



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**VALDIRENE LEÃO CARNEIRO**

**PERFIL DE RESPOSTA IMUNE *in vitro* A ANTÍGENOS  
ESPECÍFICOS DO *Mycobacterium tuberculosis* E DO  
POLIMORFISMO DE GENES DE CITOCINAS NA  
TUBERCULOSE**

Salvador, BA  
2012

**VALDIRENE LEÃO CARNEIRO**

**PERFIL DE RESPOSTA IMUNE *in vitro* A ANTÍGENOS  
ESPECÍFICOS DO *Mycobacterium tuberculosis* E DO  
POLIMORFISMO DE GENES DE CITOCINAS NA  
TUBERCULOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Imunologia da Universidade Federal da Bahia como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Songelí Menezes Freire

Salvador, BA  
2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,  
SIBI - UFBA.

C289	Carneiro, Valdirene Leão
	Perfil de resposta imune <i>in vitro</i> a antígenos específicos do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e do polimorfismo de genes de citocinas na tuberculose – BA / Valdirene Leão Carneiro. – Salvador, 2012.
	114 f.
	Orientadora: Prof <sup>a</sup> Dr <sup>a</sup> Songeli Menezes Freire.
	Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2012.
	1. Tuberculose. 2. Polimorfismo. 3. IGRA. I. Freire, Songeli Menezes. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.
	CDU 616-002.5

Dedico este trabalho ao meu pai, que não pode presenciar este momento importante para mim (*in memoriam*).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora, Songeli Menezes Freire, pela paciência e conhecimentos prestados durante a execução deste trabalho.

À minha colega e amiga Teresita Bendicho, que muito me ajudou e incentivou nos momentos difíceis durante a execução deste trabalho.

À Rosalina Guedes e Marilda Casela pela colaboração na coleta de amostras e dados deste projeto.

À Luciana Cardoso pelo incentivo e discussões sobre a Imunologia.

Aos amigos do anexo III Geraldo Sampaio, Gabriela Félix, Alan, Mariane, Selma, Letícia, Thaís e Thaísa.

Aos meus colegas da UNEB, pelo apoio e compreensão da minha ausência em alguns momentos que me dedicava a este trabalho.

Aos ICs Juliana, Filipe, Catarina, Alex, Eula, Evelin e Natália pela preciosa colaboração na bancada.

Aos colegas do Labimuno Marcos, Vanessa, Bruna, Élide, Thaís, Heidy, Tadeu, Tereza, Zilda, Rafaela, Dona Chica, Luciane, Tereza, Manoel, Mário e Seu Zé.

Agradeço aos professores, funcionários e colegas do PPGIm por todos estes anos de convivência e aprendizado mútuo.

Pela ajuda financeira agradeço ao INCT-DT.

À minha querida família, especialmente, minha mãe e irmãos por me incentivarem a crescer e acreditar nos meus sonhos.

Ao companheiro, Antônio Cezar de Castro Lima, pela ajuda constante na confecção deste trabalho e paciência para aturar minha obsessão.

Finalmente, agradeço aos participantes que tornaram este estudo possível.

## RESUMO

**Introdução:** A tuberculose (TB) continua sendo um problema significativo para a saúde pública mundial. A maioria dos indivíduos expostos ao *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) persistirão infectados, embora, controlem o crescimento micobacteriano. As citocinas podem ter um papel central no controle, susceptibilidade e formas clínicas da TB, além de poderem ser utilizadas como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico desta doença. A meta deste estudo foi investigar a possível associação entre o perfil de resposta na produção de citocinas induzida por antígenos do *kit* Quantiferon®-TB Gold in tube (QFT-IT) e os padrões genéticos de citocinas na tuberculose latente e ativa. **Metodologia:** Foram selecionados 181 voluntários divididos em três grupos: 51 indivíduos com TB pulmonar, 70 com TST positivo e 60 com TST negativo. Foram coletadas amostras de sangue para a realização do ensaio QFT-IT, imunofenotipagem dos linfócitos e extração do DNA genômico. As citocinas IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF e TGF- $\beta$ 1 foram analisadas no sobrenadante do QFT-IT por citometria de fluxo e a genotipagem destas citocinas por PCR-SSP. **Resultados e discussão:** Houve redução significativa no número de linfócitos totais, células B, células T CD4+ e CD8+ ( $p < 0,005$ , para todas as células) e aumento percentual de células NK, neutrófilos e monócitos ( $p=0,038$ ,  $<0,0001$  e  $<0,001$ , respectivamente) em pacientes com TB, quando comparados a indivíduos TST positivos e TST negativos. A sensibilidade e especificidade para o QFT-IT foram 92,1% e 80,7%, respectivamente. A concordância entre o TST e o QFT-IT foi de 0,72 ( $Kappa= 0,45$ , IC 95% 0,31-0,59). O ponto de corte de 0,30 UI/mL para o QFT-IT não altera a sensibilidade e especificidade no diagnóstico da TB ativa, contudo aumenta a sensibilidade do QFT-IT no diagnóstico da TB latente. O grupo TB apresentou maior frequência do alelo A ( $p=0,024$ ) e do genótipo AA ( $p=0,027$ ) IFN- $\gamma$  +874 em relação aos demais grupos do estudo, sendo que nesse grupo células sanguíneas de indivíduos com genótipo AA apresentaram menores valores de IFN- $\gamma$  quando estimuladas com a PHA. Para o polimorfismo das outras citocinas não houve diferença significativa entre os grupos do estudo. Sob estímulo da PHA foi observada uma menor produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF para o grupo TB em relação aos demais. Quando comparada a produção de IL-6 sem estímulo e estimulada com antígenos do Mtb, por grupo de estudo, foi observada uma redução dessa citocina ( $p= 0,001$ ;  $<0,0001$  e  $<0,0002$  para os grupos TB, TST positivo e TST negativo, respectivamente). **Conclusões:** O QFT-IT tem concordância moderada com o TST e o ponto de corte de 0,30 UI/mL pode melhorar a sensibilidade para o diagnóstico da TB latente sem perda da especificidade. A imunossupressão sistêmica observada nos pacientes com tuberculose pode levar a diminuição na produção de IL-10, TNF e IFN- $\gamma$  pelas células sanguíneas quando estimuladas com a PHA. Os antígenos do Mtb podem modular a resposta imune do hospedeiro por inibir a produção de IL-6 contribuindo para a gravidade da tuberculose. Apesar, do alelo A e o genótipo AA de IFN- $\gamma$  (+874) estarem associados com a tuberculose e a menor produção de IFN- $\gamma$ , não há interferência deste polimorfismo sobre o resultado do teste QFT-IT.

