



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**FERNANDO HENRIQUE AZEVEDO LOPES**

**NÍVEIS SÉRICOS DE INTERLEUCINA-6 E POLIMORFISMO -174G→C DO GENE  
DESSA CITOCINA EM INFECÇÃO LATENTE PELO *Mycobacterium*  
*tuberculosis*.**

**FORTALEZA**

**2012**

FERNANDO HENRIQUE AZEVEDO LOPES

NÍVEIS SÉRICOS DE INTERLEUCINA-6 E POLIMORFISMO -174G→C DO GENE  
DESSA CITOCINA EM INFECÇÃO LATENTE PELO *Mycobacterium tuberculosis*.

Dissertação submetida ao curso de Pós-graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Patologia. Área de concentração: Imunogenética.

Orientador: Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas.

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

L852n Lopes, Fernando Henrique Azevedo.

Níveis séricos de interleucina – 6 e polimorfismo – 174 G>C do gene dessa citocina em infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*. – 2012.

68 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2012.

Área de concentração: Imunogenética

Orientação: Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas

1. Infecção por *Mycobacterium*.
2. *Mycobacterium tuberculosis*.
3. Interleucina - 6
4. Polimorfismo Genético I. Título.

---

CDD 616.995

FERNANDO HENRIQUE AZEVEDO LOPES

NÍVEIS SÉRICOS DE INTERLEUCINA-6 E POLIMORFISMO -174G→C DO GENE  
DESSA CITOCINA EM INFECÇÃO LATENTE PELO *Mycobacterium tuberculosis*.

Dissertação submetida ao curso de Pós-graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Patologia. Área de concentração: Imunogenética.

Data da Aprovação: 24/02/2012.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas (Orientador)  
(Universidade Federal do Ceará)

---

Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu  
(Universidade Federal do Ceará)

---

Prof. Dr. Jeová Keny Baima Colares  
(Universidade de Fortaleza)

---

Prof. Dr. Fernando Sérgio Studart Leitão Filho  
(Universidade de Fortaleza)

Ao meu pai, por mostrar-me que, na árdua missão de educar, amor, dedicação e simplicidade são virtudes imprescindíveis.

À minha mãe, que, com grande entusiasmo, ensinou-me a amar os livros e que é possível vencer pelo conhecimento.

Aos meus irmãos, Patrícia e Leonardo, pelo carinho e apoio.

À minha esposa Kelly, companheira de todas as horas, por seu estímulo e compreensão.

Aos meus filhos Clarice e Davi, por darem sentido à minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao amigo **Dr. José Walter Correia**, por sempre ter acreditado em meu potencial e por reconduzir-me ao mundo do conhecimento acadêmico.

Ao **Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas**, pela forma elegante, cordial e objetiva com que desempenha sua nobre missão de orientador.

Ao **Prof. Dr. Roberto da Justa Pires Neto**, profissional de extremas competência e generosidade. Sem o seu apoio, este estudo jamais teria sido possível.

À **Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota**, que, gentilmente, cedeu as instalações do Laboratório de Micobactérias, onde foram feitas as análises das amostras.

À acadêmica de Farmácia **Lívia Coelho de Assis**, que realizou, de forma sempre competente, as extrações de DNA e as PCRs das amostras coletadas.

À farmacêutica **Kélvia Miranda Sá**, pela realização dos testes de ELISA e pelos vários conselhos técnicos, sempre tão pertinentes.

À acadêmica de Medicina **Karine Paschoal Botelho**, pela valiosa ajuda na triagem dos contactantes de TB no Hospital São José.

À amiga **Giselda Medeiros**, da Academia Cearense de Letras, pela revisão gramatical desta dissertação.

Aos professores das bancas de qualificação e defesa, pelas indispensáveis contribuições a este estudo.

À Capes, pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da UFC, pela forma respeitosa com que sempre fui tratado.

A todos os profissionais do Hospital Universitário Walter Cantídio, Hospital São José de Doenças Infecciosas e Centro de Saúde da Família Anastácio Magalhães que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os contactantes dos pacientes de TB que concordaram em participar do estudo.

### **Pneumotórax**

Febre, hemoptise, dispnéia e suores noturnos.

**A vida inteira que podia ter sido e que não foi.**

Tosse, tosse, tosse.

Mandou chamar o médico:

- Diga trinta e três.

- Trinta e três... trinta e três... trinta e três...

- Respire.

- O senhor tem uma escavação no pulmão esquerdo e o pulmão direito infiltrado.

- Então, doutor, não é possível tentar o pneumotórax?

- Não. A única coisa a fazer é tocar um tango argentino.

Manuel Bandeira (1886 – 1968).

## RESUMO

A interleucina-6 (IL-6) é uma importante citocina que exerce papel fundamental na imunopatogênese de diversas doenças infecciosas. O objetivo deste estudo foi investigar o nível de produção sistêmica de IL-6 e aferir o papel funcional do polimorfismo -174 G→C do gene dessa citocina em indivíduos diagnosticados como portadores de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ILTB). Para controle, foram utilizados dois grupos de comparação: um deles composto por portadores de tuberculose pulmonar ativa (TB) e o outro formado por indivíduos saudáveis, doadores de sangue. O grupo ILTB foi composto por 15 indivíduos, selecionados dentre os contactantes de portadores de TB pulmonar ativa, atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas e no Centro de Saúde da Família Anastácio Magalhães. O grupo TB foi formado por 38 pacientes com TB pulmonar ativa, procedentes do Hospital de Messejana, Hospital de Maracanaú e Hospital Geral Dr. César Cals. O grupo de indivíduos saudáveis contava com 63 doadores voluntários de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará. A dosagem sérica de IL-6 foi realizada por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA), com kit específico fornecido pela Invitrogen Corporation. Para purificação do DNA, foi utilizado o kit GFX Genomic Blood DNA Purification, da GE Healthcare. O polimorfismo -174G→C do gene da IL – 6 foi tipificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se iniciadores de sequência específica (PCR-SSP) (One-Lambda). As medianas de concentrações séricas de IL-6 para os grupos ILTB, TB e saudáveis foram de, respectivamente, 1,7 pg/mL, 4,3 pg/mL e 0,5 pg/mL ( $p < 0,0001$ ). Nos três grupos estudados, o genótipo encontrado com maior frequência foi o G/G [ILTB = (80%); TB = (58,9%); saudáveis = (62,8%)]. Em conclusão, podemos inferir que a IL-6 deve desempenhar um papel importante na manutenção do estado de latência, haja vista que sua concentração, nos indivíduos com ILTB, foi 3,4 vezes maior que no grupo saudável. Ademais, constatamos que, na população estudada, o polimorfismo -174G→C não se mostrou funcional no âmbito da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

**Palavras-chave:** Infecção Latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Dosagem de IL-6. Polimorfismo gênico de IL-6.

## ABSTRACT

Interleukin-6 (IL-6) is an important cytokine involved in the pathogenesis of multiple infectious diseases. The aim of this study was to investigate the levels of IL-6 production and to correlate to the -174G→C polymorphism at the IL-6 gene in latent infection with *M. tuberculosis* (ILTB). As controls, two groups were used. One of them with active pulmonary tuberculosis (TB) patients and the other with healthy blood donors. ILTB group was composed by 15 individuals, selected among active pulmonary TB contacts seen at the *Hospital São José de Doenças Infecciosas* and the *Centro de Saúde da Família Anastácio Magalhães*. TB group had 38 patients with active pulmonary disease seen at the *Hospital de Messejana*, *Hospital de Maracanaú* and the *Hospital Geral Dr. César Cals*. The third group was composed by 63 healthy blood donors from the *Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará*. Serum levels of IL-6 were measured by an ELISA using specific kits from Invitrogen Corporation. For DNA purification a GFX Genomic Blood DNA Purification kit (GE Healthcare) was used. The -174G→C polymorphism was analyzed by a SSP-PCR method using One-Lambda kits. Median values of serum levels of IL-6 from ILTB, TB and healthy groups were, respectively, 1.7 pg/mL, 4.3 pg/mL and 0.5 pg/mL ( $p < 0.0001$ ). For the three studied group, the most frequent genotype found was the G/G (ILTB = 80%; TB = 58.9%; saudáveis = 62.8%). In conclusion, it is possible to consider that IL-6 should play an important role in the maintenance of latent infection state as its concentrations were 3.4 fold higher in ILTB group than that of healthy controls. Moreover, the -174G→C polymorphism was not functional in the ILTB group.

**Key-words:** *Mycobacterium tuberculosis* latent infection; IL-6 levels; IL-6 polymorphism; Polymerase chain reaction.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Cultura de <i>M. tuberculosis</i> corada pela técnica de Ziehl-Nielsen ....	18
<b>Figura 2</b> - Micrografia eletrônica de <i>M. tuberculosis</i> crescendo em cultura .....	18
<b>Figura 3</b> - Imunidade adaptativa ao <i>M. tuberculosis</i> .....	25
<b>Figura 4</b> - Formação do granuloma .....	26
<b>Figura 5</b> - Espectro de respostas à infecção tuberculosa .....	31
<b>Figura 6</b> - Fluxograma para investigação de contatos adultos e adolescentes ...	36
<b>Figura 7</b> – Curva-padrão para dosagem de IL-6 .....	43
<b>Figura 8</b> – Concentrações séricas de IL-6 nos grupos estudados .....	44
<b>Figura 9</b> - Bandas de eletroforese em gel de agarose a 1,5% .....	45
<b>Figura 10</b> - Níveis séricos de IL-6 em indivíduos do grupo ILTB em função dos genótipos.....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características do TT e dos IGRAs .....	30
<b>Tabela 2</b> - Características demográficas dos indivíduos com infecção latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (ILTb) e dos grupos de comparação (tuberculose e indivíduos saudáveis) .....	42
<b>Tabela 3</b> - Distribuição dos polimorfismos de genótipos -174G→C de IL-6 em indivíduos com infecção latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e em grupos de comparação .....	45
<b>Tabela 4</b> - Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos -174G→C de IL-6 em indivíduos dos grupos teste e de comparação.....	46
<b>Tabela 5</b> - Dados demográficos, genótipos -174G→C de IL-6 e níveis séricos de IL-6 nos grupos teste e de comparação.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
C	Citosina
CD	<i>Cluster Differentiation</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFP-10	<i>Culture Filtrate Protein - 10</i>
CNS	Conselho Nacional da Saúde
CSFAM	Centro de Saúde da Família Anastácio Magalhães
dc	Depois de Cristo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etileno-Diamino –Tetra –Acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ESAT-6	<i>Early Secretory Antigen Target - 6</i>
G	Guanina
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSJ	Hospital São José de Doenças Infecciosas
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
IGRAs	Ensaio de Liberação de Interferon- $\gamma$
IL-1 $\beta$	Interleucina – 1 $\beta$
IL-4	Interleucina – 4
IL-5	Interleucina – 5
IL-6	Interleucina – 6
IL-6R	Receptor de IL-6
IL-7	Interleucina – 7
IL-12	Interleucina – 12
IL-15	Interleucina – 15
IL-17	Interleucina – 17
IL-23	Interleucina – 23
ILTB	Infeção Latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
INH	Isoniazida
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
MAIS	Complexo <i>Mycobacterium avium, intracelularis e scrofulaceum</i>
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde
<i>M.tb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPD	Derivado Proteico Purificado
RPM	Rotações por minuto
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SVS	Secretaria de vigilância em Saúde

T- $\gamma\delta$	Linfócito T gama-delta
TB	Tuberculose
TBMDR	Tuberculose multidrogarresistente
TBS	Tuberculose sensível aos medicamentos
TBXDR	Tuberculose Extensivamente Resistente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDO	Tratamento Diretamente Observado
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformador - beta
T <sub>H</sub> 0	Linfócito T auxiliar 0.
T <sub>H</sub> 1	Linfócito T auxiliar 1.
T <sub>H</sub> 2	Linfócito T auxiliar 2.
T <sub>H</sub> 17	Linfócito T auxiliar 17.
TLR	Receptor semelhante ao Toll
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral - alfa
T <sub>reg</sub>	Linfócito T regulador
TT	Teste Tuberculínico
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 Aspectos históricos .....	14
1.2 Gênero <i>Mycobacterium</i> .....	16
1.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	17
1.4 Relação infecção / doença .....	18
1.5 Dados epidemiológicos .....	19
1.6 Aspectos imunológicos .....	23
1.6.1 Importância da Interleucina-6 .....	27
1.7 Polimorfismo gênico .....	28
1.8 Infecção latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	29
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	34
3.1 Objetivo geral .....	34
3.2 Objetivos específicos .....	34
<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 Seleção dos sujeitos da pesquisa .....	35
4.2 Seleção dos controles .....	36
4.3 Critérios de inclusão .....	37
4.4 Critérios de exclusão .....	37
4.5 Colheita de sangue .....	37
4.6 Purificação do DNA .....	38
4.7 Tipificação do polimorfismo -174G→C do gene da interleucina-6 .....	39
4.8 Análise dos fragmentos de DNA .....	40
4.9 Dosagem da IL-6 .....	40
4.10 Análise estatística .....	41
4.11 Considerações éticas .....	41
<b>5 RESULTADOS</b> .....	42
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53
<b>APÊNDICES</b> .....	61
<b>ANEXOS</b> .....	66

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos históricos

A domesticação de plantas e animais é considerada um dos mais importantes eventos nos últimos 13.000 anos na história da humanidade. Desde o advento da agricultura, os principais “assassinos” de seres humanos têm sido doenças epidêmicas e altamente infecciosas. Tais enfermidades, denominadas “doenças das multidões”, mantêm-se apenas em regiões com grandes aglomerados populacionais, uma condição inexistente antes do desenvolvimento das atividades agrícolas (DIAMOND, 2002).

A tuberculose (TB) é, certamente, uma das mais antigas doenças que afligem a humanidade. Em um sítio arqueológico submerso chamado Atlit–Yam (uma das mais antigas vilas pré-históricas com evidências de agricultura e criação de animais), localizada a 500 metros da costa e profundidade variando de 8 a 12 metros, na baía de Atlit, 10 km ao sul de Haifa, Israel, pesquisadores extraíram e identificaram DNA do *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da TB, a partir de amostras ósseas humanas com típicas lesões de tuberculose e datação por carbono radioativo estimada entre 9250 e 8160 anos. O uso generalizado de animais domesticados não foi, decerto, a fonte da infecção, mas pode ter contribuído para a formação de adensamentos populacionais, facilitando a disseminação do bacilo da TB (HERSHKOVITZ et al., 2008). Uma vez que a enfermidade é transmitida por via aérea, quanto maior o número de pessoas em áreas fechadas, maior a possibilidade de contaminação (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000).

Na obra *The Canon of Medicine*, escrita pelo médico usbeque Ibn Sina (Avicena nas culturas ocidentais) e publicada por volta do ano 1025 dc, a tuberculose pulmonar já era identificada como doença contagiosa, sugerindo que a mesma poderia ser propagada a partir da água e do solo (AL-SHARRAH, 2003).

Nos séculos XIV e XV, médicos italianos passam a recomendar o isolamento dos doentes e dos seus pertences, na tentativa de evitar a disseminação da moléstia e as consequentes epidemias (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000).

Na Europa dos séculos XVII e XVIII, a TB era conhecida como “Peste Branca”. Estima-se que, nessa época, quase 100% da população estivesse infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo a enfermidade responsável por 25% de todas as mortes de adultos (TODAR, 2011).

Em 1689, o médico inglês Richard Morton associou a forma pulmonar da doença à presença de tubérculos (TRAIL, 1970). No entanto, devido à variedade de sintomas, a TB só passou a ser identificada como moléstia única, na década de 1820, recebendo a denominação “tuberculose” somente em 1839, dada pelo médico alemão Johann Lukas Schönlein (ACKERKNECHT, 1964).

O bacilo causador da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*), foi identificado e descrito em 1882, pelo médico alemão Heinrich Hermann Robert Koch. Por esse feito, Koch foi agraciado com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1905 (NOBELPRIZE.ORG, 2011).

Em 1890, Koch anuncia que um extrato de glicerina contendo o bacilo da TB, por ele denominado tuberculina, seria capaz de curar a doença. O entusiasmo logo arrefeceu quando se comprovou a ineficácia do extrato no tratamento da enfermidade. Contudo, evidências de que o mesmo poderia ser usado como uma valiosa ferramenta diagnóstica deu a ele uma nova função. Após passar por várias adaptações, a tuberculina começou a ser utilizada em humanos no ano de 1907, na forma de injeção intradérmica. Argumentos favoráveis ao novo método ressaltavam que a reação, manifesta na forma de uma endureção no local inoculado, era muito confiável e passível de ser aferida com grande acurácia (WADDINGTON, 2004).

