



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

JOSÉ WALTER CORREIA

POLIMORFISMO -174G>C DO GENE DE
INTERLEUCINA-6 NA TUBERCULOSE PULMONAR

FORTALEZA

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

JOSÉ WALTER CORREIA

POLIMORFISMO -174G>C DO GENE DE
INTERLEUCINA-6 NA TUBERCULOSE PULMONAR

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim

FORTALEZA

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Ceará
©reprodução autorizada pelo autor

C848p Correia, José Walter

Polimorfismo -174G>C do gene de interleucina-6 na
tuberculose pulmonar/ José Walter Correia. – Fortaleza, 2009.
108 f.

Orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina.

1. Tuberculose 2. Polimorfismo Genético 3. Interleucina-6
4. *Mycobacterium tuberculosis* 5. Dosagem 6. Reação em
Cadeia de Polimerase I. Sidrim, José Júlio Costa (orient.). II.
Título.

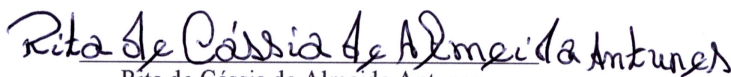
CDD 616.995



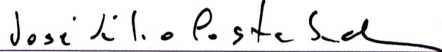
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE **JOSÉ WALTER CORREIA**,
REALIZADA NO DIA SETE DE MAIO DE DOIS MIL E NOVE.

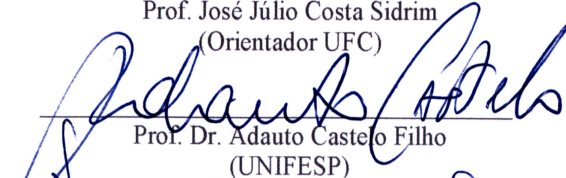
1 Às oito horas e trinta minutos do dia sete de maio de dois mil e nove, no Auditório Paulo Marcelo, da
2 Universidade Federal do Ceará, realizou-se a 10ª. Sessão de Defesa da Tese de Doutorado de autoria de
3 **JOSÉ WALTER CORREIA**. O trabalho tinha como título: "POLIMORFISMO -174G>C DO GENE
4 DE INTERLEUCINA-6 NA TUBERCULOSE PULMONAR." Compunham a Banca Examinadora os
5 professores doutores: **JOSÉ JÚLIO COSTA SIDRIM (ORIENTADOR)**, **ADAUTO CASTELO**
6 **FILHO**, **BENEDITO ANTÔNIO LOPES DA FONSECA**, **JEOVÁ KENY BAIMA COLARES E**
7 **MAX VICTOR CARIOCA FREITAS**, A sessão foi aberta pela coordenadora do Programa de Pós-
8 Graduação em Ciências Médicas professora doutora **GEANNE MATOS DE ANDRADE**, que apresentou
9 a Banca Examinadora e passou a palavra ao orientador afim de que apresentasse o candidato. Após a
10 exposição, seguiu-se o processo de arguição do doutorando. O primeiro examinador foi o professor doutor
11 **Adauto Castelo Filho**, Logo após procederam à arguição os professores doutores **Benedito Antônio Lopes**
12 **da Fonseca**, **Jeová Keny Baima Colares** e **Max Victor Carioca Freitas**. Em seguida a Banca
13 Examinadora se reuniu reservadamente a fim de avaliar o desempenho do candidato. Por unanimidade a
14 Banca Examinadora considerou **APROVADO** o trabalho do doutorando. Nada mais havendo a relatar a sessão
15 foi encerrada às doze horas. E eu, Rita de Cássia de Almeida Antunes, secretária do Programa de Pós-
16 Graduação em Ciências Médicas, lavrei a presente ata, que depois de lida e aprovada, será assinada por
17 mim e pelos membros da Banca Examinadora. Fortaleza, sete de maio de dois mil e nove



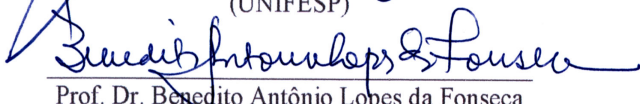
Rita de Cássia de Almeida Antunes
(Secretária)



Prof. José Júlio Costa Sidrim
(Orientador UFC)

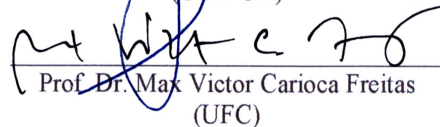


Prof. Dr. Adauto Castelo Filho
(UNIFESP)



Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca
(USP)


Prof. Dr. Jeová Keny Baima Colares
(UNIFOR)


Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas
(UFC)

Ao meu pai, pelo grande exemplo deixado; primeiro e mais importante incentivador.

À minha mãe, exemplo de paciência, perseverança e obstinação.

À minha esposa, Aglaís, pelo estímulo e compreensão.

À minha filha Márcia, uma especial dedicação.

Aos filhos Walter Filho, Júlio Marcus e Carlos Henrique.

Ao genro Washington e às noras Neide, Kátia e Carol.

Aos netos Victor, Mariana Gabriela, Matheus, Walter Luis, Daniel,

João Henrique e Luis Eduardo.

Dedico também este trabalho aos **amigos** que, compreensivos, participativos e voluntariosos, tornaram imperceptíveis minhas ausências durante o período de elaboração deste trabalho.

Dr. José Otho Leal Nogueira

Dr. Manoel Pedro Guedes Guimarães

Dr. Marco Antonio Carvalho Caminha Muniz

Dr. André Luis Coutinho Araújo Macêdo

Dr. Juvêncio Paiva Câmara Júnior

Dr. Antônio George Matos Cavalcante

Dr. Plínio José da Silva Câmara

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas**, profissional exemplar, amigo, incentivador, sem seu apoio, estímulo e orientação, este estudo não teria sido possível.

À **Prof. Dra. Geanne Matos de Andrade**, por sua paciência e confiança nos momentos difíceis, ocorridos durante a realização deste trabalho, minha gratidão e respeito.

Ao **Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim**, criador, impulsionador e primeiro coordenador deste programa, pela firmeza e coragem na implantação, meus sinceros sentimentos de admiração e respeito.

À **Prof. Dra. Cristiane Cunha Frota**, pela revisão e discussão técnicas, assim como pela cessão do Laboratório de Genética do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, meu sincero sentimento de gratidão.

À **bióloga e mestra Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima**, pela grande contribuição na fase operacional da análise laboratorial, meu eterno agradecimento.

Ao **enfermeiro e mestrando Emerson Ramalho Ferreira**, por sua grande colaboração nas colheitas de sangue, e extração de DNA, muito obrigado.

À **Dra. Elizabeth Clara Barroso**, pelo incentivo e espírito cooperativo no envio de pacientes.

À **bibliotecária Rosane Maria Costa**, pela diligente revisão especializada, minha gratidão.

Ao **Prof. Dr. Miércio Pereira-Perrin**, grande amigo, incansável na troca de idéias.

À minha querida filha **Márcia Cardinale Correia Viana**, pela grande ajuda na correção técnica deste trabalho, um beijo de agradecimento.

*“Um dia você aprende que o importante não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que **bons amigos** são a família que nos permitiram escolher”.*

William Shakespeare

RESUMO

POLIMORFISMO-174G>C DO GENE DE INTERLEUCINA-6 NA TUBERCULOSE PULMONAR. JOSÉ WALTER CORREIA. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim.

O objetivo do estudo foi investigar o perfil de produção de IL-6 em pacientes com tuberculose pulmonar ativa e avaliar o papel funcional do polimorfismo -174G>C do gene de IL-6 na produção sistêmica desta citocina. Um total de 63 pacientes e 99 controles foi estudado, sendo 38 pacientes [25(65,8%) masculinos] e 63 controles [51 (81%) masculinos] para a dosagem de IL-6, enquanto, 42 pacientes [25 (60%) masculinos] e 79 controles [62(78,5%) masculinos] para o estudo do polimorfismo. Os pacientes foram selecionados dos centros de referência da rede estadual de saúde: Dona Libânia, Hospital de Messejana, Hospital de Maracanaú e Hospital Geral Dr. César Cals. O grupo controle foi selecionado no HEMOCE. Foi realizado teste de ELISA para a dosagem sérica de IL-6. O DNA genômico foi extraído de sangue periférico e o polimorfismo de IL-6 foi estudado por reação de polimerase em cadeia utilizando iniciadores seqüência específicos. A dosagem sérica de IL-6 se mostrou elevada nos pacientes portadores de tuberculose em relação aos controles (mediana = 4,3 pg/mL versus 0,5 pg/mL, $p<0,001$), porém não exibiu diferença entre os grupos de doentes sensíveis e os resistentes ao tratamento específico. Em relação ao estudo funcional do polimorfismo de IL-6, foi observado um robusto aumento dos níveis de IL-6 nos doentes portadores do genótipo GG (mediana=4,1 pg/mL, variação 0,5-12,0 pg/mL), em relação aos portadores dos genótipos GC e CC, sendo que nestes se observou uma expressão de IL-6 semelhante a dos controles (mediana=0,6 pg/mL, variação 0,0-2,8 pg/mL), conferindo significância estatística com $p=0,04$. A relevância deste estudo é mostrar *in vivo* o papel funcional do polimorfismo de IL-6 na tuberculose. Em conclusão, o genótipo GG de pacientes com tuberculose pulmonar ativa determina produção aumentada de IL-6.

Palavras-chave: Tuberculose. Polimorfismo de IL-6. *Mycobacterium tuberculosis*. Dosagem de IL-6. Reação de Polimerase em Cadeia.

ABSTRACT

INTERLEUKIN-6-174G>C POLYMORPHISM GENE IN PULMONARY TUBERCULOSIS. JOSÉ WALTER CORREIA. Thesis (Doctorate). Post-Graduation in Medical Science (Internal Medicine). Federal University of Ceará. Advisor Professor Dr. José Júlio Costa Sidrim.

The aim of this study was to investigate the profile of IL-6 production in patients with active pulmonary tuberculosis and to evaluate the functional role of polymorphism -174G>C in the systemic production of this cytokine. A total of 63 patients and 99 controls were studied. Among them 38 patients [25(65.8%) males] and 63 controls [51(81%) males] were studied for the IL-6 dosage. Moreover, 42 patients [25(60%) males] and 79 controls [62(78.5%) males] were studied for the -174G>C polymorphism. Patients were selected from Dona Libânia Center; Messejana Hospital, Maracanaú Hospital and Dr. Cesar Cals General Hospital. The control group was selected from HEMOCE. An ELISA test was performed to measure IL-6 in peripheral blood. The genomic DNA was extracted from peripheral blood and IL-6 polymorphism was studied by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. The IL-6 dosage showed an increase in patients with tuberculosis in relation to controls (An increase in IL6 dosage was found in patients with tuberculosis in relation to controls) (median= 4.3 pg/mL vs 0.5 pg/mL, $p < 0.001$), but no difference was observed in drug-sensitive patients in comparison to drug-resistant ones. The genotype distribution showed no difference between patients and controls. In relation to the functional study, the IL-6 levels pointed out a significant increase in patients presenting GG genotype (median=4.1 pg/mL, range 0.5-12.0 pg/mL), in relation to GC and CC careers; these two latter genotypes presented similar IL-6 production as in healthy individuals with median=0.6 pg/mL, range 0.0-2.8 pg/mL, corroborating statistical significance with $p = 0.04$. The relevance of this study is to show *in vivo* the functional role of IL-6 polymorphism in active pulmonary tuberculosis. Conclusion, the GG genotype in patients with pulmonary tuberculosis determines an increase in IL-6 systemic production.

Keywords: Tuberculosis. IL-6 polymorphism. Interleukin-6. *Mycobacterium tuberculosis*. IL-6 Dosage. Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

1	Distribuição de amostras de pacientes e controles.....	37
2	Curva-padrão de concentrações de IL-6 expressas em densidades óptica (DO) e pg/mL.....	39
3	Concentrações de IL-6 em soro de indivíduos do grupo 1, controles e pacientes com tuberculose (TB), sensíveis (TB-S) e multirresistentes (TB-MDR) às drogas anti-tuberculose.....	44
4	Níveis séricos de IL-6 em controles do grupo 3, segundo genótipos -174G>C de IL-6.....	47
5	Níveis séricos de IL-6 em indivíduos do grupo 3, $p < 0,01$	48
6	Níveis de IL-6 em pacientes do grupo 3 com tuberculose, segundo genótipos -174G>C de IL-6 $p = 0,04$	49
7	Gel de agarose mostrando bandas de amplificação de IL-6-174 em amostra de um indivíduo do grupo 2.....	51

LISTA DE TABELAS

1	Proporção de genótipos de IL-6 -174G>C em diferentes populações.....	33
2	Caracterização demográfica dos indivíduos do grupo 1 segundo o sexo e a idade.....	43
3	Caracterização demográfica dos indivíduos do grupo 2 segundo o sexo e a idade	45
4	Distribuição dos genótipos nos pacientes e nos controles do grupo 2.....	45
5	Características demográficas, distribuição dos genótipos de IL-6 -174G>C e níveis séricos de IL-6 em indivíduos do grupo 3, casos e controles.....	46
6	Distribuição dos genótipos nos pacientes do grupo 2, sensíveis e resistentes.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida.
AR	Artrite Reumatóide.
ATS	American Thoracic Society.
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente.
CDC	Center of Disease Control and Prevention.
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
DO	Densidade óptica.
DOTS	<i>Directly observed treatment short-course.</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay.</i>
ES	Esclerose sistêmica.
HEMOCE	Hemocentro do Ceará.
HIV	Vírus da imunodeficiência humana.
HLA	Antígeno Leucocitário Humano.
IDSA	Infectious Disease Society of America.
IFN- γ	Gama-interferon.
IgE	Imunoglobulina-E.
I	Isoniazida.
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase induzível.
IL-4	Interleucina-4.
IL-5	Interleucina-5.
IL-6	Interleucina-6.
IL-6R	Receptor de IL-6.
IL-10	Interleucina-10.
IL-12	Interleucina-12.
IL-18	Interleucina-18.
IPEA	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada.
LACEN-CE	Laboratório Central do Estado do Ceará.

LPS	Lipopolissacarídeo.
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
NK	<i>Natural killer</i> .
OMS	Organização Mundial da Saúde.
PCR	Proteína C reativa
PPD	Derivado Protéico Purificado.
R	Rifampicina.
SS	Síndrome de Sjögren.
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multidrogarresistente.
TB-S	Tuberculose sensível às drogas anti-TB.
TB-XDR	Tuberculose Extensivamente Resistente às drogas anti-TB.
Th0	T auxiliar 0.
Th1	T auxiliar 1.
Th2	T auxiliar 2.
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa.
TNF1	Alelo 1 do TNF.
TNF2	Alelo 2 do TNF.
USA	United States of América.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Aspectos históricos	15
1.2	Aspectos epidemiológicos	17
1.3	Aspectos imunológicos	21
1.3.1	Citocinas	21
1.4	Polimorfismo gênico	26
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo Geral	34
2.2	Objetivos Específicos	34
3	CASUÍSTICA E MÉTODO	35
3.1	Seleção da amostragem	35
3.1.1	Pacientes.....	35
3.1.2	Controles	37
3.2	Colheita das amostras	38
3.2.1	Dosagem da IL-6	38
3.3	Polimorfismo do gene de IL-6 (-174G>C)	40
3.3.1	Extração e Purificação do DNA.....	40
3.3.2	Tipificação do polimorfismo do gene de IL-6 (-174G>C)	40
3.3.3	Resolução dos fragmentos em gel de agarose	41
3.3.4	Interpretação dos perfis polimórficos.....	42
3.4	Análise estatística	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Grupo 1	43

4.2	Grupo 2	44
4.3	Grupo 3	46
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos

A tuberculose (TB) acompanha o homem desde os seus primórdios. Existem relatos de evidência de TB em ossos humanos pré-históricos, encontrados na Alemanha, e datados de oito mil anos antes de Cristo (a.C.). Não menos antigos são os ossos encontrados no Egito, examinados por Grafton Elliot Smith e Marc Armand Ruffer, em 1908, ocasião em que descobriram sinais da doença na coluna vertebral de uma múmia de três mil anos de idade; esses dois paleopatologistas descreveram extensa destruição do centro da primeira vértebra lombar e de três torácicas baixas — sinais típicos do Mal de Pott (SCHREIBER; MATHYS, 1991). No Peru, em estudo de múmia de um mil e cem anos (datação pelo carbono 14), encontrou-se DNA intacto, tendo sido identificada a inserção sequencial *IS 6110*, não se podendo afirmar a origem do bacilo, se humano ou bovino (ROSEMBERG, 1999). Essa seqüência é a encontrada nas espécies que compõem o complexo *Mycobacterium tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canneti*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium africanum* (MICHAELA *et al.*, 2005).

No relato de suas viagens pelo Egito, Heródoto (485-425 a.C.) descreve sintomas sugestivos de tuberculose. Plínio, o Velho, que pereceu na erupção do Vesúvio, em Pompéia (79 d.C.), e seu sobrinho — Plínio, o Moço, buscaram cura de suas doenças (TB) no Egito. O Talmud da Babilônia (coleções de tradições judaicas, escritas entre os séculos II e VI d.C.) sentenciava: "sangue proveniente da boca deve ser testado com uma palha de trigo: se aderir, origina-se dos pulmões e a doença pode ser curável" (SCHREIBER; MATHYS, 1991; RUFINO-NETO, 1998; KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2000).

A tuberculose é uma doença com longa história, tendo sido descrita em uma das primeiras obras médicas, o livro chinês *Huang Ti Nei-Ching*, escrito no 3° milênio a.C. Análises de ossos que remontam à dinastia *Shang* (1650-1027 a.C.) revelaram vestígios da doença; Coube a Hipócrates (420 a.C.), na Grécia antiga, o reconhecimento da TB como uma doença natural e não um castigo divino, como era até então entendida. Devido ao grande esgotamento físico que provoca, passou a ser chamada de tísica, em grego *phthisikos*, ou seja,

que traz consumação (BIER, 1963; ISEMAN, 2000).

Somente no século XVII é que o aspecto anátomo-patológico da doença passou a ser registrado, com os estudos do médico francês Sylvius Deleboe (1614-1672) sobre formações nodulares encontradas nos pulmões, por ocasião da realização de necropsias; a partir daí, a doença passou a ser descrita e caracterizada pela presença desses nódulos, chamados de tubérculos, originando-se, daí, o termo tuberculose, que foi oficialmente adotado em 1832, por Johann Lukas Shonlein (LYONS; PETRUCCELLI, 1987). O diagnóstico das doenças pulmonares foi celeremente melhorado, *ante mortem*, a partir da invenção de René Théophile Hyacinthe Laennec (1804), ao fabricar um tubo formado por uma folha de papel enrolado, que servia de trompa auricular, mais tarde chamado de estetoscópio, e publicado em seu livro *Traité de l'auscultation médiate et des maladies des Poumons et du Coue*, em 1821. Seis anos depois, ele próprio morreria caquético, com tuberculose (SCHREIBER; MATHYS, 1991).

Várias outras personalidades famosas sucumbiram diante dessa grave enfermidade. Durante a encenação de sua peça *La Maladie imaginaire* em 1637, Molière criticava acidamente aos médicos por considerar que estes estavam inventando uma doença, quando ele próprio representando o personagem principal, teve hemorragia pulmonar fatal. Descreve-se que São Francisco morreu de tuberculose, assim como Santa Tereza de Jesus, Calvino, o Cardeal Richilieu, Bolívar, Salazar, Tutankanon, D. Pedro I, Graham Bell, Mozart, Rossini, Paganini; Caruso morreu em meio à crise de hemoptise. Também morreram vítimas da doença: Noel Rosa, Goethe, Descartes, Balzac, Molière, Eça de Queiroz, Castro Alves, Gonçalves Dias, Graciliano Ramos, José do Patrocínio, Manuel Bandeira, e tantos outros escritores, políticos, artistas e personalidades famosas (CONDE; SOUZA; KRITSKI, 2002).

O envolvimento da coluna cervical por TB tem sido imputado como o responsável pela conhecida deformidade de Corcunda de Notre Dame. Fiódor Mikhâilovitch Dostoiévski, que escreveu sobre tuberculose em "Recordações da casa dos mortos", morreu dessa doença, em 1881, existindo, hoje, um hospital em Moscou, com seu nome, em sua homenagem (REICHMAN, 2001). No século XVIII, a TB passou a ser conhecida por peste branca, numa alusão à peste negra ou bubônica, que cursava com lesões enegrecidas na pele, e pneumonia fulminante. O compositor Frédéric Chopin estava sendo tratado de tuberculose, quando por ordem do rei da Espanha D. Fernando VI, foi expulso e transportado para a ilha de Majorca,

em um barco usado para o transporte de porcos. Apesar do sofrimento físico, e da atitude discriminatória que sofrera, o compositor compôs muitos dos seus inúmeros e maravilhosos prelúdios em inspiração às belezas naturais da ilha (CONDE; SOUZA; KRITSKI, 2002).

1.2 Aspectos epidemiológicos

“A tuberculose tem sido considerada como um dos grandes desastres da saúde pública” (ALVES; NATAL, 2002). E continua sê-lo, a matar em torno de 2.000.000 de pessoas anualmente, acrescido do inexorável aumento de espécies resistentes. A coinfeção com HIV (TB/HIV), especialmente na África, e a TB-MDR em todas as regiões, principalmente no leste europeu tem tornado o controle da tuberculose cada vez mais complexo (RAVIGLIONE, 2006).

Em 1999, a *American Thoracic Society (ATS)* e o *Center for Disease Control and Prevention* publicaram, endossados pela *Infectious Disease Society of América*, os três critérios a serem usados para o sistema de classificação da tuberculose, usados até os dias atuais: i) história de exposição; ii) evidência de infecção (PPD positivo); iii) evidência que a infecção resultou em doença, no passado ou ativa (baseado por critérios clínicos, bacteriológicos ou radiológicos). Com o surgimento de HIV/AIDS, o manejo se alterou significativamente, tanto do ponto de vista diagnóstico quanto terapêutico. Assim, a *American Thoracic Society (ATS)* classifica a TB em seis grupos, como se segue (ATS, 2000):

- 0 Ausência de exposição à TB, não infectado;
- 1 Exposição à TB, ausência de evidência de infecção;
- 2 TB latente, evidência de infecção;
- 3 TB clinicamente ativa;
- 4 TB clinicamente inativa (TB no passado);
- 5 TB suspeita - pendência diagnóstica.

As Normas Técnicas do Ministério da Saúde (2002), o II Consenso Brasileiro de Tuberculose e as Diretrizes Brasileiras para Tuberculose publicados em 2004 classificam a tuberculose da maneira como segue:

- 1 TB pulmonar positiva:
 - Duas baciloscopias diretas positivas (duas B+) ou
 - Uma baciloscopia direta positiva ou duas ou mais baciloscopias negativas e uma cultura positiva (uma C+) ou
 - Uma baciloscopia direta positiva e imagem radiológica sugestiva de tuberculose (uma B+; RX).

- 2 TB pulmonar negativa
 - Duas baciloscopias diretas negativas, com imagem radiológica sugestiva e achados clínicos ou outros exames complementares que permitam ao médico efetuar o diagnóstico de tuberculose (duas B-; RX sugestivo; quadro clínico ou laboratorial sugestivo).

- 3 TB extrapulmonar

- 4 TB disseminada (miliar ou TB em mais de dois sítios)

Em 2005, a co-morbidade com HIV/AIDS, já afetava 11.000.000 de pessoas e matava em torno de 200.000. Existe um perigo real que a infecção pelo HIV possa disseminar espécies resistentes de *M. tuberculosis*, provocando uma epidemia mundial (RAVIGLIONE, 2006). Este fato parece evidenciar que, dos fatores responsáveis pela gravidade ameaçadora da tuberculose, merece menção especial a co-infecção com HIV/AIDS, considerada a pior situação em toda sua história natural, em virtude da grave imunodeficiência celular ocasionada por esse vírus. Ocorre um sinergismo com aprofundada reciprocidade de malefícios; de um lado, HIV/AIDS promove a progressão da TB, enquanto esta, através do mecanismo da transativação heteróloga, esgota mais ainda o já fragilizado sistema imune celular, acelerando e agravando o curso daquela retrovírose, com todo o cortejo de afecções oportunistas (TELZAK *et al.*, 1995; GASNER *et al.*, 1999; KHAN *et al.*, 2002; BARROSO, 2002). Segundo projeções da Organização Mundial de Saúde, até 2020 haverá cerca de um bilhão de novos infectados, dos quais duzentos milhões irão adoecer, com 35.000.000 de

óbitos. Esta cifra é tão expressiva quanto a dimensão populacional de vários imponentes e destacados países de qualquer um dos continentes.

