PINGOUD, A. Real-time polymerase chain reaction. **ChemBiochem**, Weinheim, v. 4, n. 11, p. 1120-8, 2003.
- WILSON, A. G. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, 94, p. 3195-3199, 1997.
- YOUNG, D. et al. Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. **Nature Immunology**, New York, v. 3, n. 11, p. 1126-1132, 2002.
- YOUNG, D. B. et al. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. **Journal Clinical Investigation**, New York, v.118, p. 1255–1265, 2008.
- ZDANOV, A. Structural Analysis of cytokines comprising the IL-10 family. **Cytokines and Growth Factors Reviews**, Oxford, v.21, n.5, p.325-330, 2010.
- ZEMBRZUSKI V. M. et al. Cytokine genes are associated with tuberculin skin test response in a native Brazilian population. **Tuberculosis**, Montivideu, v. 90, p. 44–49, 2010.
- ZHANG J.; et al. Interleukin-10 polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. **International journal of tuberculosis and lung disease**, Paris, v. 15, n. 5, p. 594–601, 2011.

## APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

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

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a), da pesquisa - “**Avaliação da associação entre polimorfismos genéticos e níveis séricos das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 com a susceptibilidade a tuberculose pulmonar.**”, após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de nenhuma forma.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

**TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:** **Avaliação da associação entre polimorfismos genéticos e níveis séricos das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 com a susceptibilidade a tuberculose pulmonar.**

**Pesquisador (a) Responsável:** Lílian Maria Lapa Montenegro

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

**Pesquisadores Participantes:** Dra. Haiana Charifker Schindler; Dr<sup>a</sup> Clarice Neuenschwander Lins de Moraes; André Luiz Alves do Nascimento.

**Objetivos:** Avaliar a associação de polimorfismos genéticos dos genes da Interleucina-10 e TNF- $\alpha$  com o desenvolvimento da tuberculose pulmonar ativa.

**Procedimentos do estudo:** Quando o Sr(a) for atendido pelo médico(a) assistente do hospital, Sr(a) responderá a um questionário onde irão constar: nome, endereço, telefone para contato, característica do domicílio, escolaridade, queixas principais e tempo de duração, se está tomando algum remédio, exames físico, laboratoriais e tratamento atual. O preenchimento do questionário será feito por um dos integrantes da pesquisa. O Sr(a) será acompanhado por uma equipe multidisciplinar envolvendo os médicos responsáveis do serviço de saúde com experiência reconhecida no manejo da tuberculose, enfermeiras e técnicos que realizarão outros exames necessários e seguirão os procedimentos adequados e de rotina do hospital. O acompanhamento e tratamento serão feitos pelo médico assistente do serviço que é responsável por todos os leitos, cujos pacientes estão sendo investigados quanto à existência ou não de Tuberculose pulmonar. Caso for diagnosticada a doença será utilizado como terapia de primeira escolha o esquema com rifampicina, isonizida, pirazinamida e etambutol e se necessário, um esquema de segunda escolha será oferecido em casos selecionados. Todo o medicamento será fornecido pela rede SUS (fornecido pelo Hospital ou pelo Posto de Saúde).

Para a nossa pesquisa será realizado o teste tuberculínico e em 72 horas (3 dias) será realizada a leitura do teste e também será coletado 4ml de sangue (menos de uma colher de sopa) e 5 a 10 ml (uma colher de sopa) de escarro. Além disso, será realizado o teste rápido para detectar o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) em todos os indivíduos selecionados para a pesquisa. As amostras de sangue e escarro serão encaminhadas ao laboratório de Imunoepidemiologia do departamento de Imunologia do CPqAM para serem analisadas por profissionais capacitados. Os resultados de todos os exames serão encaminhados ao médico responsável pelo atendimento. Todas as amostras biológicas (sangue e escarro) serão congeladas e armazenadas a -20°C, caso seja necessário a repetição do exame.

**Riscos e Benefícios:** O Sr (a) não será submetido a qualquer risco ou desconforto adicional e seguiremos a rotina estabelecida pelo profissional de saúde, seja a nível ambulatorial ou enfermaria. O abandono da pesquisa não trará prejuízo ao seu tratamento ou ao acompanhamento clínico. Todo o conhecimento gerado com a realização deste estudo será de fundamental importância para o entendimento das possíveis alterações no sistema de defesa do corpo humano que podem estar influenciando no desenvolvimento da tuberculose pulmonar.