**Palavras-chave:** Tuberculose. TST. Subtipos linfocitários. Polimorfismo. IGRA. IL-6. IFN- $\gamma$ .

## ABSTRACT

**Introduction:** Tuberculosis (TB) still remains a worldwide public health problem. Most individuals exposed to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) will keep carrying this bacillus for the rest of their lives, although with mycobacterial growth control. Cytokines may play a central role in the control, susceptibility and clinical forms of TB, and can be used as biomarkers for diagnosis and prognosis of this disease. The aim of this study was to investigate the possible association between the response profile in cytokine production induced by antigens kit Quantiferon®-TB Gold in tube (QFT-IT) and the genetic patterns of cytokines in active and latent tuberculosis. **Methodology:** The study enrolled 181 subjects divided into three groups: 51 individuals with pulmonary TB, 70 with TST positive and 60 with TST negative. We collected blood samples from all individuals in order to carry out the QFT-IT test, immunophenotyping of lymphocytes and genomic DNA extraction. The cytokines IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF and TGF- $\beta$ 1 were analyzed in QFT-IT supernatant by the use of flow cytometry, whereas the genotyping of these cytokines has been obtained by PCR-SSP. **Results and Discussion:** There was a significant reduction in the total number of lymphocytes, B cells, CD4+ T and CD8+ T cells ( $p < 0.005$  for all cells) and also percentage increase of NK cells, neutrophils and monocytes ( $p = 0.038$ ,  $< 0.0001$  and  $< 0.001$ , respectively) in patients with TB, when compared to TST positive and TST negative individuals. The sensitivity and specificity for QFT-IT were 92.1% and 80.7%, respectively. The agreement between TST and QFT-IT was 0.72 ( $Kappa = 0.45$ , 95% CI 0.31 to 0.59). The cutoff point of 0.30 IU/mL for QFT-IT does not change sensitivity and specificity in the diagnosis of active TB, but increases QFT-IT sensitivity in the diagnosis of latent TB. The TB group has shown higher frequency of A allele ( $p = 0.024$ ) and AA genotype ( $p = 0.027$ ) IFN- $\gamma$  +874, when compared to other groups. Moreover, blood cells of individuals in this group with AA genotype had lower levels IFN- $\gamma$  when stimulated with PHA. For the polymorphism of other cytokines no significant difference has been noticed among all groups. A lower production of cytokines IFN- $\gamma$ , IL-10 and TNF, under the stimulus of PHA, was observed in the TB group in relation to others. When the IL-6 production with and without stimulation of Mtb antigens, by group of study, has been compared, we observed a reduction of this cytokine ( $p = 0.001$ ;  $< 0.0001$  and  $< 0.0002$  for TB, TST positive and TST negative individuals, respectively). **Conclusions:** QFT-IT has moderate agreement with TST and the cutoff point of 0.30 IU/mL can improve sensitivity for diagnosis of latent TB without loss of specificity. The systemic immunosuppression observed in tuberculosis patients can lead to decreased production of IL-10, TNF and IFN- $\gamma$  blood cells when stimulated with PHA. The Mtb antigens can modulate the host immune response by inhibiting the production of IL-6, therefore contributing to severity of TB. Although the A allele and AA genotype of IFN- $\gamma$  (+874) are associated with tuberculosis and low production of IFN- $\gamma$ , there is no interference of this polymorphism on the QFT-IT result.

**Keywords:** Tuberculosis. TST. Polymorphism. Lymphocyte subtypes. IGRA. IL-6. IFN- $\gamma$ .

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Receptores de macrófagos (PRR) envolvidos no reconhecimento do Mtb e os seus respectivos ligantes (PAMP).....18.
- Figura 2: Tempo percorrido a partir da infecção até a geração de resposta imune efetora no pulmão. As células dendríticas reconhecem e mostram os antígenos. Papel regulatório da célula T e da IL-10 tanto no linfonodo como no pulmão.....20.
- Figura 3: Demonstração dos mecanismos efetores no combate à tuberculose. Participação dos linfócitos T efetores convencionais (CD4+ e CD8+) e não-convencionais.....22.
- Figure 4: Identificação e caracterização das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo. Figura 4a *gated* de linfócitos. Figura 4b purificação. Figuras 1c e 1e apresentam a distribuição das células de acordo com intensidades de fluorescência emitidas pela ligação dos anticorpos monoclonais específicos, em ambos os eixos. As figuras 1d e 1f apresentam tamanho celular *versus* padrão de fluorescência (CD56/CD3-PE e CD4-PE/Cy5, respectivamente).....37.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag85c	Antígenos do complexo 85
AIDS -	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BCG -	Bacilo de Calmette-Guérin
BK -	Bacilo de Koch
CAM	Modelagem calmodulina/cálcio
CFP-10 -	Proteína 10 KDa de filtrado de cultura
CLR -	Lectina do tipo C
DC -	Célula dendrítica
dsDNA	DNA dupla fita
ESAT-6 -	<i>Early secreted antigenic target-6</i>
HIV -	Vírus da imunodeficiência humana
Hsp-70	Proteína do choque térmico 70
IGRA -	Ensaio de liberação de interferon-gama
IL -	Interleucina
IFN- $\gamma$ -	Interferon-gama
kDa -	Quilodalton
LAM -	Lipoarabinomanose
LM -	Lipomanose
LT -	Linfócito T
MHC -	Complexo principal de histocompatibilidade
Mtb -	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NF- $\kappa$ B -	Fator de transcrição nuclear $\kappa$ B
Nil -	Salina
NO -	Óxido nítrico
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PAMP -	Padrão molecular associado a patógeno
PGN	Peptidoglicano
PHA -	Fitohemaglutinina
PIM -	Proteína inflamatória de macrófagos
PPD -	Derivado protéico purificado
PRR -	Receptores de reconhecimento de padrões