Na América Latina, o quadro da doença varia de um país para outro, na dependência de condições sócio-econômicas, da estabilidade política e do desenvolvimento de serviços e programas de controle. É considerada de extrema gravidade no Peru, Bolívia, Equador, Guatemala, El Salvador, República Dominicana, Nicarágua, Honduras e Haiti. Anualmente, são notificados 230.000 casos na América Latina, o que torna mais grave a situação, em virtude da prática subnotificatória existente. Os países com eficientes programas de controle (Cuba, Chile e Uruguai) registram curvas de mortalidade descendente (ROSEMBERG, 1999). As taxas de notificação por 100.000 habitantes em 2002 foram de 8 para Cuba, 16 para Chile, 16 para Uruguai, 17 para México, 25 para Venezuela e 30 para Argentina (TEIXEIRA, 2004).

O quadro epidemiológico da tuberculose no Brasil é considerado muito grave. Segundo dados do Programa Nacional de Controle de Tuberculose, do Ministério da Saúde, cerca de 60 milhões de pessoas estão infectadas pelo bacilo da tuberculose, com uma média de 5.000 óbitos a cada ano. O país apresentou 110.000 casos em 2002 e ocupa o primeiro lugar em incidência da doença na América Latina e o 15º lugar entre os 22 países com mais casos de TB no mundo, que respondem por 80% dos doentes. Este grupo é liderado pela Índia com 1.761.000 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE - PROGRAMA DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE TUBERCULOSE, 2008). Um dos fatores responsáveis por esses dados é a desigualdade social, que pode ser claramente entendida ao se imaginar que na década de 60, os 10% mais ricos se apropriavam 34 vezes mais da renda nacional, enquanto que, na década de 90, esse dado percentual teve seu registro duplicado (COHN, 1997). Segundo relatório do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), de 15 de maio de 2008, os 10% mais pobres pagam 32% de sua renda em impostos e contribuições, enquanto os 10% mais ricos pagam somente 22% e concentram 75% da riqueza e da renda nacional (POCHMANN, 2008).

Após ter declarado a tuberculose como uma emergência mundial, em 1993 (GRANGE; ZUMIZ, 1999), a OMS passou a desenvolver e promover o programa de gerenciamento supervisionado — DOTS (*Directly Observed Treatment Short-Course*), em 1994-1995, que se constitui de: a) compromisso governamental; b) diagnóstico através de microscopia; c) tratamento estandardizado e supervisionado; d) suprimento das drogas, sem

interrupção; e) regular monitoramento. Não é um programa inédito, pois modelos semelhantes, inclusive o do Brasil, já utilizavam quimioterapia de curta duração, supervisionada. O que existe de novo é o entusiasmo, a ênfase, os recursos empregados, o marketing, tornando-o um programa oportuno e factível de operacionalização em qualquer país (CHOWDHURY, 1999).

Em 2005, a OMS aprovou o chamado *Stop TB Strategy*, cujos alvos foram definidos temporalmente, conforme se segue: **1)** para 2005: detectar, pelo menos, 70% dos casos de TB com o exame de escarro (BAAR) e curar, pelo menos, 85% destes casos; **2)** para 2015: reduzir em 50% a prevalência da doença e de mortes em relação a 1990; **3)** para 2050: eliminar a tuberculose como um problema de saúde pública, o que significa uma incidência de menos de 1 caso por 1.000.000 de habitantes (RAVIGLIONE; UPLEKAR, 2006).

Na década de 70, a quimioterapia com tempo de duração encurtado ofereceu uma perspectiva de erradicação da doença. Já na década seguinte, com o aparecimento da pandemia de HIV, ficou claro que essa associação levaria ao ressurgimento rápido da tuberculose em muitos países, posando como a maior ameaça ao seu controle, e destruindo a esperança da erradicação (OMS, 1989). Durante os anos 90, a tuberculose multidrogarresistente (TB-MDR) passou a receber uma especial atenção das autoridades mundiais, devido a vários fatores, dentre os quais, o surgimento de alguns surtos nosocomiais, ocorridos nos Estados Unidos da América (PERASON *et al.*, 1992). Sua rápida disseminação leva ao temor de comprometer o sucesso adquirido com DOTS (BROWN, 2004).

A carga de sofrimento e a perda econômica causadas pela tuberculose chegam a afrontar a consciência da comunidade científica, principalmente por se tratar de doença prevenível e curável (OMS, 2006). Segundo Mario Raviglione, diretor da *WHO's Stop TB Department*, o tratamento da forma sensível da TB custa menos de 10 dólares por mês, enquanto para TB-MDR este valor figura entre 500 e 6000 dólares (BROWN, 2004). Mais recentemente, em 2005, um novo capítulo foi adicionado ao já tão fragilizado controle da doença, quando uma forma quase intratável da doença passou a ser registrada, chamada TB-XDR (*Extensively Drug-Resistant – TB*), resistente à rifampicina e isoniazidaa (que se define como MDR), e também, à fluoroquinolona e, pelo menos uma das três drogas de 2ª linha injetáveis: amicacina, canamicina ou capreomicina (RAVIGLIONE; SMITH, 2007).

1.3 Aspectos imunológicos

A imunidade mediada por células desempenha um papel fundamental no controle da tuberculose, assim como dos demais patógenos intracelulares. A maioria das pessoas infectadas tem a infecção primária e desenvolve uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia duas a dez semanas depois da exposição ao bacilo. Os principais mecanismos utilizados para destruir o bacilo são o resultado de uma série de interações ocorridas nos fagócitos, mediadas por citocinas (PARKIN; COHEN, 2001).

O controle imunológico do *M. tuberculosis* se baseia na resposta tipo Th1. Uma vez ocorrida a fagocitose do *M. tuberculosis*, IL-12 é liberada do macrófago, sendo responsável pela diferenciação do linfócito Th0 em Th1 (LIN; ZHANG; BARNES, 1998; MANCA *et al.*, 2001). A resposta CD4+Th1 consiste na produção de Interleucina-2 (IL-2) e IFN- γ , que auxiliarão o macrófago a vencer a luta contra o bacilo (NEWPORT *et al.*, 1996). Se a via Th1 não tiver ação predominante, a estimulação de linfócitos T CD4+Th2 desencadeará a produção de interleucina-4 (IL-4) e interleucina-5 (IL-5), citocinas envolvidas na contra-regulação negativa e conseqüente inibição do eixo Th1. Esta resposta é considerada lesiva para o hospedeiro, podendo caracterizar a evolução para doença. Torna-se tão importante e crítico para a micobactéria residir dentro do macrófago para perpetuar a infecção, quanto para o hospedeiro, na perspectiva de eliminá-la, através da ativação de mecanismos microbicidas (APELBERG, 1997; MAES; CAUSSE; MAES, 1999; HUSSAIN *et al.*, 2001).

A resposta imune de todos os patógenos, pelo menos em parte, depende de citocinas que regulam todas as células do sistema imune (LA CAVA, 2003). Com o *M. tuberculosis*, esta resposta modula a reação inflamatória, sendo crucial para o controle da infecção, assim como pode contribuir para o surgimento da doença e para sua cronificação (YAMAMURA *et al.*, 1992; APELBERG, 1997).

1.3.1 Citocinas

Citocinas são proteínas ou glicoproteínas imunomodulatórias, produzidas por uma variedade de células, com múltiplas e complexas atividades. Elas atuam ativando genes, que positiva ou negativamente podem controlar ou modular a função da célula alvo promovendo a

divisão, o crescimento, a diferenciação, a migração ou a morte celular. Agem por intermédio de ligações a receptores específicos presentes nas superfícies celulares, tendo a rede funcional de citocinas um papel central na homeostase do sistema imune, de maneira que variações de suas concentrações fisiológicas podem levar a uma resposta imune anormal (HIBI; HIRANO, 1998; ONISHI; NOSAKA; KITAMURA, 1998; IHLE *et al.*, 1998; RUBINSTEIN *et al.*, 1998; BIDWELL *et al.*, 1999).

As citocinas envolvidas no processo inflamatório são produzidas por tipos celulares diferentes, particularmente, pelas células mononucleares, atuando de forma complexa e coordenada, podendo estimular ou inibir sua própria síntese, assim como, de outras citocinas e de seus receptores. Além disso, as citocinas atuam em conjunto, sendo comum haver sobreposição e redundância funcionais entre as mesmas (BALKWILL; BURKE, 1989; ELIAS; ZITNIK, 1992; FRASER; LILL; FINGLIN, 1996).

Algumas citocinas estão mais intimamente implicadas na resposta imune da infecção tuberculosa. À luz dos dados clínicos e experimentais, o IFN- γ é a citocina-chave no controle da tuberculose; é produzida por ambas as células TCD4 e TCD8, assim como por células NK. Existe evidência da produção de IFN- γ dependente de IL-12, a partir de macrófagos alveolares infectados com a micobactéria. Apesar de isoladamente ser ineficiente para controlar a infecção pelo *M. tuberculosis*, o IFN- γ é considerado indispensável à resposta protetora do hospedeiro contra este patógeno (HOLLAND, 2000; FLYNN; CHAN, 2001).

Com referência ao fator de necrose tumoral (TNF- α), acredita-se que esta citocina desempenha múltiplos papéis nas respostas imune e patológica da TB. O requerimento do TNF- α no controle da infecção micobacteriana é complexo, agindo na mediação da ativação do macrófago. Ademais, seu sinergismo com o IFN- α induz a expressão de iNOS, tão necessário à ação anti-micobacteriana (HUSSAIN *et al.*, 2001).

Ainda é discutível o papel da IL-10 na modulação imunopatológica da TB. Sabe-se que essa citocina tem sido considerada, em contraste com TNF- α , um agente antiinflamatório. Produzida por macrófagos e células T durante a infecção tuberculosa, a IL-10 possui a propriedade de promover regulação negativa da produção de IL-12, que, por seu turno, diminui a produção de IFN- γ por células T, sendo, portanto, de importância, na ativação maior ou menor do eixo Th1 ou Th2 (FLYNN; CHAN, 2001).

A interleucina-6 é produzida por um vasto repertório de células, incluindo macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, neuronais, mastócitos e células CD4Th2. As células apresentadoras de antígenos representam a maior fonte conhecida de IL-6. Pouco tem sido estudado a respeito de seu papel na tuberculose. Sabe-se, entretanto, que esta citocina desempenha múltiplas ações, sendo as mais relevantes na inflamação, na hematopoiese e na diferenciação de células T e B (VAN SNICK, 1990; FITZPATRICK; BRADEN, 2000).

Clonada em 1986, a interleucina-6 tem algumas de suas ações baseadas nos princípios da redundância e pleiotropia, e calcadas na utilização de seu receptor, que na verdade é um complexo sistema constituído por duas cadeias polipeptídicas: um receptor de 80kDa - IL-6R e um transdutor de sinal de 130 kDa - gp130. O receptor de 80 kDa existe em duas formas: uma transmembrana e outra solúvel. A forma transmembrana, sob estimulação por sua ligação com a molécula de IL-6, dispara uma associação com gp130. O receptor solúvel forma um complexo estimulatório com IL-6, podendo se associar com gp130 e disparar eventos celulares, chamado de transsinalização (TAGA *et al.*, 1989, VAN SNICK, 1990; AKIRA; TAGA, 1992; HASEGAWA *et al.*, 1998; KISHIMOTO).

Alguns comentários devem ser feitos sobre a IL-6 para que se possa melhor conhecê-la. Diferentemente das demais, é a citocina que apresenta função endócrina mais pronunciada (PEREIRA, 1998; PAPANICOLAU; VGONTZAS, 2000), sendo, portanto, chamada de citocina endócrina (HARRIS *et al.*, 1999). Em razão de ter ação endócrina, torna-se muito relevante sua dosagem no sangue periférico, significando um real reflexo do que ocorre em seus sítios de produção. A IL-6 é o principal estímulo à produção de proteínas da fase aguda da inflamação, particularmente a Proteína C Reativa, um dos principais marcadores da resposta inflamatória (GABAY, 1999), podendo sua elevação sérica ser interpretada como um aumento indireto de IL-6. Níveis séricos aumentados de IL-6 e de proteína C reativa têm sido associados com mortalidade em idosos saudáveis (HARRIS *et al.* 1999).

Níveis circulantes elevados de IL-6 estão fortemente relacionados com elevação dos lípides sanguíneos e da pressão arterial, assim como com a resistência à insulina (FERNÁNDEZ-REAL *et al.*, 2000 e 2001). O efeito da IL-6 na cascata da coagulação, através de sua ação nas plaquetas e na ativação do fibrinogênio, justifica sua importância como um dos possíveis agentes causais dos estados de hipercoagulabilidade

(FERNANDEZ-REAL *et al.*, 2001; SUGAWARA *et al.*, 2001); por ilação, como grande parte de pacientes com vasculopatia diabética têm aumento de plaquetas, pode-se especular que IL-6 seria um dos fatores responsáveis por esse incremento. Järemo e Nilsson demonstraram que pacientes que sofreram de infarto agudo do miocárdio e que sobreviveram por mais de 8 anos tinham os níveis mais baixos de IL-6, em relação àqueles que tiveram curta sobrevida (JÄREMO; NILSSON, 2008).

Conhece-se o papel da IL-6 na regulação do metabolismo ósseo como um agente estimulador de osteoclastos, tendo importante significado etiológico nas lesões líticas do mieloma múltiplo, assim como um preditor de resposta clínica (33 KAWANO *et al.*, 1988). Semelhante papel exerce também na Doença de Castleman (YOSHIZAKI *et al.*, 1989). Concentração elevada de IL-6 foi demonstrada no soro de pacientes portadores de Síndrome de Sjögren (SS), sendo significativamente maior entre os pacientes com doença celíaca associada, com neuropatia periférica, com alveolite ou fibrose pulmonar, assim como naqueles com comprometimento salivar (HULKKONEN *et al.*, 2001). Paralelamente, a IL-6 se mostrou elevada na lágrima dos portadores de SS (TISHLER, 1998). Trabalhos existem mostrando a participação de IL-6 na Esclerose Sistêmica (ES), principalmente quando associada de fibrose pulmonar (HASEGAWA *et al.*, 1998). Tal achado foi também demonstrado em outro estudo, tendo os autores encontrado um significativo aumento de IL-6 em portadores de ES (CORREIA *et al.*, 2006).

Alguns estudos experimentais demonstram a elevação de IL-6 tanto na fase de resposta imune precoce, quanto na resposta tardia. As concentrações de IL-6 foram mensuradas e comparadas com estudo histopatológico em modelo murino de TB induzida por instilação intratraqueal de espécies viáveis de *Mycobacterium H37-Rv*. As dosagens foram feitas no homogenato de tecido pulmonar. Dois picos de concentração foram encontrados: o primeiro no 3º dia após a injeção da micobactéria coincidindo com o encontro de infiltrado inflamatório intersticial e intra-alveolar; o segundo pico foi registrado no 21º dia, correspondendo à formação de granuloma. No 2º pico (21º dia) quando o granuloma se achava plenamente maduro, foi observado o pico máximo de IL-6 sugerindo que a TB pulmonar está relacionada com a produção de IL-6, sendo ratificada por relevantes alterações histopatológicas particularmente a formação do granuloma (HERNANDEZ-PANDO *et al.*, 1998).

Um outro estudo realizado na Austrália conseguiu documentar que IL-6 é importante na fase precoce da resposta imune. Usando também um modelo murino com animais depletados (*knockout*) de IL-6, os autores observaram uma reduzida produção de IFN- γ e um aumento da produção de IL-4. A IL-6 age juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias, com TNF- α e também com IL-1 para iniciar a resposta inflamatória precoce. Isto sinaliza que a ausência de IL-6 induz um retardo da imunidade protetora com conseqüente aumento da carga bacteriana. Concluíram os autores que a IL-6 é requerida para iniciar a resposta muito precoce dirigida pelo IFN- γ e que limita o crescimento bacteriano (SAUNDERS, 2000).

Sabe-se que o IFN- γ é um ativador predominante das funções microbidas dos macrófagos para matar patógenos intracelulares como *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani* e *Legionella pneumophila*. Na tuberculose em adição ao efeito direto da micobactéria nos macrófagos em resposta ao IFN- γ , os macrófagos adjacentes aos infectadas são incapazes de responder normalmente ao IFN- γ . Isto ocorre porque os macrófagos infectados sintetizam e secretam IL-6 e esta citocina tem a propriedade de inabilitar o IFN- γ quanto a sua função de erradicar a infecção micobacteriana. Assim, a IL-6 ao ser induzida pela infecção micobacteriana dos macrófagos, contribui para inibição da resposta dos mesmos ao IFN- γ (NAGABHUSHANAM *et al.*, 2003).

Significantes quantidades de IL-6 são produzidas em resposta à infecção pelo *M. tuberculosis* tanto em modelo murino como já citado, quanto em humanos (GIACOMINI *et al.*, 2001). Ladel *et al.*, 1997 sugeriram que IL-6 fosse uma citocina pró-inflamatória crucial durante a infecção aguda. Além dos mencionados estudos *in vitro*, as concentrações de IL-6 se mostraram elevadas em efusão pericárdica (BURGESS *et al.*, 2002), no fluido de lavado broncoalveolar (TSAO *et al.*, 1999) e em efusão pleural (NEKTARIA *et al.*, 2002; WONG *et al.*, 2003). Em outro estudo, a dosagem de IL-6 no catarro e no soro de pacientes com tuberculose ativa foi comparada com aquela obtida em pacientes com pneumonia bacteriana e indivíduos saudáveis PPD positivo, sendo relatada elevação desta citocina nos pacientes com TB (RIBEIRO-RODRIGUES *et al.*, 2002). Da mesma maneira, IL-6 foi dosada no sangue periférico de 25 pacientes com infecção com bacteriana crônica, sendo que 13 deles tinham tuberculose, sendo observado aumento de seu nível na população com TB (POVEDA *et al.*, 1999).

Já foi demonstrado que a resposta imune global à antígenos do *M. tuberculosis* está diminuída na TB-MDR quando comparada com TB-S, entretanto a correlação entre os níveis de citocinas e o tempo de doença ou o perfil de resistência não foi detectado (FORTES *et al.*, 2005). Estes autores estudaram a resposta da TB-MDR e os níveis de IFN- γ e TNF- α . Estes achados foram importantes na decisão de se estudar no presente trabalho a dosagem de IL-6 em pacientes com TB-S e compará-la com portadores de TB-MDR.

A participação de um componente genético atuando na susceptibilidade ou resistência à tuberculose tem sido suspeitado por muitos anos (BELLAMY; ADRIAN, 1998); a presença deste componente na variação observada entre indivíduos e sua resposta ao *M. tuberculosis* foi ratificada por vários estudos, podendo-se citar, dentre eles, um realizado em gêmeos africanos (JEPSON *et al.*, 2001); da mesma maneira, realça-se este fenômeno pelo relato da seletiva expressão local de citocinas do subtipo Th1 associada com formas auto-resolutivas da tuberculose pleural, em contraste com a forma miliar da doença (SHARMA; MITRA; BALAMURUGAN, 2002).

1.4 Polimorfismo gênico

Ao tempo que o Beagle deixou as águas da bela e remota Ilha Galápagos, no Oceano Pacífico, Charles Darwin ainda não tinha percebido que as variações naturais dentro das espécies proveriam os meios para a compreensão de sua teoria da evolução. Mais tarde, em 1836, decorridos 5 anos desde o início da expedição, o famoso naturalista chegava à Inglaterra levando na bagagem um conjunto de idéias revolucionárias que mudariam para sempre a geografia da alma humana, tanto quanto Cristóvão Colombo mudou a geografia terrestre. Em 1859, Darwin apresentou ao mundo sua obra prima “A Origem das Espécies e a Seleção Natural”. Ao analisar a diversidade existente entre as 13 diferentes espécies de tentilhão, Darwin reconheceu que a variação era a matéria bruta para explicar a seleção natural (DARWIN, 2003).

Essa habilidade à adaptação para mudança de condições é, também, muito bem ilustrada pelo desenvolvimento de resistência bacteriana (WOODFORD; ELLINGTON, 2007). A grande diferença se relaciona com o espaço de tempo que ocorre a mudança, pois a

seleção natural ocorre lentamente, enquanto o aparecimento da resistência bacteriana pode ser rápido, às vezes em horas ou minutos. A relevância dessa diversidade pode ser exemplificada pela importante característica do genoma humano de dois indivíduos não parentes compartilharem em torno de 99,9% de suas seqüências de DNA (VENTER; ADAMS; MYERS, 2001).

Sabe-se que em torno de 75% do genoma humano é constituído de seqüências de nucleotídeos que se repetem muito pouco, sendo denominadas de seqüências simples. Os genes que codificam para polipeptídeos localizam-se nas seqüências simples do DNA, e correspondem a 2% a 3% do DNA genômico. Todo o restante é composto por DNA repetitivo, representado por seqüências que se apresentam em *tandem*, ou melhor, com uma repetição seguida de outra, dispersas ao longo do genoma. O tamanho da seqüência que se repete, ou seja, o número de repetições em *tandem*, classifica a categoria do *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) em: i) DNA satélite, que corresponde a seqüências extensas (100 a 6500 pb), presentes em grande parte próximo ao centrômero dos cromossomos; ii) DNA minissatélite (10 a 100 pb para cada unidade de repetição), presente nos telômeros; iii) DNA microssatélite, o mais freqüente tipo de DNA repetitivo, apresenta seqüências muito pequenas de repetição (1 a 13 pb), distribuídas ao longo de todo genoma. A posição dos VNTR's é constante no genoma humano, mas o número de seqüências repetidas em cada VNTR é bastante polimórfico, variando, pois, de indivíduo para indivíduo (SUTHERLAND; RICHARDS, 1994; TAUTZ; SCHLOTTERER, 1994 HOUSMAN, 1995). Como já exposto acima, essa variação, que *ab initio*, parece pequena, passa a ter grande importância se enfocada à luz dos 3 bilhões de pares de base que constituem o genoma humano (GUTTMACHER; COLLINS, 2002; BURKE, 2002).

As citocinas, como já dito, estão envolvidas em muitas doenças. Algumas citocinas tem ação primordialmente pró-inflamatória, enquanto outras são predominantemente anti-inflamatórias. Assim, o equilíbrio em sua produção pode influenciar no surgimento ou mudança evolutiva de doenças auto-imunes, infecciosas ou neoplásicas. Muitos estudos tem sido conduzidos para investigar uma base genética para essas doenças. Sabe-se que o polimorfismo dos genes responsáveis pela produção das citocinas parece influenciar seus níveis de expressão. Os indivíduos diferem com respeito ao seu nível de produção, assim sendo classificados em altos ou baixos produtores de citocina, com consequência na modulação da resposta imune (BIDWELL *et al.*, 1999).

Alguns polimorfismos de TNF- α foram identificados, mas o que diretamente afeta mais a produção está localizado no nucleotídeo de posição -308; este polimorfismo resulta em dois alelos, um definido por guanina (TNF1) e outro, menos comum, por adenosina (TNF2), cujo registro tem sido associado com morbidade e mortalidade de formas graves de malária cerebral (MCGUIRE *et al.*, 1994), com leishmaniose mucocutânea (CABRERA *et al.*, 1995) e com a púrpura *fulminans* que acompanha a doença meningocócica (NADEL *et al.*, 1996). Outras condições são associadas com o polimorfismo de TNF, como rejeição após transplante cardíaco (AZZAWI *et al.*, 2001), renal (SANKARAN *et al.*, 1999) e hepático (BATHGATE *et al.*, 2000), e com outras entidades, como colangite esclerosante primária (BERNAL *et al.*, 1999) e hepatite autoimune (CZAJA *et al.*, 1999). A hiperexpressão de TNF- α também favorece o desenvolvimento da forma wirchowiana de hanseníase (ROY *et al.*, 1997).

Três polimorfismos nucleotídicos foram descritos na região promotora do gene de IL-10 nas posições -1082, -819 e -592. Warlé e col., 2002 descreveram uma significativa associação entre o polimorfismo -1082 IL-10 e rejeição à transplante hepático, sendo que 61% dos pacientes com genótipo GG apresentaram rejeição, enquanto 74% com AA estiveram livres de rejeição.

Polimorfismos dinucleotídicos foram descritos no gene do IFN- γ sendo sugerido que alguns desses polimorfismos estão associados com graus diferentes de produção da citocina (RUIZ-LINARES, 1993; AWATA *et al.*, 1994; PRAVICA *et al.*, 2000). Apesar de isoladamente ser ineficiente para controlar a infecção micobacteriana, o IFN- γ é a citocina-chave no controle da doença, sendo considerada indispensável à resposta protetora do hospedeiro (HOLLAND, 2000; FLYNN; CHAN, 2001). O genótipo TT (+874), relacionado com alta produção de IFN- γ (PRAVICA *et al.*, 2000), foi demonstrado em população turca reduzir o risco de desenvolvimento de tuberculose pulmonar em 30%, enquanto o AA aumenta o risco em 1,41 vezes (SALLAKCI *et al.*, 2007). Estes resultados ratificam associações anteriormente descritas em populações da Itália (LIO *et al.*, 2002), Espanha (ROSSOUW *et al.*, 2003), África do Sul (LOPEZ-MADERUELO *et al.*, 2003) e China (TSO *et al.*, 2005).

