

# Artigo Original

## Distribuição de Polimorfismos de Base única (SNPs) no gene de TNF- $\alpha$ (-238/-308) entre pacientes com TB e outras pneumopatias: Marcadores genéticos de susceptibilidade a ocorrência de TB?\*

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the TNF- $\alpha$  (-238/-308) gene among TB and non TB patients: Susceptibility markers of TB occurrence?

MARTHA MARIA DE OLIVEIRA, JOCILEA C. S. DA SILVA, JOSEANE F. COSTA, LÚCIA HELENA AMIM, CARLA C. S. LOREDO, HEDI MELO, LUIZ F. QUEIROZ, FERNANDA C. Q. MELLO, JOSÉ ROBERTO LAPA E SILVA, AFRÂNIO LINEU KRITSKI<sup>(TE SBPT)</sup>, ADALBERTO REZENDE SANTOS

**Introdução:** Fatores genéticos podem desempenhar um importante papel na susceptibilidade à tuberculose (TB) ativa, e polimorfismos de base única (SNPs) em diferentes genes que codificam para citocinas têm sido descritos e associados com doenças.

**Objetivos:** Investigar o quanto polimorfismo na região promotora do gene que codifica para TNF- $\alpha$  (-238 e -308) estão associados a ocorrência de TB ativa.

**Métodos:** SNPs dentro do gene de TNF- $\alpha$  foram analisados por PCR-RFLP em dois grupos de indivíduos: pacientes com TB (n = 234) e pacientes com pneumopatias não TB (n = 113).

**Resultados:** Neste estudo, o alelo -238A esteve associado significativamente com susceptibilidade à ocorrência de TB e gravidade das formas clínicas ( $p = 0,00002$ ; OR = 0,15; IC = 0,06-0,36). Por outro lado, o alelo -308A esteve associado significativamente com a proteção a outras formas de doença pulmonar ( $p = 0,02$ ; OR = 1,95; IC = 1,07-3,58).

**Conclusões:** Estes resultados preliminares sugerem a importância de estudos genéticos na ocorrência da TB. São necessários outros estudos para melhorar a compreensão sobre a patogênese do *M. tb*.

*J Bras Pneumol 2004; 30(4) 461-7*

**Background:** Host genetic factors may play a role in the susceptibility to active tuberculosis (TB), and several polymorphisms in different cytokine coding genes have been described and associated with diseases to date.

**Objectives:** To investigate whether polymorphisms within the promoter region of the TNF- $\alpha$  (-238/-308) coding genes are associated to the occurrence of active TB.

**Methods:** SNPs within the TNF- $\alpha$  gene were analyzed by PCR-RFLP among two groups of individuals: patients with TB (n = 234, and patients non TB (n = 113).

**Results:** In this study, the presence of the -238A allele was associated with susceptibility to TB disease occurrence and severity ( $p = 0,00002$ ; OR = 0,15; IC = 0,06-0,36). On the contrary, the -308A allele was associated with protection to the occurrence of another pulmonary diseases.

**Conclusions:** These results suggest the importance of genetics studies on TB occurrence. Further studies are needed pursuing a better understanding of the human pathogenesis of *M. tb*.

**Descritores:** Tuberculose/genética. Polimorfismo de um único nucleotídeo/genética. Fator de necrose tumoral/genética. Alelos. Genótipo. Pneumopatias.

**Key words:** tuberculosis/genetics. Polymorphism, single nucleotide/genetics. Tumor necrosis factor/genetics. Alleles. Genotype. Lung diseases.

\* Trabalho realizado no Laboratório de Genética de Biologia Molecular da Unidade de Pesquisa em Tuberculose

Hospital Estadual Santa Maria, Laboratório de Hanseníase - Fiocruz- Rio de Janeiro (RJ).

Fiannciado por: FAPERJ/ Projeto Mileniun/PROCESSO: 62.0055/01-4 PADCT

Forgaty Cornell - 3 D43 TW000018-16S3

Endereço para correspondência: Dra. Martha Maria de Oliveira. Av Brigadeiro Trompowsky s/nº. Fax: 55 21 2550 6903. CEP 21941-590

Ilha do Fundão. Rio de Janeiro. Brasil. E-mail: martholiveira@yahoo.com.br

Recebido para publicação, em 9/1/04. Aprovado, após revisão, em 13/4/04.

## INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mais de 1,7 bilhões de pessoas estejam infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*)<sup>(1)</sup>. O risco de um indivíduo infectado (TB latente) desenvolver a forma ativa da doença durante sua vida está entre 5 e 10%. Nesses indivíduos, esse risco de adoecimento depende da habilidade de seu sistema imunológico em prevenir a multiplicação do *M. tb* dormente<sup>(2,3)</sup>.

A resposta imune contra o *M. tb* depende de uma resposta mediada por células, cuja interação de linfócitos e monócitos culminam com a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios. Dentre citocinas envolvidas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) tem sido bem caracterizado como uma das moléculas mais importantes na promoção da resposta inflamatória. Smith et al.<sup>(4)</sup> demonstraram que o TNF- $\alpha$  desempenha um complexo papel local, nos pulmões, em resposta à infecção com *M. tb*, principalmente na formação de granuloma. Além da sua contribuição para o "clearance" bacteriano, ele também participa ativamente na modulação da inflamação pulmonar. A inibição da atividade de TNF- $\alpha$  nos pulmões na fase inicial da infecção leva a uma inflamação persistente. É sugerido que variações na produção de citocinas entre indivíduos possam estar associados com diferentes polimorfismos genéticos determinando desta forma, a resposta imune durante a doença. Diferentes formas alélicas de vários genes de citocinas são conhecidas até o momento, inclusive os polimorfismos de base única (SNPs) no promotor de TNF nas posições -238<sup>(5)</sup>, e -308<sup>(6)</sup>. Nestes polimorfismos ocorre uma substituição GA, estas mutações parecem estar relacionadas a diferenças na expressão gênica e secreção de proteína<sup>(7,8)</sup>, embora um pouco controversa<sup>(9,10,11)</sup>. A presença da SNP -308 esteve associado com aumento da transcrição do gene TNF- $\alpha$ <sup>(12,13)</sup>. Clinicamente, a presença do alelo -308 A (TNF2) está associada com susceptibilidade a várias enfermidades, dentre as quais a malária cerebral<sup>(14)</sup> a leishmaniose mucocutânea (MCL)<sup>(15)</sup>, a hanseníase<sup>(16)</sup>, entre outras, todas associadas com altos níveis de TNF- $\alpha$  circulantes no sangue periférico. Por outro lado, a presença desta mutação também está associada à proteção em algumas doenças como formas graves de hanseníase<sup>(17,18,19)</sup>. A SNP na posição -238 está

### Síglas e abreviaturas utilizadas neste trabalho:

DNA - Desoxyribonucleic acid)- Ácido desoxirribonucleico  
DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica  
*M. tb* - *Mycobacterium tuberculosis*  
MCL - (Mucocutaneous Leishmania) - Leishmania Mucocutânea  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PCTH - Programa de Controle da Tuberculose Hospitalar  
SNPs - (Single Nucleotide Polymorphism) - Polimorfismos de base única  
TB - Tuberculose  
TNF - (Tumor Necrosis Factor) - Fator de Necrose Tumoral  
PT+ - Prova Tuberculínica positiva

associada com diminuição da transcrição do TNF- $\alpha$ <sup>(17,19)</sup>. Em pacientes com artrite reumatóide<sup>(13)</sup>, dengue e HIV<sup>(20)</sup>, câncer<sup>(21)</sup>, a presença do alelo mutante -238A está relacionada à proteção, assim como susceptibilidade a algumas doenças como a hepatite B e C crônica<sup>(22)</sup>, a esclerose múltipla (EM)<sup>(23)</sup> e psoríase em homens<sup>(24)</sup>.

O presente estudo teve como objetivo verificar se os polimorfismos na região promotora do gene que codifica para TNF- $\alpha$  (-238 e -308) estão associados com a ocorrência de TB entre pacientes atendidos em Unidades Hospitalares no Estado do Rio de Janeiro. Adicionalmente, foi avaliada a presença ou não da associação desses polimorfismos com as diferentes formas clínicas e a co-infecção com HIV.