QFT-IT -	Quantiferon®-TB Gold in Tube
SNP -	Polimorfismo de um único nucleotídeo
TB 7.7 -	Proteína 7.7 do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TB -	Tuberculose
TBL -	Tuberculose latente
TDM -	Trealose 6,6-dimicolato
TGF- $\beta$ 1 -	Fator Transformador do Crescimento $\beta$ 1
Th -	T <i>helper</i>
TLR -	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF -	Fator de Necrose Tumoral
Treg -	T regulatória
TST -	Teste Tuberculínico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO E FISIOPATOLOGIA DA TUBERCULOSE .....	16
2.2 RESPOSTA IMUNE NA TUBERCULOSE .....	18
2.2.1 Resposta Imune Inata na Tuberculose .....	18
2.2.2 Resposta imune adquirida na Tuberculose .....	20
2.3 POLIMORFISMO DE CITOCINAS NA TUBERCULOSE .....	24
2.3.1 Polimorfismo do IFN- $\gamma$ na Tuberculose .....	25
2.3.2 Polimorfismo do Fator de Necrose Tumoral na Tuberculose .....	26
2.3.3 Polimorfismo da IL-10 na Tuberculose .....	27
2.3.4 Polimorfismo da IL-6 na Tuberculose .....	27
2.3.5 Polimorfismo do Fator de Transformação do Crescimento- $\beta$ 1 na Tuberculose .....	28
2.4 IMUNODIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE .....	29
2.4.1 Teste Tuberculínico .....	29
2.4.2 Ensaio baseado na liberação de Interferon-gama .....	30
<b>3 HIPÓTESES E OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 HIPÓTESES .....	32
3.2 OBJETIVO GERAL: .....	33
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	33
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
4.1 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	34
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	34
4.4 REALIZAÇÃO DO TESTE TUBERCULÍNICO (TST) .....	35
4.5 LEUCOGRAMA .....	36
4.6 IMUNOFENOTIPAGEM DOS LINFÓCITOS .....	36
4.7 REALIZAÇÃO DO QUANTIFERON®-TB GOLD IN TUBE .....	37
4.8 DOSAGEM DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	38
4.8.1 Dosagem de IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ e TNF .....	38
4.8.2 Dosagem de TGF- $\beta$ 1 .....	39
4.9 POLIMORFISMO DE CITOCINAS .....	39
4.9.1 Extração do DNA genômico .....	39
4.9.2 Genotipagem de citocinas (IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 e TNF) .....	39
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS .....	40

<b>5 CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1: Diferenças na Distribuição de Leucócitos e Subtipos de Linfócitos em Sangue Periférico de Pacientes com Tuberculose Pulmonar.....</b>	<b>42</b>
5.1 INTRODUÇÃO.....	Erro! Indicador não definido.
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	Erro! Indicador não definido.
5.3 RESULTADOS .....	Erro! Indicador não definido.
5.4 DISCUSSÃO.....	Erro! Indicador não definido.
5.5 REFERÊNCIAS .....	Erro! Indicador não definido.
<b>6 CAPÍTULO 2: Artigo Científico 2: Polimorfismo e Produção <i>in vitro</i> de IL-6, IL-10, IFN-<math>\gamma</math>, TNF e TGF-<math>\beta</math>1 em Pacientes com Tuberculose Pulmonar .....</b>	<b>43</b>
6.1 INTRODUÇÃO.....	Erro! Indicador não definido.
6.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	Erro! Indicador não definido.
6.3 RESULTADOS .....	Erro! Indicador não definido.
6.4 DISCUSSÃO.....	Erro! Indicador não definido.
6.5 REFERÊNCIAS .....	Erro! Indicador não definido.
<b>7 CAPÍTULO 3: Artigo científico 3: Comparação entre um Teste de Liberação de Interferon-Gama e o Teste de Sensibilidade à Tuberculina em Pacientes com Tuberculose.....</b>	<b>44</b>
7.1 INTRODUÇÃO.....	Erro! Indicador não definido.
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	Erro! Indicador não definido.
7.3 RESULTADOS .....	Erro! Indicador não definido.
7.4 DISCUSSÃO.....	Erro! Indicador não definido.
7.5 REFERÊNCIAS .....	Erro! Indicador não definido.
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
<b>APÊNDICE A – Ficha clínica.....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO A - Submissão do Artigo: Differences in the distribution of peripheral blood leukocyte and lymphocyte subsets in pulmonary tuberculosis patients</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO C - Worksheet Genotipagem.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) acompanha a humanidade há milênios, atingindo indivíduos socialmente mais vulneráveis em sua faixa etária mais produtiva, permanecendo, assim, como um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. O sinergismo mortal com Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o aparecimento de cepas resistentes a múltiplas drogas e a situação de pobreza extrema vivenciada por parte da população em países pobres ou em desenvolvimento contribuem, substancialmente, para o aumento da morbidade e mortalidade pela tuberculose. Estimativas recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam uma incidência de 8,8 milhões de casos e cerca de 1,4 milhões de mortes em todo o mundo, sendo o Brasil responsável por um grande número de casos desse total (WHO, 2011; BRASIL, 2011).

Desde a descoberta do agente etiológico responsável pela tuberculose, a comunidade científica vem somando esforços no intuito de elucidar os fatores de resistência do hospedeiro e de virulência bacteriana. Apesar dos avanços tecnológicos das últimas décadas, o entendimento do por que a resposta imune contra o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) não ser eficaz em uma pequena parcela dos infectados permanece não totalmente esclarecido (CASANOVA et al., 2002; NORTH & JUNG, 2004). Dos indivíduos que são expostos ao Mtb, 30% a 50% tornam-se infectados e destes cerca de 90% não desenvolverão doença ativa, persistindo com a infecção latente (SCHWANDER & DHEDA, 2010).

O resultado da infecção por Mtb é dependente da interação entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e os fatores de virulência do bacilo. Recentemente, tem sido proposto que a resposta imune inata pode eliminar o Mtb sem a ocorrência de participação mensurável das células T. Mesmo na infecção já estabelecida, a resposta inata pode contribuir para o controle do crescimento micobacteriano, contudo células T ativadas específicas para o patógeno são essenciais na resposta protetora antituberculose (COOPER, 2009a; COOPER, 2009b). Ambas as células T CD4+ e CD8+ têm um papel no combate ao Mtb, em que as células T CD4+ sob o estímulo da IL-12 produzem IFN- $\gamma$ , caracterizando um perfil T *helper* 1 (Th1). IFN- $\gamma$  é um componente importante na defesa, visto que ativa macrófagos infectados a destruírem o bacilo (COOPER et al., 1993). Outras

citocinas, como TNF, IL-6 e linfotóxina, participam da formação e manutenção do granuloma com o recrutamento de células para o local da inflamação. Células T CD8+ também podem produzir IFN- $\gamma$ , mas a sua principal função é lisar células infectadas (KAUFMANN, 2001). Estudos demonstram que o Mtb escapa da resposta efetora do hospedeiro inibindo a fusão do fagossomo-lisossomo (FLYNN & CHAN, 2001) e também evita a apresentação de antígenos para as células T provocando atrasos no desenvolvimento da resposta imune adquirida (TORRADO, 2011). Outro ponto importante na fisiopatologia da TB é a distinção entre resposta protetora daquela que provoca dano tecidual em que a atuação das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- $\beta$ 1 desempenham papel importante. No sítio de infecção, a produção de IL-10 e TGF- $\beta$ 1 está aumentada em pacientes com TB e o aumento destas citocinas está associado à maior susceptibilidade e pior prognóstico da doença (GONG et al., 1996; BOUSSIOTIS et al., 2000; RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006; HOUGARDY et al., 2007).