O primeiro sucesso na tentativa de desenvolver uma vacina anti-TB foi obtido pelos cientistas Albert Calmette e Camille Guérin em 1906, utilizando uma cepa atenuada do *Mycobacterium bovis*. Essa vacina foi denominada BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), tendo sido usada, pela primeira vez em 1921, na França. Entretanto, foi apenas após a II Guerra Mundial que a BCG recebeu ampla aceitação nos Estados Unidos, Grã-Bretanha e Alemanha (BONAH, 2005; COMSTOCK, 1994).

Na década de 1930, o uso de uma técnica cirúrgica chamada pneumotórax, que consistia em provocar o colapso parcial do pulmão afetado por meio da injeção de ar na cavidade pleural, passou a ser o procedimento mais frequentemente praticado como estratégia adjuvante à terapia do repouso. O objetivo da intervenção era que, estando o pulmão suficientemente colapsado, o conseqüente relaxamento dos tecidos reduzisse o volume das cavitações, além de provocar “torções” nos brônquios. O resultado era a quase total ausência de bacilos, eliminados no escarro (BASEL, 1998).

Em 1943, o microbiologista Selman Waksman e sua equipe isolaram, pela primeira vez, a partir de culturas da bactéria *Streptomyces griseus*, a estreptomicina - primeira droga

usada com sucesso no tratamento da TB. Por seu feito, Waksman recebeu o Prêmio Nobel em 1952 (SAKULA, 1988).

A monoterapia com estreptomicina, no entanto, não tardou a revelar a existência de cepas mutantes resistentes do *M.tb*. Logo se demonstrou que o uso de duas ou mais substâncias combinadas seria mais eficaz. Desde então, várias outras drogas efetivas no tratamento da TB foram desenvolvidas; isoniazida (1952), cicloserina (1955), etambutol (1962) e rifampicina (1963) são alguns exemplos (BASEL, 1998).

As esperanças de que a doença pudesse ser completamente eliminada foram frustradas com o surgimento de cepas resistentes às drogas habitualmente usadas no tratamento da TB, entre o final da década de 1980 e início dos anos 1990. Na cidade de New York, por exemplo, a proporção de casos, em que se verificou resistência às drogas anti-TB, passou de 10% em 1983 para 23% em 1991. Com isso, o número anual de casos registrados da enfermidade passou de 1307 no ano de 1978 para 3811 relatados em 1992. A gravidade dessa epidemia deveu-se, em grande parte, ao sistemático processo de desmantelamento da infraestrutura de saúde pública, bem como a diversos outros fatores: precariedade das habitações, abuso de drogas, inadequados recursos diagnósticos, estratégias de tratamento impróprias e à, então, emergente epidemia de HIV/aids (PAOLO; NOSANCHUK, 2004).

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS), numa decisão sem precedentes, declarou a tuberculose uma “emergência mundial” (WHO, 2004).

Atualmente, estima-se em meio milhão o número de novos casos anuais de tuberculose multidrogarresistente (TBMDR) ao redor do mundo (WHO, 2009).

## **1.2 Gênero *Mycobacterium*:**

O gênero *Mycobacterium* é composto por bacilos retos ou ligeiramente curvos, imóveis e não esporulados, com dimensões variando de 1-10 $\mu$ m de comprimento por 0,2-0,6 $\mu$ m de largura. Possuem, habitualmente, um elevado teor (61% a 71%) de pares G/C (guanina / citosina) em seu genoma, bem como uma parede celular com alta concentração de lipídios complexos (provavelmente a mais elevada dentre todas as bactérias), que chegam a compor mais da metade do seu peso seco. O revestimento lipídico explica algumas das idiossincráticas características do gênero: extrema hidrofobicidade, resistência (inclusive aos danos causados por muitos antibióticos) e antigenicidade. Atribui-se, também, ao espesso revestimento lipídico, a lenta taxa de crescimento de algumas espécies, uma vez que isso dificulta a obtenção de nutrientes pelo bacilo (PALOMINO; LEÃO; RITACCO, 2007).

Uma das características mais peculiares dos representantes do gênero é a álcool-ácido resistência. O termo se refere à capacidade do microrganismo em reter o corante carbolfuccina, independente do tratamento subsequente com uma mistura de etanol e ácido clorídrico (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

A maioria das espécies é de vida livre. Pouquíssimas micobactérias são patogênicas aos vertebrados (PALOMINO; LEÃO; RITACCO, 2007). Dentre essas, o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (que engloba o *M.tb*, o *M. africanum* e o *M. bovis*) é o mais importante do gênero, do ponto de vista da etiologia de doenças em humanos (MORRONE et al., 2003).

No entanto, outras espécies, classificadas como “micobactérias não tuberculosas” (ATS, 1997), ocasionalmente, determinam doença, sobretudo nos imunocomprometidos, idosos e portadores de broncopneumopatias crônicas. Nesse grupo, as espécies mais comumente envolvidas são: o *M. kansasii* (Mk), o complexo MAIS (*avium*, *intracellulare* e *scrofulaceum*), o *M. xenopi*, o *M. szulgai* e o *M. malmoense*, além do *M. leprae* (MORRONE et al., 2003).

### 1.3 *Mycobacterium tuberculosis*

São bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR), aeróbios estritos, não esporulados, em forma de bastonetes delgados e retilíneos, medindo cerca de 0,4 $\mu$ m (largura) x 3 $\mu$ m (comprimento). Possuem longos períodos de geração (16 a 20 horas) e duplicação (18 a 48 horas). Crescem muito lentamente em meios de cultura (3 a 8 semanas para formar colônias visíveis) (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000; REY, 1999).

A espécie não pode ser classificada como Gram-positiva, tampouco como Gram-negativa, por ser muito fracamente corada pelos corantes usados na técnica de Gram (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

Os ácidos micólicos, presentes na parede celular, são provavelmente o suporte molecular da álcool-ácido resistência. Ligados ao peptidoglicano, eles formam uma barreira periférica hidrofóbica capaz, durante a coloração de Ziehl-Nielsen (figura 1), de se ligar e reter a fucsina (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000).

São parasitas intracelulares facultativos, usualmente de macrófagos, tendo a espécie humana como seu único reservatório (TODAR, 2011). Ao contrário de algumas micobactérias de crescimento rápido, o *M.tb* raramente é pleomórfico, não forma filamentos alongados ou cadeias ramificadas quando observados em cultura (figura 2) (CHAUHAN, 2006).

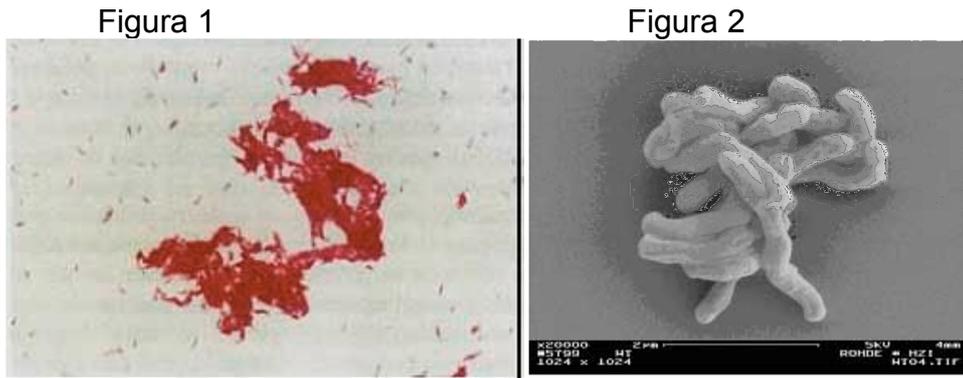


FIGURA 1: Cultura de *M. tuberculosis*, corada pela técnica de Ziehl-Nielsen.  
Fonte: Palomino; Leão; Ritacco, 2007.

FIGURA 2: Micrografia eletrônica de *M. tuberculosis* crescendo em cultura.  
Fonte: Palomino; Leão; Ritacco, 2007.

#### 1.4 Relação infecção / doença:

A tuberculose é transmitida de uma pessoa a outra através de aerossóis. Quando um portador da forma respiratória da doença ativa fala, canta, espirra ou tosse, lança no ar aerossóis contendo o *M.tb*. Indivíduos próximos inalam essas partículas, tornando-se infectados. O *M.tb* afeta usualmente os pulmões, mas também pode causar doença em diversas outras partes do corpo. Rins, coluna vertebral e cérebro são exemplos de órgãos eventualmente acometidos (CDC; WHO, 2011b).

Uma vez que nem todos os infectados adoecem, existem duas condições associadas à TB: infecção latente (ILTB) e doença ativa. Na maioria das pessoas que se infectam, o sistema imunológico é capaz de impedir o crescimento do bacilo. Desse modo, não há sintomas ou risco de transmissão da enfermidade; muitos portadores de ILTB jamais desenvolvem a forma ativa, no entanto, na presença de condições imunossupressoras, sobretudo na co-infecção por HIV, o microrganismo entra em crescimento, e a tuberculose-doença se manifesta. O que caracteriza a forma ativa é a incapacidade do sistema imunológico em deter a multiplicação da bactéria no organismo. Assim, irrompem os sinais e sintomas típicos da enfermidade, e o indivíduo torna-se infectante (CDC, 2011).

## 1.5 Dados epidemiológicos

São imensos os danos que a tuberculose traz à sociedade. Mundialmente, de cada três seres humanos, um está infectado com o *M.tb* (mais de 2,3 bilhões de pessoas). A doença ocupa o sétimo lugar no *ranking* mundial de causas de morte e, juntamente com a aids e a malária, continua a ser uma das três enfermidades infecciosas mais letais do mundo (COLLINS, 2001; DYE et al., 1999).

Estima-se em 9,4 milhões o número de casos mundiais de TB em 2009, correspondendo a uma taxa de 137 ocorrências por 100.000 habitantes. A maior parte desse contingente encontra-se na Ásia (55%) e na África (30%). Apenas 22 países respondem por 81% do total de ocorrências (WHO, 2011b).

No Brasil, são registrados anualmente cerca de 71.000 novos casos de tuberculose, com estimativa de 63 milhões de infectados pelo *M.tb* e 4.600 mortes anuais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011a). No entanto, o país vem registrando sucessivas quedas nas taxas de incidência nas últimas duas décadas. No ano de 2010, esse índice foi 27% menor em relação a 1990 (37,7 x 51,8 casos por 100.000 habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011b). No mesmo período, a taxa de mortalidade mostrou redução de 33% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011a). Atualmente, o Brasil ocupa a última posição na lista dos 22 países priorizados pela OMS que abrangem 80% da carga mundial de tuberculose (WHO, 2011b).

No ano de 2010, o Ceará apresentava taxa de incidência igual a 41,88 casos por 100.000 habitantes, superior à média nacional e o segundo maior índice dentre os estados nordestinos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011<sup>b</sup>). Em 2009, foram notificados, no estado, 3.887 casos novos de tuberculose (coeficiente de incidência de 45,5/100.000 habitantes), dos quais 2.146 foram pulmonares bacilíferos (coeficiente de incidência de 25,1/100.000hab) e 341 extrapulmonares. A forma clínica pulmonar é a predominante, concentrando cerca de 88% dos casos entre os anos de 2001 e 2010. Quanto à forma extrapulmonar e às que apresentam outras localizações (pulmonar + extrapulmonar), mantiveram-se em torno de 11% e 1%, respectivamente. Os fatores mais influentes, hoje, para o aumento do número de casos no Ceará são a pobreza e a co-infecção pelo HIV. Com isso, recomenda-se que todos os adultos com diagnóstico positivo para tuberculose realizem o teste para HIV (GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ – INFORME EPIDEMIOLÓGICO TUBERCULOSE, 2010).

Apesar de existirem drogas efetivas há mais de 50 anos, a cada 15 segundos alguém morre de tuberculose em algum lugar do mundo. E o mais alarmante: a cada segundo surge

um novo caso de infecção pelo *M.tb*. Mantida sem tratamento, uma pessoa com TB ativa infecta, em média, de 10 a 15 outros indivíduos anualmente (DYE et al., 2005).

A tuberculose impacta perversamente o desenvolvimento socioeconômico, uma vez que 75% da população afetada encontram-se em faixa etária economicamente ativa (entre 15 e 54 anos); 95% de todos os casos e 99% das mortes ocorrem nos países em desenvolvimento (DYE, 2006; WHO, 2006). Dados da OMS mostram claramente uma íntima associação epidemiológica entre TB e HIV. Indivíduos infectados pelo HIV têm 37 vezes mais chance de desenvolver a doença, em relação aos não infectados. Os portadores do vírus já representam mais de 10% do total de casos de tuberculose registrados anualmente no mundo, sendo a enfermidade responsável por uma de cada quatro mortes dentre os infectados (STOP TB PARTNERSHIP, 2011).

A infecção pelo HIV é um potencial fator de risco para a tuberculose, não apenas porque o vírus favorece a reativação de uma infecção latente pelo *M.tb*, mas também por propiciar uma rápida progressão da TB. Em um indivíduo infectado apenas com o *M.tb*, o risco de desenvolver a doença ao longo da vida fica entre 10% e 20%. Por outro lado, no contexto de uma co-infecção com HIV, essa taxa é de 10% ao ano (AARON et al., 2004; CORBETT et al., 2003; WHO, 2004).

Com base nessas informações, fica fácil compreendermos por que a incidência de tuberculose em países com níveis epidêmicos de HIV/aids, especialmente aqueles das regiões leste e sul do continente africano, aumentou tão rapidamente ao longo da última década, tornando a TB a causa mais comum de morte dentre os adultos HIV - positivos que vivem em nações menos desenvolvidas (AARON et al., 2004; CORBETT et al., 2003; WHO, 2004).

Estima-se que, dentre os 9,4 milhões de casos de TB em 2009, houvesse 1,1 milhão de HIV – positivos, cerca de 12% do total. Calcula-se em 1,7 milhão o número de mortes por tuberculose no ano de 2009, dos quais 400 mil eram HIV positivos (WHO, 2011b).

A tuberculose multidrogarresistente (TBMDR) é hoje considerada um grave problema de saúde pública. TBMDR é definida como resistência a, pelo menos, rifampicina e isoniazida, duas das mais efetivas drogas anti-TB. Diversos fatores podem contribuir para o aumento da incidência de TBMDR; não adesão ao tratamento, regimes terapêuticos inadequados e falhas no sistema de distribuição dos medicamentos são os mais comuns (WHO, 2011b).

O tratamento da TBMDR é mais longo (até dois anos) e dispendioso (pois requer o uso de fármacos de segunda linha), quando comparado ao da tuberculose sensível aos

medicamentos (TBS). Ademais, as taxas de cura da TBMDR são inferiores às da TBS (50 a 70% x 90%) (STOP TB PARTNERSHIP, 2011).

Cenário ainda mais sombrio tem sido a emergência de cepas do *M.tb* extensivamente resistentes (TBXDR). Essa condição é definida como resistência à rifampicina + isoniazida e a uma fluoroquinolona, associada à resistência a um dos três fármacos injetáveis de segunda linha (amicacina, canamicina e capreomicina) (SBPT, 2009).

Diante desse panorama preocupante, a OMS lançou, em 1995, a estratégia DOTS (*Directly Observed Treatment, Short-course*), em português: Tratamento Diretamente Observado (TDO). Esse sistema, que tem sido o cerne de todos os programas de combate à TB preconizados pela OMS, tem como diretrizes principais a detecção de casos através da baciloscopia de escarro em todos os pacientes sintomáticos e um fornecimento regular e ininterrupto de todas as drogas anti-TB necessárias ao tratamento (WHO, 1999). De 1995 a 2009, 49 milhões de pacientes com tuberculose foram tratados de acordo com a estratégia TDO; 41 milhões deles com sucesso (STOP TB PARTNERSHIP, 2011).

Em 2001, a OMS fundou a *A Stop TB Partnership*, um movimento global, composto por mais de 1200 organizações, governamentais e não-governamentais, que trabalham juntas desenvolvendo estratégias para assegurar um mundo livre da tuberculose (STOP TB PARTNERSHIP, 2011).

No ano de 2006, a *Stop TB Partnership* lançou o *Global Plan to Stop TB 2006–2015*, um roteiro para reforçar estratégias de prevenção, tratamento, pesquisa e financiamento. As metas do plano incluem reduzir à metade a prevalência e as taxas de mortalidade por TB até 2015, em relação aos níveis de 1990, abrindo assim o caminho para a eliminação da doença (definida como menos de um caso por cada milhão de habitantes por ano) até 2050 (STOP TB PARTNERSHIP, 2006).

A estratégia do *Global Plan to Stop TB 2006–2015* baseia-se no sucesso do sistema TDO. Apesar das conquistas dos últimos anos, ainda há enormes barreiras a serem transpostas, antes que se possam cumprir as metas previstas para o período. Os principais objetivos a serem contemplados, bem como as maiores dificuldades para a sua efetivação estão listadas abaixo:

- 1- Dar continuidade ao processo de expansão e aprimoramento do TDO, oferecendo serviços de alta qualidade, amplamente disponíveis e acessíveis a todos aqueles que deles precisarem, sobretudo os mais pobres e vulneráveis. Em muitos países, no entanto, a dificuldade em atender a essa demanda reside nos frágeis sistemas

de saúde pública, na falta de recursos humanos e financeiros e no insuficiente comprometimento político.