## Pacientes, Materiais e Métodos

**População estudada.** Foram incluídos no estudo, 205 pacientes portadores de TB admitidos no Programa de Controle da Tuberculose Hospitalar (PCTH) do complexo hospitalar da Universidade Federal de Rio de Janeiro: Instituto de Doenças do Tórax e Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - HUCFF e no Hospital Estadual Santa Maria. O diagnóstico foi estabelecido quando observada cultura positiva para micobactéria com subsequente confirmação da espécie como *M. tuberculosis* em espécime clínico através de testes bioquímicos. A média de idade foi de 48.5  $\pm$  7.3 (15-82 anos) e incluía 136 homens e 69 mulheres. Foram incluídos 113 pacientes admitidos nas mesmas unidades hospitalares apresentando outras pneumopatias não TB (pneumonia em 45 casos, neoplasia maligna em 5, e DPOC em 13, meningite em 15 casos, asma em 12 casos, fibrose pulmonar em 3 casos, sepse em 20 casos). A média pulmonar desse grupo, variou de (18-81anos), incluindo 56 homens e 57 mulheres. O

projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do HUCFF-UFRJ e, após esclarecimento, todos os pacientes forneceram consentimento escrito, responderam a um questionário padronizado que continha informações sócio-demográficas e histórico de enfermidades possivelmente associadas ou não à ocorrência de polimorfismos sob análise no presente estudo. As amostras clínicas foram coletadas e armazenadas em  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso posterior.

**Extração de DNA:** Foi utilizado um protocolo baseado no kit comercial para extração de DNA (DNAzol *Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA*), (Gibco), adaptado em nosso laboratório, para utilização em pequena escala diretamente de sangue total (fresco ou congelado). Em resumo, após o descongelamento das amostras 300  $\mu\text{L}$  de sangue foi transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado 1 mL de NaCl 0.9%. Após centrifugação o sedimento resultante foi ressuspensão em uma solução hipotônica de TE (20 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA) a  $4^{\circ}\text{C}$  e, após nova centrifugação o sedimento foi lisado através adição de DNAzol para a liberação do DNA o qual foi precipitado, em seguida, com etanol absoluto. Após secagem a temperatura ambiente, o mesmo foi redissolvido em 50  $\mu\text{L}$  de solução alcalina (8 mM NaOH). Após a redissolução, a amostra de DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% e coloração com brometo de etídio para verificação de integridade e estimativa da concentração sendo posteriormente estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Amplificação do DNA por PCR e genotipagem:** Em relação ao polimorfismo dentro do promotor do gene de TNF- $\alpha$ , a genotipagem seguiu a seguinte rotina: para a posição -308 após a amplificação da região de interesse (fragmento de 107 pb) como descrito por Wilson et al.<sup>(5)</sup> foi realizada uma digestão com a enzima *Nco*I; para a tipagem da mutação na posição -238, após amplificação de um fragmento de 165 pb foi feita uma digestão com a enzima *Bam*HI. Em resumo, aproximadamente 100 ng do DNA extraído foi adicionado a reação de PCR em um volume final de volume de 50  $\mu\text{L}$  (-308), 40  $\mu\text{L}$  (TNF -238) consistindo de 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu\text{M}$  dNTP, 1.25 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Perkin-Elmer Cetus) e oligonucleotídeos específicos para cada mutação, 1  $\mu\text{M}$  para -308, 12,5 pmol para TNF -238. Todas

as misturas foram incubadas por 10 min a  $95^{\circ}\text{C}$  e submetidas a amplificação, sendo trinta e oito ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 min.,  $57^{\circ}\text{C}$  por 1 min e  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 min (TNF -308) ou 38 ciclos de  $60^{\circ}\text{C}$  por 30 seg,  $72^{\circ}\text{C}$  por 30 seg ,  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 seg e  $72^{\circ}\text{C}$  por 7 min (TNF -238).

**Análise Estatística:** A significância estatística entre as proporções dos dados sócio-demográficos e as diferenças nas frequências genotípicas e alélica foi verificada usando o teste qui-quadrado, quando apropriado, ou teste de Fisher (Epi Info, versão 6, *Centers for Disease Control and Prevention.*). A magnitude das associações foi estimada como razão de chances (*odds ratio*, OR) com seus respectivos intervalos de confiança. O nível de significância estatística adotado foi de 5%.