O balanço na produção de TNF- α e da IL-10 desempenha um fundamental papel na tuberculose, porquanto estas duas citocinas tem ações antagônicas (KINDLER *et al.*, 1989).

Assim é que este balanço tem sido considerado como responsável pela apoptose ou a sobrevivência do macrófago durante a infecção tuberculosa (ROJAS *et al.*, 1999), significando em última análise, o controle ou a disseminação do *M. tuberculosis* (GERARD *et al.*, 1993). O alelo -1082A de IL-10, correlacionado com uma baixa produção desta citocina após a estimulação de células T “in vitro” (LOPEZ-MADERUELO *et al.*, 2003), foi estudado em população turca e o resultado mostrou que pode influenciar o balanço do eixo Th1/Th2 e a partir daí desempenhar papel na susceptibilidade aumentada, sendo considerado como um fator de risco de desenvolver tuberculose (ÄTES *et al.*, 2008).

Já o alelo -308A do TNF- α foi estudado em população brasileira e o resultado mostrou-o associado com a proteção à tuberculose pulmonar, diferentemente do alelo -238A que esteve associado com a susceptibilidade e gravidade de TB (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Em outro estudo realizado em população russa o nível sérico de TNF- α esteve significativamente maior em pacientes com tuberculose (212 pg/mL) que em controles (12 pg/mL), sendo o raro alelo TNF2 considerado como fator de risco para tuberculose pulmonar infiltrativa (BIKMAEVA *et al.*, 2004).

Alguns estudos de polimorfismos do promotor de IL-6 têm sido descritos e relacionados com doenças cardiovasculares. Em dois desses os autores demonstraram que o genótipo G/G (-174) é produtor de altos títulos desta citocina, em relação aos genótipos G/C e C/C, e que, indivíduos portadores desta variante alélica (GG) tem uma maior susceptibilidade para desenvolver doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral (FERNANDEZ-REAL *et al.*, 2000; FERNANDEZ-REAL *et al.*, 2001). Sabe-se que a aterosclerose compartilha características de doença degenerativa com as de um processo inflamatório crônico (LIBBY, 1995). Níveis mais elevados de IL-6 produzidos nas células vasculares de indivíduos portadores do alelo G, induzem a proliferação de células musculares lisas, a síntese de matrix extracelular, a produção do fator de crescimento derivado de plaqueta (todos abundantes na placa fibrosa), levando à formação de lesões fibromusculares nas paredes dos vasos (TEDGUI; BERNARD, 1994; ROTH *et al.*, 1995). Georges *et al.*, 2001 discutem que esse processo inflamatório crônico poderia ser responsável pela estabilidade da placa, e demonstram que os indivíduos com alelo C tem reduzida transcrição do gene de IL-6 e que a menor secreção desta citocina dentro da placa favoreceria sua instabilidade. Concluem os autores que a variação nos níveis de IL-6 é importante na determinação da estabilidade da placa ateromatosa e que estaria associada com

susceptibilidade de infarto do miocárdio.

O polimorfismo de IL-6 foi estudado em algumas doenças reumáticas, destacando-se o estudo de Fishman *et al.* (1998) em pacientes portadores de Artrite Reumatóide Juvenil Sistêmica (ARJS). Estes pesquisadores ratificaram registros anteriores mostrando que o genótipo CC produz níveis mais baixos de IL-6, quando comparado com GC ou GG, e que a redução na frequência de CC nos portadores de ARJS sugere que este genótipo confere uma influência protetora contra o desenvolvimento da doença. Os autores também afirmaram “é altamente improvável que o polimorfismo de IL-6 (-174) isoladamente represente susceptibilidade para o desenvolvimento de ARJS” (FISHMAN *et al.*, 1998).

Outro estudo foi realizado em 66 pacientes portadores de Síndrome de Sjögren, que tiveram os polimorfismos de IL-6 comparados com os de 400 indivíduos saudáveis. A frequência do alelo G, e também dos níveis sanguíneos de IL-6 estiveram aumentados nos doentes, em relação aos controles nos subgrupos com doença celíaca, acometimento pulmonar e dano neurológico periférico. Os autores concluem que o alelo G determina o nível plasmático da citocina, e sugerem que sua presença pode ser considerada como um fator de risco para as manifestações extraglandulares da SS (HULKKONEN *et al.*, 2001).

Ainda no contexto auto-imune, os mesmos estudos genéticos foram feitos com pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico (LES) em caucasianos americanos. O polimorfismo de IL-6 (-174GC) desempenha papel na susceptibilidade (LINKER-ISRAELI; WALLACE; PREHN, 1999). Já em população caucasiana germânica, não se reconheceu associação entre o mesmo polimorfismo e os acometimentos neuropsiquiátrico e renal da doença, assim como com sua gravidade. Entretanto, foi mostrada uma significativa associação entre o alelo -174G e lesões de lupus discóide (SHOTTE *et al.*, 2001). Em pacientes lúpicos colombianos, os autores não encontraram associação do polimorfismo com susceptibilidade (GUARNIZO-ZUCCARDI *et al.*, 2007).

Análises outras têm sido feitas do polimorfismo de IL-6 com *diabetes mellitus* tipo 2 (QI *et al.*, 2006), com infecção por HIV (SAUMOY *et al.*, 2008), destacando-se, por exemplo, o de Foster e col., que, estudando uma população de indivíduos com HIV/AIDS, sendo 115 portadores de Sarcoma de Kaposi (SK) e 126 sem SK, encontraram uma forte associação do genótipo GG da IL-6 na posição -174 nos pacientes com SK, concluindo que

esta homozigiosidade confere um risco aumentado de desenvolvimento de Sarcoma de Kaposi (FOSTER *et al.*, 2008). Outros estudos de polimorfismo de IL-6 foram realizados, relacionando-o com Linfoma de Hodgkin (LH) em adultos jovens e o risco aumentado de desenvolvimento da doença (CORDANO *et al.*, 2004). Noutro experimento, os autores demonstram que a tendência hereditária de produzir mais IL-6 (alelo G) confere susceptibilidade, enquanto a de produzir níveis mais baixos (alelo C) está fortemente associado com proteção contra LH (COZEN *et al.*, 2004).

Assim, a IL-6 tem sido alvo de estudos visando sua aplicação na prática clínica, pois uma vez bloqueado o sinal que é induzido quando ela se liga com IL-6R, pode se tornar em atrativo objeto terapêutico para doenças cuja participação desta citocina tem sido descrita. Um dos fatos relevantes foi a identificação de um anticorpo monoclonal humanizado chamado de tocilizumab, que se liga com ambas as formas do receptor de IL-6, bloqueando-o e prevenindo toda sinalização transmembrana e os eventos celulares que dela são dependentes (SMOLEN *et al.*, 2008). Bem antes desta descrição, anticorpo anti-IL-6 foi testado com sucesso, para aliviar as manifestações sistêmicas da doença de Castleman (BECK *et al.*, 1994).

Depois, já com o nome de tocilizumab, teve sua eficácia ressaltada em alguns trabalhos, dentre os quais, dois japoneses para tratar a forma multicêntrica da doença de Castleman, tendo sido aprovado no Japão em abril de 2005 para tratamento desta desordem linfoproliferativa (NISHIMOTO *et al.*, 2000; NISHIMOTO *et al.*, 2005). Em outras afecções inflamatórias, o agente bloqueador de IL-6 tem mostrado resultado favorável, como na doença de Crohn (ITO *et al.*, 2004), na doença de Still do adulto (NISHIMOTO; KISHIMOTO; YOSHIZAKI, 2000), e em algumas outras, tornando evidente a importância do aprofundamento do estudo do polimorfismo de IL-6 e sua relação com a produção desta citocina.

O envolvimento de genes humanos na tuberculose tem sido sugerido por numerosas observações epidemiológicas. Vários estudos mostram que o nível de resistência à infecção por *M. Tuberculosis* se correlaciona com a ancestralidade, sendo mais susceptíveis as pessoas que vem de área geográfica livre da doença (STEAD, 1992). Ratifica-se esta assertiva com a descrição do mesmo autor quando mostra que a incidência de tuberculose tem sido particularmente alta durante surtos em populações, tais como americanos nativos, cujos

ancestrais não tiveram contato com a micobactéria (STEAD, 1997).

Análises sobre vários polimorfismos em pacientes portadores de tuberculose têm sido realizadas na tentativa de melhor compreender os mecanismos responsáveis pela doença, e, também, viabilizar o estudo de novas drogas e/ou vacinas que atuem na modulação da resposta imune do hospedeiro, e que possa melhorar-lhes os índices de cura. Na literatura, poucos relatos existem estudando isoladamente o polimorfismo de IL-6 e sua relação com a produção desta citocina na tuberculose. Alguns foram feitos analisando-o, em conjunto com o de outras citocinas. Em trabalho realizado em população colombiana, os autores não encontraram diferença genotípica entre pacientes portadores de tuberculose e controles saudáveis (HENAO *et al.*, 2006). Já AMIRZARGAR *et al.*, 2006 demonstraram uma associação significativa entre o genótipo GG de IL-6 na posição -174 em pacientes iranianos com tuberculose. Selvaraj *et al.*, 2008 estudando uma população indiana com tuberculose não encontraram associação de genótipos de IL-6 -174 com tuberculose, bem como com a produção de IL-6 (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Proporção de genótipos de IL-6 -174G>C em diferentes populações

População estudada	Genótipos	Casos %	Controles %
Brasileiros (tuberculose)		n=42	n=79
	CC	11,9	7,6
	GC	23,8	35,4
	GG	64,3	57,0
Iranianos¹ (tuberculose)		n=40	n=119
	CC	10,0	8,4
	GC	32,5	59,7
	GG	57,5	31,9
Indianos² (tuberculose)		n=166	n=188
	CC	1,9	1,6
	GC	21,9	27,9
	GG	76,2	70,5
Colombianos³ (LES)		n=120	n=102
	CC	7,9	4,9
	GC	29,8	39,2
	GG	62,3	55,9
Alemães⁴ (LES)		n=211	n=158
	CC	17,0	22,0
	GC	47,0	48,0
	GG	36,0	30,0
Anglo-saxões⁵ (ARJ)		n=92	n=383
	CC	11,0	18,0
	GC	59,0	44,0
	GG	30,0	38,0

LES – lúpus eritematoso sistêmico; ARJ – artrite reumatóide juvenil.

¹ AMIRZARGAR *et al*, 2006; ² SELVARAJ *et al*, 2008; ³ GUARNIZO-ZUCCARDI *et al*, 2007; ⁴ SCHOTTE *et al*, 2001; ⁵ FISHMAN *et al*, 1998.

Baseado no interesse que o assunto desperta relativo ao melhor conhecimento da imunopatogênese da tuberculose, cujo resultado poderia também ser utilizado como ferramenta para o advento de novas drogas e/ou vacinas, e reconhecendo o estudo de polimorfismo como de muita importância para este mister, o autor objetiva investigar o perfil de produção de IL-6 na tuberculose pulmonar ativa e o papel funcional do polimorfismo de IL-6 -174G>C do gene de IL-6.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o perfil de produção de IL-6 em pacientes sensíveis e multirresistentes às drogas anti-tuberculose e avaliar o papel funcional do polimorfismo -174 G>C do gene de IL-6 na tuberculose pulmonar ativa.

2.2 Objetivos Específicos

1. Relacionar a produção sistêmica de IL-6 em pacientes com tuberculose pulmonar ativa e indivíduos saudáveis;
2. Comparar a distribuição dos genótipos -174G>C de IL-6 entre pacientes com tuberculose pulmonar ativa e indivíduos saudáveis de mesma região geográfica;
3. Relacionar a produção sistêmica de IL-6 em pacientes com tuberculose pulmonar ativa e em indivíduos saudáveis com os genótipos -174G>C de IL-6;
4. Estratificar os pacientes em sensíveis e multidrogarresistentes e relacioná-los com a produção de IL-6 e com o polimorfismo de IL-6 -174 (G>C).

3 CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 Seleção da amostragem

3.1.1 Pacientes

Os pacientes foram distribuídos em três grupos amostrais:

- i) GRUPO 1: Constituído por 38 portadores de tuberculose pulmonar ativa, com idade entre 20 e 70 anos; este grupo de pacientes foi estudado através da dosagem de IL-6 no sangue periférico;
- ii) GRUPO 2: Formado por 42 pacientes portadores de tuberculose pulmonar ativa, com idades variando de 16 anos a 71 anos. Este grupo foi submetido ao estudo do polimorfismo -174G>C do gene de IL-6.
- iii) GRUPO 3: Formado por 17 pacientes portadores de tuberculose pulmonar ativa, com idades variando entre 16 e 71 anos. Este grupo foi submetido ao estudo funcional do polimorfismo -174G>C do gene de IL-6 (genotipagem e dosagem de IL-6).

Todos os pacientes foram recrutados das seguintes unidades de saúde da rede estadual: Centro de Referência Dona Libânia e Hospitais Geral Dr. César Cals, de Messejana e de Maracanaú.

Nos dois grupos o diagnóstico se baseou em baciloscopia e cultura positivas no escarro; adicionalmente foi realizado estudo da sensibilidade às drogas antituberculose, sendo os pacientes estratificados em dois subgrupos: 1. Sensível às drogas, chamado de Tuberculose Sensível (TB-S); 2. Baciloscopia e cultura positivas no escarro em vigência de tratamento específico e resistente à três drogas, incluindo-se Rifampicina (R), Isoniazida (I), caracterizando a multidrogarresistência, sendo chamado de Tuberculose Multidrogarresistente (TB-MDR) (vide **anexo A**).

Critérios de inclusão:

- 1) Pacientes de ambos os sexos com BAAR e cultura positivos no escarro, em tratamento;
- 2) Ter idade entre 18 e 71 anos;
- 3) Não ser portador de asma, doença do colágeno ou outra doença granulomatosa;
- 4) Não ser portador de HIV/AIDS
- 5) Não ser portador de nefropatia crônica.

Foram **excluídos** os pacientes que apresentavam um dos critérios abaixo:

- 1) Idade acima de 71 anos ou abaixo de 16 anos;
- 2) Baciloscopia (BAAR) negativa, mesmo na presença de lesões radiológicas e quadro clínico sugestivos da doença.
- 3) Asma brônquica;
- 4) Doenças do colágeno (lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, esclerose sistêmica progressiva, síndrome de Sjögren);
- 5) Outras doenças granulomatosas (sarcoidose, doença de Crohn);
- 6) Infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV);
- 7) Nefropatia crônica com proteinúria acima de 3g/24 horas e/ou creatinina acima de 2,4 mg/dL.

3.1.2 Controles

Para o grupo 1 citado acima foram selecionados 63 indivíduos controle, para o grupo 2 foram 79 indivíduos controle e para o grupo 3 foram selecionados 43 indivíduos (Figura 1).

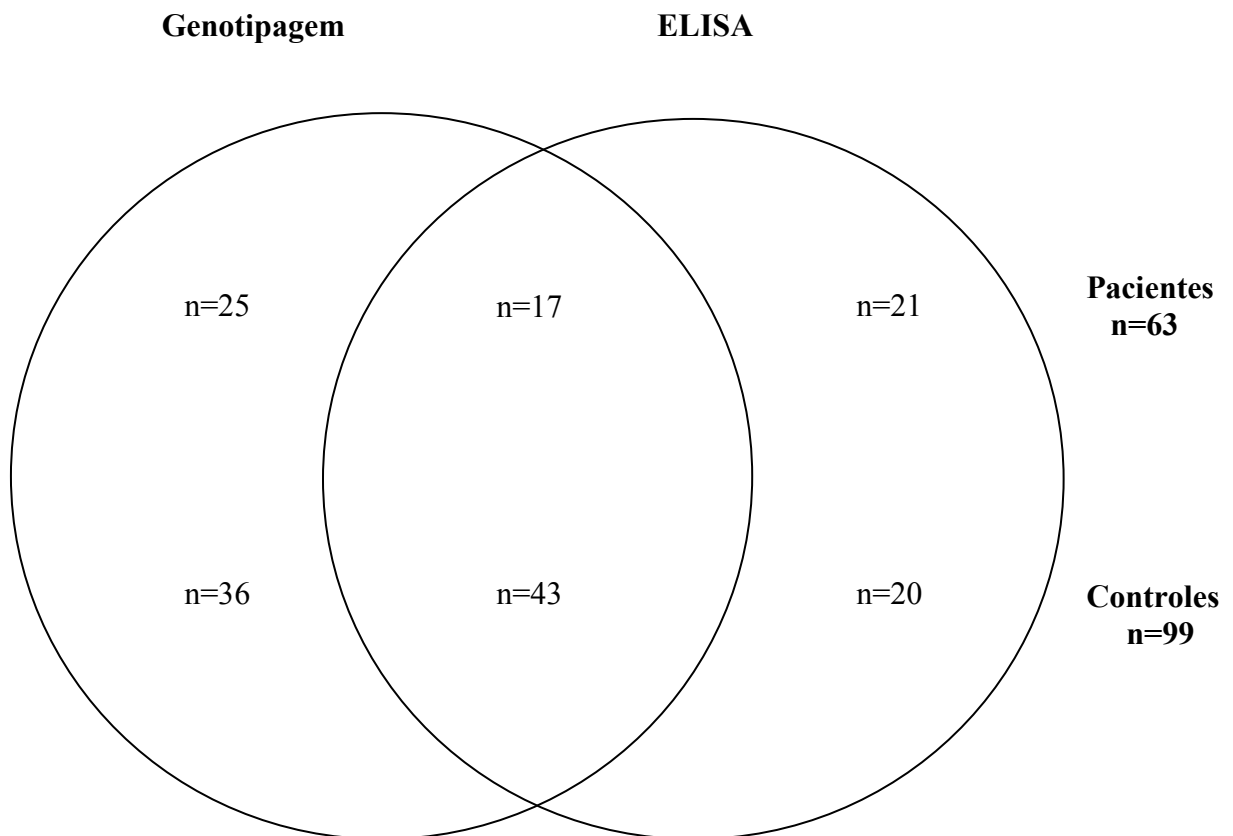


Figura 1 – Distribuição de amostras de pacientes e controles.

Todos os indivíduos controle eram doadores voluntários de sangue do HEMOCE e foram submetidos à avaliação clínica (vide **anexo B**). Ademais, todos apresentaram sorologias negativas para os vírus A, B, C, HIV, HTLV, assim como para sífilis e doença de Chagas.

Todos os pacientes e controles assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**anexo C**), assim como, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Messejana e do Hospital Geral Dr.César Cals na forma da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (**anexo D**) por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde).

3.2 Colheita das amostras

Foram colhidos 5 mL de sangue periférico, utilizando EDTA como anticoagulante. Não foi utilizado sangue heparinizado, pois a heparina pode interferir na amplificação do DNA. Foram utilizados 300 uL de sangue total para a extração de DNA. Enquanto, o restante do volume de sangue total foi centrifugado a 2.000 r.p.m. por 10 minutos e o plasma foi separado e congelado a -20°C para utilização posterior na dosagem da IL-6, conforme orientações do fabricante dos kits de extração de DNA e de dosagens de IL-6.

3.2.1 Dosagem de IL-6

A dosagem de IL-6 foi realizada utilizando-se um ELISA sanduíche conforme orientações da Biosource (Camarillo – Califórnia, USA), fornecedora dos kits. Cada placa continha 96 poços sendo suficiente para dosar 88 amostras, sendo que oito poços foram utilizados para testar amostras padronizadas com dosagens conhecidas da interleucina e traçar uma curva-padrão. Para as dosagens das amostras a serem testadas foram adicionados 100 μL de tampão de diluição fornecido pelos kits ao poço do controle negativo. Em seguida, foram adicionados a cada poço 100 μL de cada amostra de plasma a ser testada. A placa foi coberta e incubada por três horas a 37°C . Após a incubação, cada poço foi aspirado sendo descartada a solução. Cada poço foi lavado e aspirado seis vezes utilizando-se tampão de lavagem fornecido pelo kit. Em seguida, foram adicionados 100 μL do conjugado biotinado anti-IL-6, sendo agitada a placa suavemente para que houvesse homogeneização da solução, sendo coberta e incubada por 45 minutos a temperatura ambiente. Novamente, os poços foram aspirados e lavados com tampão de lavagem por seis vezes. Após as lavagens, foram adicionados a cada poço 100 μL de solução contendo estreptavidina fornecida pelo kit, sendo

a placa coberta e incubada à temperatura ambiente por 45 minutos. Seguiram-se mais seis lavagens. Nesse momento foram adicionados 100 μL em cada poço de solução contendo o cromógeno, tornando, então, a solução de cor azul. Adicionalmente, as placas foram incubadas no escuro por 30 minutos e, por fim, foram adicionados 100 μL de solução de parada da reação, fornecida pelo kit, agitando-a suavemente. A placa foi então levada ao espectrofotômetro para leitura a 450 nm. Os resultados obtidos com as amostras padronizadas foram colocados em um gráfico sendo traçada uma curva-padrão (**Figura 2**). Os resultados obtidos com as amostras testadas foram interpretados em função da curva-padrão.

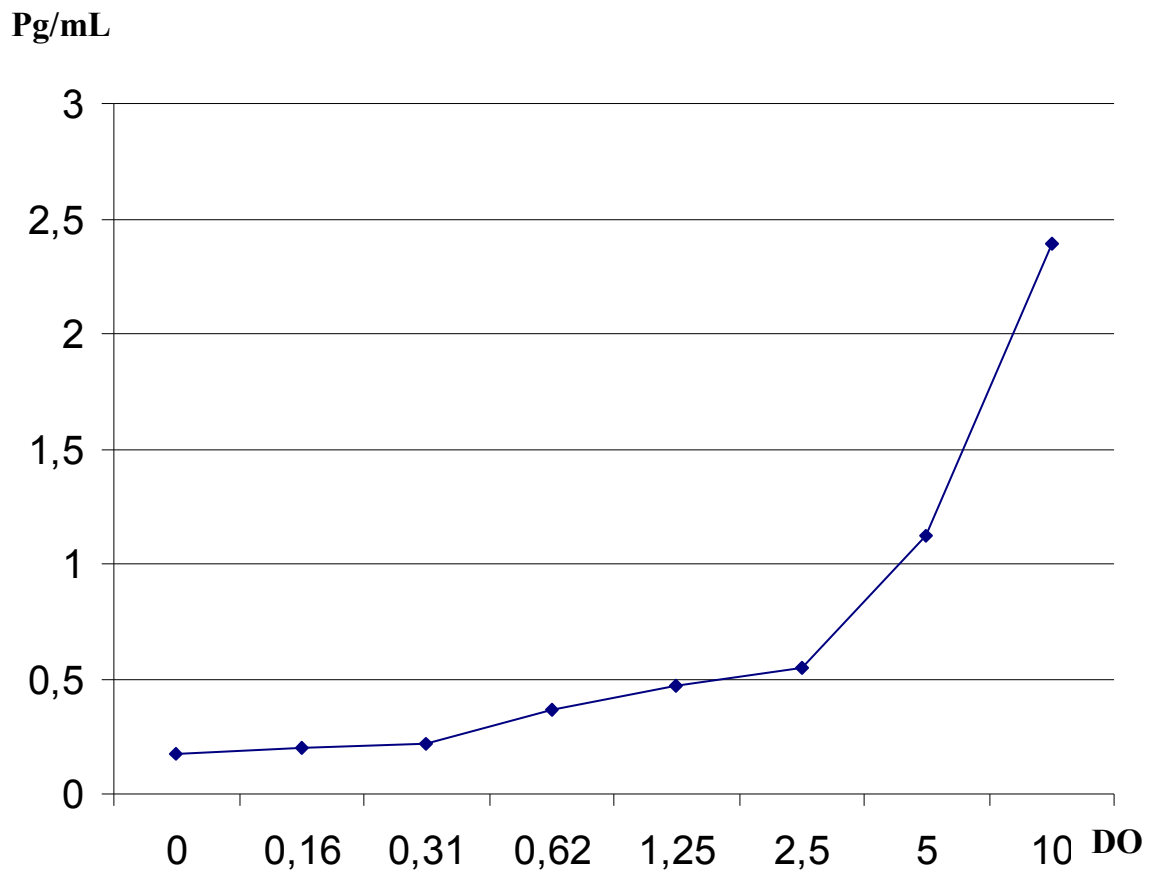


Figura 2 – Curva-padrão de concentrações de IL-6 expressas em densidades óptica (DO) e pg/mL. Leitura realizada a 450nm.