- 2- Novas ferramentas permanecem urgentemente necessárias para aumentar a velocidade e a precisão do diagnóstico de tuberculose, bem como para melhorar a eficácia do tratamento e reduzir a sua duração. Tem havido muitos progressos, mais investimentos em larga escala continuarão sendo necessários para tornar amplamente disponíveis todos esses recursos.
- 3- O HIV continua sendo um dos maiores entraves aos esforços para atingir as metas de controle da TB. Poucos pacientes com tuberculose são testados para HIV e um número ainda menor é avaliado para inserção em programas de terapia antirretroviral.
- 4- A ameaça da TBMDR tem representado um salutar impacto ao sistema TDO. Programas de implementação em larga escala do TDO ajudam a evitar o surgimento posterior de resistência às drogas. Pouquíssimos países, porém, têm políticas nacionais para o diagnóstico e tratamento da TBMDR ou, quando as têm, o tratamento geralmente não funciona como deveria.
- 5- Moradores de áreas rurais remotas, de favelas, desabrigados e migrantes ainda têm grandes dificuldades de acesso aos serviços públicos de saúde de boa qualidade.
- 6- O estigma que ainda paira sobre a doença, bem como o desconhecimento sobre os tipos de serviços de assistência disponíveis ao doente, contribui para a subutilização dos mesmos, aumentando o custo social da TB.
- 7- Muitas instituições atuantes na área da saúde, tanto públicas quanto privadas, não utilizam estratégias baseadas em evidências para o diagnóstico e tratamento da tuberculose. Isso acarreta diagnósticos incorretos, tratamentos com resultados insuficientes, aumento nas taxas de resistência às drogas e desperdício de recursos.

## 1.6 Aspectos Imunológicos

A primeira linha de defesa contra a infecção pelo *M.tb* (e outros microrganismos inaláveis) são as barreiras físicas do trato respiratório: pelos nasais, angulação das vias aéreas, secreção traqueobronquial e *clearance* mucociliar (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000). Vencidos esses obstáculos, os aerossóis contendo bacilos viáveis atingem o espaço alveolar, onde o *M.tb* é fagocitado pelos macrófagos alveolares (KANG et al., 2005), células dendríticas e neutrófilos (GEIJTENBEEK et al., 2003).

Uma vez no interior do macrófago, o *M.tb* replica-se dentro do fagossomo e impede a fusão deste com o lisossomo. O bloqueio da formação do fagolisossomo dá-se pela inibição dos sinais de  $Ca^{2+}$  e do recrutamento e montagem de proteínas que medeiam a fusão fagossomo – lisossomo. Assim, durante a fase inicial da infecção primária (primeiras três semanas, em média), o bacilo prolifera dentro dos macrófagos alveolares e espaços aéreos, com resultante bacteremia (FRATTI et al., 2001).

Após a fagocitose, os macrófagos imunologicamente ativados reagem por meio de uma grande produção de óxido nítrico (NO) e outros intermediários reativos do nitrogênio, via iNOS, sendo esse o principal mecanismo microbicida dessas células (CHAN; FLYNN, 1999). De fato, altos níveis de expressão da iNOS foram detectados em macrófagos obtidos do lavado alveolar de pacientes com tuberculose ativa (NICHOLSON et al., 1996). Os níveis de óxido nítrico no ar exalado por pacientes com TB ativa, também, encontram-se aumentados (WANG; LIU; LIN, 1998).

O controle imunológico da infecção pelo *M.tb* fundamenta-se em uma típica resposta celular do tipo  $T_H1$ . Em seguida à fagocitose do bacilo, os macrófagos e células dendríticas, já nos linfonodos de drenagem, apresentam antígenos do *M.tb* às células T e passam a produzir interleucina-12 (IL-12) (LADEL et al., 1997a). A IL-12 é importante na diferenciação de células  $T_H0$  em  $T_H1$  que, por sua vez, produzem outra citocina, o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Secretado tanto por células T ativadas quanto por células NK, o IFN- $\gamma$  é capaz de ativar os macrófagos infectados ao promover a formação do fagolisossomo, bem como a produção de intermediários reativos do nitrogênio, que têm efeito antimicrobiano. Essas ações combinadas são capazes de destruir os bacilos que foram fagocitados (KAUFMANN, 2001; MACMICKING et al., 1997). Em outro estudo, foi demonstrado que o IFN- $\gamma$ , juntamente com a via de sinalização de TLR, é capaz de induzir autofagia em macrófagos infectados pelo *M.tb* (GUTIERREZ et al., 2004).

Na imunidade adaptativa ao *M.tb*, os macrófagos e células dendríticas infectados secretam citocinas (IL-12, IL-23, IL-7, IL-15 e TNF- $\alpha$ ) e apresentam antígenos a várias populações de células T, incluindo: células T CD4+ (MHC classe II), T CD8+ (MHC classe I), células T restritas ao CD1 (antígenos glicolipídicos) e células T $\gamma\delta$ . Essas células produzem a citocina efetora IFN- $\gamma$ , a qual, juntamente com TNF- $\alpha$ , ativa macrófagos a destruir o *M.tb* por meio de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio. Além disso, células T CD8+ podem matar o *M.tb* por intermédio da granulicina e das perforinas. Um novo subtipo de células T auxiliares, chamadas T<sub>H</sub>17, caracterizadas pela produção de interleucina-17 (IL-17), atuam como importantes moduladoras da inflamação e ativação da memória imunológica. As T<sub>H</sub>17 recrutam neutrófilos, monócitos e células T CD4+ produtoras de IFN- $\gamma$ , além de estimular a expressão de quimiocinas (DHEDA et al., 2010; RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006).

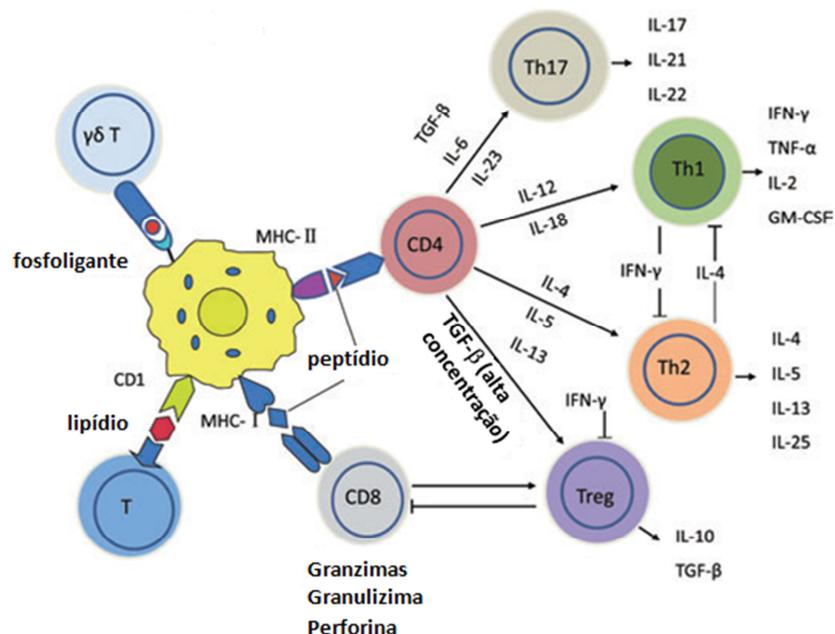
Embora a resposta T<sub>H</sub>1 ajude a conter a replicação e disseminação do *M.tb*, ela também pode causar significativos danos aos tecidos. Assim, as manifestações clínicas da TB são, em grande medida, determinadas por um delicado equilíbrio entre os efeitos protetores e imunopatológicos da resposta tipo T<sub>H</sub>1 (GUYOT-REVOL et al., 2006). Para tanto, o sistema imunológico dispõe de mecanismos regulatórios que suprimem as respostas efetoras contra antígenos persistentes, limitando os danos tissulares imunomediados (BELKAID et al., 2002).

Uma subpopulação de células TCD4+ efetivas na modulação da resposta imunológica são as células T regulatórias (T<sub>reg</sub>). Esse subtipo celular possui propriedades supressivas que inibem as funções efetoras das células T. No modelo murino, as T<sub>reg</sub> suprimiram respostas imunológicas a vários patógenos intracelulares e sua depleção *in vivo* esteve associada ao aumento dos danos aos tecidos (BELKAID; ROUSE, 2005). Em humanos, as T<sub>reg</sub> têm sido implicadas na hiporresponsividade imunológica em infecções crônicas (MILLS, 2004), tais como: citomegalovirus (AANDAHL et al., 2004), hepatite B (STOOP et al., 2005), hepatite C (CABRERA et al., 2004), HIV (AANDAHL et al., 2004) e *Helicobacter pylori* (LUNDGREN et al., 2003).

Na tuberculose, Guyot-Revol e colaboradores, 2006, detectaram que a frequência de T<sub>reg</sub> em portadores da forma pulmonar ativa foi três vezes maior que nos controles saudáveis, sugerindo que essas células exercem importante papel na imunomodulação da TB.

Assim, parece haver um complexo mecanismo de regulação cruzada entre as respostas das células  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$  e  $T_{reg}$  (figura 3), mas o preciso papel de cada um desses tipos celulares ainda permanece obscuro (DHEDA et al., 2010; RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006).

Figura 3 - Imunidade adaptativa ao *M.tb*.



Adaptada de Dheda et al., 2010.

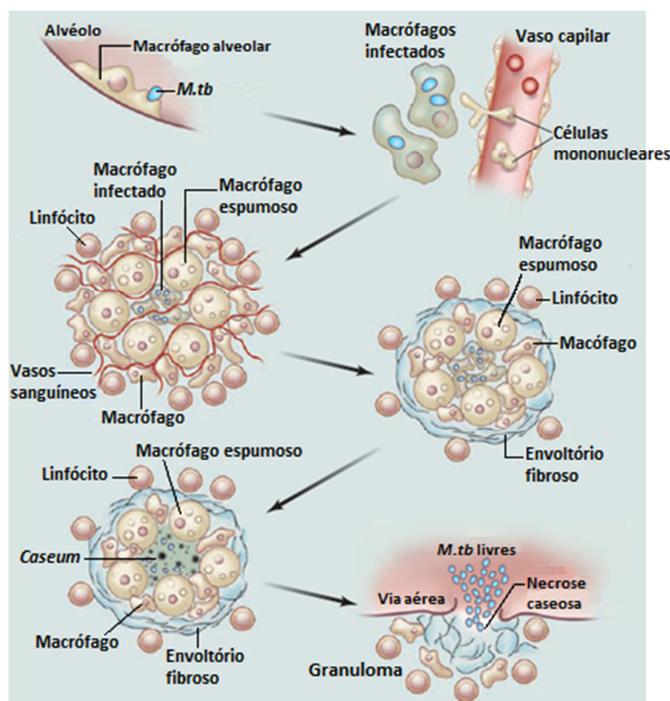
Os macrófagos e células dendríticas infectados secretam diversas citocinas (IL-12, IL-23, IL-7, IL-15 e TNF- $\alpha$ ) e apresentam antígenos para várias populações de células T, incluindo células T CD4 + (MHC de classe II), T CD8 + (MHC de classe I), células T restritas ao CD1 (antígenos glicolipídicos) e células T- $\gamma\delta$ . Essas células T produzem a citocina efetora IFN- $\gamma$ , a qual, juntamente com o TNF- $\alpha$ , ativa macrófagos, capacitando-os a destruir o *M.tb* por meio da produção de intermediários reativos de oxigênio e do nitrogênio. Além disso, linfócitos T citotóxicos (CD8+) também podem matar *M.tb* através das vias da granulizina e da perforina. Contudo, células  $T_H2$  produzem citocinas imunossupressoras, como a IL-4, e as células  $T_{reg}$  produzem IL-10 e TGF- $\beta$ , que podem suprimir mecanismos mycobactericidas. Outro subtipo de células  $T_H$ , as  $T_H17$ , diferenciadas na presença de IL-23 e caracterizadas pela síntese de IL-17, são importantes moduladoras da inflamação e da memória imunológica. As  $T_H17$  podem recrutar neutrófilos, monócitos, células T CD4+ produtoras de IFN- $\gamma$  e estimular a expressão de quimiocinas. O IFN- $\gamma$ , por sua vez, pode suprimir a produção de IL-17.

Na maioria dos indivíduos infectados pelo *M.tb*, os mecanismos imunológicos descritos acima são capazes de manter o bacilo sob controle, apesar de não eliminá-lo por completo. Essa condição assintomática, sem evidência clínica ou radiológica, mas com bacilos *M.tb* viáveis nos tecidos, é denominada tuberculose latente e não é transmissível.

Apenas uma pequena porcentagem (5% a 10%) dos portadores de ILTB evolui para a forma ativa da doença em algum momento de suas vidas. A progressão para a forma ativa é facilitada por diversas condições clínicas; infecção pelo HIV, diabetes melitus, tabagismo, desnutrição, terapia com inibidores do TNF- $\alpha$  e infecção por helmintos são exemplos de comorbidades que podem ocasionar desequilíbrio imunológico e promover a transição de infecção latente para doença ativa (DHEDA et al., 2010; LIN et al., 2009).

Na doença ativa (infecção primária ou reativação), a resposta pró-inflamatória estimula as células infectadas a invadir o tecido subjacente. Essa resposta também leva ao recrutamento de monócitos circulantes, bem como à extensiva neovascularização do local infectado (RUSSELL; BARRY; FLYNN, 2010). Tem início o processo de formação do granuloma (figura 4).

Figura 4. O ciclo de vida do *M.tb*.



Adaptado de (RUSSELL; BARRY; FLYNN, 2010).

A infecção tem início quando bacilos, presentes em aerossóis exalados, são inalados e fagocitados por macrófagos alveolares. A resultante resposta pró-inflamatória estimula a invasão do tecido subjacente pelas células infectadas. Essa resposta também leva ao recrutamento de monócitos, bem como à extensa neovascularização do local afetado. Os macrófagos diferenciam-se em células epitelióides, células gigantes multinucleadas e células espumosas repletas de gotículas lipídicas. O granuloma pode tornar-se mais estratificado pela formação de uma cápsula fibrosa, por fora da camada de macrófagos. Os linfócitos estão situados na região periférica. A maioria dos granulomas permanece neste estado de equilíbrio, mas a progressão à doença ativa é caracterizada por perda de vascularização e necrose com acúmulo de *caseum* na região central. Finalmente, bacilos são liberados nos espaços aéreos quando o granuloma colapsa.

### 1.6.1 Importância da Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que exerce diversas ações patofisiológicas em humanos (PAPANICOLAOU et al., 1998). Essa citocina tem despertado muito interesse no campo da endocrinologia, sendo considerada inclusive como “a mais endócrina de todas as citocinas” (PAPANICOLAOU, 2000).

Suas ações são exercidas por meio da ligação ao receptor específico (IL-6R) que, ao contrário da maioria dos receptores de outras citocinas, encontra-se ativo tanto ligado à membrana celular quanto na forma solúvel (KELLER; WANAGAT; ERSHLER, 1996).

Vários tipos celulares produzem IL-6: fagócitos mononucleares, fibroblastos, células endoteliais, linfócitos T e B, os quais são alguns exemplos. Embora tanto as células T<sub>H1</sub> quanto as T<sub>H2</sub> possam produzi-la, há uma predominância na produção de tal citocina pelas T<sub>H2</sub> (LADEL et al., 1997b).

A IL-6 é uma das citocinas que tem ação mais pronunciada em estimular a síntese de proteínas da fase aguda da inflamação, sobretudo a proteína C reativa, em resposta aos mais diversos estímulos (GABAY; KUSHNER, 1999). Consoante a essa função, está o fato de que os glicocorticoides inibem a produção de IL-6 (BREUNINGER et al., 1993).

São muitos os estudos que descrevem relevantes atuações da IL-6 na patogênese de uma grande lista de doenças. Diabetes (KRISTIANSEN; MANDRUP, 2005), aterosclerose (SCHIEFFER et al., 2004), depressão (DOWLATI et al., 2010), Alzheimer (SWARDFAGER et al., 2010), lupus eritematoso sistêmico (TACKEY; LIPSKY; ILLEI, 2004) e artrite reumatoide (NISHIMOTO, 2006) são exemplos de enfermidades nas quais a participação dessa citocina é decisiva.

Além disso, a IL-6 está diretamente envolvida com o processo de destruição óssea no câncer. Desta feita, seus níveis séricos, bem como os do seu receptor (na forma solúvel), têm grande potencial de uso como fator prognóstico para a tendência ao desenvolvimento de metástase em pacientes oncológicos (TAWARA; OXFORD; JORCYK, 2011).