## RESULTADOS

### Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos -238G/A e -308G/A na população estudada

**Pacientes portadores de TB:** A identificação de SNPs eventualmente presentes na posição -238 do gene que codifica para o TNF- $\alpha$  foi avaliada em 200 pacientes com TB, e na posição -308 em 205 pacientes. Na análise da mutação na posição -238 e - 308 não foi observada diferença significativa na frequência do alelo mutante ou de nenhum dos genótipos possíveis em relação ao gênero ou a co-infecção pelo vírus HIV (dados não mostrados).

Na estratificação dos pacientes, de acordo com a apresentação clínica da doença (pulmonar versus extrapulmonar e disseminada), para a mutação na posição -238, ficou demonstrado um aumento significativo na frequência do genótipo selvagem homocigoto GG no grupo de pacientes com as formas pulmonares da TB em comparação com formas extrapulmonar e disseminada [ $p = 0,003$ ; OR = 5,54; IC = 2,01-15,00]. Inversamente, a frequência dos genótipos mutantes GA e AA foi significativamente maior no grupo com as formas extrapulmonar e disseminada comparada aos portadores da forma pulmonar [ $p = 0,04$ ; OR = 0,33; IC = 0,11-1,07] e [ $p = 0,001$ ; OR = 0,05; IC = 0-0,44] respectivamente. Foi observado também um aumento significativo na frequência do alelo -238A no grupo de pacientes com formas mais graves: (extrapulmonar/ disseminada) [ $p = 0,00002$ ; OR = 0,15; IC = 0,06-0,36]. Com relação

à mutação na posição -308 nenhuma diferença significativa das freqüências genotípicas e alélicas foram observadas nas diferentes formas de apresentação clínica da TB (dados não mostrados).

**Pacientes com outras pneumopatias:** A variabilidade genética na posição -238 e na posição -308 do gene que codifica para o TNF- $\alpha$  foi avaliada respectivamente em 100 e 113 pacientes com outras pneumopatias não TB. Após a estratificação por gênero, foi observado que apenas três indivíduos do gênero masculino foram carreadores do alelo -238A com um genótipo heterozigoto. O gênero feminino não apresentou carreadores do alelo mutante -238A. Com relação à infecção pelo HIV, nenhum carreador do alelo -238A foi encontrado entre os pacientes soros negativos para o HIV, e entre os soropositivos para HIV, somente três pacientes (6,7%) carream o alelo mutante, todos com o genótipo GA. Entre os 113 indivíduos analisados para a mutação na posição -308 do gene de TNF- $\alpha$ , nenhuma diferença significativa foi observada quando foram analisadas variáveis como gênero e infecção pelo HIV (dados não mostrados).

### Distribuição dos polimorfismos -238 e -308 G/A entre pacientes portadores de TB e pacientes não TB

A distribuição das freqüências genotípica e alélica para os polimorfismos nas posições -238 e -308 no grupo de pacientes com TB e pacientes

sem TB é mostrada na Tabela 1. Foi observado um aumento significativo na freqüência do genótipo selvagem -238 GG no grupo de pacientes sem TB em relação ao grupo de pacientes com TB. Inversamente, a freqüência do genótipo heterozigoto GA foi significativamente maior no grupo de pacientes com TB, e nenhum paciente sem TB apresentou o genótipo mutante homozigoto AA. A análise da freqüência alélica, mostrou que a freqüência do alelo -238A esteve significativamente aumentada entre os pacientes com TB quando comparados com os pacientes sem TB ( $p < 0,01$ ).

A comparação da distribuição genotípica da SNP na posição -308A entre estes grupos mostrou que a freqüência do genótipo homozigoto mutante (AA) [ $p = 0,04$ ; OR = 2,48; IC = 0,93-0,97] bem como a freqüência alélica de -308A [ $p = 0,02$ ; OR = 1,94; IC = 1,07-3,58] foi significativamente maior no grupo de pacientes com TB.