3.3 Polimorfismo do gene de IL-6 (-174G>C)

3.3.1 Extração e Purificação do DNA

O DNA foi extraído e purificado conforme orientações do fornecedor dos kits “Genomic Prep Blood DNA Isolation” (Amersham – Buckinghamshire, UK). Para a lise celular acrescentou-se 300uL de sangue total a um tubo de 1,5mL contendo 900uL de solução de lise de eritrócitos. A amostra foi misturada por inversão do tubo e incubada por 10min a temperatura ambiente; ainda foi invertida uma vez durante a incubação. Em seguida, centrifugou-se a 13000-16000 x g por 20 segundos, removeu-se o sobrenadante com uma micropipeta, deixando o *pellet* de leucócitos com 10-20 uL de líquido residual, passou-se o tubo no vortex vigorosamente para ressuspender os leucócitos no resíduo de sobrenadante e acrescentou-se 300 uL de solução de lise celular ao tubo contendo as células ressuspendidas, pipetando-se acima e abaixo para lise celular. Para precipitação de proteínas, adicionou-se 100uL da solução de precipitação e levou-se ao vortex vigorosamente por 20s, centrifugando-se a 13000-16000 x g por 3 minutos. Um *pellet* escuro foi formado com o precipitado de proteínas. Para a precipitação do DNA, escoou-se o sobrenadante cuidadosamente em um tubo de 1,5mL contendo 300uL de isopropanol a 100%. Inverteu-se gentilmente cerca de 50 vezes e centrifugou-se a 13000-16000 x g por 1 minuto. Escoou-se o sobrenadante e secou-se o tubo em papel absorvente. Acrescentou-se 300uL de etanol a 70% e inverteu-se o tubo várias vezes para lavar o DNA. Centrifugou-se a 13000-16000 x g por 1 minuto e escoou-se o etanol cuidadosamente sendo secado o tubo em papel absorvente por 10-15 minutos. Adicionou-se 100uL de solução de hidratação do DNA e deixou-se “overnight” para reidratação.

3.3.2 Tipificação do polimorfismo de gene de IL-6 (-174G>C)

O DNA foi amplificado por intermédio da reação da polimerase em cadeia, utilizando iniciadores com seqüências específicas, utilizando kits da “One-Lambda” (Canoga Park, CA, EUA), conforme as orientações do fornecedor. Inicialmente, foi acrescentado 1µL do diluente do DNA (H₂Odd) no poço referente ao controle negativo. Em seguida, foi acrescentado 1µL da Taq-polimerase (Gibco, EUA) (5 U/µL) ao tubo contendo o D-mix (180 µL), agitando-se vigorosamente por 5 segundos. Dessa solução foram retirados 9 µL e acrescentados ao poço do controle negativo. Em seguida, foram acrescentados 19 µL de

solução contendo DNA, na concentração de 100 ng/ μ L, à solução D-mix/Taq-polimerase, sendo então, agitada vigorosamente por 5 segundos. Foram então, adicionados 10 μ L dessa solução em cada poço contendo os iniciadores com seqüências específicas, exceto no poço do controle negativo. Esse material foi colocado no termociclador (PE-9600 - Perkin-Elmer – San Francisco, EUA) para amplificação do DNA, que ocorria em três etapas. Inicialmente, a amostra era aquecida a 96°C, por 10 segundos, para que ocorresse a desnaturação do DNA, ou seja, separação das fitas complementares. A seguir, a reação era resfriada a 59°C, por 50 segundos. Nessa etapa, os iniciadores, um par de oligonucleotídeos complementares às extremidades do trecho de DNA a ser amplificado, hibridizavam-se às respectivas extremidades das fitas despareadas de DNA. E, por fim, a reação era aquecida a 72°C, por 30 segundos, quando a Taq-polimerase acrescentava nucleotídeos em seqüência aos iniciadores, formando uma fita complementar, nos moldes das duas originais, completando um ciclo. Foram realizados 30 ciclos de amplificação. A tipificação do polimorfismo do gene da IL-6 foi realizada por intermédio de 3 reações de amplificação por indivíduo, sendo uma reação para controle negativo (controle interno, β -globina) e duas reações para IL-6.

3.3.3 Resolução dos fragmentos em gel de agarose

Os produtos da reação de polimerização em cadeia foram visualizados por eletroforese em gel de agarose conforme orientações contidas no kit de amplificação (One-Lambda, Canoga Park, CA, EUA). O gel de agarose preparado com a adição de 1,75g de agarose e 5mL de tampão 5X TAE (Tris-HCL, pH = 7,5, 10mM; NaEDTA, pH = 8.0, 1mM) a 250 ml H₂Odd. A agarose foi dissolvida por ebulição e resfriada a 60°C, com posterior adição de 12,5 μ L de brometo de etídeo a 1,0%, misturada e despejada na placa, deixando em repouso por 1 hora, a temperatura ambiente. Um gel de 12x8 cm foi colocado em cuba de eletroforese (Pharmacia cell GNA200 – Upsalla, Suécia), com o nível da solução tampão (tampão 5X TAE) de 2 a 3 mm acima da superfície do gel, em ordem padronizada dos iniciadores e, finalmente, o controle negativo. Seguiu-se a eletroforese por 15-25 minutos, a 170 V (aproximadamente 0.4V/cm²). Terminada a eletroforese, o gel foi colocado em um transiluminador luz UV de 312 nm (Hybaid, EUA) e fotografado para documentação e interpretação (**Figura 7**).

3.3.4 Interpretação dos perfis polimórficos

A interpretação das bandas obtidas a partir do kit OneLambda foi realizada empregando a tabela de interpretação fornecida pelo fabricante (**anexo E**).

3.4 Análise estatística

Os valores das dosagens de IL-6 encontrados no grupo de pacientes e no grupo de indivíduos controle foram comparados utilizando-se o teste de Mann-Whitney, considerando-se que trata-se de amostras com distribuição não normal. As comparações entre as frequências dos alelos e dos genótipos de IL-6 foram realizadas utilizando-se o teste bicaudal de Fisher. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

Ao total foram estudadas 162 amostras das quais 63 eram de pacientes e 99 de controles. O grupo 1 foi constituído por 101 amostras, sendo 38 casos e 63 controles. O grupo 2 foi constituído por 121 amostras, sendo 42 casos e 79 controles.

4.1 Grupo 1

Dentre os 38 casos estudados neste grupo, 25 (65,8%) eram do sexo masculino e 13 (34,2%) do feminino, com idades variando entre 20 e 70 anos e mediana igual a 44 anos. Dos 63 controles estudados 51 (81%) eram masculino e 12 (19%) eram femininos, com idades entre 19 e 50 anos e mediana igual a 26 anos (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Caracterização demográfica dos indivíduos do grupo 1 segundo o sexo e a idade.

Características demográficas	TB (n =38)	TB-S (n =23)	TB-MDR (n =15)	Controles (n = 63)
Masculino	25 (65,8%)	16 (73,9%)	9 (60%)	51 (81%)
Feminino	13 (34,2%)	7 (26,1%)	6 (40%)	12 (19%)
Faixa etária	20-70 anos	20-70 anos	22-59 anos	19-50 anos
Mediana	44 anos	38 anos	46 anos	26 anos

TB tuberculose; TB-S tuberculose sensível; TB-MDR tuberculose multirresistente.

As dosagens de IL-6 estão demonstradas na **figura 3**. A mediana da concentração de IL-6 nos casos foi de 4,3pg/mL, enquanto que nos controles foi de 0,5pg/mL, conferindo

significância estatística com $p < 0,001$. Quando os casos foram estratificados de acordo com o teste de sensibilidade às drogas anti-tuberculose, as medianas de concentrações de IL-6 encontradas foram: 4,1pg/mL e 5,1pg/mL para TB-S e TB-MDR, respectivamente, sem diferenças estatísticas.

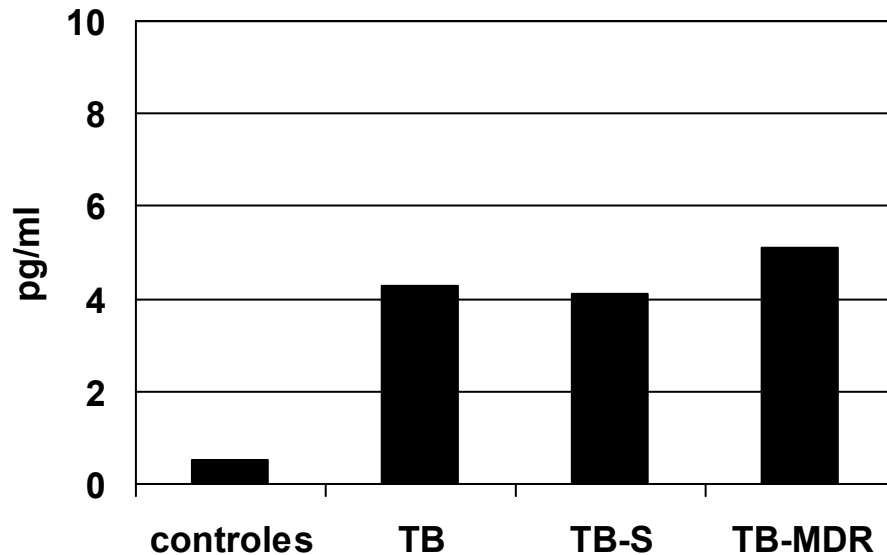


Figura 3 – Concentrações de IL-6 em soro de indivíduos do grupo 1, controles e pacientes com tuberculose (TB), sensíveis (TB-S) e multirresistentes (TB-MDR) às drogas anti-tuberculose. As concentrações de IL-6 estão apresentadas em medianas; $p < 0,001$ para TB vs controles, TB-S vs controles, TB-MDR vs controles; $p > 0,05$ para TB-S vs TB-MDR.

4.2 Grupo 2

Dentre os 42 casos estudados neste grupo, 25 eram do sexo masculino (60%) e 17 do feminino (40%), com idades variando entre 16 e 71 anos (mediana = 44,5 anos), conforme **Tabela 3**. Dos 79 indivíduos saudáveis, 62 eram do sexo masculino (78,5%) e 17 do feminino (21,5%), com idades compreendidas entre 19 e 51 anos (mediana = 27 anos), demonstrados na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Caracterização demográfica dos indivíduos do grupo 2 segundo o sexo e a idade.

Características Demográficas	TB (n =42)	Controles (n = 79)
Masculino	25 (60%)	62 (78,5%)
Feminino	17 (40%)	17 (21,5%)
Faixa etária	16-71 anos	19-51 anos
Mediana	44,5 anos	27 anos

TB – tuberculose.

Todos os pacientes do grupo 2 foram submetidos ao estudo do polimorfismo de IL-6 na posição -174. A frequência dos genótipos CC, GC e GG foi de 5 (11,9%), 10 (23,8%) e 27 (64,3%), respectivamente. Nos indivíduos controle a frequência dos genótipos CC, GC e GG foi de 6 (7,60%), 28 (35,40%) e 45 (57%), respectivamente, como mostrado na **tabela 4**. Não houve diferença estatística entre estas frequências (vide **anexo G**).

Tabela 4 – Distribuição dos genótipos nos pacientes e nos controles do grupo 2.

Genótipo	TB (n =42)	Controles (n = 79)
C/C	5 (11,9%)	6 (7,6%)
G/C	10 (23,8%)	28 (35,4%)
G/G	27 (64,3%)	45 (57,0%)

TB – tuberculose; $p > 0,05$ – teste de Fisher.

4.3 Grupo 3

Em 17 pacientes foi também realizada a dosagem sérica de IL-6 para estudo funcional do polimorfismo. Este grupo era constituído por 8 (47%) indivíduos do sexo masculino e 9 (53%) do feminino, com idade entre 25 e 71 anos (mediana=51). A dosagem sérica de IL-6 variou de 0,5 a 12 pg/mL, com mediana de 4,1 pg/mL. Da população controle, constituída por 43 indivíduos a dosagem de IL-6 foi realizada no sangue periférico. O resultado do polimorfismo, assim como as dosagens de IL-6 encontradas nos pacientes e nos indivíduos controle estão demonstradas na **tabela 5**.

Tabela 5 – Características demográficas, distribuição dos genótipos de IL-6 -174G>C e níveis séricos de IL-6 em indivíduos do grupo 3, casos e controles.

	Genótipo de IL-6 (-174G>C)			p
	G/G	G/C	C/C	
Tuberculose				
N	10	7		
Idade (mediana)	51	51		>0,05
Sexo, % masculino	40	57		>0,05
Níveis de IL-6 (mediana - pg/mL)	4,1	0,6		0,04
Controles				
N	27	16		
Idade (mediana)	26	25		>0,05
Sexo, % masculino	78	94		>0,05
Níveis de IL-6 (mediana - pg/mL)	0.6	0.6		>0,05

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para análise estatística.

Os valores de IL-6 encontrados em indivíduos controle apresentaram variação de 0-2,8 pg/mL, com mediana de 0,60 pg/m. Estes dados são mostrados na **figura 4**.

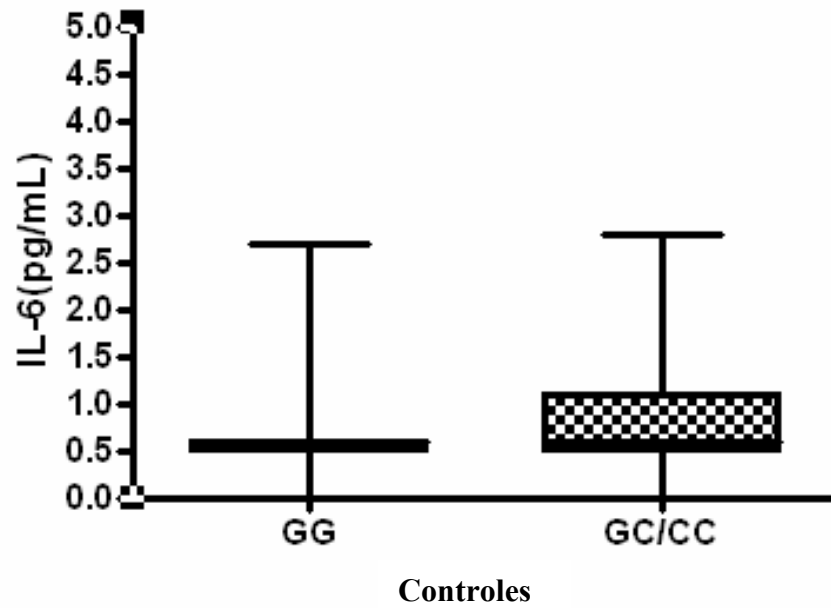


Figura 4 – Níveis séricos de IL-6 em controles do grupo 3, segundo genótipos -174G>C de IL-6. $p > 0,05$. Foi utilizado o programa Prisma em versão 5 para confecção do gráfico.

Os níveis séricos de IL-6 diferiram entre os grupos controle e de casos. As concentrações de IL-6 encontradas nos casos estão aumentadas em 6,8 vezes com relação às encontradas no grupo controle, conferindo significância estatística com $p < 0,01$ (**figura 5**).

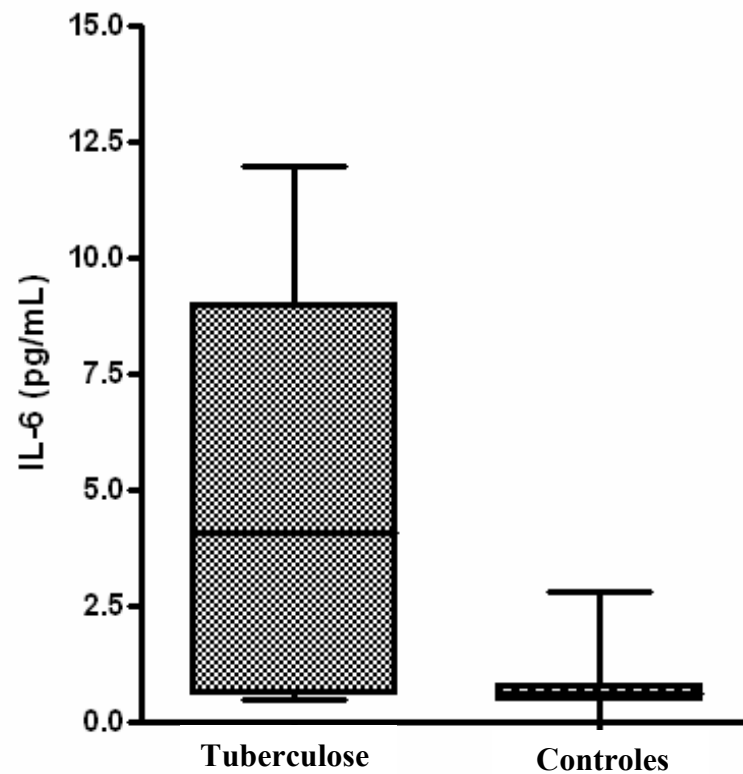


Figura 5 – Níveis séricos de IL-6 em indivíduos do grupo 3, $p < 0,01$. Foi utilizado o programa Prisma em versão 5 para confecção do gráfico.

Em adição observou-se um aumento na produção de IL-6 em pacientes com tuberculose portadores do genótipo -174G/G (mediana=4,1 pg/mL) quando comparados com os pacientes portadores dos genótipos G/C ou C/C (mediana=0,6 pg/mL), demonstrado em **figura 6**, com $p=0,04$.

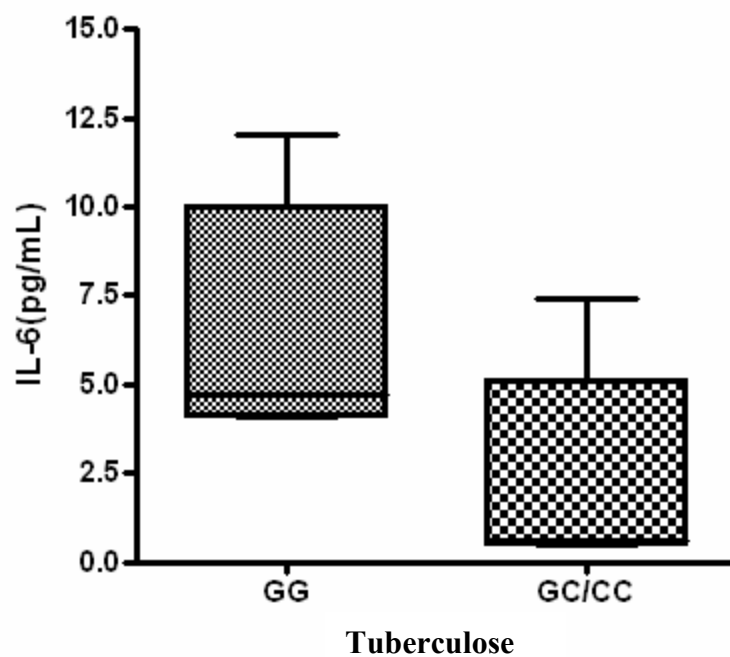


Figura 6 – Níveis de IL-6 em pacientes do grupo 3 com tuberculose, segundo genótipos -174G>C de IL-6. $p = 0,04$. Foi utilizado o programa Prisma em versão 5 para confecção do gráfico.

Este aumento na produção de IL-6 não foi observado em controles portadores do genótipo G/G (**tabela 5**), demonstrado na **figura 4**.

Os pacientes do grupo 2 foram estratificados de acordo com o resultado do teste de sensibilidade às drogas anti-tuberculose, sendo 24 (57%) TB-MDR e 18 (43%) TB-S. A distribuição dos genótipos de IL-6 nestes grupos está demonstrada na **tabela 6** e não conferiu significância estatística (vide **anexo F**).

Tabela 6 – Distribuição dos genótipos nos pacientes do grupo 2, sensíveis e resistentes.

Genótipo	TB-S (n =18)	TB-MDR (n = 24)
C/C	3 (16,7%)	2 (8,3%)
G/C	6 (33,3%)	4 (16,7%)
G/G	9 (50%)	18 (75%)

TB-S – tuberculose sensível às drogas anti-tuberculose; TB-MDR – tuberculose multidrogarresistente; $p>0,05$ – teste de Fisher.

A **figura 7** mostra gel de agarose com os diferentes padrões de polimorfismo de IL-6-174.

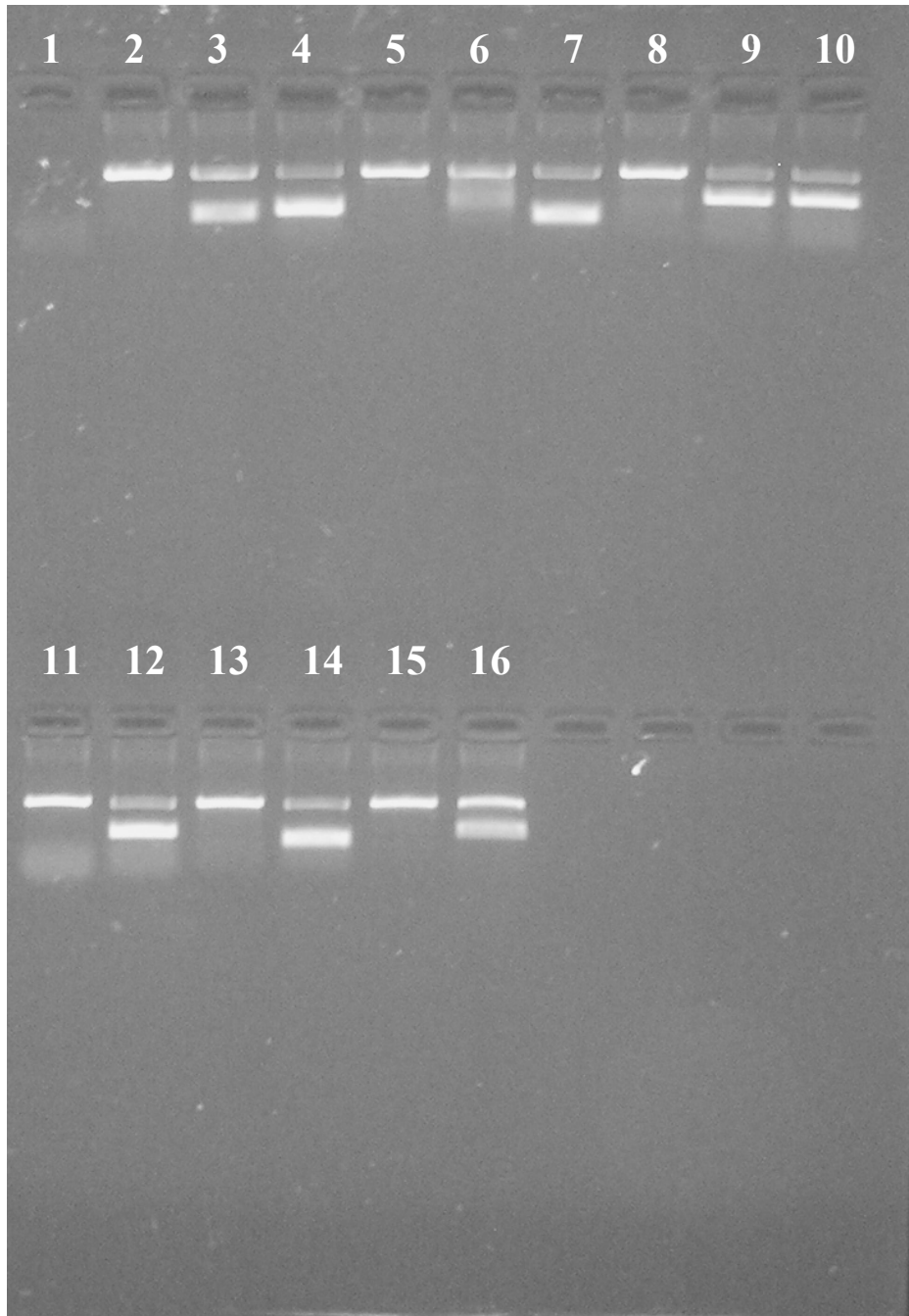


Figura 7 – Gel de agarose mostrando bandas de amplificação de IL-6-174 em amostra de um indivíduo do grupo 2. O poço 1 representa o controle negativo. Poços 2-12 e 15-16 mostram amplificação de genes de outras citocinas. O poço 13 mostra banda positiva do controle interno (beta-globina) e ausência da banda de amplificação do alelo -174C. O poço 14 mostra banda positiva do alelo -174G.

5 DISCUSSÃO

Imagine uma nova doença com transmissão através de núcleos de gotículas, por via inalatória; carregada de uma para outra pessoa, de uma para outra cidade, estado, país, continente; infecta tanto as pessoas com o sistema imune comprometido, quanto as saudáveis. Para cada pessoa doente, 10 a 20 são infectadas silenciosamente, e destas, em torno de 10% desenvolvem-na na forma ativa e, provavelmente espalham-na na comunidade; imagine uma nova doença que é curável com drogas que são disponíveis, cujo agente etiológico já pode ser resistente *ab initio* e que algumas vezes pode ser considerada praticamente intratável, pois é extensivamente resistente às drogas. Imagine essa nova doença que, se não tratada, tem a probabilidade de afetar dezena de milhões de pessoas em todo mundo, e matar, pelo menos, a metade daqueles que desenvolvem a forma ativa (HEYMANN *et al.*, 1999).