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

**Garantia de Sigilo:** Os dados do (a) Sr. (a) serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa.

*Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ  
Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia  
Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária.  
Campus da UFPE.*

Fone: (81) 2101-2569

Contato: Lílian Maria Lapa Montenegro e André Luiz Alves do Nascimento.

### CONSENTIMENTO

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

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou responsável

Nome do Pesquisador: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.  
Local

## APÊNDICE B - PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE

## PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE

IDENTIFICAÇÃO		
<b>1. Número da ficha na pesquisa</b> <div style="text-align: center;"> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> </div>	<b>2. Data da entrevista</b> <div style="text-align: center;">           ____ / ____ / ____         </div>	
<b>3. Procedência:</b> 1. Ambulatório <input type="checkbox"/> 2. Enfermaria <input type="checkbox"/>	<b>4. Número do Prontuário do Hospital</b> <div style="text-align: center;"> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> </div>	
<b>5. Hospital de origem:</b> 1. Hospital das Clínicas <input type="checkbox"/> 2. Hospital Otávio de Freitas 3. IMIP 4. Pol. Lessa de Andrade 5. PSF Joaquim Cavalcanti	<b>6. Número do SAME</b> <div style="text-align: center;"> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> </div>	
DADOS DO PACIENTE		
<b>7. Nome Completo do Paciente</b> _____ _____		
<b>8. Nome da Mãe ou Responsável</b> _____ _____		
<b>9. Data de nascimento</b> ____ / ____ / ____	<b>10. Idade do paciente</b> <div style="text-align: center;"> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/>           anos           <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/>           meses         </div>	<b>11. Sexo</b> 1. Feminino <input type="checkbox"/> 2. Masculino <input type="checkbox"/>
<b>12. Endereço</b> _____ _____ <b>Ponto de referência</b> _____ _____		
<b>13. Bairro</b> _____	<b>14. Cidade</b> _____	<b>15. UF</b> <div style="text-align: center;"> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> </div>
<b>16. Telefone Res. e Celular</b> (____) _____ - _____ (____) _____ - _____	<b>17. CEP</b> _____	<b>18. Zona de localização da moradia</b> 1. Urbana <input type="checkbox"/> 2. Rural <input type="checkbox"/>
DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS		
<b>19. Grau de instrução do paciente</b> 1. Analfabeto <input type="checkbox"/> 2. Iniciou alfabetização 3. 1º grau 4. 2º grau 5. 3º grau 6. Outro	<b>20. Renda familiar mensal</b> 1. Menor ou igual a 1 salário mínimo 2. De 2 a 4 salários mínimos 3. Mais que 5 salários mínimos 4. Biscate 8. Não sabe <input type="checkbox"/>	

<b>21. Quantas pessoas moram na casa do paciente?</b> 1. Até 3 <input type="checkbox"/> 2. De 4 a 6 3. Mais de 6 8. Não sabe informar	<b>22. Quantos adultos?</b> 1. Até 2 <input type="checkbox"/> 2. De 3 a 5 3. Mais que 5	<b>23. Quantas crianças?</b> 1. Até 2 <input type="checkbox"/> 2. De 3 a 5 3. Mais que 5	<b>24. Quantos cômodos (locais de dormir) têm na casa?</b> 1. Um <input type="checkbox"/> 2. De 2 a 4 3. Mais de 4 8. Não sabe informar
<b>25. O senhor(a) ou algum adulto na casa fuma?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar	<b>26. O senhor(a) ou alguém na casa bebe?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar	<b>27. Existe algum caso de HIV na família?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar	
<b>28. Existe algum caso de alcoolismo na família?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar	<b>29. Uso de drogas na família</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar	<b>30. Existe alguém da família ou do convívio que faz tratamento prolongado para TB?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 3. Sim - não sabe informar a doença 8. Não sabe informar	
<b>31. Raça/Cor</b> 1. Branca <input type="checkbox"/> 2. Preta 3. Parda 4. Amarela 5. Indígena			
<b>DADOS EPIDEMIOLÓGICOS</b>			
<b>32. Existe algum caso de tuberculose na família ou em pessoa de convívio?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar  <b>31. Caso sim, há quanto tempo?</b> _____		<b>33. Qual o grau de parentesco?</b> 1. Mãe <input type="checkbox"/> 2. Pai 3. Irmã (o) 4. Avô (ó) 5. Tio (a) <input type="checkbox"/> 6. Primo (a) 7. Outro 8. Não sabe informar 9. Inaplicável  Outro: _____	
<b>34. Período de duração do contato:</b> 1. < 3 meses 2. 3 meses a 2 anos 3. + que 2 anos 8. Não sabe informar 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>		<b>35. Qual o tipo de contato?</b> 1. Intradomiciliar contínuo (5 a 7 dias/semana, > 6h/dia) 2. Intradomiciliar intermitente (5 a 7 dias/semana, < 6h/dia) 3. Esporádico (entre 2 a 4 dias/semana) 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável	
<b>36. Em relação ao tratamento para TB o contato:</b> 1. Foi tratado totalmente 2. Está em tratamento 3. Não tratado 4. Interrompeu o tratamento <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 9. Inaplicável  <b>Caso não tenha havido interrupção, seguir para 39.</b>		<b>37. Qual o motivo da interrupção:</b> 1. Intolerância ao medicamento 2. Falta de medicamento 3. Abandono do tratamento 4. Outro motivo <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	