A natureza e o controle da resposta imune, tanto inata quanto adquirida, podem determinar o desenvolvimento de uma imunidade protetora ou levar à destruição tecidual e à progressão da doença. Diferenças interindividuais na regulação da produção de moléculas envolvidas na resposta imune ainda não estão completamente esclarecidas. Atualmente, há fortes evidências de que a maioria dos fatores do hospedeiro relacionados à susceptibilidade à TB são genéticos e muitos genes estão envolvidos (CASANOVA et al., 2002; FERNANDO & BRITTON, 2006). As citocinas regulam todas as células do sistema imune e os polimorfismos genéticos de citocinas e de seus receptores têm sido muito estudados na TB.

Durante quase um século, o Teste Tuberculínico (TST) foi o único ensaio diagnóstico capaz de detectar indivíduos com TB latente (VON PIRQUET, 1907 *apud* DENKINGER et al., 2011). Contudo, muitos fatores podem levar a resultados falso-negativos e falso-positivos do TST (ANDERSEN et al., 2000). Nas últimas décadas surgiram novos testes, dentre eles, os ensaios para detectar a liberação de interferon-gama (IGRA) após estímulo das células sanguíneas com antígenos recombinantes codificados na região de diferença-1 (RD-1) (AREND et al., 2000; VAN PINXTEREN et al., 2000; BROCK et al., 2004). O uso desses testes está sendo cada vez mais recomendado em guias para o controle da TB latente e ativa em países de alta renda e baixa incidência (DENKINGER et al., 2011). A maioria dos

guias dos países de alta renda recomenda a realização do TST com confirmação pelo IGRA com base em estudos de meta-análise e revisões sistemáticas (PAI et al., 2004; PAI et al., 2007; PAI et al., 2008). Em países de baixa renda e alta incidência de TB, a sensibilidade e a especificidade dos IGRAs são menores do que em países de alta renda e baixa incidência (METCALFE et al., 2011). No Brasil, pouquíssimos trabalhos têm avaliado a utilização desses testes no diagnóstico da TB latente e ativa (MACHADO et al., 2009).

A resposta protetora e patológica ao Mtb bem definida é essencial para o desenvolvimento e aplicação de estratégias vacinais, diagnósticas e terapêuticas eficazes para tuberculose. A combinação de estudos em modelos animais e em seres humanos é fundamental para melhorar a nossa compreensão deste patógeno que continua a desafiar os imunologistas.

O presente estudo tem como proposição investigar a resposta imune celular após estímulos inespecíficos e específicos do *Mycobacterium tuberculosis* nos indivíduos com tuberculose latente e ativa, avaliar o papel do QuantiFERON®-TB Gold in tube no diagnóstico da tuberculose, bem como os polimorfismos de genes de citocinas na predisposição genética à tuberculose e capacidade de resposta imune.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO E FISIOPATOLOGIA DA TUBERCULOSE

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é composto das subespécies: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* e o *Mycobacterium canettii*. Chegam a ter 99,9% de similaridade na composição de seus nucleotídeos, porém, diferenciam-se em seus fenótipos, tropismo ao hospedeiro e patogenicidade (BROSCH et al., 2002; ARNOLD, 2006).

Os avanços nas pesquisas em filogenética que buscam elucidar a origem e evolução do Mtb, bem como certos aspectos de sua estrutura e biologia só foram possíveis após a caracterização completa do genoma da cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Esta cepa tem uso extenso em atividades biomédicas, pois manteve sua virulência completa em modelos animais infectados com tuberculose desde o seu isolamento em 1905. Com isso Cole & Cols. (1998) determinaram que o genoma da cepa H37Rv é constituído de 4.411.529 pares de bases e contém cerca de 4.000 genes com predomínio das bases nitrogenadas citosina e guanina.

*Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo gram positivo, resistente, delgado e ligeiramente encurvado, não produtor de toxinas e intracelular facultativo, seu comprimento está em torno de 1,0 a 4,0 µm, tendo 0,3 a 0,6 µm de diâmetro. Sua transmissão é direta de pessoa para pessoa e é considerado um patógeno aeróbio estrito, pois, além de competir com o pulmão por oxigênio consegue adaptar-se ao ambiente microaerofílico do interior das células infectadas e do centro do granuloma (KONEMAN, 2008). Uma melhor compreensão das características biológicas, bioquímicas e estruturais do patógeno é extremamente importante, visto que essas informações podem ajudar no desenvolvimento de novas intervenções profiláticas e terapêuticas (COLE, 2003).

Após inalação do aerossol contendo o Mtb a bactéria é introduzida nos pulmões podendo gerar infecção no sistema respiratório (tuberculose pulmonar) ou migrar para outros órgãos, causando tuberculose extrapulmonar. Uma proporção relativamente pequena das pessoas infectadas com Mtb irá desenvolver a tuberculose. A patologia e o curso da doença dependem principalmente da sensibilidade do hospedeiro, do estado do sistema imune e do tipo de infecção, se



primária, secundária, latente ou de reativação (KAUFMANN, 2001; ARAUJO et al., 2008).

A presença do Mtb nos alvéolos pulmonares é logo detectada pelas células fagocíticas do hospedeiro, especialmente pelos macrófagos alveolares que fagocitam a bactéria e migram através do sistema linfático em direção aos linfonodos. Os macrófagos ativados secretam quimiocinas e citocinas, gerando como consequência uma reação de hipersensibilidade, que em seguida pode levar a formação do granuloma para conter a infecção (FLYNN & CHAN, 2001a). O granuloma é uma massa de células, em grande parte compreendendo macrófagos infectados com células T por todo seu entorno influenciando seu estado de diferenciação e ativação com intuito de manter o granuloma estável. Dessa forma, o bacilo pode ficar contido nas lesões do granuloma durante anos em um estado de dormência a depender do estado imunológico do hospedeiro e outros fatores que podem contribuir para a ativação da doença (SUTER, 1952 *apud* FLYNN & CHAN, 2001a; SCHREIBER et al., 2011).