Em função da ampla gama de atuações da IL-6 em processos patológicos tão distintos, tem crescido o interesse da indústria farmacêutica em desenvolver drogas anti-IL-6 para uso no tratamento de tais doenças. O primeiro desses agentes foi o tocilizumab, aprovado para uso na abordagem terapêutica da artrite reumatóide (SMOLEN; MAINI, 2006). Trata-se de um anticorpo monoclonal humanizado anti-IL-6R que impede a ligação da IL-6 ao seu receptor (VENKITESHWARAN, 2009).

Estudo anterior demonstrou que a IL-6 secretada por macrófagos infectados com *M.tb* inibe a resposta ao INF- $\gamma$  por parte dos macrófagos não infectados, adjacentes aos infectados. Esses resultados revelam uma nova função da IL-6 e indicam que essa citocina, secretada por macrófagos infectados por *M.tb*, pode contribuir com a inabilidade da resposta imunológica celular em erradicar a infecção (NAGABHUSHANAM et al., 2003). A IL-6 pode também ser prejudicial em infecções micobacterianas, visto que inibe a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (SCHINDLER et al., 1990).

Por outro lado, há estudos que sugerem um papel protetor para a IL-6 em relação ao *M.tb*: ratos com deficiência na produção de IL-6 demonstraram ser mais susceptíveis à infecção pelo *M.tb* (LADEL et al., 1997b), enquanto ratos depletados (*knockout*) para o gene da IL-6 apresentam uma reduzida produção de interferon- $\gamma$ . Sendo o IFN- $\gamma$  crucial na resposta protetora ao *M.tb*, é plausível que a IL-6 desempenhe um papel protetor nas infecções micobacterianas (SAUNDERS et al., 2000).

### 1.7 Polimorfismo gênico

Há muitos anos, tem-se suspeitado de que fatores hereditários estejam envolvidos na resistência / susceptibilidade à tuberculose (BELLAMY; HILL, 1998). Estudos genéticos realizados com gêmeos monozigóticos e dizigóticos têm demonstrado haver componentes com significativa herdabilidade nas variações observadas entre indivíduos quanto à sua resposta imunológica ao *M.tb* (COMSTOCK, 1978; JEPSON et al., 2001), assim como diferenças raciais na susceptibilidade à infecção pelo bacilo da TB (STEAD et al., 1990).

Embora as citocinas exibam um baixo grau de variação genética, um número crescente de estudos tem relacionado polimorfismos (localizados tanto nas regiões promotoras quanto nas codificadoras de genes de citocinas) como fatores do hospedeiro associados com susceptibilidade a doenças infecciosas (BIDWELL et al., 1999 ; KNIGHT, 2001). Mutações nesses genes podem resultar em distorções no processo de transcrição gênica, alterando os níveis de produção das citocinas (ESKDALE, et al., 1998; PRAVIKA et al., 1999; REES et al., 2002; RIVERA-CHAVEZ, et al., 2003).

Estudos têm investigado polimorfismos no gene da IL-6, a fim de verificar a existência de associações entre suas diferentes variantes alélicas e o decurso de doenças agudas e crônicas. O maior foco desses trabalhos tem sido um polimorfismo de nucleotídeo único (ou *single nucleotide polymorphism* - SNP) na posição -174. Esse SNP (G $\rightarrow$ C), ou seja,

troca de uma guanina por uma citosina, tem sido associado, por exemplo, a condições clínicas que variam desde artrite reumatóide juvenil e sepse grave à sensibilidade à insulina e espessamento da camada íntima da artéria carótida (FERNANDEZ-REAL et al., 2000; FISHMAN et al., 1998; RUNDEK et al., 2002; SCHLUTER et al., 2002).

Na literatura, são escassos os estudos relacionando polimorfismo gênico da IL-6 com tuberculose. Henao et al., 2006, em estudo realizado com população colombiana, demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos genótipos para a posição -174 do gene da IL-6, quando comparados o grupo controle (indivíduos saudáveis) com o grupo teste (pacientes com TB pulmonar). Amirzargar et al., 2006, estudando população iraniana, verificaram que a frequência do genótipo -174 G/G é significativamente mais elevada nos pacientes quando comparados aos controles. Esse trabalho também demonstrou que o alelo G esteve mais associado com elevada produção de IL-6. Por fim, Selvaraj et al., 2008, pesquisando população indiana, não encontraram diferença significativa, quer na frequência dos genótipos, quer nos níveis de IL-6 associados aos mesmos.

Estudo realizado em população cearense constatou que o genótipo -174 G/G é significativamente mais frequente nos pacientes de tuberculose (70,5%) que nos controles saudáveis (50,6%) (ROLIM, 2009).

### **1.8 Infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis***

A patogênese da infecção latente pelo *M.tb* (ILTB) é pouco conhecida. Até hoje, tal condição tem sido definida, somente, por um resultado positivo no teste tuberculínico (TT) em indivíduo exposto ao bacilo e que esteja assintomático e sem sinais clínicos e radiográficos de TB ativa. A relevância clínica da ILTB está no risco, pequeno, mas significativo, de progressão à doença ativa, mormente naqueles com sistema imunológico suprimido ou ainda imaturo (LALVANI, 2007).

Empregado mundialmente há mais de cem anos, o TT é barato, fácil de executar e não exige qualquer infraestrutura laboratorial (DUARTE, 2009). No entanto, uma notória desvantagem é que o reagente aplicado, o PPD (*purified protein derivative*) contém antígenos que também estão presentes em espécies não patogênicas do gênero *mycobacterium*, predispondo a resultados falsos – positivos (BARRY et al., 2009). Por fim, o método apresenta baixa especificidade, sobretudo quando aplicado em indivíduos previamente

imunizados com BCG, e reduzida sensibilidade nos co-infectados pelo HIV (DODD et al., 2010).

A despeito de suas limitações, o TT continua sendo útil. Uma vez identificada conversão ou viragem tuberculínica (aumento da enduração do TT  $\geq 10$  mm em relação a um TT realizado entre 2 semanas e 2 anos após TT anterior), tal achado é reconhecido como de bom valor diagnóstico (SBPT, 2009; STEAD, 1995). Infelizmente, a conversão costuma estar ausente em crianças e adultos infectados pelo HIV; indivíduos sob alto risco de desenvolver TB disseminada (PAI; ZWERLING; MENZIES, 2008).

Desde o final da década de 1980, tem-se desenvolvido uma nova geração de testes sanguíneos rápidos para o diagnóstico da ILTB, mais sensíveis que o centenário TT. Tais métodos, denominados coletivamente IGRAs (*Interferon- $\gamma$ -release assays*), baseiam-se na detecção do IFN- $\gamma$  liberado por células T de memória em resposta a antígenos específicos do *M.tb* (RICHELDI, 2006). Duas modalidades de IGRA têm sido utilizadas mundialmente: QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold test (*Cellestis, Carnegie, Australia*) e T-SPOT.TB test<sup>®</sup> (*Oxford Immunotec, Abingdon, UK*). A tabela 1 traz um comparativo entre os IGRAs e o TT.

Tabela1: Características do TT e dos IGRAs. Adaptada de Richeldi, 2006.

	IGRAs	TT
Antígenos	ESAT-6 e CFP-10	PPD (mais de 200 antígenos)
Controle interno positivo	Sim	Não
Uniformidade de métodos e reagentes	Sim	Não
Potencial para <i>efeito booster</i> * em testes repetidos	Não	Sim
Necessidade de retorno do paciente para leitura do resultado	Não	Sim
Tempo necessário para os resultados	16 – 24 horas	72 horas
Configuração do teste	In vitro	In vivo
Interpretação do teste	Objetiva (feita por instrumentos)	Subjetiva (baseada no operador)
Unidade de leitura	Unidades internacionais de IFN- $\gamma$ ou número de células-T produtoras de IFN- $\gamma$ .	Milímetros de enduração.

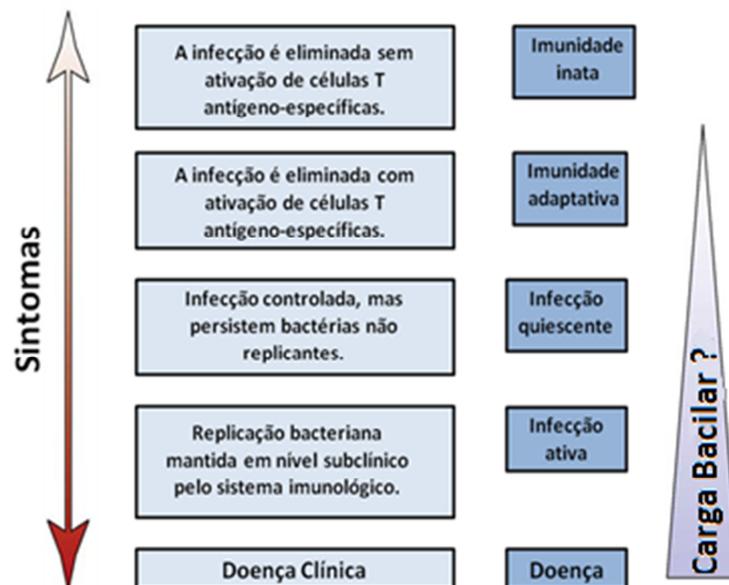
\* TT com enduração  $\geq 10$  mm que tenha aumento da enduração  $\geq 6$  mm em relação ao TT realizado 1-2 semanas antes.

Lamentavelmente, o TT e os IGRAs são incapazes de distinguir infecção latente de doença ativa. Um resultado positivo em qualquer desses testes, apenas indica uma sensibilização imunológica em virtude de uma exposição prévia do hospedeiro aos antígenos do *M.tb*. Ambos os métodos falham em confirmar a presença de bacilos viáveis (MACK et al., 2009; YOUNG; GIDEON; WILKINSON, 2009). Ademais, ainda não se sabe se o valor preditivo dos IGRAs é melhor que o do TT, nem quais são suas taxas de resultados falsos-negativos em indivíduos imunossuprimidos com ILTB, em alto risco de progressão para TB ativa (LALVANI; PARREK, 2010).

Nos últimos anos, tem sido proposta uma nova abordagem conceitual para a ILTB. A ideia é tratar o problema no contexto de um espectro de respostas do hospedeiro à presença do bacilo (figura 5). Esse modelo permite, por exemplo, direcionar o tratamento profilático da ILTB ao setor do espectro em que se encontram os indivíduos em maior risco de progressão à doença ativa; ao invés de recomendá-lo, indiscriminadamente, a mais de 1/3 da humanidade (BARRY et al., 2009).

A conduta terapêutica para ILTB mais utilizada no mundo, ao longo dos últimos 50 anos, tem sido a administração diária de isoniazida (INH) por um período de seis a nove meses. Esse regime, quando corretamente empregado, apresenta taxa de sucesso superior a 90%. Contudo, a INH está associada a sérios efeitos adversos, inclusive hepatotoxicidade. Além disso, os custos da distribuição, em larga escala, desse medicamento são bastante elevados (LOBUE; MENZIES, 2010). Tais fatos ratificam a “teoria do espectro”.

**Figura 5 - O espectro de respostas à infecção tuberculosa:**



Adaptada de (YOUNG, D.B.; GIDEON, H.P.; WILKINSON, R.J., 2009).

O controle da tuberculose reside, portanto, na pronta identificação e tratamento profilático dos indivíduos saudáveis infectados pelo *M.tb* e que estejam sob risco iminente de progressão à TB ativa (MACK et al., 2009).

A quebra da cadeia de transmissão da TB passa, necessariamente, por uma melhor compreensão da imunopatogênese da infecção latente. Levando-se em conta o fato de ainda não haver, sequer, um teste diagnóstico considerado padrão-ouro para ILTB, justifica-se a premência pela realização de mais estudos nessa área.

## 2 JUSTIFICATIVA

A IL-6 é uma importante citocina que, certamente, exerce um papel fundamental na patogênese da TB. Porém, seu exato mecanismo de ação nesse processo ainda carece de melhores esclarecimentos. Sabe-se que, na doença ativa, os níveis séricos dessa citocina encontram-se muito aumentados quando comparados aos de indivíduos saudáveis. Estudos tentando estabelecer associação entre o polimorfismo -174G→C do gene da IL-6 com o seu nível de produção na tuberculose (doença ativa) obtiveram resultados conflitantes. Desconhece-se a existência, na literatura científica, de trabalhos que tenham estudado o perfil de produção de IL-6 no cenário da ILTB. Sabendo-se que a tuberculose apresenta uma ampla gama espectral de manifestações clínicas, desde casos em que a enfermidade é prontamente contida pela imunidade inata, até manifestações graves com ampla destruição tissular, é imperativa a realização de pesquisas de funcionalidade do supracitado polimorfismo, em indivíduos que sabidamente albergam o bacilo, mas sem apresentar sinais ou sintomas da doença. Desse modo, poder-se-ia ter uma compreensão mais abrangente do papel da IL-6 na tuberculose, podendo-se inferir, por exemplo, se a exposição continuada a uma diminuta carga bacilar é capaz de manter, de forma sustentada, uma produção contínua da citocina. É nesse contexto, portanto, que se justifica a realização do presente trabalho.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar o nível de produção sistêmica de IL-6 e aferir o papel funcional do polimorfismo -174 G→C do gene dessa citocina em indivíduos diagnosticados como portadores de ILTB.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- I- Dosar as concentrações séricas de IL-6 em indivíduos portadores de ILTB e comparar os resultados com os de pacientes de TB pulmonar ativa e pessoas saudáveis;
- II- Tipificar o polimorfismo -174G→C do gene da IL-6 em indivíduos com ILTB e comparar os resultados com os dos dois grupos-controle mencionados acima;
- III- Relacionar a produção sistêmica de IL-6 em portadores de ILTB e grupos de comparação (TB e saudáveis) com os genótipos -174G→C de IL-6, a fim de realizar estudo funcional desse polimorfismo.

## 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1 Seleção dos sujeitos da pesquisa

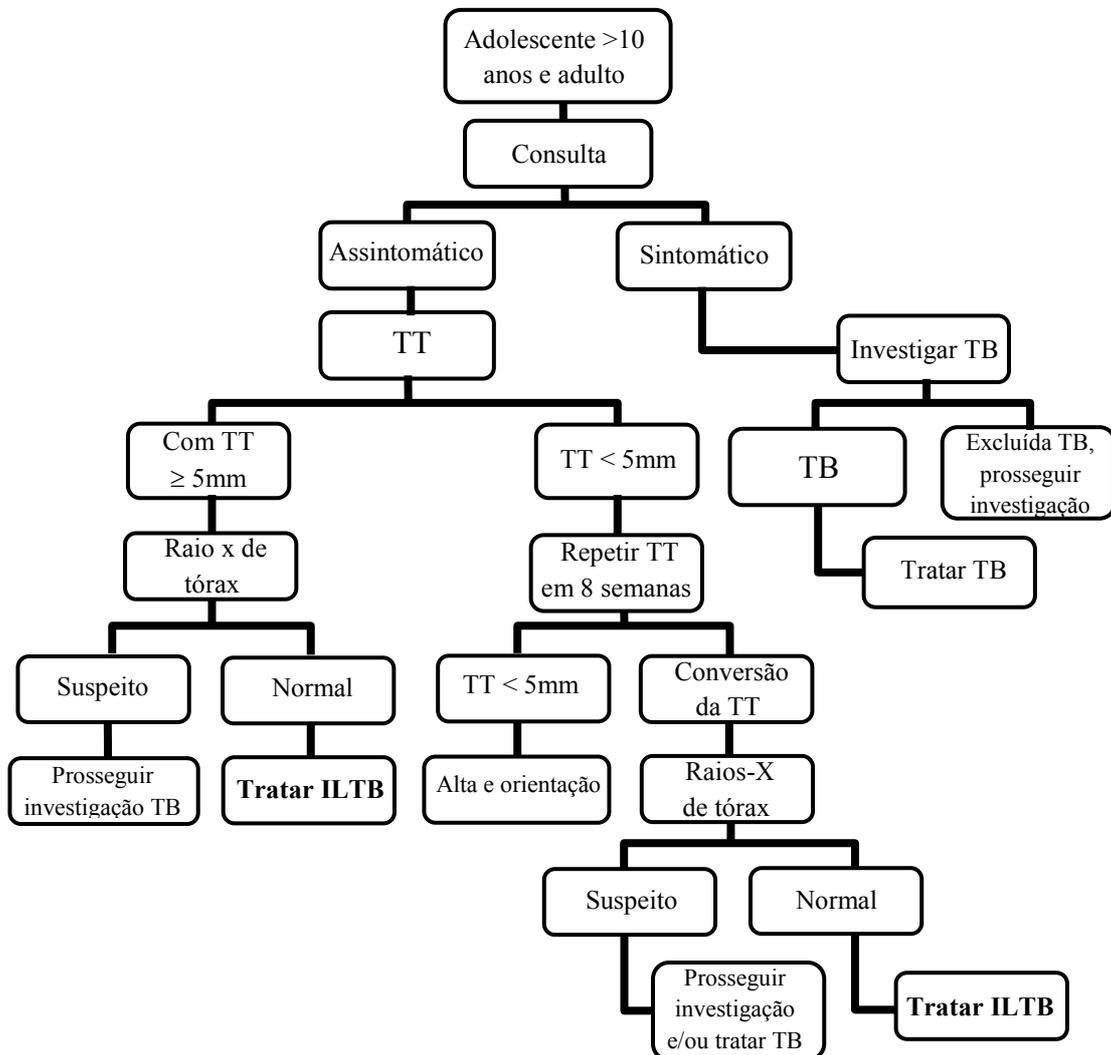
O presente trabalho trata-se de um estudo transversal. Os sujeitos da pesquisa são contactantes de pacientes portadores de tuberculose pulmonar ativa (diagnosticada por exame clínico, radiografia pulmonar e baciloscopia), atendidos nos ambulatórios do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) e Centro de Saúde da Família Anastácio Magalhães (CSFAM).