ANTECEDENTES DO PACIENTE		
<b>38. Já teve alguma doença?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	<b>39. Qual doença?</b> 1. Asma                      6. Fibrose Cística 2. Pneumonia            7. HIV/AIDS 3. Bronquite            8. Câncer 4. Tuberculose        9. Não sabe 5. Diabetes            10. Outro: _____ <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	
<b>Caso a resposta seja Não, seguir para 41</b>		
<b>40. Tem cicatriz de BCG? (vista pelo entrevistador no braço direito ou através de cartão)</b>  1. Sim 2. Não 8. Não verificado <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>		
<b>41. Fez PPD anterior?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe Data de realização: ____/____/____(Vê no cartão)  Caso não tenha feito, seguir para 45. <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	<b>42. Resultado do PPD:</b>  1. Não reator (0-4mm)                      4. Reator muito forte (>15mm) 2. Reator fraco (5-9mm)                      8. Não sabe informar 3. Reator forte (10-14mm)                      9. Inaplicável <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	
<b>43. Toma algum medicamento atualmente?</b> 1. Sim 2. Não Qual: _____ <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	<b>44. Já fez TTO para tuberculose?</b> 1. Sim 2. Não Qual: _____ <b>Caso sim, quanto tempo?</b> _____  <b>Caso sim, número de TTO anteriores:</b> _____ <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (referidos pelo Informante)		
<b>45. Há quanto tempo o paciente está doente?</b>  <div style="display: flex; align-items: center; gap: 10px;"> <input style="width: 30px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <span>meses</span> <input style="width: 30px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/> <span>dias</span> </div>	<b>46. Tem febre?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <b>Caso sim, há quanto tempo:</b> _____ <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	<b>47. Perda de peso?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>
<b>48. Tem tosse há mais de 15 dias?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <b>Caso sim, há quanto tempo:</b> _____ <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	<b>49. Tipo de tosse:</b> 1. Seca 2. Produtiva 3. Hemoptise 9. Inaplicável <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	<b>50. Tem falta de apetite?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>
<b>51. Tem fraqueza muscular?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	<b>52. Apresenta falta de ar desde que ficou doente?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	<b>53. Tem dor nas juntas?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <b>Caso não, seguir para 60.</b> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>
<b>54. Qual o local?</b> 1. Joelho 2. Cotovelo 3. Punho 4. Coluna <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	<b>55. Apresenta dor na barriga?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	<b>56. Notou aumento da barriga?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>
<b>57. Notou linfonodo (lândria ou íngua) aumentado?</b>  1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	<b>58. Local do linfonodo:</b> 1. Pescoço 2. Axila 3. Região inguinal (virilha) Outros _____ <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>	<b>59. Apresenta suor noturno?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"><input type="checkbox"/></div>