O curso da patologia pode levar ao estabelecimento de TB secundária, essa forma ocorre normalmente anos após a lesão primária e pode ter origem endógena, por reativação de um foco em latência ou ser originada de uma nova infecção com cepas mais virulentas que resistem à resposta imune do hospedeiro. Nesse ponto, o indivíduo já apresenta forte memória imune aos antígenos do Mtb graças à lesão primária, assim, a tuberculose secundária ocorre com maior reação inflamatória, do tipo hipersensibilidade tardia caracterizada por cavitação e fibrose, desenvolvendo lesões mais limitadas e com evolução mais arrastada que as formas primárias (NORTH & JUNG, 2004; DHEDA et al., 2005; KAUFMANN et al., 2005).

A latência clínica observada na maioria dos casos pode se estender por anos, acompanhando o indivíduo ao longo da vida, isso pelo simples fato do bacilo permanecer em um estado não replicante (FLYNN & CHAN, 2001b). No entanto, mesmo neste estado de dormência a bactéria mantém sua capacidade de causar tuberculose ativa, se e quando ocorre uma interrupção da resposta imune: desnutrição, velhice e condições médicas que comprometam o sistema imunológico como a insuficiência renal, o diabetes mellitus não controlado, e terapia com drogas imunossupressoras são alguns dos fatores que levam a imunodepressão, e, conseqüentemente, a reativação da infecção latente (GARCIA & GONZALEZ, 2001). Dentre todos os fatores de risco para reativação da doença, a infecção pelo HIV sem

dúvida alguma é o elemento de risco mais importante para por fim a dormência do bacilo e gerar doença ativa em adultos, já que provoca a redução de células T CD4<sup>+</sup> e produz algumas anormalidades funcionais em células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, as quais desempenham papel essencial na proteção contra a TB ativa (FLYNN & CHAN, 2001a ; WELLS et al., 2007; AHMAD, 2011).

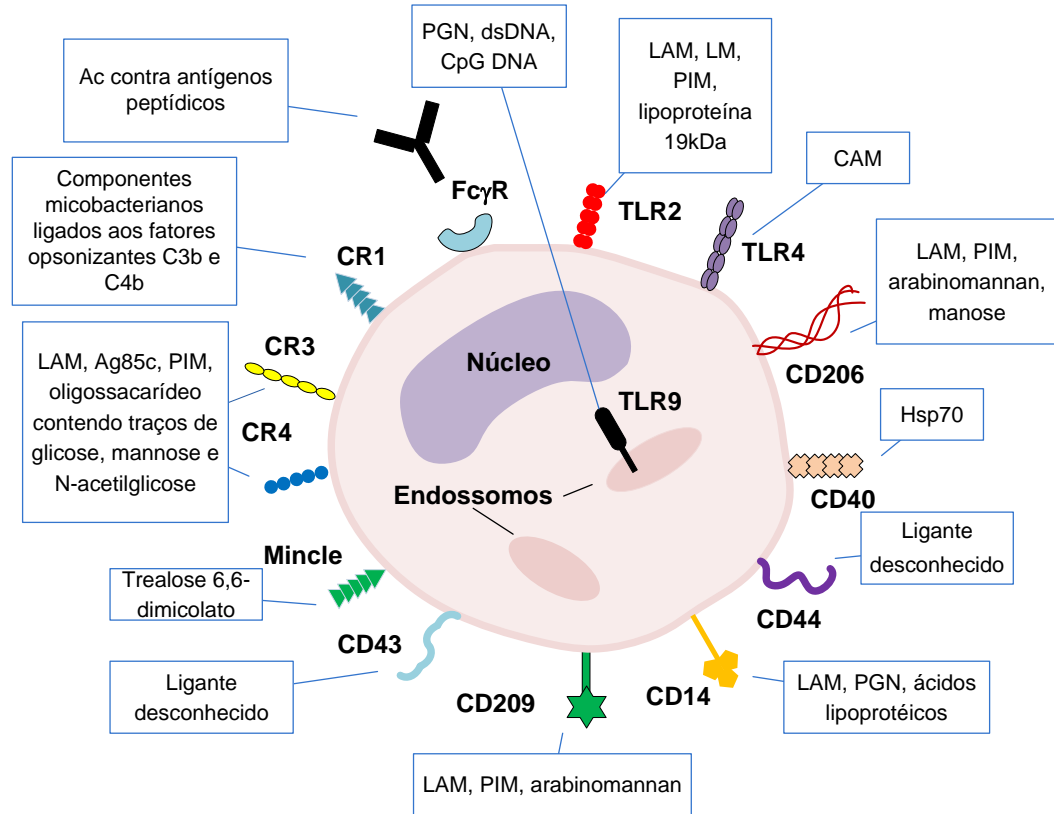
## 2.2 RESPOSTA IMUNE NA TUBERCULOSE

### 2.2.1 Resposta Imune Inata na Tuberculose

A fagocitose do bacilo da tuberculose por células apresentadoras de antígenos no pulmão humano desencadeia um complexo processo infeccioso, que conduz a uma resposta imune potente e potencialmente protetora do hospedeiro. Neste cenário, os fagócitos, componentes do sistema imune inato têm papel fundamental, pois, através dos seus receptores de reconhecimento de padrões moleculares derivados da linhagem germinal (PRR) conseguem detectar a presença de estruturas moleculares microbianas denominadas padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP) e dessa maneira geram resposta imediata à infecção pelo Mtb. Vários grupos diferentes de PRR que respondem a componentes micobacterianos já foram identificados, dentre estes estão os receptores *Toll-like* (TLR), *Nod-like* e lectina do tipo C (CLR) (MODLIN et al., 1999; VAN CREVEL et al., 2002).