A doença que perspassou por todo o imaginário do leitor no parágrafo anterior não é uma enfermidade virtual. É, na verdade, uma doença real; muito menos por ter vitimado e morto o Rei Eduardo VI do que por se tratar de uma constante ameaça à consciência e à inteligência das autoridades sanitárias mundiais. É profundamente perturbador entender esta doença - a tuberculose, uma infecção/doença que mata uma pessoa a cada 16 segundos, que usa um teste diagnóstico descrito há 100 anos, uma vacina que foi desenvolvida há 80 anos e arsenal terapêutico que permanece sem novidades nos últimos 60 anos (GAGNEUX; SMALL, 2007).

A primeira etapa deste trabalho, representada pelas amostras do grupo 1, mostra que a concentração de IL-6 no sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar ativa (n=38) esteve 8,6 vezes maior em relação ao grupo controle (n = 63). Este resultado é consistente com trabalhos prévios que mediram IL-6 no fluido do lavado broncoalveolar (TSAO *et al.*, 1999), no esputo (RIBEIRO-RODRIGUES *et al.*, 2002) e na efusão pleural (KIROUCHAKI *et al.*, 2002).

Muitas tentativas tem sido feitas para definir o papel da IL-6 na resposta imune da tuberculose, sendo enfatizado seu potencial pró-inflamatório durante infecções agudas (KOPF *et al.*, 1994), assim como em processos infecciosos crônicos (POVEDA, 1999).

Por outro lado, em outro trabalho, esta citocina tem sido considerada como tendo ação tanto pró quanto anti-inflamatória (FLYNN, 1998).

Na segunda etapa deste trabalho, analisa-se o polimorfismo de IL-6 em 42 pacientes portadores de tuberculose pulmonar ativa, comparado com 79 indivíduos saudáveis, doadores de sangue do HEMOCENTRO de Fortaleza – Ceará. A frequência dos genótipos CC, GC e G/G nos controles foi de 4,5%, 32,5% e 63%, respectivamente. Apesar de pequena amostra, comparou-se estes resultados com os dos controles constantes na **tabela 1**, assim distribuídos: 119 de população iraniana (AMIRZARGAR *et al.*, 2006), 188 indianos (SELVARAJ *et al.*, 2008); 102 colombianos (GUARNIZO-ZUCCARDI *et al.*, 2007), 158 caucasianos alemães (SCHOTTE *et al.*, 2001) e 383 caucasianos do Reino Unido (FISHMAN *et al.*, 1998). Neste estudo comparativo, observa-se que os achados do presente experimento são similares aos encontrados nas amostras colombianas. São, entretanto, totalmente diversos dos das amostras de caucasianos. Por outro lado, observa-se grande similaridade entre os genótipos dos dois grupos de caucasianos. Quando comparado o genótipo CC do corrente estudo com o da população alemã e do Reino Unido observa-se nestes um aumento de 3 vezes e de 2 vezes, respectivamente. Contrariamente, o genótipo GG esteve respectivamente 2 vezes e 1,5 vezes menor nos dois controles caucasianos, quando comparado com o do atual estudo (vide **tabela 1**).

Estes resultados merecem uma reflexão, do ponto de vista de genética populacional, que pode ser aplicada à susceptibilidade ou resistência à tuberculose:

- i) em primeiro lugar, destaca-se a grande similaridade étnica existente entre as populações sul-americanas, haja vista que quando os colonizadores espanhóis chegaram à região da atual Colômbia, no fim do século XV, tanto o litoral como o planalto era habitado por índios.
- ii) A população brasileira constituída, à época da chegada dos portugueses (em 1500) por cerca de 2,4 milhões de ameríndios, é considerada uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de 5 séculos de imigração de caucasianos europeus (em torno de 6 milhões), oriundos principalmente de Portugal, mas também da Espanha, Itália e Alemanha, e de escravos africanos (4 milhões), originários primordialmente da África Equatorial; essas duas classes populacionais aqui se juntaram aos ameríndios nativos (ALVES-SILVA *et al.*, 2000; CARVALHO-SILVA *et al.*, 2001), acrescido de holandeses que dominaram o nordeste, principalmente Pernambuco, durante três décadas no século XVII. Esta mistura de povos de diferentes origens confere um alto grau de miscigenação da população brasileira, já

previamente demonstrado por estudos de tipificação do HLA (LOUZADA-JUNIOR *et al.*, 2001).

Esta heterogeneidade reflete o *pool* genético de cada grupamento étnico parental. Stead documentou que aqueles indivíduos refratários à infecção tuberculosa são o resultado da seleção natural entre os ancestrais que sobreviveram enquanto crassavam prolongadas e letais epidemias. Ressaltou o mesmo autor que já se incorporou ao conhecimento médico que afro-americanos têm mais tuberculose que brancos, com uma prevalência de duas vezes maior entre os indivíduos negros (STEAD, 2001). Mantendo a mesma linha de raciocínio, torna-se tentador especular que indivíduos altamente susceptíveis e que morreram de TB poderiam ter carregado genótipos de alto risco. Existe, sabe-se, uma grande diversidade genética em populações miscigenizadas, podendo resultar da agregação de distintos alelos oriundos de grupos étnicos e raciais separados. Esta heterogeneidade reflete, em última análise, a presença de genótipos prevalentes nos componentes dos grupos étnicos, ou seja, diversidade tanto intra como interétnica, em zonas promotoras de genes, regiões reconhecidamente polimórficas, portanto, importantes na determinação do papel funcional, e, conseqüentemente, na regulação da expressão gênica de citocinas, tema central do presente estudo (GIBSON, 2001).

Em recente trabalho, Taudorf e col. injetaram lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (0,1ng/kg por via venosa), em 200 caucasianos saudáveis moradores em Copenhague; o objetivo era o estudo de modelo de inflamação de baixo grau em doença crônica, relacionando-o com os polimorfismos nas regiões promotoras dos genes de TNF- α , IL-18, IFN- γ , IL-10 e IL-6. Os autores concluíram que os polimorfismos analisados não afetaram os níveis sanguíneos nem a produção de TNF- α , IL-10 e IL-6 (TAUDORF *et al.*, 2008). Em outro ensaio, também com LPS, realizado em população húngara, os autores utilizaram células endoteliais de veia umbilical humana (CEVUH) de indivíduos saudáveis e estudaram a produção de IL-6, relacionando-a com diferentes genótipos. A frequência de genótipos encontrada foi CC 12%; GC 52%; GG 36%. Apesar de serem as células endoteliais consideradas como grandes produtoras de IL-6 (LIBBY, 1995; FERNANDEZ-REAL *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 2001; FERNANDEZ-REAL *et al.*, 2001; GEORGES *et al.*, 2001), os autores não conseguiram demonstrar qualquer relação entre o polimorfismo e a produção de IL-6, concluindo que a produção desta citocina não depende de diferentes genótipos na posição -174 (KISZEL *et al.*, 2007).

Como se vê, os dois trabalhos experimentais com LPS não lograram êxito em mostrar qualquer relação entre os diferentes genótipos e a produção de IL-6, tanto no sangue periférico como em cultura de células endoteliais. Diferentemente dos supracitados resultados negativos obtidos a partir do estímulo com LPS, o atual estudo realizado em seres humanos mostra que o desafio imunológico com antígeno micobacteriano resultou em robusto aumento do nível sérico de IL-6, relacionando-o com o genótipo GG, sugerindo que esta citocina contribui para a atividade inflamatória em pacientes com TB, estando em acordo com seu potencial pró-inflamatório, o que já foi demonstrado em modelos de infecção aguda (POVEDA *et al.*, 1999).

Apesar do papel de IL-6 não ter sido suficientemente bem elucidado em processos infecciosos crônicos, Angrill e col. demonstraram a presença de maiores níveis de IL-6 no sangue periférico em pacientes com TB do que em outras infecções bacterianas crônicas (ANGRILL *et al.*, 2001). Este dado valoriza e enfatiza os resultados do presente trabalho, pois os pacientes aqui estudados tinham tempos diversos de duração da doença, assim como diferentes graus de gravidade. Seria o desafio antigênico micobacteriano tão diverso do realizado com lipopolissacarídeo? Entre outras citocinas, a interleucina-6 parece desempenhar papel central no desenvolvimento das reações inflamatórias sistêmicas que, ao final, por exemplo, podem levar ao choque séptico (SCHLUTER *et al.*, 1991). Torna-se relevante ressaltar que a interleucina-6 sofre um rápido clareamento plasmático, tendo uma meia-vida muito curta < 10 min (VAN SNICK, 1990; DENDORFER, 1996; PAPANICOLAU; VGONTZAS, 2000; La CAVA, 2003). Com base nestes argumentos, pode-se especular que o desafio com antígeno micobacteriano do presente estudo, por ser mais duradouro, foi capaz de elicitar uma resposta funcional do polimorfismo, com conseqüente aumento sustentado dos níveis séricos de IL-6, em contraste com os registrados nos experimentos com lipopolissacarídeo.

Mesmo sem ter sido detectada no corrente trabalho diferença quanto à frequência genotípica entre controles e pacientes, os dados aqui apresentados mostram uma associação entre a produção de IL-6 e a presença da variante alélica G/G nos pacientes com tuberculose pulmonar ativa. Estes resultados já foram previamente encontrados por outros pesquisadores em diversas enfermidades, como em pacientes portadores de Doença Arterial Coronariana e Acidente Vascular Cerebral (FERNANDEZ-REAL *et al.*, 2000; FERNANDEZ-REAL *et al.*, 2001), Artrite Reumatóide Juvenil Sistêmica (FISHMAN *et al.*, 1998), Síndrome de Sjögren

(HULKKONEN *et al.*, 2001), lupus discóide (SHOTTE *et al.*, 2001), Sarcoma de Kaposi (FOSTER *et al.*, 2008), Linfoma de Hódgkin (COZEN *et al.*, 2004) e lupus eritematoso sistêmico (LINKER-ISRAELI; WALLACE; PREHN, 1999).

Em estudo prévio realizado em população colombiana, Henao e col. avaliaram 190 pacientes portadores de tuberculose, assim distribuídos: 140 com TBP, 30 com TB pleural, 20 com TB miliar e analisaram o polimorfismo de TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-10 e IL-6. Especificamente com relação a IL-6, os autores não encontraram diferença nas distribuições de alelos ou de genótipos entre controles saudáveis e pacientes com TB, e concluíram afirmando que não havia associação, nem tampouco outros relatos sobre tal ilação entre polimorfismo de IL-6 e tuberculose (HENAO *et al.*, 2006). Os resultados do presente estudo são concordantes com os de Henao e col., com referência à distribuição dos genótipos entre os controles e os pacientes, ou seja, o estudo qualitativo. O resultado final do presente estudo, entretanto, aprofunda a discussão do papel do polimorfismo -174G>C de IL-6 na tuberculose pulmonar, vez que o estudo funcional, quantitativo, é que mostrou tal associação. Dessa forma, depreende-se que a análise do polimorfismo deveria, sempre que possível, ser complementada com a dosagem dos níveis de IL-6, como aqui realizada.

Dos trabalhos, cujos genótipos dos controles foram comparados com os do atual estudo, apenas o iraniano e o indiano foram realizados com pacientes portadores de tuberculose. Como mostrado na **tabela 1**, poucas e inexpressivas são as diferenças com relação ao genótipo GG nas amostras dos pacientes portadores de tuberculose do Brasil e da Índia; Selvaraj *et al.* (2008) não encontraram relação entre os níveis de IL-6 e o alelo G nas amostras de população indiana em estudo realizado *in vitro* com 166 pacientes. Em outro trabalho realizado em população iraniana, os autores mostram que o genótipo GG é significativamente maior em doentes com tuberculose em comparação com os controles — 57,5% versus 31,9% e que existe associação positiva entre tuberculose e o genótipo GG. Os autores finalizam o artigo ressaltando que acabam de publicar o primeiro relato mostrando o papel de IL-6 na tuberculose (AMIRZARGAR *et al.*, 2006).

No presente estudo mostrou-se que o polimorfismo de IL-6 é fator determinante da produção desta citocina em pacientes portadores de tuberculose pulmonar, pois o mesmo genótipo GG hiperprodutor de IL-6 nos doentes, não o é nos indivíduos saudáveis, deixando muito claro que, após o contato com o *Mycobacterium tuberculosis*, este polimorfismo se

torna funcionalmente importante e responsável pelo aumento da expressão de IL-6. A hiperexpressão desta citocina ao desafio micobacteriano está de acordo com o fato de que IL-6 não é expressa constitutivamente, mas é altamente induzível e produzida em resposta à estímulos inflamatórios, como IL-1, fator de crescimento derivado de plaquetas, TNF- α , e produtos bacterianos ou virais (TERRY; LOUKACI; GREEN, 2000).

Os pacientes do presente estudo foram estratificados de acordo com o teste de sensibilidade; dos portadores de TB-MDR 75% tinham o genótipo GG, enquanto 50% dos com TB-S apresentavam este genótipo, sem significância estatística. Reforce-se que na análise do grupo 1 do presente estudo, foi demonstrada uma robusta diferença na produção de IL-6 em pacientes com tuberculose pulmonar quando comparados com controles saudáveis, entretanto não se encontrou diferença nos níveis séricos quando se comparou pacientes com tuberculose sensível e com tuberculose multidrogarresistente.

Sintetizando, pode-se dizer que até o presente momento, três estudos avaliaram o polimorfismo do gene de IL-6 na tuberculose pulmonar: **(i)** em população iraniana, **(ii)** em população colombiana e **(iii)** em população indiana. Dos estudos acima, apenas o iraniano descreveu uma associação entre o genótipo GG e susceptibilidade à tuberculose pulmonar. Apesar do número reduzido de amostras, conforme mencionado acima, não se observou diferenças significantes entre as distribuições dos genótipos de IL-6 -174G>C em pacientes e indivíduos saudáveis. Por outro lado, quando as dosagens séricas de IL-6 foram comparadas entre pacientes e controles, observou-se diferença significativa com aumento expressivo dos níveis periféricos de IL-6 nos pacientes com tuberculose pulmonar ativa. Provavelmente, esta citocina desempenha papel relevante no processo inflamatório em pulmões de indivíduos com tuberculose ativa.

Dentre os três estudos citados acima, o único que avaliou o aspecto funcional do polimorfismo do gene de IL-6, foi o indiano, tendo sido feita por ELISA os níveis de IL-6 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico cultivadas e estimuladas com fitohemaglutinina ou antígenos de *M. tuberculosis* obtidos de filtrado de cultura. Os resultados demonstraram ausência de associações entre os níveis de IL-6 e os genótipos de IL-6 -174G>C. Neste presente estudo, optou-se pela investigação dos níveis séricos de IL-6, considerando que esta citocina desempenha importante papel no componente sistêmico da inflamação e que seus níveis séricos representam sua produção tecidual. Dessa

forma, utilizou-se ELISA para quantificar a produção sistêmica de IL-6 em sangue periférico de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, comparando com controles saudáveis. Para a análise dos genótipos de IL-6 -174G>C comparou-se a mediana de produção da citocina nos diversos subgrupos de genótipos. Dessa forma, este é o primeiro estudo a relacionar a distribuição dos genótipos de IL-6 com a produção *in vivo* da citocina.

Os resultados demonstram uma forte influência dos genótipos na produção de IL-6. Destaca-se a observação de níveis reduzidos de IL-6, semelhante aos controles, em indivíduos com tuberculose pulmonar ativa e genótipos G/C ou C/C, porquanto os indivíduos saudáveis apresentaram níveis baixos de IL-6, mesmo expressando o genótipo G/G, fortemente associado a hiperprodução da citocina em pacientes com tuberculose. Por fim, o atual estudo permite concluir que os níveis de IL-6 são influenciados de forma expressiva pelo genótipo de IL-6 -174G>C.

6 CONCLUSÕES

1. A dosagem sérica de IL-6 demonstrou um aumento das concentrações em pacientes com tuberculose quando comparadas aos indivíduos saudáveis;
2. Não houve diferenças nas dosagens séricas de IL-6 entre os subgrupos sensível e multirresistente às drogas anti-tuberculose;
3. Não houve diferenças nas distribuições dos genótipos entre os pacientes e os indivíduos saudáveis, assim como entre pacientes com TB-S e TB-MDR;
4. O estudo funcional do polimorfismo de IL-6 demonstrou que a produção sistêmica de IL-6 é influenciada pelos genótipos -174G>C, na tuberculose pulmonar, sendo que o genótipo de IL-6 -174GG determina o aumento na produção sistêmica de IL-6 na tuberculose pulmonar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R; NATAL, S. Epidemiologia e controle da tuberculose. *In*: SANT'ANNA, C. C. **Tuberculose na infância e na adolescência**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002. p. 5-15.

ALVES-SILVA, J.; SANTOS, M. S.; GUIMARÃES, P. E. M.; FERREIRA, A. C. S.; BANDELT, H. J.; PENA, S. D. J.; PRADO, V. F. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 67, p. 444-461, 2000.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 161, p. 1376-1395, 2000.

AMIRZARGAR, A. A.; REZAEI, N.; JABBARI, H.; DANESH, A. A.; KHOSRAVI, F.; HAJABDOLBAGHI, M. *et al.* Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 17, n. 2, p. 84-89, June 2006.

ANGRILL, J.; AGUSTI, C.; DE CELIS, R.; FILELLA, X.; RANO, A.; ELENA, M. *et al.* Bronchial inflammation and colonization in patients with clinically stable bronchiectasis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 164, n. 9, p. 1628-1632, Nov. 2001.

APPELBERG, R. Protective role of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in Mycobacterium tuberculosis and M. Avium infections - Review. **Immunobiology**, v. 191, n. 4/5, p. 520-525, Oct.1997.

ATES, Ö.; MUSELLIM, B.; ONGEN, G.; TOPAL-SARIKAYA, A. Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- α Gene Polymorphisms in Tuberculosis. **J. Clin. Immunol.**, v. 28, p. 232-236, 2008.

AWATA, T.; MATSUMOTO, C.; URAKAMI, T.; HAGURA, R.; AMEMYIA, S.; KANAZAWA, Y. Association of polymorphism in the interferon- γ gene with IDDM. **Diabetologia**, v. 37, p. 1159-1162, 1994.

AZZAWI, M.; HASLETON, P. S.; TURNER, D. M.; YONAN, N.; DEIRANIYA, A. K.; SINNOTT, P. J *et al.* Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism and death due to acute cellular rejection in a subgroup of heart transplant recipients. **Hum. Immunol.**, v. 62, p.140-142, 2001.

BALKWILL, F. R.; BURKE, F. The cytokine network. **Immunol. Today**, v. 10, p. 299-304, 1989.

BARNARD, M.; ALBERT, H.; COETZEE, G.; O'BRIEN, R.; BOSMAN, E. Rapid Molecular Screening for Multidrug-Resistant Tuberculosis in a High-Volume Public Health Laboratory in South Africa. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.177, p. 787-792, 2008.

BARROSO, E. W. Imunopatogenia da tuberculose, em tuberculose na infância e na adolescência. *In*: SANT'ANNA, C. C. **Tuberculose na infância e na adolescência**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002. p. 17-27.

BATHGATE, A. J.; PRAVICA, V.; PERREY, C.; THERAPONDON, G.; PLEVRIS, J. N.; HAYES, P. C. *et al.* The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor- α , interleukin-10, and transforming growth factor- β 1 genes in acute hepatic allograft rejection. **Transplantation**, v. 69, p.1514-1517, 2000.

BECK, J. T.; HSU, S. M.; WIJDENES, J., BATAILLE, R., KLEIN, B., VESOLE, D., HAYDEN, K., JAGANNATH, S., BARLOGIE, B. Alleviation of Systemic Manifestations of Castleman's Disease by Monoclonal Anti-Interleukin-6 Antibody. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, n. 9, p. 602-605, Mar. 1994.

BELLAMY, R.; ADRIAN, V. S. H. Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 10, n. 4, p. 483-487, 1998.

BERNAL, W.; MOLONEY, M.; UNDERHILL, J.; DONALDSON, P. T. Association of tumor necrosis factor polymorphism with primary sclerosing cholangitis. **J. Hepatol.**, v. 30, p. 237-241, 1999.

BIDWELL, J.; KEEN, L.; GALLAGHER, G.; KIMBERLY, R.; HUIZINGA, T.; McDERMOTT, M. F. *et al.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. **Genes Immun.**, v. 1, n. 1, p. 3-19, Sept. 1999.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1963.

BIKMAEVA, A. R.; SIBIRYAK, S. V.; VALIAKHMETOVA, K. H.; KHUSNUTDINOVA, E. K. Polymorphisms of the Tumor Necrosis Factor- α Gene in Patients with Infiltrative Tuberculosis from the Bashkortostan Populations. **Mol. Biol. (Mosk.)**, v. 36, n. 5, p. 784-777, Sept./Oct. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa de controle e prevenção de tuberculose**. Brasília, DF, 2008.

BROWN, H. WHO identifies drug-resistant tuberculosis “hotspots”. Former Russian states are worst affected, but lack of data from China hides true extent of disease. **Lancet**, v. 363, n. 9413, p. 951, Mar. 2004.

BURGESS, L. J.; REUTER, H.; CARSTENS, ME.; JALJAARD, J.J.F.; DOUBELL, A.F. Cytokine production in patients with tuberculous pericarditis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 6, n. 5, p. 439-446, 2002.

BURKE, W. Genetic Testing. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n. 23, p. 1867-1875, Dec. 2002.

CABRERA, M.; SHAW, M. A.; SHARPLES, C.; WILLIAMS, H.; CASTES, M.; CONVIT, J. *et al.* Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous Leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v.182, n. 5, p.1259-1264, Nov. 1995.

CARVALHO-SILVA, D. R.; SANTOS, F. R.; ROCHA, J.; PENA, S. D. J. The Phylogeography of Brazilian Y-Chromosome Lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 68, p. 281-286, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Reported TB in the united states, surveillance reports: 2000. **MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.**, p. 1-95, 2001.

COHN, A. Desenvolvimento social e impactos na saúde. *In*: BARATA, R. B. **Condições de vida e situação de saúde**. Rio de Janeiro: ABRASCO, 1997.

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

CONDE, M. B.; SOUZA, G. M.; KRITSKI, A. L. **Tuberculose sem medo**. São Paulo: Atheneu, 2002.

CORDANO, P.; LAKE, A.; SHIELD, L.; TAYLOR, G. M.; ALEXANDER, F. E.; TAYLOR, P. R. A.; WHITE, J. Effect of IL-6 promoter polymorphism on incidence and outcome in Hodgkin’s lymphoma. **Br. J. Haematol.**, v. 128, n. 4, p. 493-495, Feb. 2005.

CORREIA, J. W.; FREITAS, M. V.; QUEIROZ, J. A.; PEREIRA-PERRIN, M.; CAVADAS, B. Interleukin-6 Blood Levels in sensitive and Multiresistant Tuberculosis. **Infection**, Nov. 2008.

CORREIA, J. W.; LIMA, A. C. M.; NOGUEIRA, J. A.; FREITAS, M. V. C. Serum Concentrations of Interleukin-6 in Systemic Sclerosis. **J. Clin. Rheumatol.**, v. 12, suppl., Apr. 2006.

COZEN, W.; GILL, P. S.; INGLES, S.A.; MASOOD, R.; MARTINEZ-MAZA, O.; COCKBUM, M. G. *et al.* IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 103, n. 8, p. 3216-3221, Apr. 2004.

CZAJA, A. J.; COOKSON, S.; CONSTANTINI, P. K.; CLARE, M.; UNDERHILL, J. A.; DONALDSON, P. T. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in tyto 1 autoimmune hepatitis. **Gastroenterology**, v. 117, p. 645-652, 1999.

DARWIN, C. **A origem das espécies e a seleção natural**. [S.l.]: Hemus, 2003.

DENDORFER, U. Molecular biology of cytokines. **Artif. Organs**, v. 20, n. 5, p. 437-444, May 1996.

ELIAS, J. A.; ZITNIK, R. J. Cytokine-cytokine interactions in the context of cytokine networking. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 7, n. 4, p. 365-367, Oct. 1992.

ELLIOT, M. J.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M.; LONGFOX, A.; CHARLES, P.; KATSISKIS, P. *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. **Arthritis Rheum.**, v. 36, p. 1681-1690, 1993.

FERNANDEZ-REAL, J. M.; VENDRELL, J.; RICHART, C.; GUTIERREZ, C.; RICART, W. Platelet count and Interleukin 6 Gene polymorphism in healthy subjects. **BMC Med. Genet.**, v. 2, p. 6, 2001.

FERNÁNDEZ-REAL, J. M.; VAYREDA, M.; RICHART, C.; GUTIÉRREZ, C.; BROCH, M.; VENDRELL, J.; RICART, W. Circulating Interleukin 6 blood pressure and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 3, p. 1154-1159, Mar. 2001.

FERNÁNDEZ-REAL, J. M.; BROCH, M.; VENDRELL, J.; RICHART, C.; RICART, W. Interleukin 6 Gene Polymorphism and Lipid Abnormalities in Healthy Subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, n. 3, p. 1334-1339, Mar. 2000.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDKIN, J. S.; HUMPHRIES, S.; WOO, P. The effect of a novel polymorphism 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, Oct. 1998.