### DISCUSSÃO

A contribuição do “background” genético na resistência e susceptibilidade à infecção inicial e progressão do estado latente para a TB ativa tem sido elegantemente demonstrada em vários modelos animais<sup>(25,26,27)</sup>. Em humanos, vários estudos têm indicado um componente genético na susceptibilidade do hospedeiro e resistência à ocorrência de TB infecção e TB ativa<sup>(28)</sup>. A concordância entre gêmeos monozigóticos na

TABELA 1  
Distribuição genotípica das SNPs nas posições -238 e -308 na região promotora do gene de TNF- $\alpha$  entre pacientes TB e não TB

	Paciente TB		p=value	Paciente NTB	
	n=200	n=100		OR	IC
-238					
GG	173 (86,5%)	97 (97%)	0,004	0,20	0,05-0,71
GA	20 (10%)	03 (3%)	0,031	3,59	0,98-15
AA	07 (3,5 %)	0			
f(A)	0,085	0,015	0,0007	6,10	1,77-25
-308					
GG	174 (84,8%)	102 (90,3%)	0,17	0,61	0,27-1,32
GA	06 (2,9%)	05 (4,4%)	0,34	0,65	0,93
AA	25 (12,1%)	06 (5,3%)	0,04	2,48	0,93
f (A)	0,13	0,084	0,02	1,94	1,07-3,58

n = Número de indivíduos analisados; p= value Valor de P; OR razão de odds; IC Intervalo de confiança; GG genótipo homozigoto selvagem; GA genótipo heterozigoto; AA genótipo homozigoto mutante; f = freqüência; NTB pacientes com pneumopatias não TB.

ocorrência de TB ativa é em torno de 65 a 85% e para dizigóticos entre 20 a 35%. Em um estudo inovador, realizado por Willian Stead, num inquérito tuberculínico, foi demonstrado que afro-americanos eram mais infectados pelo *M. tb* do que caucasianos em uma clínica de repouso no Arkansas<sup>(29)</sup>. Em outros estudos foi demonstrado que pacientes carregando mutações nos receptores de IFN- $\gamma$  e IL-12 apresentaram infecção por BCG e micobactérias atípicas nas formas clínicas de maior gravidade<sup>(30,31)</sup>. Mais recentemente, foram realizados estudos de associação com diferentes genes importantes na patogênese da TB, incluindo NRAMP1, VDR, IL-10, IL-1 e IFN- $\gamma$ <sup>(33,34,32)</sup>. Quatro polimorfismos, deleções e /ou mutações pontuais no gene que codifica para NRAMP1, já foram associados com susceptibilidade à ocorrência de TB na Gâmbia e em outras populações do Japão, da Korea e da Guiné<sup>(32,33)</sup>. SNPs do cluster gênico de IL-1 e no receptor de vitamina D (VDR) também foram associados com susceptibilidade à TB em pacientes oriundos da Índia<sup>(34,35)</sup>. Recentemente, em um estudo caso controle na Índia, Selvaraj et al.<sup>(39)</sup> não encontraram associação entre os as SNPs nas posições -238 e -308 do gene que codifica o TNF- $\alpha$  com desenvolvimento de TB pulmonar. Contudo neste estudo, os autores não comparam a frequência destes polimorfismos com diferentes formas clínicas da TB. No presente trabalho, foi realizada a análise da possível associação dos polimorfismos em questão com gravidade às diferentes formas da TB. Adicionalmente, avaliamos também, a presença ou não da associação destes polimorfismos diversas características clínicas e demográficas, tais como a gravidade da forma clínica, gênero, co-infecção com HIV.

### Polimorfismos na região promotora de TNF- $\alpha$ e sua associação com TB: gravidade e infecção

No presente estudo, apenas 8% dos pacientes sem TB eram portadores do alelo -238A, enquanto 15% dos pacientes TB apresentavam esta mutação ( $p \leq 0,01$ ). Estes resultados corroboram as informações relatadas na literatura, quando da comparação entre pacientes com TB e contatos com provável TB infecção (PT+), pois a presença deste alelo (-238A) pode ser considerada um marcador de susceptibilidade à TB<sup>(40)</sup>. É inédita na literatura a associação entre a ocorrência do alelo

-238A com as formas disseminada/extrapulmonar da TB observada neste estudo. Outros estudos que avaliem tal associação e virulência do *Mtb* poderão confirmar ou não, a sua utilidade como marcador de gravidade clínica, principalmente nos grupos de indivíduos recentemente infectados que estarão sob risco de adoecimento de formas de TB de elevada morbi/letalidade.