A definição de contactante, que adotamos para o estudo, é a preconizada pelo Ministério da Saúde - MS (2010, p.83),

Toda pessoa que convive no mesmo ambiente com o caso-índice (todo paciente com TB pulmonar ativa, prioritariamente com baciloscopia positiva) no momento do diagnóstico da TB. Esse convívio pode se dar em casa e/ou em ambientes de trabalho, instituições de longa permanência, escola ou pré-escola. A avaliação do grau de exposição do contato deve ser individualizada considerando-se a forma da doença, o ambiente e o tempo de exposição.

A abordagem diagnóstica por nós utilizada a fim de identificarmos, dentre os contactantes, aqueles portadores de ILTB tem, por base, fluxograma recomendado pelo Ministério da Saúde (figura 6).

**Figura 6** - Fluxograma para investigação de contatos adultos e adolescentes (>10 anos).



Fonte: Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. MS, 2010.

#### 4.2 Seleção dos controles

Integram o grupo controle participantes de estudo prévio realizado no Laboratório de Imunologia do DPML (CORREIA, 2009a). O mesmo foi estratificado em dois subgrupos: a) 63 doadores voluntários de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), sem relato prévio de tuberculose ou de contato com portadores de tuberculose ou hanseníase; b) 38 pacientes com tuberculose pulmonar ativa, confirmada por cultura de escarro positiva.

### 4.3 Critérios de inclusão

- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (pelo sujeito da pesquisa ou responsável);
- Ser portador de ILTB, conforme definido pelo fluxograma do MS;
- Idade igual ou superior a 15 anos.

### 4.4 Critérios de exclusão

- Recusa em assinar o TCLE;
- Não enquadramento nos critérios diagnósticos para ILTB;
- HIV-positivos;
- Gestantes;
- Idade inferior a 15 anos.

### 4.5 Colheita de sangue

A colheita do sangue foi realizada no período de 9 de junho de 2011 a 20 de janeiro de 2012 e deu-se no ambulatório da unidade de saúde onde o caso-índice (paciente com tuberculose pulmonar ativa) do respectivo contactante foi atendido (HSJ, HUWC ou CSFAM), sendo as amostras transportadas imediatamente para o Laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, onde foram processadas de acordo com os protocolos descritos abaixo.

Foi realizada coleta de amostra de sangue (4mL) por punção venosa em tubos com EDTA, para a análise do polimorfismo genético, e tubos (5mL), sem anticoagulante, a fim de se obter o soro para a dosagem da IL-6. As amostras colhidas em tubos sem EDTA foram centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 RPM. O soro obtido foi transferido para tubos eppendorf e armazenados a -20°C até o descongelamento para a dosagem de IL-6 pelo teste de ELISA.

## 4.6 Purificação do DNA

Para purificação do DNA, foi utilizado o kit GFX Genomic Blood DNA Purification, da GE Healthcare. O protocolo seguiu rigorosamente as instruções contidas no manual que acompanha o kit, sendo o procedimento realizado em quatro etapas subsequentes (extração, ligação do DNA, lavagem e eluição), conforme descrição abaixo:

### I Extração:

1. Foram adicionados 500µl da solução de extração em um tubo de microcentrífuga de 1,5mL.
2. Adicionaram-se 100µL de sangue total a 500µL da solução de extração, misturando imediatamente em vórtex.
3. Incubou-se a mistura extraída por 5min em temperatura ambiente.
  - 3.1 Durante a incubação, foi colocada uma coluna GFX em um tubo de coleta de 2mL para cada purificação.

**Nota:** A água para eluição foi pré-aquecida a 70°C.

### II Ligação do DNA:

4. A mistura extraída foi transferida para coluna GFX.
  - 4.1 Centrifugou-se a mistura a 8.000 RPM por 1 min.
5. O conteúdo do tubo coletor foi descartado. A coluna GFX foi recolocada no mesmo tubo.

### III Lavagem:

6. Foram adicionados 500µL da solução de extração à coluna, centrifugando-se em seguida a mistura a 8.000 RPM por 1 min.
7. O conteúdo do tubo coletor foi descartado. A coluna GFX foi recolocada no mesmo tubo.
8. Adicionaram-se 500µL da solução de lavagem à coluna, e centrifugou-se em velocidade máxima (12.000 a 16.000 RPM) por 3min.
9. O tubo de coleta foi descartado, e a coluna GFX transferida para um tubo novo de microcentrífuga de 1,5mL.

#### IV Eluição:

10. Aplicaram-se 100µL da água de eluição pré-aquecida diretamente na matriz de fibra de vidro da coluna GFX.
11. Incubou-se à temperatura ambiente por 1 minuto.
12. Centrifugou-se a mistura a 8.000 RPM por 1 minuto para recuperar o DNA purificado.

**Nota:** o volume recuperado foi de 80% a 100% do volume da água de eluição aplicada à coluna.

#### **4.7 Tipificação do polimorfismo -174G→C do gene da interleucina-6**

O polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNPs) -174G→C do gene de IL-6 foi tipificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase, utilizando-se iniciadores de sequência específica (PCR-SSP) (One-Lambda).

O material utilizado na tipificação das amostras (água miliQ, tubos com D-Mix, placas e amostras de DNA) foi levado à temperatura ambiente, exceto a enzima Taq polimerase (Invitrogen), mantida sob congelamento até seu uso. Em seguida, identificaram-se, com a numeração da respectiva amostra, os tubos com D-Mix e a placa de tipificação (kits Cytgen, One-Lambda), adicionando-se 1µL de água MiliQ ao poço de controle negativo da placa. Foi adicionado 1µL de Taq polimerase (5U/µL) a cada tubo com D-Mix, fechando-se e agitando-se em vortex por 5 segundos, pipetando-se logo após 9µL da mistura D-Mix + Taq polimerase ao poço de controle negativo. Após homogeneização das amostras de DNA em vórtex, adicionaram-se 19µL da amostra ao tubo com D-Mix + Taq polimerase, fechando-os e agitando-os em vórtex por 5 segundos. Nesse momento, foram aliqüotados 10µL da solução de DNA-Taq polimerase-D-Mix para cada um dos 15 poços restantes da placa contendo os iniciadores sequência-específica; vale ressaltar que o kit supracitado não fornece a sequência das bases nitrogenadas dos iniciadores. A placa foi levada ao termociclador “Gene Amp PCR System 9700” (Applied Biosystems) e o DNA amplificado por intermédio da (PCR-SSP), usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 96°C por 130 segundos, 63°C por 60 segundos, seguido por 9 ciclos de 96°C por 10 segundos, 63°C por 60 segundos e 20 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 59°C por 50 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e logo após 4°C antes do uso.

#### **4.8 Análise dos fragmentos de DNA em gel de agarose**

Em uma balança analítica foram pesados 0,75 gramas de agarose a 1,5% (Invitrogen), acrescentando-se em um Erlenmeyer 50 mL de tampão TBE 1X. Utilizou-se uma manta térmica para completa dissolução da mistura, que foi colocada em uma fôrma apropriada com pentes que demarcaram os poços no gel. A análise do produto de amplificação foi feita após eletroforese, utilizando-se corrente elétrica de 150V, 400mA por 8 minutos (Electrophoresis Power Supply EPS 600 – Pharmacia Biotech), o qual foi visualizado em transiluminador de luz UV(GE Healthcare) a 304nm, após adição de brometo de etídio na concentração final de 0,5µg/mL ao gel. Em seguida, o gel foi fotografado para documentação, sendo tipificado o polimorfismo -174G→C do gene da IL-6.

#### **4.9 Dosagem da interleucina-6**

A dosagem de IL-6 foi realizada utilizando o teste de ELISA sanduíche conforme orientações da Invitrogen Corporation (Frederick – Maryland, USA), fornecedora do kit. Cada placa contém 96 poços, o suficiente para dosar até 88 amostras, sendo que 8 poços são usados para testar amostras padronizadas com concentrações conhecidas da interleucina e traçar uma curva-padrão. Para as dosagens das amostras, foram adicionados 100µL do tampão de diluição fornecido pelo kit ao poço zero da placa, seguida da adição de 50µL de solução biotilada anti-IL-6Hu a todos os poços, exceto o poço zero. Em seguida, adicionaram-se a cada poço 100µL de cada amostra do soro a ser testada. A placa foi coberta e incubada por duas horas em temperatura ambiente. A solução contida nos poços foi aspirada, e os mesmos lavados por quatro vezes.

Após as lavagens foram adicionados a cada poço (exceto o zero) 100µL de solução contendo estreptavidina-HRP fornecida pelo kit. A placa foi coberta e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Seguiram-se mais quatro lavagens. Nesse momento foram adicionados, a cada poço, 100µL de solução contendo o cromógeno estabilizado, tornando azul a cor da solução. Novamente, a placa foi incubada no escuro por 30 minutos e, por fim, adicionados 100µL de solução de parada da reação, fornecida pelo kit, seguindo-se suave agitação da placa, que foi então levada ao espectrofotômetro para leitura a 450nm. Os resultados obtidos com as amostras padronizadas foram colocados em um gráfico, sendo traçada uma curva-padrão de concentrações de IL-6 (figura 8), e os resultados obtidos com as amostras testadas foram interpretados em função dessa curva.

#### **4.10 Análise estatística**

Foi utilizado o teste de Fisher bicaudal para as comparações entre as frequências genotípicas e alélicas, enquanto os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados para comparar as concentrações séricas de IL-6. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para determinar a normalidade das amostras testadas. O nível de significância estatística foi estabelecido quando  $p$  for menor do que 0,05. O programa utilizado para os cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism versão 5.0.

#### **4.11 Considerações éticas**

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do HUWC (Protocolo nº 125.12.10) e do HSJ (Protocolo nº 032/2011) – (anexos 2 e 3). Todos os sujeitos da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (apêndice 1). Os controles assinaram o TCLE para voluntário doador de sangue do HEMOCE, estando em conformidade com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Dados demográficos:

A amostra de indivíduos selecionados para este estudo foi composta por 20 contactantes de pacientes com TB pulmonar ativa, sendo três do sexo masculino (15%) e 17 do feminino (85%). Desse grupo, cinco foram excluídos (um deles por não ter realizado o TT, dois por não comparecimento para leitura do TT, um por não conversão do segundo TT e o último por não realização do segundo TT), conforme apresentado no quadro 1 (apêndice 1). Os demais 15 indivíduos contactantes (apêndice 2) compuseram o grupo teste por terem diagnóstico confirmado de ILTB (3 masculinos e 12 femininos). A mediana de idade desse grupo foi de 43 anos (15 – 81 anos). Para compor os grupos de comparação, utilizou-se um total de 101 amostras de sangue (38 procedentes de portadores de TB pulmonar ativa e 63 oriundas de doadores saudáveis). O subgrupo TB foi composto por 25(65,8%) indivíduos do sexo masculino e 13(34,2%) do feminino. Já o subgrupo de voluntários saudáveis consistiu de 51(81%) do sexo masculino e 12(19%) do feminino. Estes dados estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 – Características demográficas dos indivíduos com infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ILTB) e dos grupos de comparação (TB e indivíduos saudáveis).

Características demográficas	ILTB (n = 15)	Grupos de comparação	
		TB (n = 38)	Saudáveis (n = 63)
<b>Sexo (%)</b>			
<b>Masculino</b>	03 (20)	25 (65,8)	51 (81)
<b>Feminino</b>	12 (80)	13 (34,2)	12 (19)
<b>Idade em mediana (mín-max)</b>	45 (15-81)	44 (20-70)	26 (19-50)

## 5.2 Objetivo específico I

O ensaio para avaliação das concentrações séricas da IL-6 resultou em curva-padrão que está demonstrada na figura 7. A mediana dos níveis séricos de IL-6 do grupo teste (ILTB) foi de 1,7 pg/mL (0,96 – 4,8 pg/mL). Quanto aos grupos de comparação, as medianas de concentração de IL-6 foram de 4,3 pg/mL (0 – 12 pg/mL) e 0,5 pg/mL (0 – 2,8 pg/mL), respectivamente, para os subgrupos TB e saudáveis. Foi constatada significância estatística ( $p < 0,0001$ ) quando comparados os três grupos entre si. Estes dados estão demonstrados na figura 8.

**Figura 7** – Curva-padrão de dosagem de IL-6 realizada no Laboratório de Imunologia. Leitura realizada a 450nm.

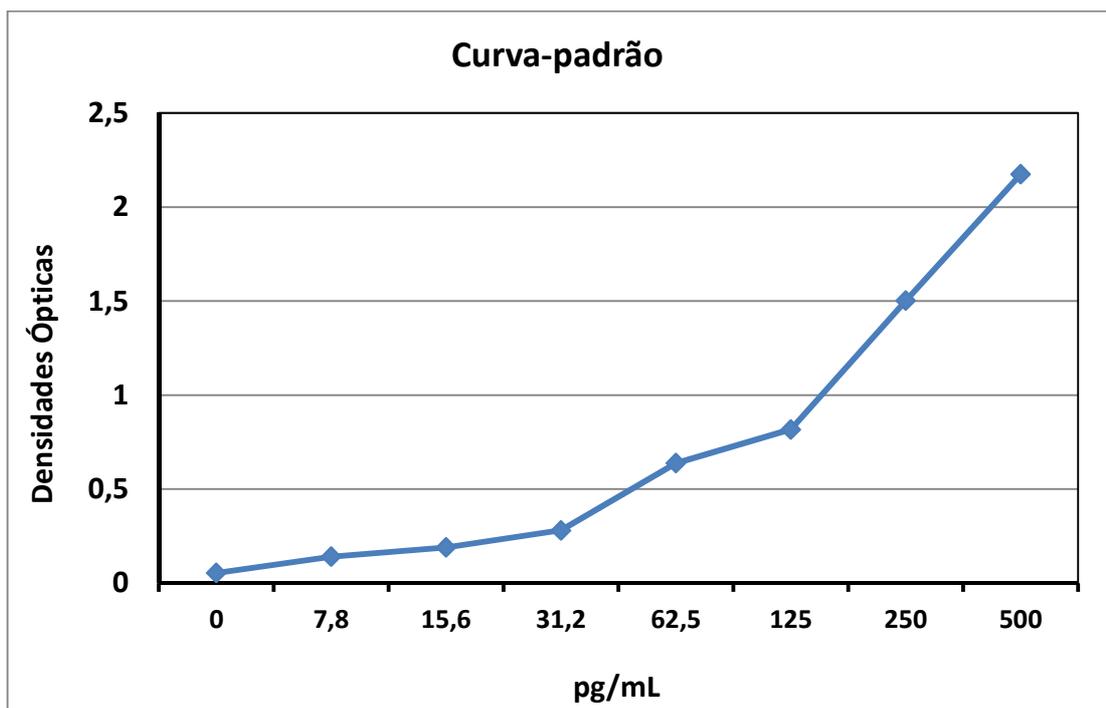


Figura do autor, confeccionada com o software Microsoft Office Excel® 2010.

**Figura 8** - Concentrações séricas (em picogramas por mL) de IL-6 dos grupos teste (ILTB) e de comparação (TB e saudáveis). As concentrações estão representadas em medianas ( $p < 0,0001$ ).