FITZPATRICK, L. K.; BRADEN, C. Tuberculosis. *In*: HUMES, H. D. (Ed.). **Kelley's Textbook of Internal Medicine**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 2055-2065.

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

FOSTER, C. B.; LEHRNVECHER, T.; SAMUELS, S.; STEIN, S.; MOL, F.; METCALF, J. A. *et al.* An IL-6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus. **Blood**, v. 7, p. 2562-2566, 2000.

FORTES, A.; PEREIRA, K.; ANTAS, P.R.Z.; FRANDEN, C.L.M.C.; DALCOLMO, M.; RIBEIRO-CARVALHO, M.M.; *et al.* Detection of *in vitro* interferon- γ and serum tumour necrosis factor- α in multidrug-resistant tuberculosis patients. **Clinical and Experimental Immunology**. v.141, p. 541-548.

FRASER, J. K.; LILL, M. C.; FINGLIN, R. A. The biology of the cytokine sequence cascade. **Semin. Oncol.**, v. 23, n. 2, suppl. 4, p. 2-8, Apr. 1996.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, n. 6, p. 448-454, Feb.1999.

GAGNEUX, S.; SMALL, P. M. Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development. **Lancet Infect. Dis.**, v. 7, p. 328-337, 2007.

GASNER, M. R.; MAW, K. L.; FELDMAN, G. E.; FUJIWARA, P. I.; FRIEDMAN, T. R. The use of Legal Action in New York City to Ensure Treatment of Tuberculosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, n. 5, p. 359-366, 1999.

GEORGES, J. L.; LOUKACI, V.; POIRIER, O.; EVANS, A.; LUC, G.; ARVEILER., D. *et al.* Interleukin-6 gene polymorphisms and susceptibility to myocardial infarction: the ECTIM study. **J. Mol. Med.**, v. 79, p. 300-305, 2001.

GERARD, C.; BRUYNS, C.; MARCHANT, A.; ABRAMOWICZ, D.; VANDENABEELE, P.; DELVAUX, A. *et al.* Interleukin-10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxaemia. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 547-550, 1993.

GIACOMINI, E.; IONA, E.; FERRONI, L.; MIETTINEN, M.; FATTORINI, L.; OREFICI, G *et al.* Infection of Human Macrophages and Dendritic Cells with *Mycobacterium tuberculosis* Induces a Differential Cytokine Gene Expression That Modulates T Cell Response. **The Journal of Immunology**, v.166, p. 7033-7041, 2001.

GIBSON, A. W.; EDBERG, J. C.; WU, J.; WESTENDORP, R. G. J.; HUIZINGA, T. W. J.; KIMBERLY, R. P. Novel Single Nucleotide Polymorphisms in the Distal IL-10 Promoter Affect IL-10 Production and Enhance the Risk of Systemic Lupus Erythematosus. **J. Immunol.**, v. 166, p. 3915-3922, 2001.

GÓMEZ-REINO, J. J.; CARMONA, L.; RODRÍGUEZ, V. V.; MOLA, E. M.; MONTERO, M. D. Treatment of Rheumatoid Arthritis With Tumor Necrosis Factor Inhibitors May Predispose to Significant Increase in Tuberculosis Risk a Multicenter Active-Surveillance Report. **Arthritis Rheum.**, v. 48, n. 8, p. 2122-2127, Aug. 2003.

GRANGE, J. M.; ZUMLA, A. Paradox of the global emergency of tuberculosis. **Lancet**, v. 353, n. 9157, p. 996, Mar. 1999.

GUARNIZO-ZUCCARDI, P.; LOPEZ, Y.; GIRALDO, M.; GARCIA, N.; RODRIGUEZ, L.; RAMIREZ, L. *et al.* Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v. 70, n. 5, p. 376-382, Nov. 2007.

GUTTMACHER, A. E.; COLLINS, F. S. Genomic Medicine-A Primer. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n. 19, p. 1512-1520, Nov. 2002.

HARRIS, T. B.; FERRUCCI, L.; TRACY, R. P.; CORTI, M. C.; WACHOLDER, S.; ETTINGER, W. H. *et al.* Association of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. **Am. J. Med.**, v. 106, n. 5, p. 506-512, 1999.

HASEGAWA, M.; SATO, S.; FUJIMOTO, M.; IHN, H.; KIKUCHI, K.; TAKEHARA, K. Serum levels of interleukin 6, oncostatin M, IL-6 receptor and soluble gp 130 in patients with systemic sclerosis. **J. Rheumatol.**, v. 25, p. 308-313, 1998.

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

HERNÁNDEZ- PANDO R, ARRIAGA A.K., PANDURO C.A., OROZCO E. H., MADRID-MARINA V, LARRIVA-SAHD J. The response of hepatic acute phase proteins during experimental pulmonary tuberculosis. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 65, n.1, p. 25-36, 1998

HEYMANN, S. J.; BREWER, T. F.; WILSON, M. E.; FINEBERG, H. V. The Need for Global Action Against Multi-drugResistant Tuberculosis. **JAMA**, v. 281, n. 22, p. 2138-2141, June 1999.

HIBI, M.; HIRANO, T. Signal transduction through cytokine receptors. **Int. Rev. Immunol.**, v. 17, n. ¼, p. 75-102, 1998.

HOLLAND, S. M. Cytokine Therapy of Mycobacterial Infections. *In*: SCHRIER, R. W.; BAXTER, J. D.; FAUCI, A. S.; DZAU, V. J. (Ed.). **Advances in internal medicine**. St. Louis: Mosby, 2000. v. 45, cap. 15.

HOUSMAN, D. Human DNA Polymorphism. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, n. 5, p. 318-320, Feb. 1995.

HULKKONEN, J.; PERTOVAARA, M.; ANTONEN, J.; PASTERNAK, A.; HURNE, M. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL-6 gene in primary Sjögren syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. **Rheumatology**, v. 40, p. 656-661, 2001.

HUSSAIN, R.; SHIRATSUCHI, H.; PHILIPS, M.; ELLNER, J.; WALLIS, R. S. Opsonizing antibodies (IgG1) up-regulate monocyte proinflammatory cytokines tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and IL-6 but not anti-inflammatory cytokine IL-10 in mycobacterial antigen-stimulated monocytes- implications for pathogenesis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 123, n. 2, p. 210-218, 2001.

IHLE, J. N.; THIERFELDER, W.; TEGLUND.; STRAVAPODIS, D.; WANG, D.; FENG, J.; PARGANAS, E. Signaling by the cytokine receptor superfamily. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 865 p. 1-9, Dec. 1998.

ISEMAN, M. D. **A clinician's guide to tuberculosis**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

ITO, H.; TAKAZOE, M.; FUKUKUDA, Y.; HIBI, T.; KUSUGAMI, K.; ANDOH, A. *et al.* A Pilot Randomized Trial of a Human Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody in Active Crohn's Disease. **Gastroenterology**, v. 4, p.989-996, 2004.

JÄREMO, P.; NILSSON, O. Interleukin-6 and neutrophils are associated with long-term survival after acute myocardial infarction. **Eur. J. Int. Med.**, v. 19, n. 5, p. 330-333, July 2008.

JEPSON, A.; FOWLER, A.; BANYA, W.; SINGH, M.; BENNETT, S.; WHITTLE, H.; HILL, A.V. S. 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, June 2001.

JONES, K. G.; BRULL, D. J.; BROWN, L. C.; SIAN, M.; GREENHALGH, R. M.; HUMPHRIES, S. E.; POWELL, J. T. Interleukin-6 (IL- 6) and the Prognosis of Abdominal Aortic Aneurysms. **Circulation**, v. 103, p. 2260-2265, 2001.

KAWANO, M.; HIRANO, T.; MATSUDA, T.; TAGA, T.; HORII, Y.; IWATO, K. *et al.* Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. **Nature**, v. 332, n. 6159, p. 83-85, Mar. 1988.

KEANE, J.; GERSHON, S.; WISE, R. P.; MIRABILE-LEVENS, E.; KASZNICA, J.; SCHWIETERMAN, W. D. *et al.* Tuberculosis Associated with Infliximab, a Tumor Necrosis Factor - Neutralizing Agent . **N. Engl. J. Med.**, v. 345, n. 8, p.1098-1104, 2001.

KHAN, K.; MUENNIG, P.; BEHTA, M.; ZIVIN, J. G.; Global drug-resistance patterns and the management of latent tuberculosis infection in immigrants to the United States. **N. Engl. Med.**, v. 347, n. 23, p. 1850-1859, 2002.

KINDLER, V.; SHAPPINO, A. P.; GRAU, G. E.; PIGNET, P. F.; VASSALI, P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**, v. 199, n. 56, p. 7311-7340, 1989.

KIROUCHAKI, N.; TZAMALOS, N.; BOUROS, D.; KYRIAKOU, D.; KARKAVITSAS, N.; ALEXANDRAKIS, M. *et al.* SIAFAKAS, N. Diagnostic value of interleukin-1a, interleukin-6 and tumor necrosis factor on pleural effusions. **Chest**, v. 121, p. 815-820, 2002.

KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; TAGA, T. IL-6 receptor and mechanism of signal transduction. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 3, p. 431-438, 1992.

KISZEL, P.; MAKÓ, V.; PROHÁSZKA, Z.; CERVENAK, L. Interleukin - 6 -174 promoter polymorphism does not influence IL-6 production after LPS and IL-1 β stimulation in human umbilical cord vein endothelial cells. **Cytokine**, v. 40, p.17-22, 2007.

KOPF, M.; BAUMANN, H.; FREER, G.; FREUDENBERG, M.; LAMERS, M.; KISHIMOTO, T. et al. Impaired immune and acute phase responses in interleukin-6 deficient mice. **Nature**, v. 368, p. 339-342, 1994.

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

La CAVA, A. Cytokines and Autoimmune Rheumatic Diseases. **Int. J. Adv. Rheumatol.**, v.1 n.1, 2003.

LACAZ, C. S.; MACHADO, C. M. **Oportunismo microbiano e de neoplasias na medicina contemporânea**. São Paulo: Fundo Editorial Byk, 2000.

LADEL, C.H.; BLUM, C.; DREHER, A.; REIFENBERG, K.; KOPF, M.; KAUFMANN S.H.E. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. **Infect. Immun.** v. 65, p. 4843, 1997

LIBBY, P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 9, p. 2844-2850, 1995.

LIN, Y.; ZHANG, M.; BARNES, P. F. Chemokine production by human alveolar epithelial cell line in response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 3, p. 1121-1126, Mar. 1998.

LINKER-ISRAELI, M.; WALLACE, D. J.; PREHN, J.; MICHAEL, D.; HONDA, M.; TAYLOR, K. D. et al. Association of IL - 6 gene alleles with systemic lupus erythematosus (SLE) and with elevated IL-6 expression. **Genes Immun.**, v. 1, n. 1, p. 45-52, Sept. 1999.

LIO, D.; MARINO, V.; SERAUT, A.; GIOIA, V.; SCOLA, L.; CRIVELLO, A. et al. Genotype frequencies of the +874 T-A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon- γ gene in a sample of Scilian patients affected by tuberculosis. **Eur. J. Immunogenet.**, v. 29, n. 5, p. 371-374, 2002.

LOPEZ-MEDERUELO, D.; ARNALICH, F.; SERANTES, R.; GONZALEZ, A.; CODOCEO, R.; MADERO, R. *et al.* Interferon- γ and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. **Am. Respir. Crit. Care Med.**, v. 167, n. 7, p. 990-995, Apr. 2003.

LOUZADA-JUNIOR, P.; SMITH, A. G.; HANSEN, J.; DONADI, E. A. HLA-DRB1 and DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo. **Tissue Antigens**, v. 57, p.158-162, 2001.

LYONS, A. S.; PETRUCCELLI, R. J. **Medicine**: an illustrated history. New York: Harry N. Abrams, Publishers, 1987.

MAES, H. H.; CAUSSE, J. E.; MAES, R. F. Tuberculosis I: a conceptual of frame for the immunopathology of the disease. **Med. Hypotheses**, v. 52, n. 6, p. 583-593, 1999.

MANCA, C.; TSENOVA, L.; BERGTOLD, A.; FREEMAN, S.; TOVEY, M.; MUSSER, J. M. *et al.* Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th 1 type immunity and is associated with induction of IFN- γ . **Immunology**, v. 98, n. 10, p. 5752-5757, May 2001.

MCGUIRE, W.; HILL, A. V. S.; ALLSOPP, C. E. M.; GREENWOOD, B. M.; KWIATKOWSKI, D. Variation in the TNF- α promoter region associate with susceptibility to cerebral malaria. **Nature**, v. 371, p. 508-511, 1994.

MICHAELA, M. G.; MATHEMA, B.; SOINI, H.; SHASHKINA, E.; KREISWIRTH, B. N.; GRAVISS, E. A.; MUSSER, J. M. Single-Nucleotide Polymorphism-Based Population Genetic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strains from 4 Geographic Sites. **J. Infect. Dis.**, v.193, n. 1, p. 121-128, Jan. 2005.

MIRA, J. P.; CARIOU, A.; GRALL, F.; DELCLAUX, C.; LOSSER, M. R.; HESHMATI, F. *et al.* Association of TNF2, a TNF- α Promoter Polymorphism, With Septic Shock Susceptibility and Mortality-A Multicenter Study. **JAMA**, v. 6, p. 561-568, 1999.

MUSHTAQUE, A.; CHOWDHURY, R. Success with the DOTS strategy. **Lancet**, v. 353, n. 9157, p. 1003-1004, Mar. 1999.

NADELL, W.; NEWPORT, M. J.; BOOY, R.; LEVIN, M. Variation in the tumor necrosis factor- α gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. **J. Infect. Dis.**, v. 174, p. 878-880, 1996.

NAGABHUSHANAM, V.; SOLACHE, A.; TING, L.; ESCARON, C.J.; ZHANG, J. Y.; ERNST, J. D. Innate Inhibition of Adaptive Immunity: *Mycobacterium tuberculosis* - Induced IL-6 Inhibits Macrophage Responses to IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v.171, p. 4750-4757, 2003.

NEKTARIA, X.; NIKOLAOS, T.; DEMOSTHENES, B.; DESPINA, K.; NIKOLAOS, K.; MICHALIS, A. *et al.* Diagnostic Value of Interleukin- 1 α , Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor in Pleural Effusions. **Chest**, v. 121, p.815-820, 2002.

NEWPORT, M. J.; HUXLEY, C. M.; HUSTON, S.; HAWRLOWICZ, C. M.; OOSTRA, B. A.; WILLIAMSON, R.; LEVIN, M. A Mutation in the Interferon- γ Receptor Gene and Susceptibility to Mycobacterial Infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 335, n. 26, p. 1941-1949, 1996.

NISHIMOTO, N.; KANAKURA, Y.; AOZASA, K.; JOHKOH, T.; NAKAMURA, M.; NAKANO, S. *et al.* Humanized anti-interleukin- receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. **Blood**, v. 6, p. 2627-2632, 2005.

NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T.; YOSHIZAKI, K. Anti-interleukin - 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 59, suppl 1, p.21-27, 2000.

NISHIMOTO, N.; SASAI, M.; SHIMA, Y.; NAKAGAWA, M.; MATSUMOTO, T.; SHIRAI, T. K.; KISHIMOTO, T. Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. **Blood**, v. 95, p.56-61, 2000.

OLIVEIRA, M. M.; FONSECA, D. A.; COSTA, J.; ALMEIDA, A. S.; AMIM, L. H. V.; LOREDO, C. C. S. *et al.* Distribuição de Polimorfismos de Base única (SNPs) no gene de TNF- α (-238 /-308) entre pacientes com TB e outras pneumopatias: marcadores genéticos de susceptibilidade à ocorrência de TB ?. **J. Bras. Pneumol.**, v. 30, n. 4, jul./ago. 2004.

ONISHI, M.; NOSAKA, T.; KITAMURA, T. Cytokine receptors: structures and signal transduction. **Int. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 617-634, 1998.

PAPANICOLAOU, D. A.; VGONTZAS, A. N. Interleukin-6: The endocrine cytokine. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, p. 1331-1332, 2000.

PARKIN, J.; COHEN, B. An Overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777-1789, 2001.

PERASON, M. L.; JEREB, J. A.; FRIEDEN, T. R.; CRAWFORD, J. T.; DAVIS, B. J.; DOOLEY, S. W.; JARVIS, W. R. Nosocomial transmission of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: a risk to patients and health care workers. **Ann. Intern. Med.**, v. 117, n. 3, p.191-196, Aug. 1992.

PEREIRA, M. A. **In basic immunology**. Boston: Williams & Wilkins, 1998.

POCHMANN, M. **Desigualdade e justiça tributária**. São Paulo: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2008. Disponível em:
<http://www.ipea.gov.br/sites/000/2/pdf/08_05_15_DesigualdadeJusticaTributaria.pdf>.
Acesso em: 12 nov. 2008.

POVEDA, F.; CAMACHO, J.; ARNALICH, F.; CODOCEO, R.; DEL ARCO, A.; MARTINEZ-HERNÁNDEZ, P. Circulating cytokine concentrations in tuberculosis and other chronic bacterial infections. **Infection**, v. 27, n. 4, p. 272-274, 1999.

PRAVICA, V.; PERREY, C.; STEVENS, A.; LEE, J. H.; HUTCHINSON, V. I. A. Single Nucleotide Polymorphism in the First Intron of Human IFN- γ Gene: Absolute Correlation with a Polymorphic CA Microsatellite Marker of High IFN- γ Production. **Human Immunol.**, v. 61, p. 863-866, 2000.

QI, L.; VAN DAM, R. M.; MEIGS, J. B.; MANSON, J. E.; HUNTER, D.; HU, F.B. Genetic variation in IL-6 gene and type 2 diabetes: tagging- SNP haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. **Human Mol. Genet.**, v.15, p. 1914-1920, 2006.

RAVIGLIONE, M.; UPLEKAR, M. W. WHO's new Stop TB Strategy. **Lancet**, v. 367, p. 952-955, 2006.

RAVIGLIONE, M.; SMITH, M. B. XDR Tuberculosis: implications for global public health. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, n. 7, p. 656-659, Feb. 2007.

RIBEIRO-RODRIGUES, R.; RESENDE, C. T.; JOHNSON, J.L.; RIBEIRO, F.; PALACI, M.S.R.T.; MACIEL, E.L.et al. Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis early markers of mycobacterial clearance. **Clin Diagn Lab Immunol.** v.9 n.4. p. 818-23, 2002 Jul.

REICHMAN, L. B. **Timebomb: The Global Epidemic of Multi-Drug-Resistant Tuberculosis** New York: Mc Graw-Hill, 2001.

ROJAS, M.; OLIVER, M.; GROS, P.; BARRERA, L. F.; GARCIA, L. F. TNF- α and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. **J. Immunol.**, v. 162, p. 6122-6131, 1999.

ROSEMBERG, J. **Tuberculose: panorama global, óbices para o seu controle.** Fortaleza, 1999.

ROTH, M.; NAUCK, M.; TAMM, M.; PERRUCHOUD, A. P.; ZIESCHE, R.; BLOCK, L.H. Intracellular interleukin - 6 mediates platelet-derived growth factor-induced proliferation of nontransformed cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p.1312-1316, 1995.

ROY, W.; McGUIRE, W.; MASCIE-TAYLOR, C. G. N.; SAHA, T.; HAZRA, S. K.; HILL, A. V. S.; KWIATKOWSKI, D. Tumor Necrosis Factor Promoter Polymorphism and Susceptibility to Lepromatous Leprosy. **J. Infect. Dis.**, v. 176, p. 530-532, 1997.

RUBINSTEIN, M.; DINARELLO, C. A.; OPPENHEIM, J. L.; HERTZOG, P. Recent advances in cytokines, cytokine receptors and signal transduction. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 9, n. 2, p. 175-181, June 1998.

RUFINO-NETTO, A. Tuberculose. **MDR – MÉDICOS HC- FMUSP**, ano 1, n. 3, jul./ago. 1998.

RUIZ-LINARES, A. Dinucleotide repeat polymorphism in the interferon-gamma (IFNG) gene. **Hum. Mol. Genet.**, v. 2, n. 9, p. 1508, Sept. 1993.

RUSSOUW, M.; NEL, H. J.; COOKE, G. S.; VAN HEIDEN, P. D.; HOAL. E. G. Association between tuberculosis and polymorphic NF (kappa) B binding site in the interferon gamma gene. **Lancet**, v. 361, p.1871-1872, 2003.

SALLAKCI, N.; COSKUN, M.; BERBER, Z.; GÜRKAN, F.; KOCAMAZ, H.; UYSAL, G. *et al.* Interferon- γ gene +874 T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. **Tuberculosis (Edinb.)**, v. 87, n. 3, p. 225-230, May 2007.

SANKARAN, D.; ASDERAKIS, A.; ASHRAF, S.; ROBERTS, I. S. D.; SHORT, C. D.; DYER, P. A. *et al.* Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. **Kidney Int.**, v. 56, n. 1, p. 281-288, July 1999.

SAUMOY, M.; LÓPEZ-DUPLA, M.; VELOSO, S.; ALONSO-VILLAVARDE, C.; DOMINGO, P.; BROCH, M. et al. The IL-6 system in HIV-infection and in HAART-related fat redistribution syndromes. **AIDS**, v. 22, n. 7, p. 893-903, Apr. 2008.

SAUNDERS, B.M., FRANK, A.A., ORME, A.M., COOPER, A.M. 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, June. 2000.

SCHLUTER, B.; KONIG, B.; BERGMANN, U.; MULLER, F. E.; KONIG, W. Interleukin 6: a potential mediator of lethal sepsis after major thermal trauma : evidence for increased IL-6 production by peripheral blood mononuclear cells. **J. Trauma**, v. 31, n. 12, p. 1663-1670, Dec.1991.

SCHOTTE, H.; SCHLÜTER, B.; RUST, S.; ASSMANN, G.; DOMSCHKE, W.; GAUBITZ, M. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 GC) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 40, n. 4, p. 393-400, Apr. 2001.

SCHREIBER, W.; MATHYS, F. K. **Infectio**: doenças infecciosas na história da medicina. Basileia, Suíça: Editiones Roche, 1991.

SCHWARTZ, R. S. Jumping Genes. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, n. 14, p.941-944, Apr.1995.

SELVARAJ, P.; ALAGARASU, K.; HARISHANKAR, M.; VIDYARANI, M.; RAJESWARI, N. D.; NARAYANAN, P. R. Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. **Cytokine**, v. 43, n. 1, p. 26-33, July 2008.

SHARMA, S. K.; MITRA, D. K.; BALAMURUGAN, A.; PANDEY, R. M.; MEHRA, N. K. Cytokine polarization in miliary and pleural tuberculosis. **J. Clin. Immunol.**, v. 22, n. 6, p. 345-352, Nov. 2002.

SMOLEN, S. J.; BEAULIEU, A.; RUBBERT-ROTH, A.; RAMOS-REMUS, C.; ROVENSKY, J.; ALECOCK, E. *et al.* Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. **Lancet**, v. 371, n. 9617, p. 987-997, Mar. 2008.

STEAD, W.W. Genetics and resistance to tuberculosis: could resistance be enhanced by genetic engineering? **Ann Intern Med**, v.116, p. 937-941, 1992.

STEAD, W. W. The origin and erratic global spread of tuberculosis: how the past explains the present and is the key to the future. **Clin Chest Med**, v.18, p. 65-77, 1997.

STEAD, W. W. Variation in vulnerability to tuberculosis in America today: random, or legacies of different ancestral epidemics?. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 5, n. 9, p. 807-814, 2001.

STOP TB partnership. The Global Plan to Stop TB, 2006-2015. actions for life: towards a world free of tuberculosis. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 10, n. 3, p. 240-241, Mar. 2006.

SUGAWARA, I.; MIZUNO, S.; YAMADA, H.; MATSUMOTO, M.; AKIRA, S. Disruption of Nuclear Factor- Interleukin-6, a Transcription Factor, Results in Severe Mycobacterial Infection. **Am. J. Pathol.**, v. 158, n. 2, p. 361-366, Feb. 2001.

SUTHERLAND, G. R.; RICHARDS, R. I. DNA Repeats: a Treasury of Human Variation. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, p.191-193, 1994.

TAGA, T.; HIBI, M.; HIRATA, Y.; YAMASAKI, K.; YASUKAWA, K.; MATSUDA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp 130. **Cell**, v. 3, p. 573-581, 1989.

TAUDORF, S.; KRABBE, K. S.; BERG, R. M. G.; MOLLER, K.; PEDERSEN, B. K.; BRUUNSGAARD, H. Common studied polymorphisms do not affect plasma cytokine levels upon endotoxin exposure in humans. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 152, p. 147-152, 2008.

TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 4, n. 6, p. 832-837, Dez. 1994.

TEGUI, A.; BERNARD, C. Cytokines immuno-inflammatory response and atherosclerosis. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 5, p. 263-270, 1994.