Uma das principais limitações em nossa série foi a não realização da prova tuberculínica entre os pacientes com enfermidade pulmonar e sem TB. Desta maneira, não foi possível analisar nesses indivíduos a associação dos alelos mutantes no grupo de infectados ou não pelo *M. tb*.

Entretanto, quando foi avaliada a distribuição da mutação na posição -308, associada com aumento da transcrição do gene, e portanto, maior proteção na ocorrência de uma determinada enfermidade, observamos um aumento significativo na frequência desse alelo e do genótipo AA em pacientes com TB em comparação aos pacientes não TB. Uma possível explicação para este resultado conflitante é de que este grupo de pacientes sem TB foi constituído de algumas enfermidades associadas com a elevada produção de TNF- $\alpha$ , característica de portadores de tais alelos. Desta forma este grupo não pode ser considerado como grupo controle "clean". Sabemos também que o gene de TNF- $\alpha$  é regulado em vários níveis: transcricional e pós-transcricional<sup>(38)</sup>. Portanto, outra possibilidade seria que, entre os pacientes com TB portadores do alelo -308, ou seja funcionalmente mais hábeis em produzir TNF- $\alpha$ , carregassem também mutações em outros genes regulatórios da imunidade a TB, tais como no gene de IFN- $\gamma$  ou mesmo ainda no próprio receptor do TNF e desta maneira apesar de possuir uma mutação que lhe garanta uma maior produção de TNF- $\alpha$ , a ausência ou disfunção do seu receptor não permite que esta citocina exerça seu papel inflamatório e desta forma favoreça o desenvolvimento da TB.

A resposta imune, protetora ou não, ao desenvolvimento ou mesmo gravidade da TB, 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 e de outros mediadores inflamatórios representa um poderoso campo a ser explorado para investimentos em

pesquisa de novas vacinas e tratamento medicamentoso.