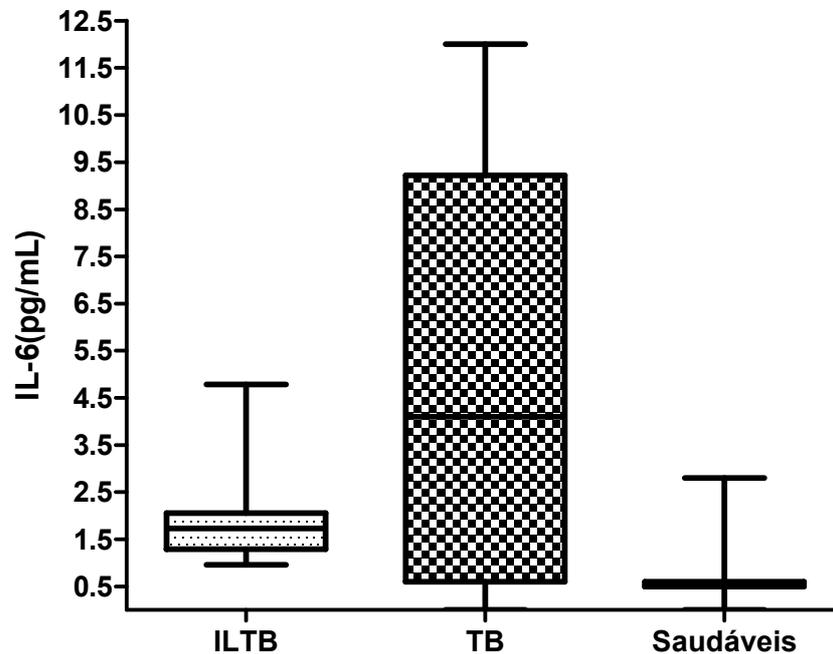
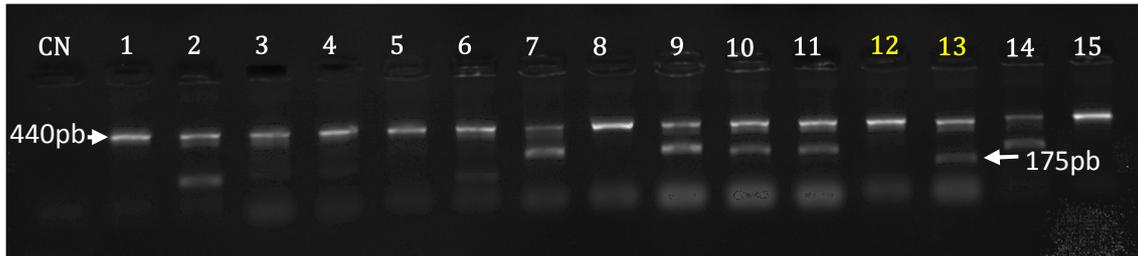


Figura do autor. O software utilizado na confecção do gráfico foi o GraphPad Prism® 5.0.

### 5.3 Objetivo específico II

O estudo do polimorfismo do gene de IL-6 na posição -174 foi realizado em todos os indivíduos do grupo teste (ILTB), em 17 dos 38 integrantes do subgrupo TB e em 43 dos 63 membros do subgrupo saudável. Fez-se a interpretação das fotografias dos géis obtidos (figura 9), tomando-se como referência a planilha fornecida pelo kit (anexo 1). Os resultados estão apresentados na tabela 3. Para o grupo ILTB ( $n = 15$ ) as frequências dos genótipos GG e GC foram de, respectivamente: 12 (80%) e 3 (20%). O genótipo CC não foi detectado. Quanto aos controles, o subgrupo TB ( $n = 17$ ) obteve, para os genótipos GG, GC e CC, respectivamente, as seguintes frequências genotípicas: 10 (58,9%); 6 (35,2%) e 1 (5,9%). Por fim, para o subgrupo de indivíduos saudáveis ( $n = 43$ ), as frequências de GG, GC e CC foram, respectivamente, 27 (62,8%); 14 (32,6%) e 2 (4,6%).

**Figura 9-** Gel de agarose mostrando bandas de amplificação dos polimorfismos gênicos de citocinas.

CN = Controle Negativo.

Foto do autor. As bandas referentes ao polimorfismo -174G→C de IL-6 estão nos poços 12 (-174C) e 13 (-174G). Nesta foto, o poço 12 mostra apenas a banda positiva do controle interno [ $\beta$  – globina (440pb)]; o poço 13, além da banda da  $\beta$ -globina, também mostra banda positiva do alelo -174G (seta à direita). Portanto, esse indivíduo apresenta genótipo GG.

Tabela 3 – Distribuição dos polimorfismos de genótipos -174G→C de IL-6 em indivíduos com infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* e em grupos de comparação (tuberculose e indivíduos saudáveis).

	<b>ILTB (n = 15)</b>	<b>TB (n = 17)</b>	<b>Saudáveis (n = 43)</b>	<b>Valores de p*</b>
<b>G/G</b>	12 (80%)	10 (58,9%)	27 (62,8%)	>0,05
<b>G/C</b>	3 (20%)	6 (35,2%)	14 (32,6%)	>0,05
<b>C/C</b>	0 (0%)	1 (5,9%)	2 (4,6%)	>0,05

\*Para cálculo dos valores de p foi utilizado o teste de Fisher bicaudal. Comparações entre os grupos ILTB e TB; ILTB e Saudáveis.

Quanto às frequências dos alelos para o polimorfismo -174G→C do gene de IL-6, houve predomínio do alelo -174G nos grupos ILTB (90%), TB (76,5%) e saudáveis (79,1%). Os resultados encontram-se descritos na tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos -174G→C de IL-6 em indivíduos com infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* e em grupos de comparação (tuberculose e indivíduos saudáveis).

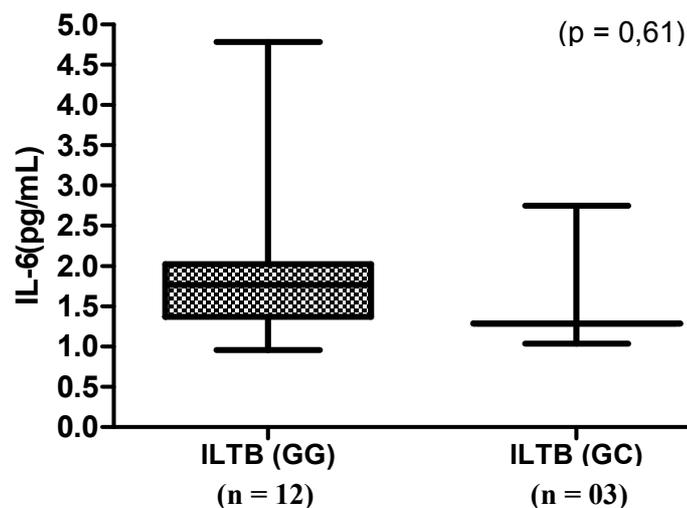
	<b>ILTB (n = 15)</b>	<b>TB (n = 17)</b>	<b>Saudáveis (n=43)</b>	<b>Valores de p*</b>
<b>G</b>	27 (90%)	26 (76,5%)	68 (79,1%)	>0,05
<b>C</b>	3 (10%)	8 (23,5%)	18 (20,9%)	>0,05

\*Para cálculo dos valores de p foi utilizado o teste de Fisher bicaudal. Comparações entre os grupos ILTB e TB; ILTB e Saudáveis.

### 5.4 Objetivo específico III

Para o estudo funcional do polimorfismo de IL-6 na ILTB foi feita uma análise associativa entre a distribuição dos genótipos de IL-6 -174G→C e os níveis séricos de IL-6 (expressos em medianas). Os indivíduos ILTB portadores do genótipo G (n = 12) apresentaram mediana de concentração de IL-6 igual a 1,76 pg/mL (0,96 – 4,78 pg/mL); para os portadores do genótipo GC (n = 3), tais valores foram: 1,29 pg/mL (1,03 – 2,75 pg/mL). Estas informações encontram-se representadas no gráfico da figura 10 (p = 0,61).

**Figura 10** - Níveis séricos de IL-6 em indivíduos do grupo ILTB em função dos genótipos -174G→C de IL-6.



O software utilizado na confecção da figura 10 foi o GraphPad Prism® 5.0.

A tabela 5 mostra os dados demográficos, a distribuição dos genótipos de IL-6 -174G→C e os níveis séricos de IL-6 para o grupo teste (ILTB) e grupos de comparação. Considerando que a frequência do genótipo CC é muito baixa, tanto na população em geral quanto nos grupos analisados neste estudo, decidiu-se por organizar a tabela da seguinte forma: genótipo 1 = GG; genótipo 2 = GC / CC.

Tabela 5: Dados demográficos, genótipos -174G→C de IL-6 e níveis séricos de IL-6 nos grupos teste (ILTB) e de comparação (TB e SAUDÁVEIS).

	<b>Genótipo de IL-6 -174G→C</b>		
	<b>Genótipo 1</b>	<b>Genótipo 2</b>	<b>p</b>
<b>ILTB</b>			
<b>N</b>	12	3	
<b>Idade em mediana</b>	46	18	>0,10
<b>Níveis de IL-6 em mediana (pg/mL)</b>	1,76	1,29	0,61
<b>TB</b>			
<b>N</b>	10	7	
<b>Idade em mediana</b>	51	51	>0,05
<b>Níveis de IL-6 em mediana (pg/mL)</b>	4,1	0,6	0,04
<b>SAUDÁVEIS</b>			
<b>N</b>	27	16	
<b>Idade em mediana</b>	26	25	>0,05
<b>Níveis de IL-6 em mediana (pg/mL)</b>	0,6	0,6	>0,05

Genótipo 1 = GG; Genótipo 2 = GC / CC.

## 6 DISCUSSÃO

O objetivo geral deste estudo foi investigar o nível de produção de IL-6 e aferir o papel funcional do polimorfismo -174 G→C do gene dessa citocina em indivíduos diagnosticados como portadores de ILTB e em controles, tanto com a doença ativa quanto em não infectados.

O primeiro grande desafio encontrado foi estabelecer, de forma clara e adequada, qual seria o critério definidor do diagnóstico de ILTB. A opção foi pelo modelo adotado pelo Ministério da Saúde, por estar validado pela opinião de vários especialistas em tuberculose. No entanto, é reconhecida a ausência de ensaios clínicos com randomização que tenham validado esses critérios. A ausência de tais ensaios dá-se pela imensa dificuldade em se trabalhar com infecção latente. Isto ficou muito claro também neste estudo. Dessa forma, nosso padrão-ouro para o diagnóstico de ILTB foi definido pela detecção, no indivíduo contactante de pacientes com TB ativa, de TT reator ou incremento de, pelo menos, 10 mm na leitura do 2º TT, em relação ao primeiro, realizado oito semanas antes. Além disso, o indivíduo deveria ter sido submetido a uma avaliação clínica por especialista treinado, sendo excluído o diagnóstico de TB, assim como ter raios X de tórax sem evidências de doença ativa.

Estes critérios adotados são rigorosos e limitaram o número de amostras estudadas. É importante ressaltar que o contactante de pacientes com TB, de modo geral, não comparece para avaliação médica e, frequentemente, as equipes de saúde, por exemplo equipes de saúde da família nas unidades de atenção básica, não conseguem visitar este contactante. Dessa forma, estas pessoas deixam de passar por avaliação fundamental ao controle da disseminação da TB. Além disso, foi observada também uma grande dificuldade para convencer estas pessoas a se submeterem ao teste tuberculínico, sobretudo pela necessidade de retorno para leitura do resultado.

Em um momento anterior, o mesmo grupo de pesquisa havia realizado estudo comparando as dosagens séricas de IL-6 de pacientes com tuberculose pulmonar ativa com aquelas de indivíduos saudáveis, doadores de sangue. Os dados encontrados revelaram níveis séricos de IL-6, cerca de oito vezes maiores em indivíduos com TB (CORREIA et al., 2009b). Esses dados reforçaram o envolvimento da IL-6 na resposta imunológica ao *M.tb*. Ademais, também apontavam para a necessidade de se estudar a participação da IL-6 na resposta imunológica de indivíduos com infecção latente, sendo esta a motivação principal para o presente estudo.

É consenso no meio científico que a IL-6 exerce importantes funções nos mecanismos de defesa imunológica contra o *M.tb*. Há evidências de uma contribuição protetora para essa citocina, pois animais depletados ou deficientes de IL-6 são mais susceptíveis à infecção pelo *M.tb* (LADEL et al., 1997b; SAUNDERS et al., 2000). Por outro lado, macrófagos infectados com *M.tb* produzem menos INF- $\gamma$ , podendo contribuir para a inabilidade do sistema imunológico em erradicar a infecção (SCHINDLER et al., 1990).

Como se pode perceber a partir da leitura do parágrafo anterior, a exata contribuição da IL-6 na imunologia da TB ainda é assunto nebuloso e que carece de melhor compreensão. Para tanto, são necessários mais estudos clínicos, tanto no que diz respeito à TB doença quanto à infecção latente, motivação maior desta pesquisa.

O presente estudo comparou, inicialmente, as dosagens séricas de IL-6 nos três grupos em análise. Para o grupo ILTB (n = 15), a concentração dessa citocina foi 3,4 vezes maior que aquela do grupo saudável (n = 63) e 2,5 vezes menor que a do grupo de portadores de TB ativa (n = 38). Tais resultados apontam fortemente para o fato de que a IL-6 deve desempenhar papel importante na manutenção do estado de latência. Considerando que o estímulo antigênico para a produção da citocina seja a infecção pelo *M.tb* e levando-se em conta os dados acima descritos, é plausível que a produção de IL-6 seja diretamente proporcional à carga bacilar. Além disso, pode-se considerar que a evolução do processo infeccioso é acompanhada pelo aumento dos níveis séricos da IL-6. Considerando que esta citocina é um potente indutor de produção sistêmica de proteína C-reativa e que este marcador tem uso clínico rotineiro, de baixo custo e fácil acesso, também se pode sugerir que os níveis séricos de proteína C-reativa possam reproduzir a evolução da infecção em seu espectro do estado latente para doença e, eventualmente, ter algum uso clínico adicional na avaliação destes indivíduos.

O segundo objetivo deste estudo foi avaliar as frequências genotípicas -174G→C em indivíduos com ILTB e comparar com aquelas encontradas em portadores de TB ativa e nos saudáveis. Em estudo anterior, um aumento da frequência do alelo G foi descrito em população com TB ativa no estado do Ceará, acompanhada de redução na frequência do alelo C, comparado com controles saudáveis da mesma região. Outros estudos, com amostras de pacientes oriundos de países com baixo grau de desenvolvimento, mostraram ausência de associações entre as frequências destes alelos com o risco de desenvolvimento de TB (AMIRZARGAR et al. 2006; HENAO et al. 2006). Com relação às distribuições genotípicas, estudo iraniano mostrou aumento da frequência do genótipo G/G na TB (AMIRZARGAR et al. 2006). Quando foi avaliada a distribuição genotípica em ILTB, não foram observadas

diferenças entre as amostras. Nenhum dos estudos anteriores avaliou esta população específica.

Outro objetivo do estudo é relacionado a uma questão que circula frequentemente entre os grupos que estudam imunogenética e trabalham com expressão de genes envolvidos com produção de citocinas: seriam estes polimorfismos funcionais? Um estudo de Taudorf et al., (2008) demonstrou que os polimorfismos de genes de citocinas comumente estudadas, em ensaio *in vivo* utilizando como estímulo antigênico endotoxina de *Escherichia coli*, não eram funcionais, ou seja, a produção de citocinas não sofria interferência dos genótipos estudados. Este estudo incluiu o polimorfismo -174 G→C de IL-6. Apesar de ter estudado um número grande de amostras, o grupo de Taudorf utilizou antígenos bacterianos para estimular a produção das citocinas, e seus dados foram contrários aos descritos por vários outros autores que estudaram a influência desses polimorfismos em pacientes com infecção ativa, doença. Dois estudos com esse modelo são importantes porque avaliaram pacientes com TB ativa. Em iranianos, Amirzargar et al. (2006) encontraram associação entre o alelo mais frequente -174 G com maior produção de IL-6, tendo sido o genótipo G/G o com maior distribuição entre os casos. Por outro lado, Selvaraj et al. (2008) não reproduziram esses dados quando estudaram indianos. Assim, os dados relacionados à funcionalidade do polimorfismo -174G→C de IL-6 ainda são controversos.

Em recente pesquisa com população portadora de TB pulmonar ativa (n = 17), concluiu-se que o supracitado polimorfismo de IL-6 é funcional. Na ocasião, encontrou-se uma concentração sérica da citocina 6,8 vezes maior nos indivíduos com genótipo GG em relação aos demais genótipos, sendo o alelo G considerado hiperprodutor de IL-6 (CORREIA et al., 2009a).

No presente estudo, feita a mesma análise em portadores de ILTB (n = 15), concluiu-se que o referido polimorfismo não é funcional, visto que a diferença entre as concentrações séricas de IL-6 nos portadores do genótipo GG (1,76 pg/mL) e GC (1,29 pg/mL) não foi estatisticamente significativa (p = 0,61). O genótipo CC não foi detectado nessa população. É necessário assumir que o número de amostras estudadas limitou as conclusões para os dois estudos. Como a expressão do alelo C é bem reduzida em relação ao G, um número bem maior de amostras deveria ser analisado. De toda forma, os dados ainda permitem mostrar um aspecto funcional que surgiu com a avaliação do genótipo G/G em pacientes com TB pulmonar ativa, mas não na ILTB. Do ponto de vista imunológico é razoável pensar que diante de um estímulo continuado e intenso, como ocorre na TB ativa, este polimorfismo

realmente tenha um impacto sobre a produção da citocina, o que parece não ocorrer nos indivíduos saudáveis e na ILTB.