## EXAMES LABORATORIAIS (preenchido pelo médico pesquisador)

<b>60. Realizou Raio X de Tórax na admissão?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 112	<b>61. Resultado do Raio X de admissão:</b> 1. Normal      2. Alterado  <input type="checkbox"/>	<b>- Se alterado:</b> <input type="checkbox"/> 1. Padrão não sugestivo de TB 2. Forma Pneumônica 3. Forma Pneumoganglionar 4. Forma Pleuropulmonar 5. Forma Miliar 6. Forma Ganglionar 7. Inaplicável 8. Não sabe informar
<b>62. Realizou Raio X de tórax de controle?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 114	<b>63. Resultado do Raio X de controle:</b> 1. Normalizou <input type="checkbox"/> 2. Houve melhora 3. Houve piora 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	
<b>66. Realizou Tomografia de tórax?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 116	<b>67. Resultado da Tomografia de tórax:</b> 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Alterado sugestivo 3. Alterado inespecífico 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	
<b>68. Realizou PPD para pesquisa?</b> 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 118	<b>69. Resultado do PPD:</b> 1. Não reator (0-4mm)      4. Reator muito forte (>15mm) 2. Reator fraco (5-9mm)      8. Não sabe informar 3. Reator forte (10-14mm)      9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	
<b>70. Realizou Baciloscopia?</b> 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 124	<b>71. Resultado da baciloscopia:</b> 1. Positiva 2. Negativa 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> _____ Cruzes	<b>72. Material da baciloscopia:</b> 1. Escarro 2. Lavado gástrico 3. Líquor <input type="checkbox"/> 4. Biópsia 5. Outro material 9. Inaplicável Outro _____
<b>73. Realizou Cultura em meio Lowestein-Jensen?</b> 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 130.	<b>74. Resultado da Cultura:</b> 1. Positiva 2. Negativa 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	<b>75. Material da Cultura:</b> 1. Escarro 2. Sangue 3. Urina 4. Lavado gástrico 5. Líquor <input type="checkbox"/> 6. Biópsia 7. Outro material 9. Inaplicável Outro _____

<b>76. Diagnóstico inicial</b> 1. TB infecção 2. TB doença 3. TB suspeita 4. Não é TB	<b>77. Data da notificação:</b> Data: ____/____/____ Profissional que notificou: -----	<b>Se Extra pulmonar:</b> 1. Ganglionar Periférica 2. Ganglionar Pulmonar 3. Meningoencefálica 4. Miliar 5. Óssea 6. Pleural 7. Outra 8. Inaplicável
<b>78. Diagnóstico Final</b> 1. TB infecção 2. TB doença 3. TB suspeita 4. Não é TB	<b>79. Forma de TB</b> 1. Pulmonar      2. Extra pulmonar  <input type="checkbox"/>	
<b>80. Tratamento realizado:</b> 1. Profilaxia primária (INH por 3 meses) 2. Profilaxia secundária (INH por 6 meses) 3. Esquema I (INH + RMP por 6 meses e PZA por 2 meses) - Tradicional 4. Esquema IR (INH + RMP + BEM por 6 meses e PZA por 2 meses) 5. Esquema II (INH + RMP por 9 meses e PZA por 2 meses) 6. Esquema III (SM + PZA por 3 meses e ETH + EM por 12 meses) 9. Inaplicável		<b>81. Data do início do tratamento:</b>  ____/____/____
<b>82. Tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico de TB:</b> 1. ≤ 1 mês 2. 1 – 3 meses 3. ≥ 3 meses 4. Não investigado	<b>83. Tempo entre o diagnóstico de TB e início do tratamento específico:</b> 1. ≤ 1 mês 2. 1 – 3 meses 3. ≥ 3 meses 4. Não investigado	

### EVOLUÇÃO

<b>84- Resposta ao tratamento específico (feita pelo médico acompanhante)</b> 1. Melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Resposta ao tratamento) 2. Não houve melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Não houve resposta ao tratamento) 3. TB resistente 4. Não sabe informar 9. Inaplicável	
Entrevistador: _____	Assinatura: _____

### DIAGNÓSTICO PELO LABORATÓRIO DE IMUNOEPIDEMIOLOGIA

<b>85. Realizou Baciloscopia?</b> 1. Sim 2. Não Data: ____/____/____	<b>86. Resultado</b> 1. Positivo 2. Negativo 9. Não se aplica Cruzes: _____	<b>87. Realizou cultura?</b> 1. Sim 2. Não Data: ____/____/____
---	---	--