## REFERÊNCIAS

1. OMS. Global tuberculosis control - surveillance planning, financing. [citado em 2002]. Disponível em: <http://www.who.org>.
2. Aisu T, Raviglione MC, van Praag E, Erick P, Narain J, Barugahare L, et al. Preventive chemotherapy for HIV-associated tuberculosis in Uganda: an operational assessment at a voluntary counseling and testing centre. *AIDS*. 1995;9:267-73.
3. Narain J, Raviglione MC, Kochi A. HIV associated tuberculosis in development countries: epidemiology and strategies for interventions. *Tubercle Lung Dis*. 1992;73:311-21.
4. Smith S, Liggitt D, Jeromsky E, Tan X, Skerrett SJ, Wilson CB. Local role for tumor necrosis factor alpha in the pulmonary inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun*. 2002;70:2082-9.
5. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AIF, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor (TNF) alpha gene detectable by *NcoI* restriction of PCR product. *Hum Mol Genet*. 1992;1:353.
6. Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, et al. Different transcriptional activity and in vitro TNF- $\alpha$  production in psoriasis patients carrying the TNF- 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol*. 2000;114:1180-3.
7. Hajjeer AH. Influence of TNF $\alpha$  gene polymorphisms on TNF $\alpha$  production and disease. *Hum Immunol*. 2001;62:1191-9.
8. D'Afonso SPMR. An intragenic polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) chain-encoding gene. *Immunogenetics*. 1996;44:32.
9. Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the Transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol*. 1999;66:562-6.
10. Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine*. 2000;12:110-9.
11. Bayley JP, de Rooij H van den Elsen PJ, Huizinga TW, Verweij CL. Functional analysis of linker-scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF-alpha promoter. *Cytokine*. 2001;14:316-23.
12. Kroeger KM, Carville KS. The -308 Tumor necrosis factor-promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997;34:391-9.
13. Kaijzel E, van Krugten M, Brinkman Bec. Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism related to damage in rheumatoid arthritis. *Mol Med*. 1998;4.
14. McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*. 1994;371:508-10.
15. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 1995;182:1259-64.
16. Roy S, McGuire W, Mascie Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis*. 1997;176:530-2.
17. Santos A, Almeida A, Suffys PN, Moraes MO, Filho VF, Mattos HJ, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2000;68:325-7.
18. Santos A, Suffys P, Vanderborgh P, Moraes M, Vieira L, Cabello P, et al. Role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphism. *J Infect Dis*. 2002;186:1687-91.
19. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumor necrosis factor genes. *Genes Immun*. 2001;2:196-204.
20. Hill AVS, Ruwende C, McGuire W, Bellamy R, Coleman E, Ali S, et al. Association of the TNF-238 promoter polymorphism with susceptibility to tuberculosis and malaria in Africa. *Hum Immunol*. 1996;47:118.
21. Jang W, Yang Y, Yea Sec. The- 208 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. *Cancer Lett*. 2001;166:41-6.
22. Hohler T, Schaper T, Schneider P, Meyer Z, Buschenfelde K, E M-H. Association of different tumor necrosis factor alpha promoter allele frequencies with ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. *Arthritis Rheum*: 1998;41:1489-92.
23. Huizinga T, Westendorp R, et al. TNF-alpha promoter polymorphism production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol*. 1997;72:149-53.
24. Reich K, Westphal G, Schulz Tec. Combined analysis of polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter regions and polymorphic xenophobic metabolizing enzymes in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 1999;113:214-20.
25. Lurie M, Abramson S, Heppleston A. On the response of genetically resistance and susceptible rabbits to the quantitative inhalation of human-type tubercle bacilli and the nature resistance to tuberculosis. *J Exp Med*. 1952;95:119-34.
26. Vidal S, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for BCG. *Cell*. 1993;73:469-85.
27. Flynn JL, Goldstein M, Chan J, Triebold K, Pfeffer K, Lowenstein C, et al. Tumor necrosis factor alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995;2:251-72.
28. Stead WW. Variation in vulnerability to tuberculosis in America today: random, or legacies of different ancestral epidemics? *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001;5:807-14.
29. Stead WW, Senner J, Reddick W, Lofgrien J. Racial differences in susceptibility to infection by *M. tuberculosis*. *N Engl J Med*. 1990;322:422-7.
30. Newport M, Huxley C, Huston S, Hawrylowicz C, Oostra B, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N. Engl J Med*. 1996;335:1941-5.

31. Altare F, Duarandy A, Lammas D, et al. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science*. 1998;280:1432-5.
32. Bellamy R, Hill AVS. Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:483-7.
33. Ryu S, Park Y, Bai G, Kim S, Park S, Kang S. 3'UTR polymorphism in the NRAMP1 gene is associated with susceptibility to tuberculosis in Koreans. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000;4:577-80.
34. Bellamy R, Ruwende C, Corrh T, McAdam HPWJ, Thursz M, Whittle HC, et al. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variations in vitamin D receptor gene. *J Infect Dis*. 1999;179:721-4.
35. Selvaraj P, Narayanan P, Reetha A. Association of vitamin D receptor genotypes with the susceptibility to pulmonary tuberculosis in female patients & resistance in female contacts. *Indian J Med Res*. 2000;111:172-9.
36. Orme IM. The immunopathogenesis of tuberculosis: a new working hypothesis. *Trends Microbiol*. 1993;6:94-8.
37. Roy S, McGuire W, Mascie Taylor CG, Saha B, Hazra SK, Hill AV, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis*. 1997;176:530-2.
38. Makhatadze N. Tumor necrosis factor: Genetic organization and biological implications. *Hum Immunol*. 1998;59:571-9.
39. Selvaraj P, Sriram U, Mathan Kurian S, Reetha AM, Narayanan PR. Tumour necrosis factor alpha (-238 and -308) and beta gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis: haplotype analysis with HLA-A, B and DR genes. *Tuberculosis*. 2001;81:335-41.
40. Oliveira MM, Fonseca da Costa J, Almeida AS, Amim LHV, Loredó CCS, Rabahi MF, Mello FCQ, Lapa e Silva JR, Kritski AL, Santos AR. TNF- $\alpha$  e a conversão ao teste tuberculínico: papel dos polimorfismos de base única -238/-308. *Pulmão, RJ*. 2003;12:148-54.