Comparando os dados desses dois estudos, verifica-se que o comportamento da funcionalidade do polimorfismo -174G→C do gene de IL-6 muda de acordo com o status imunológico do indivíduo, sendo funcional na doença e não funcional na infecção latente. Para explicar tal fato, hipotetizamos que, no cenário da doença ativa, o estímulo antigênico causado por uma alta carga bacilar é bem maior que na condição de latência. Com isso, a ativação gênica é muito mais intensa na TB, sobretudo nos portadores do genótipo GG, refletindo-se em uma concentração sérica mais elevada de IL-6.

É também relevante ressaltar que nosso grupo ILTB é extremamente homogêneo. Todos os integrantes estavam em contato próximo, domiciliar, com os casos de TB ativa, e as amostras foram colhidas somente de contactantes de casos novos, sem tratamento, pois foi considerado que o tratamento do caso ativo, e conseqüente redução da eliminação de bacilos pela via aérea, implicaria menor exposição do contactante ao *M.tb*, portanto com menor estímulo. Isso tem implicação clara para as dosagens séricas de IL-6, pois se a opção fosse estudar contatos de quaisquer casos de TB, mesmo daqueles pacientes em tratamento, certamente seria criado um viés de observação. Dessa forma, quando foi aplicado o fluxograma do Ministério da Saúde para o diagnóstico de ILTB e também respeitada esta condição de somente estudar amostras de contatos de indivíduos com doença ativa, houve uma limitação no número de amostras disponíveis. Contudo, esses dados reproduzem, de forma mais fiel, a condição biológica de infecção latente – exposição continuada ao patógeno sem evidências de desenvolvimento de doença.

Até o presente momento, não se sabe da existência, na literatura científica, de outros trabalhos que tenham investigado a concentração sérica e o polimorfismo de IL-6 na ILTB. Isso impossibilita a comparação dos dados deste estudo com os de outros grupos de pesquisa, sobretudo em populações com perfis genéticos diferentes da nossa.

Em adição, esperamos prosseguir com aprofundamento destas análises utilizando modelos, *in vitro*, para avaliação de resposta celular de indivíduos portadores dos diversos genótipos de IL-6, após estímulo com antígenos do *M.tb*, através de dosagem de IL-6 em sobrenadante de culturas destas células.

O pioneirismo do presente estudo demonstra o quão pouco ainda se sabe a respeito da imunologia da ILTB; uma séria ameaça à saúde pública que acomete cerca de 2,3 bilhões de pessoas ao redor do mundo.

## 7 CONCLUSÕES

1. A dosagem de IL-6 mostrou que as concentrações dessa citocina estão aumentadas em portadores de ILTB, quando comparadas aos indivíduos saudáveis.
2. Indivíduos portadores de tuberculose pulmonar ativa apresentam níveis séricos de IL-6 mais elevados que aqueles com infecção latente.
3. O estudo funcional do polimorfismo -174G→C de IL-6 revelou que a produção sistêmica da citocina não é influenciada pelas diferentes variantes alélicas desse gene na ILTB.

## REFERÊNCIAS

- AANDAHL, E.M. *et al.* Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. **J Virol.**, v.78, n.5, p. 2454-2459, mar., 2004.
- AARON, L. *et al.* Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive Review. **Clin Microbiol Infect.**, v.10, n.5, p. 388-398, mai., 2004.
- ACKERKNECHT, E.H.; Johann Lukas Schönlein 1793 – 1864. **J Hist Med Allied Sci.**, n.19 (2), p. 131 -138, 1964.
- AL-SHARRAH, Y.A. The arab tradition of medical education and its relationship with the european tradition. **Prospects.**, v.33, n. 4, p.1-14, dez., 2003.
- AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 156, p. S1–S25, 1997.
- AMIRZARGAR, A.A. *et al.* Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 17, n.2, p.84-89, Jun., 2006.
- BARRY, C.E. *et al.* The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature Reviews Microbiology.**, v.7, p.845-855, dez., 2009.
- BASEL, H.H. History of Tuberculosis. **Respiration.**, v.65, p.5–15, 1998.
- BELKAID, Y. *et al.* CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. **Nature.**, v.420, p.502-507, 2002.
- BELKAID, Y.; ROUSE, B.T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat Immunol.**, v.4, p. 353-360, 2005.
- BELLAMY, R.; HILL, A.V.S. Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans. **Curr Opin Immunol.**, v.10, p.483-487, 1998.
- BIDWELL, J. *et al.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. **Genes Immun.**, v.1, p.3-19, set., 1999.
- BONAH, C. The ‘experimental stable’ of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof, and standards, 1921–1933. **Stud. Hist. Phil. Biol. & Biomed. Sci.**, v.36, p. 696-721, 2005.
- BREUNINGER, L.M. *et al.* Hydrocortisone regulation of interleukin-6 protein production by a purified population of human peripheral blood monocytes. **Clin Immunol Immunopathol.**, v.69, n.2, p. 205-214, nov., 1993.
- CABRERA, R. *et al.* Na immunomodulatory role for CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. **Hepatology.**, v.40, p.1062–1071, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Tuberculosis (TB)**.

Disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/topic/basics/default.htm>. Acesso em: 27 nov. 2011.

CHAN, J.; FLYNN, J.L. Nitric oxide in *Mycobacterium tuberculosis* infection. In: FANG, F.C. **Nitric oxid and infection**. Nova York: Kluwer Academic Publishers, 1999. cap.14, p.281-307.

CHAUHAN, A. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. **J Bacteriol.**, v.188, n.5, p.1856-1865, mar., 2006.

COLLINS, H.L.; KAUFMANN, S.H.E. The many faces of host responses to tuberculosis. **Immunology.**, v. 103, n.9, p.1-9, mai., 2001.

COMSTOCK, G.W. Tuberculosis in Twins: a re-analysis of the prophit survey. **Am Rev Respir Dis.**, v.117, n.4, p.621-624, abr., 1978.

COMSTOCK, G.W. The International Tuberculosis Campaign: A Pioneering Venture in Mass Vaccination and Research. **Clinical Infectious Diseases.**, v.19, p.528-540, 1994.

CORBETT, E.L. *et al.* The Growing Burden of Tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. **Arch Intern Med.**, v.163, n.9, p. 1009-1021, mai., 2003.

CORREIA, J.W. **Polimorfismo -174G>C do gene de interleucina-6 na tuberculose pulmonar**. 2009. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009a.

CORREIA, J.W. *et al.* Interleukin-6 Blood Levels in Sensitive and Multiresistant Tuberculosis. **Infection.**, v.37, p.138-141, 2009b.

DHEDA, K. *et al.* The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. **Respirology.**, v.15, p. 433-450, 2010.

DIAMOND, J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. **Nature.**, v.418, p.700-707, ago., 2002.

DODD, P.J. *et al.* Interpreting Tuberculin Skin Tests in a Population With a High Prevalence of HIV, Tuberculosis, and Nonspecific Tuberculin Sensitivity. **Am J Epidemiol.**, v.171, p.1037-1045, 2010.

DOWLATI, Y. *et al.* A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. **Biol Psychiatry.**, v.67, p.446-457, 2010.

DUARTE, R. Teste tuberculínico. Como otimizar? **Rev Port Pneumol.**, v.15, n.2, p. 295-304, 2009.

DYE, C. *et al.* Global burden of tuberculosis. Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. **JAMA.**, v. 282, n.7, p. 677-686, 1999.

DYE, C. *et al.* Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. **JAMA.**, v. 293, n. 22, p. 2767-2775, jun., 2005.

DYE, C. Global epidemiology of tuberculosis. **Lancet.**, v.367, p. 938-940, mar., 2006.

ESKDALE, J. *et al.* Interleukin-10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.95, p.9465-9470, ago., 1998.

FERNÁNDEZ-REAL, J.M. *et al.* Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. **Diabetes.**, v.49, n.3, p.517–520, mar., 2000.

FISHMAN, D. *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest.**, v.102, n.7, p.1369–1376, out., 1998.

FRATTI, R.A. *et al.* Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. **J Cell Biol.**, v.154, n.3, p.631-644, ago., 2001.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **N. Engl. J. Med.**, v.340, n.6, p. 448-454, fev., 1999.

GEIJTENBEEK, T.B.H. *et al.* Mycobacteria Target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. **J. Exp. Med.**, v.197, n.1, p.7-17, jan., 2003.

GUTIERREZ, M.G. *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. **Cell.**, v. 119, p. 753–766, dez., 2004.

GUYOT-REVOL, V. *et al.* Regulatory T Cells Are Expanded in Blood and Disease Sites in Patients with Tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 173, p. 803-810, 2006.

HENAO, M.I. *et al.* Cytokine gene polymorphisms in colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. **Tuberculosis.**, v.86, p.11-19, 2006.

HERSHKOVITZ, I. *et al.* Detection and Molecular Characterization of 9000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. **PLoS ONE.**, v. 3, n.10, p.1-6, out., 2008.

JEPSON, A. *et al.* Genetic regulation of acquired immune responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: a study of twins in west Africa. **Infect. Immun.**, v.69, n.6, p. 3989–3994, jun., 2001.

KANG, P.B. *et al.* The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. **J. Exp. Med.**, v.202, n.7, p. 987–999, out., 2005.

KAUFMANN S.H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat. Rev. Immunol.**, v.1, p. 20–30, 2001.

KELLER, E.T.; WANAGAT, J.; ERSHLER, W.B. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. **Frontiers in Bioscience.**, v.1, p.340-357, 1996.

KNIGHT, J. Polymorphisms in tumor necrosis factor and other cytokines as risks for infectious disease and the septic syndrome. **Curr Infect Dis.**, v.3, n.5, p. 427-439, 2001.

KRISTIANSEN, O.P; MANDRUP-POULSEN, T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? **Diabetes.**, v.54, n.2, p. S114–124, dez., 2005.

KRITSKI, A.L.; CONDE, M.B.; SOUZA, G.M. **Tuberculose: do ambulatório à enfermaria.** 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

LADEL, C.H. *et al.* Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis* - infected macrophages. **Infect. Immun.**, v.65, n.5, p.1936-1938, mai., 1997a.

LADEL, C.H. *et al.* Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. **Infect. Immun.**, v.65, n.11, p.4843–4849, 1997b.

LALVANI, A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy. **Chest.**, v.131, p.1898-1906, 2007.

LALVANI, A.; PARREK, M. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection. **British Medical Bulletin.**, v.93, p. 69–84, 2010.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. Micobactérias. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia Médica e Imunologia.** 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.21, p.154-160.

LIN, P. L. *et al.* Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the Cynomolgus Macaque model. **Infection and Immunity.** v.77(10) p. 4631–4642 , 2009.

LOBUE, P.; MENZIES, D. Treatment of latent tuberculosis infection: An update. **Respirology.**, v.15, p.603–622, 2010.

LUNDGREN, A. *et al.* Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. **Infect Immun.**, v.71, p.1755-1762, 2003.

MACK,U. *et al.* LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. **Eur Respir J.**, v.33, p. 956–973, 2009.

MACMICKING, J.D. *et al.* Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.94, n.10, p. 5243-5248, mai., 1997.

MILLS, K.H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nat Rev Immunol.**, v.4, p. 841-855, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2011. **Situação epidemiológica.** Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31115](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31115). Acesso em: 30 dez. 2011a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2011. **Série histórica da Taxa de Incidência de Tuberculose. Brasil, Regiões e Unidades Federadas de residência por ano de diagnóstico (1990 a 2010)**. Atualizado em 20/10/2011. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa\\_incidencia\\_tuberculose\\_1990\\_2011\\_20\\_10\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa_incidencia_tuberculose_1990_2011_20_10_11.pdf). Acesso em: 30 dez. 2011b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em saúde, Programa Nacional de Controle da Tuberculose, 2010.

MORRONE, N. *et al.* Pneumopatia causada por *Mycobacterium kansasii*. **J Pneumol.**, v.29, n.6, p.341-349, 2003.

NAGABHUSHANAM, V. *et al.* Innate inhibition of adaptive immunity: *Mycobacterium tuberculosis*-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN- $\gamma$ . **J. Immunol.**, v.171, p.4750-4757, 2003.

NICHOLSON, S. *et al.* Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis., **J. Exp. Med.**, v.183, p. 2293-2302, mai., 1996.

NISHIMOTO, N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol.**, v.18, n.3, p. 277–281, mai., 2006.

NOBELPRIZE.ORG. The official web site of the Nobel Prize. "**The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1905**". Disponível em: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1905/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1905/). Acesso em: 27 nov. 2011.

PAI, M.; ZWERLING, A.; MENZIES, D. Systematic Review: T-Cell–based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. **Ann Intern Med.**, v.149, n.3, p. 177–184, ago., 2008.

PALOMINO, J.C.; LEÃO, S.C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007**: From basic science to patient care. Disponível em [www.tuberculosis-textbook.com](http://www.tuberculosis-textbook.com). Acesso em: 22 de novembro de 2011.

PAOLO, W.F., Jr.; NOSANCHUK, J.D. Tuberculosis in New York city: recent lessons and a look ahead. **Lancet Infect Dis.**, v.4, n.5, p.287-293, abr., 2004.

PAPANICOLAOU, D.A. *et al.* The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. **Ann Intern Med.**, v.128, n.2, p.127-137, jan., 1998.

PAPANICOLAOU, D.A. Editorial: Interleukin-6: the endocrine cytokine. **JCE & M.**, v.85, n.3, p.1331-1333, mar., 2000.

PRAVICA, V. *et al.* In vitro production of IFN- $\gamma$  correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- $\gamma$  gene. **European Journal of Immunogenetics.**, v.26, n.1, p.1-3, fev., 1999.

REES, L.E.N. *et al.* The interleukin-10 -1082 G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functional significance. **Cell Mol life Sci.**, v.59, n.3, p.560-569, 2002.

REY, Luís. **Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

RIBEIRO-RODRIGUES, R. *et al.* A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.144, n.1, p.25-34, abr., 2006.

RICHELDI, L. An Update on the Diagnosis of Tuberculosis Infection. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 174, p.736–742, 2006.

RIVERA-CHAVEZ, F.A. *et al.* Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses. **Shock.**, v.20, n,3, p.218-223, set., 2003.

ROLIM, P.H.G. **Polimorfismos dos genes de citocinas em pacientes com tuberculose pulmonar**. 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

RUNDEK, T. *et al.* Carotid intima-media thickness is associated with allelic variants of stromelysin-1, interleukin-6, and hepatic lipase genes: the Northern Manhattan Prospective Cohort Study. **Stroke.**, v.33, p.1420–1423, 2002.

RUSSELL, D.G.; BARRY, C.E.; FLYNN, J.L. Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. **Science.**, v.328, p. 852-856, 2010.

SAKULA, A. Selman Waksman (1888–1973), discoverer of streptomycin: a centenary review. **Br J Dis Chest.**, v.82, n.1, p.23-31, 1988.

SAUNDERS, B. M. *et al.* Interleukin-6 Induces Early Gamma Interferon Production in the Infected Lung but Is Not Required for Generation of Specific Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Infection and Immunity**. v.68 n.6, p.3322–3326, 2000.

SCHIEFFER, B. *et al.* Impact of Interleukin-6 on Plaque Development and Morphology in Experimental Atherosclerosis. **Circulation.**, v.110, p.3493-3500, nov., 2004.

SCHINDLER, R. *et al.* Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. **Blood.**, v.75, n.1, p.40-47, jan.,1990.

SCHLÜTER, B. *et al.* Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis. **Crit Care Med.**, v.30, n.1, p.32-37, jan., 2002.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Informe técnico de tuberculose, julho, 2010**. Novo sistema de tratamento da tuberculose para adultos e adolescentes no Brasil.

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: 28 nov. 2011.

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

SMOLEN, J.S.; MAINI, R.N. Interleukin-6: a new therapeutic target. **Arthritis Research & Therapy.**, v.8, n.2, p.1-4, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **J Bras Pneumol.**, v.35, n.10, p.1018-1048, 2009.

STEAD, W.W. *et al.* Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. **N Engl J Med.**, v.322, p.422-427, fev., 1990.

STEAD, W.W. Management of health care workers after inadvertent exposure to tuberculosis: a guide for the use of preventive therapy. **Ann Intern Med.**, v.122, p.906-912, 1995.

STOOP, J.N. *et al.* Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. **Hepatology.**, v.41, p.771-778, 2005.

STOP TB PARTNERSHIP (2006). **Global Plan to Stop TB 2006–2015: Actions for life towards a world free of tuberculosis.** Disponível em: <http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/GlobalPlanFinal>. Acesso em: 28 nov. 2011.

STOP TB PARTNERSHIP (2011). **Global Plan to Stop TB 2011–2015.** Disponível em: [http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/TB\\_GlobalPlanToStopTB2011-2015.pdf](http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/TB_GlobalPlanToStopTB2011-2015.pdf). Acesso em: 28 nov. 2011.