TEIXEIRA, G.M. Onde estamos e aonde vamos no que toca ao controle da tuberculose - editorial. **Bol Pneumol Sanit.**, v.12, n.1.p.3-4, 2004

TELZAK, E. E.; SEPKOWITZ, K.; ALPERT, P.; MANNHEIMER, S.; MEDARD, F.; EL-SADR, W. *et al.* Multidrug-Resistant Tuberculosis in Patients without HIV Infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 1333, n.14, p. 907-912, 1995.

TERRY, C. F.; LOUKACI, V.; GREEN, F. R. Cooperative Influence of Genetic Polymorphisms on Interleukin 6 Transcriptional Regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 24, p. 18138-18144, June 2000.

TISHLER, M.; YARON, I.; GEYER, O.; SHIRAZI, I.; NAFTALIEV, E.; YARON, M. Elevated Tear Interleukin-6 Levels in Patients with Sjögren Syndrome. **Ophthalmology**, v. 105, p. 2327-2329, 199

TSAO, T.; HUANG, C.; YANG, P.; LIAO, S.K.; CHANG, K.S.S.; Increased TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in the bronchoalveolar lavage fluid with the upregulation of their mRNA in macrophages lavaged from patients with active pulmonary tuberculosis. **Tubercle and Lung Diseases.**, v.79, n. 5, p.. 279-285, 1999

TSO, H. W.; IP, W. K.; CHONG, W. P.; TAM, C. M.; CHIANG, A. K.; LAU, Y. L.; Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. **Genes Immun.**, v. 6, p.358-363, 2005.

TUBERCULOSIS and AIDS. Statement on AIDS and tuberculosis. Geneva, March 1989. Global Programme on AIDS and Tuberculosis Programme, World Health Organization, in collaboration with the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. **Bull. Int. Union Tuberculosis Lung Dis.**, v. 64, n. 1, p. 8-11, Mar. 1989.

VAN SNICK, J. Interleukin – 6: an overview. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 252-278, 1990.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G. *et al.* The Sequence of Human Genome. **Science**, v. 291, n. 5507, p.1304-1351, Feb. 2001.

WARLÉ, C. M.; FARHAN, A.; METSELAAR, J. H.; HOP, C. J. W.; PERREY, C.; ZONDERVAN, E. P. *et al.* Cytokine Gene Polymorphisms and Acute Human Liver Graft Rejection. **Liver Transpl.**, v. 8, n. 7, p. 603-611, July 2002.

WONG, C.F.; YEW, W.W.; LEUNG, S.K.; CHAN, C.Y.; HUI, M.; AU-YEANG, C.; CHENG, A.F. Assay of pleural fluid interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma in the diagnosis and outcome correlations of tuberculosis effusion. **Respir Med.** v.12 p. 1289-95, 2003 Dec.

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M. J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 13, n. 1, p. 5-18, Jan. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Medical News Today**: Faster Detection Of Multidrug-Resistant TB. 2008. Disponivel:

<http://www.searo.who.int/EN/Section10/Section2097/Section2103/Section2510_14294.htm>. Acesso em: 12 Nov. 2008.

YAMAMURA, M.; WANG, X. H.; OHMEN, J. D.; UYEMURA, K.; REA, T. H.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Cytokine Patterns of Immunologically Mediated Tissue Damage. **J. Immunol.**, v. 149, n. 4, p.1470-1475, Aug. 1992.

YOSHIZAKI, K. T.; MATSUDA, N.; NISHIMOTO, T.; KURITANI, L.; TACHO, K.; AOZASA, T.; NAKAHATA, H.; KAWAI, H. Y.; TOGOH, T.; KOMORI, T. *et al.* Pathogenic significance of interleukin 6 in Castleman's Disease. **Blood**, v. 74, n. 4, p. 1360-1367, Sept. 1989.

ANEXOS

ANEXO A

FICHA INDIVIDUAL: Tb. MDR x INTERLEUCINA – 6

MDR

TS

ESP

SADIO

Nome: Pront. / Origem:

Idade: Sexo: M F IMC: Cor: B P O

Data do diag. Inicial: Data do diag. da M.R.:

Início do trat.: Mudança terapêutica p/ M.R.:

TS NA FAMÍLIA : SIM NÃO MDR NA FAMÍLIA : SIM NÃO Drogas em uso: RMP INH PZA SM EMB ETH AMICACINA OFLOXACINA TERISIDONA CLOFAZIMINA OUTRAS Doenças associadas: HIV AIDS LINFOMA SILICOSE DM

OUTROS

Drogas em uso: CORTICOIDE CITOSTÁTICO ANTI-ULCEROSOS BRONCODILATADOR OUTROS _TSA x Resistência: RMP INH PZA EMB SM ETH AMICACINA OFLOXACINA TERISIDONA CLOFAZIMINA

IL – 6:

GENOTIPAGEM DA IL- 6

R X TÓRAX

CT TÓRAX.....

OUTROS.....

Data da alta: Data do óbito:

ANEXO B

Ficha de doação de sangue do HEMOCE



FICHA DE DOAÇÃO DE SANGUE		Sequenc.	Data Emissão
Reg. Internação	Beneficiário		
Hospital	Motivo da doação		
Código Triagem	Tipagem Preliminar	Hemoglobina	Hematócrito
	Pressão Arterial	Peso	Pulso
			Temperatura
			Altura
	S	N	S N
01. Atualmente se sente bem, tem boa saúde			19. Teve Hanseníase, Calazar, Leishmaniose?
02. Ingeriu bebida alcoólica?			20. Tatuagem, acupuntura / furou a orelha, quando?
03. Está de jejum? Está de vigília?			21. Gravidez? Puerpério? Amamentação? Aborto?
04. Está gripado? Virose?			22. Usa drogas? Etilista?
05. Tomou algum medicamento?			23. Apresenta perda de peso / lúgias no corpo?
06. Fez tratamento dentário últimas 72 horas?			24. Diarréia, febre persistente ou sudorese?
07. Tratamento médico anterior?			25. Mancha na pele / lesões na boca / genitais?
08. Fez cirurgia, esteve hospitalizado?			26. Pratica sexo seguro?
09. Recebeu transfusão de sangue? Quando?			27. Teve sífilis ou outras doenças venéreas?
10. Tomou vacina recentemente? Quando? Quais?			28. Teve relação homossexual c/perc. Homo?
11. Doenças cardiovasculares? Dor no peito?			29. Contato sexual c/prostituta, viciado em drogas?
12. Tuberculose? Asma?			30. Você veio doar para fazer teste de AIDS?
13. Hepatite? Icterícia? Contato Intimo?			31. Morou fora do Brasil? Onde? (Ano e Tempo)
14. Malária: Área endêmica? Anti-malarico?			32. Você já doou sangue? Data da última doação:
15. Teve anemia? Sangramento anormal? Câncer?			
16. Já teve desmaio ou convulsão?			
17. Tem alergias? Reumatismo? Diabetes?			
18. Teve Chagas ou foi picado pelo barbeiro?			
Observ.:			
	Resp. Triagem	Código	Assinatura
Avaliação () AP () RT () RD	Mot. Rec.	Desc. Motivo de Recusa	
Flebotom. Inic.	Assinatura	Flebotom. Term.	Assinatura
			1. () Doação s/Transfusão 2. () Coleta de Amostra 3. () Doação p/ Transfusão
Código da Bolsa	Braço Puncionado	Hora Inic. Coleta	Hora Term. Coleta
	Reações Adversas	Código da Amostra	

Candidato				
Sexo <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	Data Nasc.	Nº Documento	Tipo Doc.	Org. Expedidor
Nome do Pai				
Nome da Mãe				
Endereço			Bairro	
Município		CEP	Telefone	
Município de Nascimento				Estado de Nasc.
Estado Civil <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> V	Co-habitante <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	Grau de Escolaridade	Cor da Pele <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> N	
Ocupação				

Estado Civil: C = Casado, D = Divorciado, S = Solteiro, V = Viúvo
Cor da Pele: A = Amarela, B = Branca, M = Mulata, N = Negra

TERMO DE RESPONSABILIDADE

Declaro que compreendi as questões a mim formuladas e que as informações que eu prestei são verdadeiras, e desde que atendam aos requisitos para doação de sangue, permito que sejam retirados _____ ml de meu sangue para uso a critério do _____.

_____, _____ de _____ de _____

Assinatura do Doador

ANEXO C

Termo de consentimento informado

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

PACIENTE	RESPONSÁVEL LEGAL	GRAU
NOME DO PACIENTE: _____		
IDENTIDADE _____	SEXO M F	DN ___ / ___ / ___
ENDEREÇO: _____	Nº _____	Apto _____
BAIRRO: _____	CIDADE _____	
CEP: _____	Nº TELEFONE: () _____	

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO: Dosagem de Interleucina – 6 em pacientes com Tuberculose multidrogarresistente e estudo do polimorfismo do promotor da Interleucina – 6.

PESQUISADOR: José Walter Correia, médico-chefe do Serviço de Clínica Médica do Hospital Geral Dr. César Cals / SESA.

Endereço: Av. Do Imperador, 455. Fones: 3488-4600, 3488-2661 e 9982-5689.

O objeto de nossa pesquisa científica é tentar identificar as pessoas que tem tendência para desenvolver tuberculose resistente aos medicamentos usualmente utilizados para tratar essa doença, assim como determinar se a destruição do pulmão que se pode ser vista neste grupo de pacientes está relacionado com a produção de uma substância chamada de interleucina – 6. Será dividida em duas partes: na primeira, faremos inicialmente a dosagem da Interleucina – 6 no sangue, pois poderemos estar descobrindo o elemento responsável pela inflamação crônica que ocorre na tuberculose resistente; depois, procuraremos saber porque o organismo de certas pessoas produzem uma quantidade maior da Interleucina do que outras; com isto, estaremos tentando descobrir os motivos de alguns doentes terem o pulmão destruído pela doença, enquanto outros se curam com muita facilidade.

Nossa pesquisa será feita com a análise do sangue, colhido em veia do braço (2cc), portanto com risco desprezível; apenas o incômodo da picada da agulha e, no máximo, um pequeno hematoma no local da picada. Os pacientes participantes da pesquisa poderão desistir, a qualquer tempo, sem prejuízo para nosso trabalho, assim como terão livre acesso aos resultados dos exames a que se submeteram.

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 _____

ANEXO D

Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa



SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ / SUS
HOSPITAL GERAL CÉSAR CALS
CENTRO DE ESTUDOS APERFEIÇOAMENTO E PESQUISA
COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA



Of. 043/2005

Protocolo do CEP: 043/2005

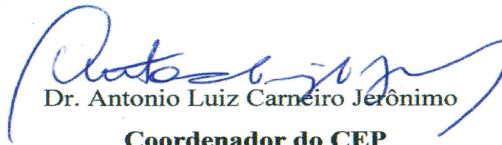
Pesquisador responsável: José Walter Correia

Titulo do Projeto: Estudo do Polimorfismo do Promotor da Interleucina – em Pacientes Portadores de tuberculose Multidrogarresistente.

Levamos ao conhecimento de V.Sa. que o Comitê de Ética Pesquisa(CEP) do **Hospital Geral Dr. César Cals**, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, Resolução N°. 196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução N°. 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, apreciado e aprovado o projeto supracitado na reunião do dia 04 de Novembro de 2005.

Outrossim, informamos que o pesquisador deverá se comprometer a enviar relatório parcial e final do referido projeto.

Atenciosamente,


Dr. Antonio Luiz Carneiro Jerônimo
Coordenador do CEP


Dr. Ernani Ximenes Rodrigues
Diretor Geral /HGCC

ANEXO E

Quadro de interpretação dos perfis polimórficos



WORKSHEET
Cytokine Genotyping Tray, Lot 4

Patient Male
 Donor Female

Name _____ Race _____ Birthdate _____ ABO/Rh _____

Sample I.D. _____ Tray Exp. Date _____

Disease _____ Tray Lot # _____

Relationship to Patient _____

POSITIONS	1H/3H/ 5H/7H/ 9H/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
RESULTS (mark positive locations)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
PRODUCT SIZE (bp)	750	125	125	175	175	125	125	300	300	300	250	250	175	175	250	250
SPECIFICITY	Neg Ctrl	TNF-α promoter -308A	TNF-α promoter -308G	TGF-β1 codon 10T	TGF-β1 codon 10C	TGF-β1 codon 25C	TGF-β1 codon 25G	IL-10 promoter -1082A,-819T	IL-10 promoter -1082G,-819C	IL-10 promoter -1082A,-819C	IL-10 promoter -819T,-592A	IL-10 promoter -819C,-592C	IL-6 promoter -174C	IL-6 promoter -174G	IFN-γ intron 1 +874T	IFN-γ intron 1 +874A
TNF-α	G/G (low)	G/A (high)	A/A (high)	T/T G/G (high)	T/C G/C (high)	C/C G/C (intermediate)	T/T G/C (intermediate)	C/C G/C (low)	T/T C/C (low)	T/C C/C (low)	GCC/GCC (high)	GCC/ACC (intermediate)	GCC/ATA (intermediate)	ACC/ACC (low)	ACC/ATA (low)	ATA/ATA (low)
TGF-β1	G/G (high)	T/T G/C (high)	C/C G/C (intermediate)	T/T G/C (intermediate)	C/C G/C (low)	T/T C/C (low)	T/C C/C (low)	GCC/GCC (high)	GCC/ACC (intermediate)	GCC/ATA (intermediate)	ACC/ACC (low)	ACC/ATA (low)	ATA/ATA (low)	G/G (high)	G/C (high)	C/C (low)
IL-10	T/T (high)	T/A (intermediate)	A/A (low)													
IL-6																
IFN-γ																

Test Performed by _____ Date _____

Read by _____ Date _____

Reviewed by _____ Date _____

ANEXO F

Distribuição de genótipos de IL-6 -174 em pacientes do grupo 2 com tuberculose, segundo sexo, idade e classificação quanto à resistência aos tuberculostáticos.

CASO	IDADE	SEXO	CLASSIFICAÇÃO	GENÓTIPO
1	56	F	MDR	C/C
2	43	F	TS	C/C
3	46	M	TS	C/C
4	47	M	MDR	C/C
5	62	F	TS	C/C
6	40	M	TS	G/C
7	41	M	MDR	G/C
8	50	M	TS	G/C
9	51	F	MDR	G/C
10	16	M	MDR	G/C
11	29	M	TS	G/C
12	64	M	TS	G/C
13	30	F	TS	G/C
14	55	M	MDR	G/C
15	39	M	TS	G/C
16	65	M	MDR	G/G
17	34	F	MDR	G/G
18	38	F	MDR	G/G
19	41	F	MDR	G/G
20	25	F	MDR	G/G
21	54	F	MDR	G/G
22	41	F	MDR	G/G
23	48	M	TS	G/G
24	39	M	TS	G/G
25	45	F	MDR	G/G
26	30	M	MDR	G/G
27	43	M	MDR	G/G
28	44	M	TS	G/G
29	44	M	TS	G/G
30	25	F	TS	G/G
31	49	M	MDR	G/G
32	61	F	MDR	G/G
33	71	M	TS	G/G
34	63	F	TS	G/G
35	50	M	MDR	G/G
36	56	F	MDR	G/G
37	28	F	MDR	G/G
38	32	M	TS	G/G
39	48	M	MDR	G/G
40	57	M	MDR	G/G
41	51	M	MDR	G/G
42	32	M	TS	G/G

ANEXO G

**Distribuição de genótipos de IL-6 -174, segundo sexo e idade,
em indivíduos saudáveis do grupo 2.**

NÚMERO	IDADE	SEXO	GENÓTIPO
1	23	M	C/C
2	39	M	G/G
3	26	F	G/G
4	24	M	G/G
5	29	M	G/G
6	23	M	G/C
7	27	M	G/G
8	26	M	G/G
9	26	F	G/G
10	27	M	G/G
11	45	M	G/G
12	26	F	G/G
13	25	M	G/C
14	24	F	G/G
15	26	M	G/G
16	27	F	G/C
17	26	M	G/G
18	19	M	G/C
19	19	M	G/G
20	20	M	G/C
21	26	M	G/C
22	25	M	G/C
23	24	M	G/G
24	23	M	G/C
25	27	M	G/G
26	19	M	G/G
27	20	M	G/G
28	50	M	G/G
29	34	M	G/G
30	22	M	G/G
31	26	F	G/G
32	31	M	C/C
33	30	M	G/G
34	23	M	G/C
35	38	M	G/C
36	28	M	G/C
37	29	M	G/C
38	29	F	G/G
39	25	M	G/G
40	35	M	G/C
41	26	M	G/G
42	28	M	G/G
43	20	M	G/C
44	27	F	G/G
45	32	M	G/G

46	40	M	C/C
47	30	M	C/C
48	30	F	C/C
49	41	M	C/C
50	27	M	G/C
51	29	M	G/C
52	29	M	G/C
53	31	M	G/C
54	20	M	G/C
55	24	M	G/C
56	36	M	G/C
57	46	M	G/C
58	28	F	G/C
59	36	M	G/C
60	23	M	G/C
61	39	M	G/C
62	34	M	G/C
63	29	M	G/C
64	28	M	G/G
65	27	F	G/G
66	26	F	G/G
67	28	M	G/G
68	51	M	G/G
69	27	F	G/G
70	21	M	G/G
71	28	F	G/G
72	29	M	G/G
73	25	F	G/G
74	30	M	G/G
75	34	M	G/G
76	38	M	G/G
77	23	M	G/G
78	27	F	G/G
79	28	F	G/G

Interleukin-6 Blood Levels in Sensitive and Multiresistant Tuberculosis

J.W. Correia, M.V. Freitas, J.A. Queiroz, M. PereiraPerrin, B. Cavadas

Abstract

Background: Interleukin-6 (IL-6) is a proinflammatory cytokine implicated in the immunopathogenesis of tuberculosis (TB). Multidrug resistance in tuberculosis is recognized worldwide as an important public health issue. The mechanism underlying TB pathogenesis in general and drug resistance in particular is not well understood, but it may be that IL-6 is one factor that enhances pathology in drug-resistant TB. The purpose of this study was to identify patterns of IL-6 production in active pulmonary TB with different sensitivity to standard drug therapy.

Patients and Methods: IL-6 blood levels were studied in 38 patients with active pulmonary TB: 23 patients were very sensitive to specific chemotherapy (STB), and 15 were multiresistant (MDRTB). An ELISA assay (Biossource) was used to quantify IL-6 in the sera of 38 TB patients and 63 healthy blood donors.

Results: The STB group was composed of 16 males (73.9%) and 7 females, MDRTB by 9 males (60%) and 6 females, and control group by 51 males (81%) and 12 females. The results showed a significant increase in IL-6 concentration in TB (median = 4.3 pg/ml, range 0.5–24) compared to that of healthy individuals (median = 0.5 pg/ml, range 0–2.8, $p < 0.001$). Additionally, IL-6 concentrations were increased in both STB (median = 4.1 pg/ml, range 0.5–24) and MDRTB (median = 5.1 pg/ml, range 0.5–12) groups in relation to controls ($p < 0.001$). In contrast, significant differences were not observed between STB and MDRTB groups ($p > 0.05$).

Conclusion: IL-6 levels were increased in pulmonary tuberculosis, independent of drug resistance.

will become sick and result in an predicted 35 million deaths [1]. The disease, together with AIDS and malaria, continues to be one of the top three lethal infectious diseases in the world [2]. In most European countries, the incidence of TB has gone down since the 1970s and the 1980s [1], except in prisons where the incidence is up 83.6 times compared to civilians [3]. For example, TB rates in Russia jumped from 38/100,000 in 1991 to 74/100,000 in 1997, and in prisons it increased by nearly 100 times [4]. The picture of tuberculosis in Brazil has a similar trend [5]. The disease accentuates social inequalities and is exacerbated by co-infection with HIV.

The interaction between mycobacteria and host, especially with macrophages, is well known. Given that 90% to 95% of infected individuals do not develop the clinical disease, a so far unknown mechanism must exist to justify such pathochrony. Host immune response is usually successful in containing the evolution of the infection, although not sufficient to eliminate the microorganism. Active disease is due probably to the absence of an effective immune response [2]. Cellular immunity plays a fundamental role in tuberculosis control. Most infected people develop hypersensitivity response 2–10 weeks after the exposure to the bacteria, which are destroyed mostly by mechanisms that depend on a series of interactions between phagocytes and cytokines [7, 8]. Immune response to pathogens depends, at least partly, on cytokines that regulate cells of the immune system [10].

IL-6 has been implicated in the immunopathogenesis of tuberculosis [11–13]; Saunders et al. [13] demonstrated

Infection 2008
DOI 10.1007/s15010-008-7398-3

Introduction

Tuberculosis (TB), caused by infection of *Mycobacterium tuberculosis*, represents a major public health challenge to the world. According to the projections of the World Health Organization (WHO), there will be about 1 billion newly infected individuals by 2020; of these, 200 million

J.W. Correia

Internal Medicine Unit, Hospital Geral Dr César Cals, Fortaleza, CE, Brazil
M.V. Freitas (corresponding author), J.A. Queiroz
Dept. of Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Monsenhor Furtado s/n, Fortaleza, CE, CEP: 60441-750 Brazil,
e-mail: maxvcf@hotmail.com

M. PereiraPerrin

Tufts University School of Medicine, Boston, MA, USA

B. Cavadas

Dept. of Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

Received: October 11, 2007 · Revision accepted: April 28, 2008
Published online: November 8, 2008

that IL-6 is required for the rapid expression of an initial protective IFN- γ response during *M. tuberculosis* infection. This early response occurs in the lung and is important to the initial containment of mycobacterial growth in this organ. However, the precise mechanism by which IL-6 mediates protection has not been completely clarified [11].

It remains to be determined whether drug resistance alters cytokine patterns in TB patients. This study was designed to determine whether sera levels of IL-6 increase or decrease in TB patients and whether such levels are dependent on the sensitivity to drug.

Patients and Methods

Patients

A total of 38 patients with pulmonary tuberculosis, aged between 20 years and 70 years, were analyzed in this study. Patients were recruited at Dona Libânia Healthy Unit and in Messejana or Maracanau Hospitals, Fortaleza, Ceará, Brazil. Patients were divided into two groups according to the sensitivity to anti-tuberculosis drugs: [1] sensitive tuberculosis (STB) and [2] multi-resistant tuberculosis (MDRTB).

The STB group was composed of 23 patients presenting with initial or reactivated tuberculosis using anti-tuberculosis drugs, with positive bacilloscopy. The MDRTB group was composed of 15 patients with positive bacilloscopy and culture to *M. tuberculosis* in sputum, during anti-tuberculosis treatment. Additionally, MDRTB patients presented resistance to, at least, rifampicin (RFP) and isoniazid (INH), confirming multi-drug resistance. Patients with AIDS, others pulmonary diseases and others granulomatosis were excluded.

Controls

Sixty-three voluntary healthy blood donors from HEMOCE in Ceará, Brazil were also included in the study. All of them had negative serology for hepatitis (A, B and C), HIV, HTLV, syphilis, and Chagas disease.

IL-6 Dosage

IL-6 serum concentrations in peripheral venous blood were measured by an ELISA sandwich assay and quantified based on standard curves of IL-6 as per instructions of the manufacturer (Biossource, Camarillo, CA, USA).

Statistical Analysis

Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to compare IL-6 values observed in patients and controls. P values < 0.05 were considered significant.

Ethical Considerations

An informed consent term was signed by all patients and controls and the study was approved by the Ethical Committee from the Messejana Hospital, Ceará, Brazil.

Results

Distribution of Average Age and Sex in Control and TB Patients

The demographic characteristics of controls and patients are demonstrated in table 1.

Table 1
Demographic characteristics of tuberculosis (TB) patients, sensitive (STB) or multiresistant (MDRTB), and healthy control individuals.

Demographic characteristics	TB (n = 38) n (%)	STB (n = 23) n (%)	MDRTB (n = 15) n (%)	Controls (n = 63) n (%)
Sex				
Male	25 (65.8)	16 (73.9)	9 (60)	51 (81)
Female	13 (34.2)	7 (26.1)	6 (40)	12 (19)
Age (years)	20-70	20-70	22-59	19-50
Median (years)	44	38	46	26

IL-6 Concentrations

Figure 1 shows that the median concentration of IL-6 in the sera of TB patients was 4.3 pg/ml compared to 0.5 pg/ml for non-TB, healthy control individuals ($p < 0.001$), or 8.6-fold increase in cytokine concentration. When TB patients were stratified into drug-sensitive and drug-resistant groups, the following results were obtained: IL-6 in the sera of drug-sensitive patients continued to be much higher (8.2-fold) than in the healthy control group, as did the concentration of IL-6 in the sera of multi-drug resistant patients (10.2-fold).

Discussion

IL-6 is a multifunctional cytokine secreted by lymphoid and nonlymphoid cells regulating B- and T-cell function and is a potent inducer of the acute-phase protein response [9]. In active tuberculosis, the role of IL-6 may be predominantly negative. This is supported by two facts: (1) IL-6 promotes the growth of mycobacteria in peripheral blood monocytes and (2) IL-6 inhibits the production of TNF- α and IL-1 β , which may enhance the intracellular killing of microorganisms and the development of granuloma [8].