Os macrófagos alveolares são as primeiras células do sistema imune que internalizam o patógeno no pulmão. O Mtb possui em sua camada externa vários ligantes que são detectados pelos PRR dos macrófagos, dentre estes se destacam as lipoproteínas 19 e 27 kDa, glicoproteína 38 kDa, o Lipoarabinomanose (LAM) e o Lipomanose (LM). Todas essas estruturas são reconhecidas pelos TLR, principalmente pelos tipos TLR2, TLR4 e TLR9. A interação entre os ligantes do bacilo da tuberculose com os TLR dos macrófagos desencadeia a ativação do fator de transcrição nuclear-κB (NF-κB), e como consequência leva a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86 na superfície desses macrófagos e de células dendríticas, e também a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tais como, o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-1, IL-6, IL-12 e o óxido nítrico (NO). Dessa maneira os macrófagos respondem a infecção

iniciando a cascata inflamatória necessária para o extravasamento de leucócitos nos locais da infecção, um evento essencial para a indução e eventual expressão da imunidade frente à infecção (Figura 1) (BRIGHTBILL et al., 1999; KRUTZIK & MODLIN, 2004; BAFICA et al., 2005; KINCAID et al., 2007).



**Figura 1:** Receptores de macrófagos (PRR) envolvidos no reconhecimento do Mtb e os seus respectivos ligantes (PAMP).

**Fonte:** Adaptado de Druszczynska, M et al. "Monocyte signal transduction receptors in active and latent tuberculosis". *Clinical and Developmental Immunology*, 2011.

Outra molécula que é expressa pelo Mtb e é considerada como um importante regulador da resposta imune é a TDM (trealose 6,6-dimicolato). Recentemente Lee & Cols. (2012) afirmaram que neutrófilos ativados seletivamente por TDM através de seus receptores CLR do tipo Mincle tendem a produzir TNF, IL-6 e proteína inflamatória de macrófagos (PIM), dessa maneira causam recrutamento celular robusto e ativação de células inflamatórias, levando a formação do granuloma pulmonar. Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a migrarem para o sítio de multiplicação do bacilo, essas células são atraídas ao local da infecção através da sinalização dos macrófagos e também pela ligação TDM-receptor Mincle. É sabido que os neutrófilos estimulados secretam TNF, IL-1 $\beta$ , IL-8 e PIM-1 $\alpha$

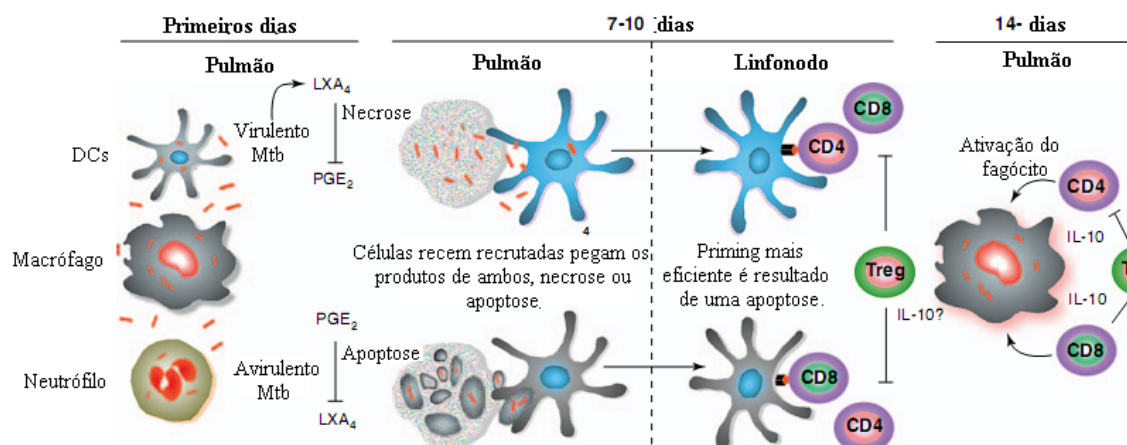
(SCANGA et al., 2004). E, de uma maneira ainda não bem esclarecida contribuem para a tentativa de contenção da infecção (LEE et al., 2012).

Mesmo com o recrutamento intenso de leucócitos para o sítio da infecção e a produção de moléculas sinalizadoras, o bacilo da tuberculose cresce de forma aparentemente descontrolada durante os primeiros dias da infecção. Moléculas do Mtb impedem a fusão do fagossoma com o lisossomo, logo, o bacilo permanece no fagossomo livre dos compostos oxidativos que poderiam lhe causar danos. Além disso, o bacilo inibe a apoptose e promove a morte necrótica dos macrófagos infectados, o que é fundamental para a sobrevivência dos bacilos, pois, se multiplicam e são fagocitados por um novo macrófago que também falha no controle do patógeno, e da mesma maneira é destruído (Figura 2). (CHEN et al., 2006; DIVANGAHI et al., 2009; AHMAD, 2011).

### **2.2.2 Resposta imune adquirida na Tuberculose**

Fortes evidências sugerem que a migração de células dendríticas (DC) dos pulmões para os linfonodos é essencial para iniciação da resposta imune efetora. DC são consideradas como as mais eficientes indutoras de ativação de células T virgens, e essa eficiência decorre do fato de que elas fornecem não só o estímulo antigênico específico, mas também sinais secundários e terciários que promovem o desenvolvimento eficiente das células T efectoras. No entanto, DC só são detectadas no linfonodo entre o sétimo e décimo dia após a infecção, o que demonstra certa dificuldade de migração para o linfonodo (Figura 2). Essa lentidão pode resultar em um atraso na ativação das células T, e gerar como consequência uma redução da resposta imune no pulmão (GALEGOS et al., 2008; REILEY et al., 2008; WOLF et al., 2008). Wolf & Cols. (2007), em um ensaio com ratos infectados com Mtb, demonstraram que a falta ou a quantidade reduzida de IL-12p40 está associada com a ausência de expressão do receptor de quimiocina CCR7 em DCs, este receptor é essencial para a atração dessas células para o linfonodo. Da mesma maneira suspeita-se que o bacilo tenha capacidade de inibir a migração de DCs por modulação do ambiente alveolar; que a IL-10 tem poder de limitar essa migração, ou mesmo que esse atraso pode ser um produto do crescimento lento das bactérias, o que levaria a escassez de antígenos; ou ainda devido à natureza privilegiada do tecido alveolar onde há uma tendência em manter o espaço como superfície de

troca de ar em oposição a um local inflamatório (COOPER, 2009(a); WOLF et al., 2007; URDAHL et al., 2011).



**Figura 2:** Tempo percorrido a partir da infecção até a geração de resposta imune efetora no pulmão. Papel regulatório da célula T e da IL-10 tanto no linfonodo como no pulmão.