<b>88. Resultado</b>  3. Positivo 4. Negativo <input type="checkbox"/> 10. Não se aplica <input type="checkbox"/>	<b>89. Tipo de micobactéria:</b>  1. M. tuberculosis <input type="checkbox"/> 2. Atípica <input type="checkbox"/>  Qual? _____	<b>90. Amostra biológica:</b>  1. <input type="checkbox"/> Sangue total <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/> Não se aplica
<b>91. Realizou Nested-PCR Único Tubo pré-tratamento?</b>  1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ____/____/____	<b>92. Resultado</b>  1. Positivo 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	<b>93. Amostra biológica:</b>  1. <input type="checkbox"/> Sangue total <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/> Não se aplica
<b>94. Realizou PCR em tempo real pré-tratamento?</b>  1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ____/____/____	<b>95. Resultado</b>  1. Positivo 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	<b>96. Amostra biológica:</b>  1. <input type="checkbox"/> Sangue total <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/> Não se aplica
<b>97. Realizou PCR colorimétrica pré-tratamento?</b>  1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ____/____/____	<b>98. Resultado</b>  1. Positivo 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	<b>99. Amostra biológica:</b>  1. <input type="checkbox"/> Sangue total <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/> Não se aplica
<b>100. Realizou RT-qPCR pré-tratamento?</b>  1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ____/____/____	<b>101. Resultado</b>  1. Positivo 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	<b>102. Amostra biológica:</b>  1. <input type="checkbox"/> Sangue total <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/> Não se aplica
<b>103. Realizou RT-qPCR pós-tratamento?</b>  1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ____/____/____	<b>104. Época</b>  1. 1ª semana 2. 2ª – 4ª semana <input type="checkbox"/> 3. 1º - 3º mês 4. 3º - 6º mês 5. Após término do tto	<b>105. Resultado</b>  1. Positivo 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>

<b>106. Realizou PCR multiplex pré-tratamento?</b>  1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>  Data: ____/____/____	<b>107. Resultado</b>  1. Positivo <input type="checkbox"/> 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	<b>108. Amostra biológica:</b>  1. <input type="checkbox"/> Sangue total <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico <input type="checkbox"/> Não se aplica
--	--	---

**PERFIL GENÉTICO E IMUNOLÓGICO DAS CITOCINAS IL-10 E TNF- $\alpha$**

<b>115. Categorização do Genótipo da IL-10:</b>  1. GG <input type="checkbox"/> 2. GA <input type="checkbox"/> 3. AA <input type="checkbox"/>	<b>116. Alelo presente:</b>  1. Alelo G <input type="checkbox"/> 2. Alelo A <input type="checkbox"/>	<b>117. Níveis séricos da Citocina IL-10:</b>  1. Alto 2. Moderado 3. Baixo  Resultado em pg/ml: _____
<b>118. Categorização do Genótipo do TNF-<math>\alpha</math>:</b>  1. GG <input type="checkbox"/> 2. GA <input type="checkbox"/> 3. AA <input type="checkbox"/>	<b>119. Alelo presente:</b>  1. Alelo G <input type="checkbox"/> 2. Alelo A <input type="checkbox"/>	<b>120. Níveis Séricos da Citocina TNF-<math>\alpha</math>:</b>  1. Alto 2. Moderado 3. Baixo  Resultado em pg/ml: _____

Responsável pelo preenchimento da ficha: \_\_\_\_\_

Responsável pelos exames moleculares: \_\_\_\_\_

**ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS**

**Título do Projeto:** “Avaliação da associação entre polimorfismos genéticos e níveis séricos das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 com a susceptibilidade a tuberculose pulmonar”.

**Pesquisador responsável:** Lílian Montenegro.

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/FIOCRUZ

**Data de apresentação ao CEP:** 21/11/2011

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 56/11

**Registro no CAAE:** 0056.0.095.000 -11

**PARECER Nº 03/2012**

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 01 de fevereiro de 2015. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 01 de fevereiro de 2012.

  
  
Giselle Campozana Couveia  
Farmacêutica  
Coordenadora  
Mat. SIAPE 0463376  
CPqAM / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 01/02/2013.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n  
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639  
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639  
Recife - PE - Brasil  
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