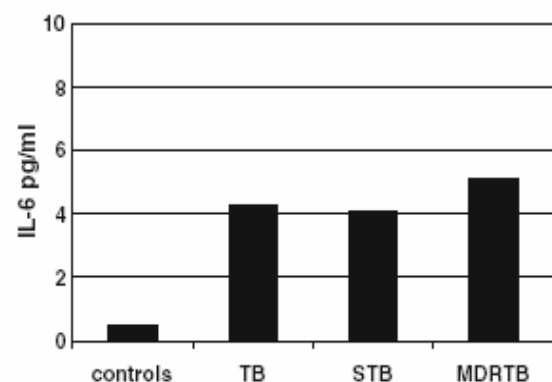


Figure 1. IL-6 levels in the sera of patients with tuberculosis (TB), sensitive (STB) or multiresistant (MDRTB), and healthy controls. IL-6 levels are presented as median; range for TB = 0.5-24, STB = 0.5-24, MDRTB = 0.5-12 and healthy controls = 0-2.8; $p < 0.001$ controls vs TB; $p < 0.001$ controls vs STB; $p < 0.001$ controls vs MDRTB; $p > 0.05$ TB vs MDRTB.

In the current study, we found IL-6 level in peripheral blood to be increased in the population of patients with tuberculosis (n = 38) compared to the healthy group (4.3 pg/ml vs 0.5 pg/ml), consistent with previous measurements in bronchoalveolar lavage fluid [14], in sputum [15] and in pleural effusion [16].

When IL-6 concentrations in the sera of patients with STB (n = 23) were compared with healthy controls (n = 63), we observed a 8.2-fold increased concentrations in the patients with STB (4.1 pg/ml vs 0.5 pg/ml, $p < 0.001$). This robust increase suggests that IL-6 contributes to the inflammatory activity in the TB patients, in accordance with the proinflammatory potential of IL-6 in experimental models of acute infection [17]. Although the role of IL-6 in chronic infectious diseases such as tuberculosis has not yet been elucidated, Poveda et al. [18] showed higher levels of IL-6 in peripheral blood in TB patients than in other chronic bacterial infections. Angrill et al. [19] also showed a significant increase in IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid in patients with bronchiectasis compared to controls, and the reduction of its levels after treatment of the infectious exacerbation [20].

The discussion about the role of cytokine in resistant patients is important because it could explain different patterns of inflammatory reaction that occur in tuberculosis. IL-6, together with tumor necrosis factor and IL-1, belongs to the group of proinflammatory cytokines which initiate early inflammatory responses. More attempts to define the role of IL-6 in the anti-infective immune response have emphasized its proinflammatory potential during acute infections [13, 18]. Nevertheless, IL-6 has been regarded to have both pro-inflammatory and anti-inflammatory properties [21]. In the setting of chronic disease, it may be a player in the elicitation of cellular immune responses against affected cells and of mucosal humoral responses against infection [22].

In this current study, we show IL-6 levels to be increased in the population of patients with active tuberculosis compared to healthy control individuals. Macrophage activation by cytokines is the main mechanism underlying acquired resistance to pathogen; however, even activated macrophages fail to fully eradicate the pathogen [6]. It has been demonstrated that IL-6 is required for the rapid expression of an initial protective IFN- γ response during *M. tuberculosis* infection [13]. This early response occurs in the lung and is important in the initial containment of mycobacterial growth in this organ. Sahashi et al. [23] suggest a similar action for IL-6 studying the lung in sarcoidosis; they defend its participation in the alveolitis that precedes granuloma formation – the characteristic hallmark of sarcoidosis. The present study clearly corroborates these results.

When compared to STB (5.1 pg/ml vs 4.1 pg/ml), a tendency of an increase in IL-6 median in MDRTB was observed, which was not significant. However, significance was not achieved. Tuberculosis group stratification

into STB and MDRTB seems to have limited this analysis as two small groups remained to be compared.

Studies about the cytokine net and tuberculosis are important because it is known that drugs used for treatment do not kill mycobacteria, they only block the bacterial cell cycle. Moreover, efficacy of the immune response against tuberculosis might be increased. Simbirtsev et al. have demonstrated the preliminary action of SCV-07 (gamma-glutamyl-tryptophan), a synthetic dipeptide that stimulates T-lymphocyte differentiation and specific response and enhances IL-2 and IFN- γ in mice. They observed an increased anti-tuberculosis efficacy when it was used in combination with the standard chemotherapy [24]. Thus, modern therapy against tuberculosis should be based on stimulation of anti-tuberculosis immune response associated with a standard chemotherapy, especially in multi-drug resistant cases.

In conclusion, peripheral IL-6 levels are increased in active pulmonary tuberculosis independent of drug sensitivity. Further studies are necessary to elucidate the role of IL-6 on MDRTB.

Acknowledgments

This work was supported by NIH NS40574 and NS429660 (to MPP) and by Grant-in-Aid of Hospital Geral César Cals.

References

1. Opravil M: Epidemiological and clinical aspects of mycobacterial infections. *Infection* 1997; 25: 56–59.
2. Collins HL, Kaufmann SHE: The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology* 2001; 103: 1–9.
3. Aerts A, Hauer B, Wanlin M, Veen J: *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006; 10: 1001–1007.
4. Banatvala N, Peremitin GG: Tuberculosis, Russia and the Holy Grail. *Lancet* 1999; 353: 999–1000.
5. Abrahão RCM, Nogueira PA, Malucelli MIC: Tuberculosis in county jail prisoners in western sector of the city of São Paulo, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 1215–1223.
6. Parkin J, Cohen B: An overview of the immune system. *Lancet* 2001; 357: 1777–1789.
7. Zhang Y, Broser M, Rom WN: Activation of the interleukin 6 gene by *Mycobacterium tuberculosis* or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF-IL-6 and NF-kB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2225–2229.
8. La Cava A, Sarvetnick N: The role of cytokines in autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun* 1999; 1: 56–71.
9. Van Snick J: Interleukin 6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 253–278.
10. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA: 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* 1990; 75: 40–47.
11. Saunders BM, Frank AA, Orme AM, Cooper AM: Interleukin-6 induces early gamma-interferon production in the infected lung, but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 2000; 68: 3322–3326.

12. Verbon N, Juffermans SJH, Van Deventer P, Speelman H, Van Der Deutekom Poll T: Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 110–113.
13. Tsao TCY, Huang C, Yang P, Liao SK, Chang KSS: Increased TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in the bronchoalveolar lavage fluid with the upregulation of their mRNA in macrophages lavaged from patients with active pulmonary tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 1999; 79: 279–285.
14. Ribeiro-Rodrigues R, Resende CT, Johnson JL, Ribeiro F, Palaci MS, Sa RT, Maciel EL, Pereira Lima FE, Dettoni V, Toossi Z, Boom WH, Dietz R, Ellner JJ, Hirsch CS: Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 818–823.
15. Xirouchaki N, Tzanakis N, Bouros D, Kyriakou D, Karkavitsas N, Alexandrakis M, Siafakas N: Diagnostic value of interleukin-1 α , interleukin-6 and tumor necrosis factor on pleural effusions. *Chest* 2002; 121: 815–820.
16. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G: Impaired immune and acute phase responses in interleukin-6 deficient mice. *Nature* 1994; 368: 339–342.
17. Poveda F, Camacho J, Arnalich F, Codoceo R, Del Arco A, Martinez-Hernández P: Circulating cytokine concentrations in tuberculosis and other chronic bacterial infections. *Infection* 1999; 27: 272–274.
18. Angrill J, Agusti C, De Celis R, Filella X, Rano A, Elena M, De La Bellacasa JP, Xaubet A, Torres A: Bronchial inflammation and colonization in patients with clinically stable bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1628–1632.
19. Nixon LS, Yung B, Bell SC, Elborn JS, Shale DJ: Circulating immunoreactive interleukin-6 in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Med* 1998; 157: 1764–1769.
20. Opal SM, DePalo VA: Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117: 1162–1172.
21. Zing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK: IL-6 is an antiinflammatory cytokine require for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998; 101: 311–320.
22. Flynn JL, Chan J: Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 93–129.
23. Sahashi K, Ina Y, Takada K, Sato T, Yamamoto M, Morishita M: Significance of interleukin 6 in patients with sarcoidosis. *Chest* 1994; 106: 156–160.
24. Simirtsev A, Kolobov A, Zabolotnyh N, Pigareva N, Konusova V, Kotov A, Variouchina E, Bokovanov V, Vinogradova T, Vasilieva S, Tuthill C: Biological activity of peptide SVC-07 against murine tuberculosis. *Russ J Immunol* 2003; 8: 11–22.



[E-mail](#)
[Endereços](#)
[Agenda](#)
[Bloco de notas](#)
[Quais as novidades?](#)
[Opções](#)

[anterior](#) | [próxima](#) | [Voltar para as mensagens](#)
[Marcar como não lida](#)
[Imprimir](#)

Pastas

[\[Adicionar - Editar\]](#)

Atalhos de busca

Submission Confirmation for your paper Segunda-feira, 17 de Novembro de 2008 13:08

De: "Patrick.Brennan@ColoState.EDU" <Patrick.Brennan@ColoState.EDU>

Para: walterhgcc@yahoo.com.br

Dear Walter,

Your submission entitled "The -174G>C polymorphism is a determinant of interleukin-6 (IL-6) levels in pulmonary tuberculosis" has been received by Tuberculosis

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/tube/>.

Your username is: waltercorreia
Your password is: correia

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Please note that papers received this December will be processed by January of next year already due to a backlog of submissions.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Tuberculosis

[anterior](#) | [próxima](#) | [Voltar para as mensagens](#)

[Cabeçalhos completos](#)

The -174G>C polymorphism is a determinant of interleukin-6 (IL-6) levels in pulmonary tuberculosis.

Correia JW¹

Sidrim JJC²

Lima LNGC²

Frota CC²

Queiroz JA²

PereiraPerrin M³

Freitas MV²

¹ Internal Medicine Unit, Hospital Geral Dr César Cals, Fortaleza-CE, Brazil

² Department of Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil

³ Tufts University School of Medicine, Boston, Massachusetts

Corresponding author address:

Correia JW

walterhgcc@yahoo.com.br

Rua Coronel Linhares 950/903

CEP: 60170-240

Tel/FAX: ++55.85.32617580

Fortaleza – Ceará

Brasil

Summary

Interleukin-6 is a multifunctional cytokine produced by different cells. A -174G>C polymorphism in the IL-6 gene is associated with cytokine production and disease susceptibility. The aim of this study was to investigate the impact of the -174G>C polymorphism in the peripheral levels of IL-6 in pulmonary tuberculosis. We studied 17 patients (median of age = 51yrs, male = 48.5%) with active pulmonary tuberculosis and 43 healthy individuals (median of age = 26yrs, male = 86%). The -174G>C polymorphism was genotyped by polymerase chain reaction and IL-6 serum levels were measured by ELISA. A Mann-Whitney test was used to compare IL-6 levels and a two-tailed Fisher's test to compare genotype frequencies. We found that the most frequent genotype in pulmonary tuberculosis and in controls was the -174G/G genotype, 58.9% and in 62.8% ($p < 0.05$), respectively. A significant increase in IL-6 levels was observed in the G/G homozygous genotype, median=4.7pg/mL (range=4.1-12 pg/mL) when compared to the combined genotype G/C C/C, median=0.6 pg/mL (range=0.5-7.4 pg/mL), $P=0.04$. In conclusion, our data suggest that the -174G/G genotype is a determinant in the overproduction of the IL-6 in patients with active pulmonary tuberculosis.

Key words

Tuberculosis, -174G>C IL-6 polymorphism, interleukin-6, IL-6 levels

Introduction

Interleukin-6 (IL-6) is produced by a vast repertoire of cells, including macrophages, fibroblasts, endothelial cells, mast cells and T-helper type 2 CD4+ cells (Th2). However, antigen presenting cells are the most relevant reservoir of IL-6. Although the role of IL-6 in the pathogenesis of tuberculosis is still not well established, it is known that this cytokine plays multiple actions on inflammation, hematopoiesis and T cell differentiation. Because IL-6 is a multifunctional cytokine and is produced by different cells, it is possible that IL-6 could play an important role in pulmonary tuberculosis^{1,2}.

A G>C polymorphism in the promoter region of the IL-6 gene, at the position -174, has been associated with the production of high serum levels of IL-6 and increased risk to develop coronary arterial and cerebral-vascular diseases^{3,4}. In autoimmune diseases it was demonstrated that the genotype C/C induces lower levels of IL-6 when compared to the G/C and G/G genotypes, and suggested that the reduction in the frequency of the C/C genotype conferred protection against systemic juvenile rheumatoid arthritis⁵. In Sjögren syndrome, the G allele was associated with high IL-6 levels and the development of extra-glandular manifestations⁶. The relevance of this polymorphism in autoimmune disease is not completely clear. In systemic lupus erythematosus, association was shown in American Caucasians⁷, but not confirmed in Germanic Caucasians⁸ and Colombians⁹. Indeed, a non-consensual association of the -174G>C polymorphism was demonstrated in Hodgkin lymphoma^{10,11}. The -174G>C polymorphism was recently studied in HIV infection and the presence of the G/G genotype conferred susceptibility to Kaposi sarcoma development¹².

Few studies has been conducted concerning to the associations of the -174G>C polymorphism in tuberculosis. For instance, a similar frequency of -174G>C was found in tuberculosis and control individuals from Colombia¹³, contrary to an increased frequency of the G/G -174 genotype in Iranian patients with pulmonary tuberculosis¹⁴.

In a recent study, we found increased levels of serum IL-6 in Brazilian patients with pulmonary tuberculosis, suggesting a role for this cytokine in the systemic inflammation of tuberculosis. The present study was conducted to investigate the impact of the -174G>C polymorphism in the peripheral levels of the IL-6 in pulmonary tuberculosis.

Material and Methods

Patients and controls

The case group was composed of 17 individuals with pulmonary tuberculosis infection by a *Mycobacterium tuberculosis* confirmed by positive culture in sputum. Patients were recruited in General Hospital Dr Cesar Cals and Messejana and Maracanau Hospitals, Fortaleza, Ceará, Brazil. Patients with extra-pulmonary involvement and/or with HIV were excluded.

The control group was composed of 43 volunteer healthy blood donors from HEMOCE in Fortaleza, Ceará, Brazil. This is the same geographic area and with similar ethnic origins of the patients. All of them had negative serology for hepatitis (A, B and C), HIV, HTLV, syphilis, and Chagas disease.

IL-6 polymorphism

Genomic DNA was isolated from peripheral blood cells using Amersham commercial kits (Buckinghamshire, UK). DNA samples were stored at -20°C. Genotyping for the -174G>C polymorphism of the promoter region of the IL-6 gene was performed by polymerase chain reaction using a sequence-specific primers procedure and OneLambda commercial kits (Canoga Park, CA, USA).

IL-6 dosage

IL-6 serum concentrations in peripheral venous blood were measured by an ELISA sandwich assay and quantified based on standard curves of IL-6 as per instructions of the manufacturer (Biossource, Camarillo, CA, USA).

Statistical analysis

Interleukin-6 levels in patients and controls were compared using Mann-Whitney test and cytokine genotype frequencies using the two-tailed Fisher's exact test. P values < 0.05 were considered significant.

Ethical considerations

Informed consent according to the Declaration of Helsinki was obtained from all individuals and the protocol of the study was approved by the General Hospital Dr Cesar Cals Ethics Committee.

Results

The median age of the cases was 51 years (range=25-71ys) and of the controls was 26 years (range=20-51ys). Table 1 shows the demographic characteristics of the population studied.

The -174 G/G homozygous genotype was observed in 9 (60%) pulmonary tuberculosis patients, whereas 5 (33.3%) cases expressed the heterozygous G/C genotype and 1 (6.7%) expressed the homozygous C/C. This genotypic distribution did not differ from that observed in healthy blood donors as shown in table 2.

IL-6 serum levels median was 4.10 pg/mL (range=0.5-12 pg/mL) in pulmonary tuberculosis cases and 0.6 pg/mL (range=0-2.8 pg/mL) in controls with a $p < 0.01$. Regarding to the different -174G>C genotypes, a significant increase in IL-6 levels was observed in the

G/G homozygous genotype, median=4.7pg/mL (range=4.1-12 pg/mL) when compared to the combined genotype G/C C/C, median=0.6 pg/mL (range=0.5-7.4 pg/mL), $P=0.04$, in pulmonary tuberculosis (Figure 1). This difference was not observed in controls (Figure 2).

Discussion

We studied 60 individuals to evaluate the influence of -174G>C polymorphism in IL-6 serum levels of pulmonary tuberculosis patients. The G allele frequencies in pulmonary tuberculosis and in healthy individuals were about 60% and genotypes distribution were also similar in both groups. Although the present study is limited by the small number of samples genotyped, it shows a similar -174G>C genotype distribution to that reported in Italians¹⁵. Differences in the frequencies of the G/G, G/C and C/C genotypes were not shown in Iranians¹⁴, Colombians⁹, Germanic Caucasians⁸, Anglo-Saxons⁵ and Indians¹⁶. Although the distribution of -174G>C polymorphism did not differ in these population among patients and healthy controls, differences were observed when each genotype was compared in the different populations studied. This is clearly demonstrated by the increased frequencies of the C/C genotype in Germanic Caucasians (4.8-fold), Anglo-Saxons (4.0-fold) and Indians (3.0-fold) when compared to the Brazilian ones. In contrast, the G/G genotype was reduced in the Germanics and the Anglo-Saxons (2.0-fold and 1.6-fold, respectively) in comparison to its frequencies in the Brazilians.

Studies on the major histocompatibility complex (MHC) polymorphisms demonstrated a high mixture in race in the Brazilian population, which results of the aggregation of a variety of distinct MHC alleles from diverse ethnic groups, including Caucasians, Afro-Americans and native Amerindians¹⁷. Such miscegenation has probably contributed to the differences observed in the genotypes distribution between Brazilians and other populations.

Amirzargar et al. (2006) studied IL-6 levels and -174G>C polymorphism in Iranians with pulmonary tuberculosis¹⁴. An increased frequency of the G/G genotype was observed in Iranian patients when compared to controls (57.5% vs 31.9%), differently from results observed in Brazilians. However, the functional investigation of the influence of the -174G>C polymorphism on the production of the IL-6 was comparable in both studies (Iranian and Brazilian). The G/G genotype was strongly associated to an increase in serum IL-6 levels in pulmonary tuberculosis in Brazilians compared to healthy individuals (median = 4.70 pg/ml vs 0.60pg/ml, respectively; p=0.04).

Literature concerning to the role of the -174G>C polymorphism on the IL-6 levels is not consensual. Recently, Taudorf et al. (2008) investigated in vitro cytokine production, including IL-6, in 200 healthy individuals stimulated with *Escherichia coli*¹⁸. Authors concluded that the IL-6 production was not influenced by the -174G>C polymorphism. This observation corroborated previous report in Hungarian population¹⁹. Both of these studies were conducted in in vitro assays, using lipopolysaccharide or *E. coli* as antigens. Our study was designed to be an in vivo assay and we studied IL-6 production in patients with active pulmonary infection by *M. tuberculosis*. We believe that this approach represents a better model to evaluate cytokine production in response to the infection because it represents most clearly what happens during human pulmonary tuberculosis, and it could explain our results that are different from others groups.

A limitation of our study was the reduced number of the cases, particularly to the genotype distribution in the population. However, this limitation did not influence the analysis of the IL-6 production in combination with the genotypes, which was our primary objective. We show that the -174G>C polymorphism is determinant on the production of the IL-6 in active pulmonary tuberculosis. The overproduction of the IL-6 is observed in G/G cases while G/C or C/C presented low levels of peripheral IL-6, similarly to that observed in healthy

individuals. It seems that these -174G/C and -174C/C genotypes influences negatively the IL-6 production. It is probably that the differential production of IL-6, under influence of the -174G>C polymorphism, could play a role in the clinical presentation and, even more, in the outcome of the tuberculosis.

This study shows that the -174G/G genotype is determinant in the overproduction of the IL-6 in patients with active pulmonary tuberculosis. Further studies might be conducted to investigate the impact of this different production of the IL-6 in the outcome of the tuberculosis.

Acknowledgements

This study was supported by NIH NS40574 and NS429660, and the Brazilian National Research Council CNPq.

Competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific manuscript.

References

1. Van Snick, J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990;**8**:252-278.
2. Fitzpatrick, LK, Braden, C. Tuberculosis. In: Kelley WN, editor. *Textbook of Internal Medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.2055-2065.
3. Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W. Interleukin 6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**:1334-1339.
4. Fernandez- Real JM, Vendrell J, Richart C, Gutierrez C, Ricart W. Platelet count and interleukin-6 gene polymorphism in healthy subjects. *BMC Med Genet* 2001;**2**:6.
5. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. 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* 1998;**102**:1369-76.
6. Hulkkonen J, Pertovaara M, Antonen J, Pasternack A, Hurne M. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL-6 gene in primary Sjögren syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. *Rheumatology* 2001;**40**:656-661.
7. Linker-Israeli M, Wallace DJ, Prehn J, Michael D, Honda M, Taylor KD, Paul-Labrador M, Fischel-Ghodsian N, Fraser PA, Klinenberg JR. Association of IL-6 gene alleles with systemic lupus erythematosus (SLE) and with elevated IL-6 expression. *Genes Immun* 1999;**1**:45-52.
8. Schotte H, Schlüter B, Rust S, Assmann G, Domschke W, Gaubitz M. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 GC) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2001;**40**:393-400.

9. Guarnizo-Zuccardi P, Lopez Y, Giraldo M, Garcia N, Rodriguez L, Ramirez L, Uribe O, Garcia L, Vasquez G. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue antigens* 2007;**70**:376-382.
10. Cordano P, Lake A, Shield L, Taylor G, Alexander F, Taylor P, White J. Effect of IL-6 promoter polymorphism on incidence and outcome in Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 2005;**128**:493-495.
11. Cozen W, Gill P, Ingles S, Masood R, Martinez-Maza O, Cockburn M, Gauderman W, Pike M, Bernstein L, Nathwani B, Salam M, Danley K, Wang W, Gage J, Gundell-Miller S, Mack T. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004;**8**:3216-3221.
12. Foster CB, Lehrnvecher T, Samuels S, Stein S, Mol F, Metcalf JA, Wyvill K, Steinberg SM, Kovaks J, Blauvelt A, Yarchoan R, Chanock SJ. An IL-6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus. *Blood* 2000;**7**:2562-2566.
13. Henao M, Montes C, París S, García L. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis* 2006;**86**: 11-19.
14. Amirzargar A, Rezaei N, Jabbari H, Danesh A, Khosravi F, Hajabdolbaghi M, Yalda A, Nikbin B. Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *Eur Cytokine Netw* 2006;**17**:84-89.
15. Fontanella M, Rainero I, Gallone S, Rubino E, Fenoglio P, Valfrè W, Garbossa D, Benevello C, Ducati A, Pinessi L. Interleukin 6 gene polymorphisms are not associated with aneurysmal subarachnoid haemorrhage in an Italian population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;**79**:471-3.

16. Selvaraj P, Alagarasu K, Harishankar M, Vidyarani M, Rajeswari Nisha D, Narayanan P. Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Cytokine* 2008;**43**:26-33.
17. Louzada-Junior P, Smith A, Hansen J, Donadi E . HLA-DRB1 and DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of São Paulo. *Tissue Antigens* 2001;**57**:158-162.
18. Taudorf S, Krabbe K, Berg R, Moller K, Pedersen B, Bruunsgaard H. Common studied polymorphisms do not affect plasma cytokine levels upon endotoxin exposure in humans. *Clin Exp Immunol* 2008;**152**:147-152.
19. Kiszal P, Makó V, Prohászka Z, Cervenak L. Interleukin-6 -174 promoter polymorphism does not influence IL-6 production after LPS and IL-1b stimulation in human umbilical cord vein endothelial cells. *Cytokine* 2007;**40**:17-22.

Table 1 – Demographic characteristics, distribution of IL-6 -174G>C genotype and IL-6 peripheral levels in patients with tuberculosis and in healthy individuals.

	IL-6 Genotype (-174G>C)		P*
	G/G	G/C C/C	
Tuberculosis			
N	10	7	
Age, y (median)	51	51	>0.05
Sex, % male	40	57	>0.05
IL-6 level (pg/mL)	4.7	0.6	0.04
Controls			
N	27	16	
Age, y (median)	26	25	>0.05
Sex, % male	78	94	>0.05
IL-6 level (pg/mL)	0.6	0.6	>0.05

*Mann-Whitney test.

Table 2 – Genotypic distribution of the -174G>C IL-6 polymorphism in pulmonary tuberculosis cases and in controls.

	G/G	G/C	C/C	P*
Pulmonary tuberculosis N=17	10 (58.9%)	6 (35.2%)	1 (5.9%)	P>0.05
Controls N=43	27 (62.8%)	14 (32.6%)	2 (4.6%)	P>0.05

*Two-tailed Fisher's exact test.