**Fonte:** Adaptado de Torrado, E et al. "Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology". Trends in Immunology, 2011.

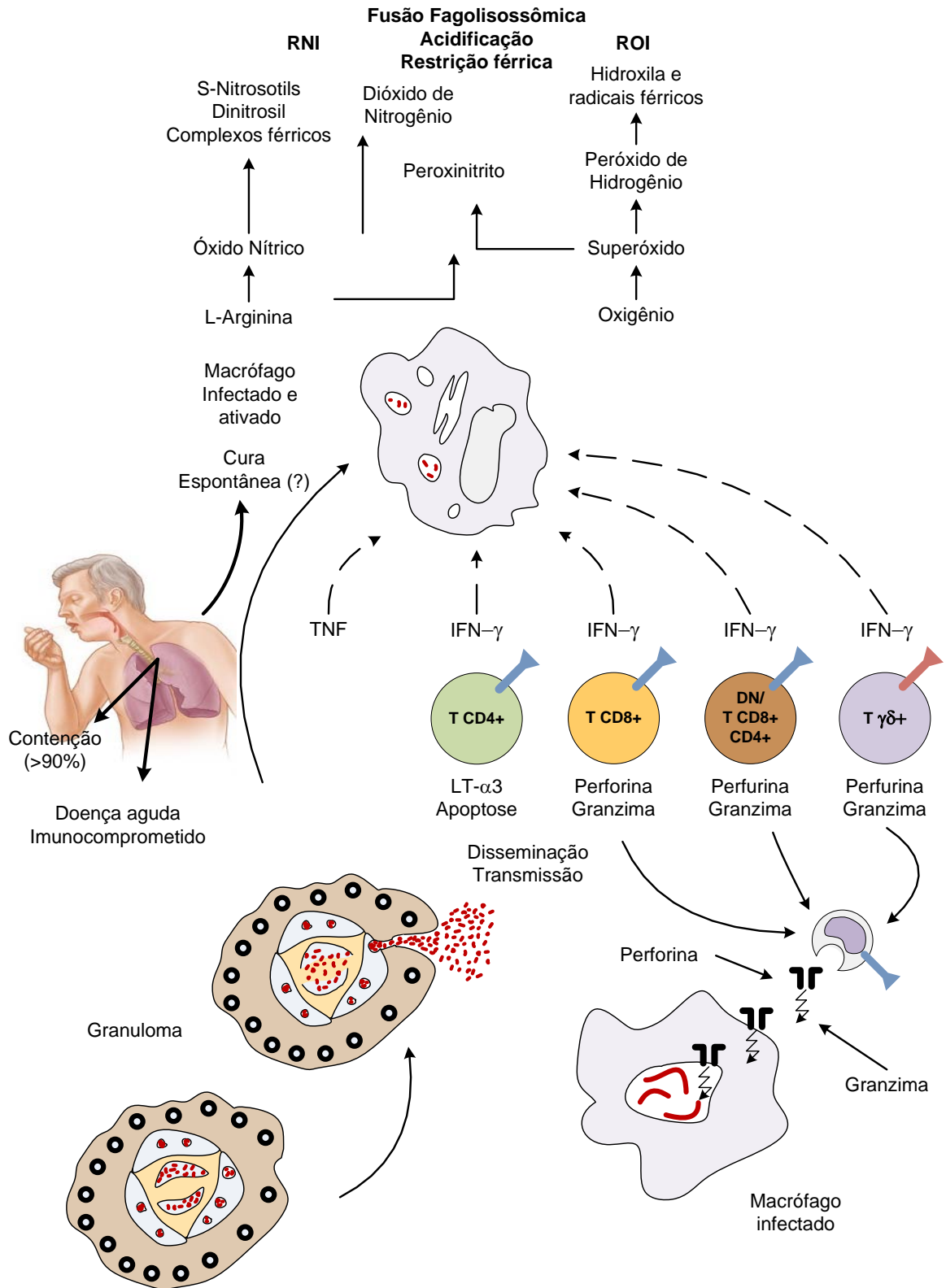
A chegada de DCs no linfonodo coincide com a ativação de células T virgens. Acredita-se que as condições ideais para a ativação das células T são exclusivas dos linfonodos e não ocorrem no pulmão. O desenvolvimento, função e fenótipo de todas as células efetoras irá depender do poder das DCs em gerar células efetoras eficazes. Para isso, torna-se necessário a expressão de antígenos associados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC), moléculas co-estimulatórias, citocinas específicas e a realimentação pelas células T regulatórias produtoras de IL-10 no linfonodo (BARNES et al., 1993; WOLF et al., 2008). Nesse ambiente, as células T virgens são ativadas e essa iniciação promove a expansão clonal, a expressão e a modulação de receptores e de algumas moléculas fundamentais para a função efetora destas células. Após a ativação e a diferenciação nos órgãos linfóides as células T seguem o seu curso rumo ao pulmão em resposta a inflamação, e dessa maneira podem gerar proteção através da ativação dos fagócitos infectados (WOLF et al., 2007; COOPER, 2009).

Para que haja uma resposta imune eficiente no pulmão é extremamente necessário a ativação das células fagocíticas do hospedeiro por meio das células T produtoras de IFN- $\gamma$ , citocina chave no controle do Mtb, visto que esta molécula potencializa a capacidade microbicida dos macrófagos aumentando a produção de

peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nítrico (NO), com as quais consegue matar o bacilo. No entanto, células T produtoras de  $IFN-\gamma$  apenas são detectadas no pulmão 14 dias após a infecção, sendo que a quantidade suficiente para limitar a proliferação do Mtb ocorre em aproximadamente 21 dias após o contato inicial (KAUFMANN, 2001; SHAFIANI et al., 2010). Reduzir o tempo de chegada das células T produtoras de  $IFN-\gamma$  no pulmão é importante para cessar o crescimento bacteriano e reduzir os impactos gerados pelo Mtb no local da inflamação. Nesse contexto, o papel das células T regulatórias e da citocina IL-10 pode ser maléfico, visto que, estas citocinas, juntamente com o bacilo, diminuem a resposta imune do tipo TH1 (Figura 2) (TORRADO et al., 2011; URDAHL et al., 2011).