SWARDFAGER, W. *et al.* A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. **Biological Psychiatry.**, v. 68, n.10, p. 930–941, nov., 2010.

TACKEY, E.; LIPSKY, P.E.; ILLEI, G.G. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. **Lupus.**, v.13, n.5, p.339–343, mai., 2004.

TAUDORF, S. *et al.* Common studied polymorphisms do not affect plasma cytokine levels upon endotoxin exposure in humans. **Clin. Exp. Immunol.**, v.152, p.147-152, 2008.

TAWARA, K.; OXFORD, J.T.; JORCYK, C.L. Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone: potential of anti-IL-6 therapies. **Cancer Management and Research.**, v.3, p.177-189, 2011.

TODAR, K. **On line textbook of bacteriology.** Disponível em: <http://www.textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html> . Acesso em: 26 nov. 2011.

TRAIL, R.R. Richard Morton (1637-1698). **Med Hist.**, v.14, n.2, p.166-174, 1970.

VENKITESHWARAN, A. Tocilizumab. **mAbs.**, v.1, n.5, p.432-438, 2009.

WADDINGTON, K. To Stamp Out “So Terrible Malady”: Bovine Tuberculosis and Tuberculin Testing in Britain, 1890 – 1939. **Med Hist.**, v.48, P.29-48, 2004.

WANG, C.H. *et al.* Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. **Eur. Respir. J.**, v.11, p.809–815, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1999). **What is DOTS?** A Guide to Understanding the WHO-recommended TB Control Strategy Known as DOTS. WHO; 1999. Publication WHO/CDS/CPC/TB/99.270.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2004). **Fact Sheet N°104, Revised August 2002.**

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2006). **Global tuberculosis control:** surveillance, planning and financing. Geneva, Switzerland: WHO; 2006. Publication WHO/HTM/TB/2006.362.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2009). **Health ministers to accelerate efforts against drug-resistant TB.** News Release, 2009. Disponível em: [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2009/tuberculosis\\_drug\\_resistant\\_20090402/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2009/tuberculosis_drug_resistant_20090402/en/index.html). Acesso em: 27 nov. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2011). **Health Topics, tuberculosis.** Disponível em: <http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>. Acesso em: 27 nov. 2011a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2011). **Global Tuberculosis Control:** WHO Report, 2011. Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2011/gtbr11\\_full.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf). Acesso em: 27 nov. 2011b.

YOUNG, D.B.; GIDEON, H.P.; WILKINSON, R.J. Eliminating latent tuberculosis. **Trends Microbiol.**, v.17, p.193–188, 2009.

# APÊNDICES

## **APÊNDICE 1: TCLE submetido aos contactantes de TB convidados a participar da pesquisa.**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:**

CONTACTANTE ( ) RESPONSÁVEL LEGAL ( ) GRAU: \_\_\_\_\_

NOME DO CONTACTANTE: \_\_\_\_\_

IDENTIDADE (N<sup>o</sup>): \_\_\_\_\_ SEXO: M( ) F( ) NASCIMENTO: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

BAIRRO: \_\_\_\_\_ CIDADE: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_ N<sup>o</sup> TELEFONE: ( ) \_\_\_\_\_

### **DADOS SOBRE A PESQUISA:**

**TÍTULO:** Avaliação dos níveis séricos e do polimorfismo -174G→C do gene de Interleucina-6 em pacientes com Tuberculose Latente.

**PESQUISADOR:** Fernando Henrique Azevedo Lopes, aluno do Curso de Mestrado em Patologia Tropical da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

Endereço: Rua Monsenhor Furtado S/N, Rodolfo Teófilo. Fortaleza - CE - CEP: 60441-750. Telefone: (85) 3366-8304

A presente pesquisa tem por objetivo identificar portadores de tuberculose latente (situação em que a pessoa não transmite nem apresenta sintomas da doença, mas abriga a bactéria causadora), bem como se os níveis de uma substância produzida pelo organismo, chamada interleucina-6 (IL-6), estão normais, aumentados ou diminuídos, quando comparados com os de pessoas não portadoras da bactéria que causa tuberculose.

Estudo anterior comprovou que o nível da IL-6 está aumentado nos pacientes portadores de tuberculose ativa (com os sintomas da doença). Saber se esse aumento também ocorre nas pessoas com a forma latente, será muito útil para uma melhor compreensão dos mecanismos dessa enfermidade, no sentido de podermos desenvolver melhores estratégias de tratamento no futuro.

Os voluntários que concordarem em participar da pesquisa serão submetidos a um teste de diagnóstico da tuberculose, chamado PPD. Trata-se de um procedimento simples e seguro que visa detectar se o paciente já teve um contato anterior com o bacilo da tuberculose. Nesse teste, é feita uma aplicação de pequena quantidade (0,1mL) de uma substância no antebraço, mediante uma picada superficial com agulha fina (sob a pele). Três dias depois, o voluntário deve retornar para ser feita a leitura do teste (mede-se, com uso de uma régua, o pequeno inchaço que se forma no local da injeção). O risco desse método é mínimo, apenas o incômodo da picada e, às vezes, coceira no local. A reação desaparece sozinha e não há nenhum risco de se infectar com a tuberculose. Se o teste for negativo, o voluntário deverá retornar com oito semanas para repetir o teste.

Como medida complementar ao teste da pele, também será feito um raio-x do tórax.

Uma amostra do seu sangue (5mL) será colhida em veia do braço (com risco desprezível, apenas o incômodo da picada da agulha e, no máximo, um pequeno hematoma no local), para realização do teste de DNA, a fim de avaliarmos o gene responsável pela produção da IL-6, bem como as dosagens desta substância no seu sangue.

Os pacientes participantes da pesquisa poderão desistir, a qualquer tempo, sem a necessidade de prestar quaisquer esclarecimentos e sem prejuízo ao seu tratamento na instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante da pesquisa.

#### **CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIMENTO**

Declaro que após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo em participar do presente protocolo de pesquisa.

Em caso de menor de idade, declaro que o mesmo foi devidamente esclarecido e aceita participar do presente protocolo de pesquisa, sendo eu o responsável legal.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Assinatura: \_\_\_\_\_  
(paciente ou responsável legal)

Assinatura e carimbo do pesquisador: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE 2: Quadro 1 – Planilha geral de dados dos contactantes avaliados.**

Contac.	Origem	Coleta em	Purificação do DNA	PPD 1 (mm)	PPD 2 (mm)	Raios-X	PCR em	Genótipo	IL-6 (pg/mL)
1	CSFAM	09/06/2011	09/06/2011	0	10	normal	09/02/2012	G/G	1,329
2	CSFAM	09/06/2011	09/06/2011	22	-	normal	17/09/2011 GEL 1	G/G	4,784
3	HUWC	05/08/2011	06/08/2011	NR	-	NR	01/10/2011 GEL 1	G/C	0,96
4	HSJ	19/08/2011	19/08/2011	25	-	normal	17/09/2011 GEL 1	G/G	1,799
5	HSJ	02/09/2011	02/09/2011	15	-	normal	17/09/2011 GEL 2	G/G	2,31
6	HSJ	02/09/2011	02/09/2011	11	-	normal	01/10/2011 GEL 1	G/G	1,511
7	CSFAM	15/09/2011	17/09/2011	25	-	normal	01/10/2011 GEL 2	G/G	1,942
8	CSFAM	15/09/2011	17/09/2011	10	-	normal	01/10/2011 GEL 2	G/G	1,727
9	HSJ	16/09/2011	17/09/2011	SL		normal	01/10/2011 GEL 3	G/C	1,867
10	CSFAM	29/09/2011	29/09/2011	8	-	normal	01/10/2011 GEL 3	G/G	1,175
11	CSFAM	06/10/2011	08/09/2011	5	-	normal	5/12/2011 GEL 1	G/C	2,748
12	CSFAM	06/10/2011	08/09/2011	0	0	normal	5/12/2011 GEL 1	G/G	2,421
13	CSFAM	06/10/2011	08/09/2011	0	10	normal	5/12/2011 GEL 2	G/C	1,287
14	HSJ	04/11/2011	04/11/2011	30	-	CD	5/12/2011 GEL 2	G/G	2,05
15	HSJ	04/11/2011	04/11/2011	30	-	CD	5/12/2011 GEL 3	G/G	1,924
16	HSJ	04/11/2011	04/11/2011	0	NR	normal	5/12/2011 GEL 3	G/G	1,3
17	HSJ	09/12/2011	09/12/2011	SL	-	normal	09/02/2012	G/G	0,895
18	HSJ	06/01/2012	06/01/2012	8	-	CD	09/02/2012	G/C	1,034
19	HSJ	13/01/2012	13/01/2012	10(?)	-	Normal	09/02/2012	G/G	0,956
20	HSJ	13/01/2012	13/01/2012	7	-	normal	09/02/2012	G/G	1,485

NR – Não Realizado.

CD – Calcificações Difusas.

**APÊNDICE 3: Quadro2: Planilha de dados dos contactantes portadores de ILTB selecionados para compor o grupo teste deste estudo.**

Contac.	Origem	Coleta em	Purificação do DNA	PPD 1 (mm)	PPD 2 (mm)	Raios-X	PCR em	Genótipo	IL-6 (pg/mL)
1	CSFAM	09/06/2011	09/06/2011	0	10	normal	09/02/2012	G/G	1,329
2	CSFAM	09/06/2011	09/06/2011	22	-	normal	17/09/2011 GEL 1	G/G	4,784
3	HSJ	19/08/2011	19/08/2011	25	-	normal	17/09/2011 GEL 1	G/G	1,799
4	HSJ	02/09/2011	02/09/2011	15	-	normal	17/09/2011 GEL 2	G/G	2,31
5	HSJ	02/09/2011	02/09/2011	11	-	normal	01/10/2011 GEL 1	G/G	1,511
6	CSFAM	15/09/2011	17/09/2011	25	-	normal	01/10/2011 GEL 2	G/G	1,942
7	CSFAM	15/09/2011	17/09/2011	10	-	normal	01/10/2011 GEL 2	G/G	1,727
8	CSFAM	29/09/2011	29/09/2011	8	-	normal	01/10/2011 GEL 3	G/G	1,175
9	CSFAM	06/10/2011	08/09/2011	5	-	normal	5/12/2011 GEL 1	G/C	2,748
10	CSFAM	06/10/2011	08/09/2011	0	10	normal	5/12/2011 GEL 2	G/C	1,287
11	HSJ	04/11/2011	04/11/2011	30	-	CD	5/12/2011 GEL 2	G/G	2,05
12	HSJ	04/11/2011	04/11/2011	30	-	CD	5/12/2011 GEL 3	G/G	1,924
13	HSJ	06/01/2012	06/01/2012	8	-	CD	09/02/2012	G/C	1,034
14	HSJ	13/01/2012	13/01/2012	10(?)	-	Normal	09/02/2012	G/G	0,956
15	HSJ	13/01/2012	13/01/2012	7	-	normal	09/02/2012	G/G	1,485

# **ANEXOS**

ANEXO 1: Planilha de interpretação de resultados do polimorfismo.

**WORKSHEET**  
**Cytokine Genotyping Tray or Primer Pack, Lot 004**

Name: \_\_\_\_\_  
 Patient  Male  
 Donor  Female

Sample ID: \_\_\_\_\_ Race: \_\_\_\_\_ Birthdate: \_\_\_\_\_ ABO/Rh: \_\_\_\_\_

Relationship to Patient: \_\_\_\_\_

Tray Exp. Date: \_\_\_\_\_  
 Tray Lot # \_\_\_\_\_  
 Tray Lot #/Batch # \_\_\_\_\_

Cat. # CYTGEN, PCYTGEN

POSITIONS (mark positive locations)	TNF-α		TG-β1		IL-10		IL-6		IFN-γ							
	750	125	125	115	175	125	125	300	300	250						
<b>RESULTS</b>	1H/3H/5G/7H/8H/11H	1G/3G/5G/7G/9G/11G	1F/3F/5F/7F/9F/11F	1E/3E/5E/7E/9E/11E	1D/3D/5D/7D/9D/11D	1C/3C/5C/7C/9C/11C	1B/3B/5B/7B/9B/11B	1A/3A/5A/7A/9A/11A	2H/4H/6H/8H/10H/12H	2G/4G/6G/8G/10G/12G	2F/4F/6F/8F/10F/12F	2E/4E/6E/8E/10E/12E	2D/4D/6D/8D/10D/12D	2C/4C/6C/8C/10C/12C	2B/4B/6B/8B/10B/12B	2A/4A/6A/8A/10A/12A
<b>PRODUCT SIZE (bp)</b>	750	125	125	115	175	125	125	300	300	250	250	250	175	175	250	250
<b>SPECIFICITY *</b>	Neg CH	TNF-α -200A	TNF-α -200C	TG-β1 107	TG-β1 10C	TG-β1 25C	TG-β1 25D	IL-10 -102A,-9197	IL-10 -102C,-919C	IL-10 -102A,-919C	IL-10 -9197,-922A	IL-10 -919C,-929C	IL-6 P573C	IL-6 P573C	IFN-γ -4871	IFN-γ -487A
<b>TNF-α</b>	G/A (high)	G/A (low)	A/A (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/C (high)	C/C (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)
<b>TG-β1</b>	T/T (high)	T/T (high)	T/C (high)	C/C (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)
<b>IL-10</b>	G/C/G/C/C (high)	G/C/G/C/C (high)	G/C/G/C/C (high)	G/C/G/C/C (high)	G/C/G/C/C (high)	G/C/G/C/C (high)	G/C/G/C/C (high)	G/C/G/C/C (high)	G/C/G/C/C (high)							
<b>IL-6</b>	G/G (high)	G/C (high)	G/C (high)	G/C (high)	G/C (high)	G/C (high)	G/C (high)	G/C (high)	G/C (high)	G/C (high)						
<b>IFN-γ</b>	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)	T/T (high)							
	A/A (low)	A/A (low)														

Photo Documentation

\_\_\_\_\_  
Total Performed by

\_\_\_\_\_  
Read by

\_\_\_\_\_  
Retrieved by

\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
Date

\* Note: Low, Intermediate and High refer to gene expression levels

CYTGEN 004 WS, Rev 1: Page 1 of 1  
 One Lambda, Inc. 21001 Kiltridge St., Canoga Park, CA 91303-2801 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-6904 www.onelambda.com  
 Template: Temp1\_CYTGEN WS Rev 0

**ANEXO 2: Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do HUWC.**

HUWC/UFC Comitê de Ética em Pesquisa Cód CEP- 425.12.10
---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430-370 – Fortaleza-CE  
FONE: (85) 3366-8589 / 3366-8613 E-MAIL: [cephuwc@huwc.ufc.br](mailto:cephuwc@huwc.ufc.br)

---

Protocolo nº: 125.12.10  
Pesquisador Responsável: Fernando Henrique Azevedo Lopes  
Departamento / Serviço:  
Título do Projeto: “**Avaliação dos níveis séricos e do polimorfismo -174G>C do gene de Interleucina-6 em pacientes com tuberculose latente**”.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou, na reunião do dia 20/12/2010, o projeto de pesquisa supracitado e, baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), resolveu classificá-lo como: **APROVADO**.

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 20/12/11).

Fortaleza, 21 de dezembro de 2010.

Dra. Maria de Fátima de Souza  
Coordenadora do CEP - HUWC

**ANEXO 3: Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do HSJ.**

	<b>GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ SECRETARIA DA SAÚDE</b>	<b>HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS (1970-2010)</b> <i>40 anos promovendo a saúde e valorizando a vida</i>	
---	---	---	---

Ofício Nº 034/2011

Fortaleza, 26 de outubro de 2011

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP-HSJ)**

**Protocolo nº 032/2011**

**C.A.A.E: 2044.1.000.042-11**

**Título:** "Avaliação do polimorfismo – 174G – C e dos níveis séricos de interleucina-6 (IL-6) na tuberculose latente"

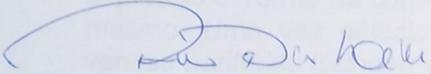
**Pesquisador Principal:** Fernando Henrique Azevedo Lopes

**Instituições envolvidas:** Universidade Federal do Ceará-UFC  
Hospital São José de Doenças Infecciosas

Senhor Diretor,

Levamos ao conhecimento de V. Sa. que, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas (CEP-HSJ), dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos do Conselho Nacional de Saúde–Ministério da Saúde, Resolução Nº 196 de outubro de 1996, publicada no Diário Oficial da União em 16 de outubro de 1996, **APROVOU** o projeto em apreço no dia 17 de outubro de 2011.

Atenciosamente,



**Dr. Robério Dias Leite**  
**Coordenador do CEP/HSJ**

Ilmo. Sr.  
Dr. Anastácio de Queiroz Sousa  
Diretor Geral do Hospital São José de Doenças Infecciosas