Os linfócitos T  $CD8^+$  também contribuem para o controle da TB, essas células reconhecem fragmentos peptídicos ligados ao MHC classe I que é expresso em praticamente todas as células do organismo. Tratando-se do Mtb, sabe-se que vesículas apoptóticas proveniente de células infectadas contendo o complexo antígeno-MHC classe I são capazes de estimular especificamente células T  $CD8^+$  conforme descrito na figura 2. Após essa ativação, os linfócitos T  $CD8^+$  produzem  $IFN-\gamma$  e sintetizam grânulos que são secretados para exercer uma função citolítica sobre as células infectadas contribuindo em grande parte para o controle inicial da patologia (KAUFMANN, 2001; NORTH & JUNG, 2004). Logo, a resposta imune celular do tipo Th1 consegue conter a infecção, com a participação de células bem conhecidas como T  $CD4^+$ , T  $CD8^+$  e fagócitos; a produção de citocinas como; IL-2,  $IFN-\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-18 e TNF dentre outras, e também as quimiocinas, que desempenham papel extremamente importante no recrutamento celular para formação do granuloma (Figura 3) (KAUFMANN, 2001; NORTH & JUNG, 2004).

A resposta por meio das células T helper do tipo 2 ao Mtb também se faz presente. Esta resposta leva a produção de IL-4, o que segundo van Crevel e cols. (2000) poderia antagonizar a defesa do hospedeiro e levar a necrose tecidual. No entanto, IL-4 pode contribuir para a proliferação de linfócitos B. Por se tratar de um micro-organismo intracelular, e estar protegido da ação biológica dos anticorpos, a resposta humoral até bem pouco tempo era considerada como pouco relevante na infecção pelo Mtb, acreditava-se que ela não oferecia contribuição significativa na



**Figura 3:** Demonstração dos mecanismos efetores no combate à tuberculose.

**Fonte:** Adaptado de Kaufmann, SH. "Mycobacterium tuberculosis and the host response". Journal Experimental of Medicine, 2001.

proteção contra o bacilo. Contudo, trabalhos recentes demonstram que a maior população de linfócitos dentro das lesões são células B220+, que são prováveis células B, se acumulam em folículos parecidos com tecido linfóide nascente, regulados por quimiocinas específicas, e dessa maneira podem desempenhar papel na regulação da imunidade no local da lesão. Esses dados deixam claro que o real papel das células B na resposta ao bacilo da tuberculose requer maiores avaliações, especialmente no que tange a sua presença e controle no local da infecção (GARCIA GONZALEZ et al., 2001; KAHNERT et al., 2007).

### 2.3 POLIMORFISMO DE CITOCINAS NA TUBERCULOSE

As citocinas têm um importante papel na regulação do perfil de citocinas pró-inflamatórias (Th1) e anti-inflamatórias (Th2) e a alteração deste equilíbrio pode ter implicações na clínica de muitas doenças autoimunes e infecciosas (KEEN, 2002). As citocinas e seus receptores são frequentemente codificados por genes com alto grau de polimorfismo (HOPKINS, 2003). Estudos de identificação de polimorfismo em genes de citocinas e seus receptores identificaram que estes genes são muito polimórficos, mas que as sequências nos éxons são conservadas (BIDWELL *et al.*, 1999). A maioria dos polimorfismos identificados, até o momento, está localizada nas regiões não transcritas dos genes (KEEN, 2002). Os polimorfismos nestas regiões do gene podem afetar a expressão, inibindo ou estimulando a transcrição, dependendo dos elementos regulatórios e do nível de regulação envolvido (KEEN, 2002; HOPKINS, 2003).

Em uma revisão sistemática da literatura Bidwell e cols. (2001) relataram um estudo mostrando a associação entre polimorfismos nos genes da IL-1b +3953 e do IL-1Ra e a tuberculose pleural. Em outra publicação de Hollegaard & Bidwell (2006) foram relacionados outros estudos que conseguiram demonstrar a associação entre polimorfismo de citocinas e TB: IL12B intron 2 ATT; IL12B promotor, intron 2, IL12RB1 haplótipo 2: 641G 684T 1094C 1132C; TNF -237 G>A; TNF -308 G>A.

Desde então, diversos estudos têm buscado a associação entre o polimorfismo de diversas citocinas e a TB. Aqui serão abordados os polimorfismos genéticos das citocinas IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF e TGF- $\beta$ 1 com a tuberculose.



O funcionamento das citocinas é um elemento central na homeostase da resposta imune, e modificações das funções das citocinas podem levar a resposta imune anormal e ineficaz, como visto na tuberculose humana.

### 2.3.1 Polimorfismo do IFN- $\gamma$ na Tuberculose

O IFN- $\gamma$  é a citocina chave no controle da tuberculose. Esta citocina é produzida pelas linfócitos T CD4+, CD8+ e células NK. Os experimentos mostram que ratos deficientes (*Knock-out-KO*) dos genes de IFN- $\gamma$  têm infecções disseminadas por agentes intracelulares, inclusive as micobactérias (COOPER et al., 1993).

*Mycobacterium tuberculosis* é um potente indutor de IL-12, e como a produção de IFN- $\gamma$  é dependente de IL-12, a produção de IFN- $\gamma$  é geralmente detectada em hospedeiros infectados. Ainda que, a produção de IFN- $\gamma$  por si só seja insuficiente para o controle da infecção por Mtb, esta citocina exibe uma resposta protetora a este patógeno. O IFN- $\gamma$  é produzido tanto por sujeitos TST positivos sãos e enfermos. Se bem que a produção de IFN- $\gamma$  pode variar muito entre sujeitos e alguns estudos sugerem que os valores de IFN- $\gamma$  estão diminuídos em pacientes com TB ativa (FLYNN & CHAN, 2001).

Foram descritos cinco alelos diferentes nas regiões microssatélites do gene IFN- $\gamma$ . Posteriormente, Pravica e colaboradores (2000) mostraram haver correlação entre o alelo#2 do microssatélite, e a presença do alelo T localizado no SNP +874 T>A no sítio de início da tradução, coincidindo com o sítio de ligação NF- $\kappa$ B que pode ser importante na indução de alta produção de IFN- $\gamma$ . Desta forma, tem sido sugerido que o polimorfismo T>A na posição +874, associado com o marcador CA microssatélite, influencia diretamente o nível da produção de IFN- $\gamma$ .

Alguns estudos têm relacionado o polimorfismo genético da citocina IFN- $\gamma$  com as diversas formas de tuberculose. Frequências alélicas e genótípicas do gene da citocina IFN- $\gamma$  (+874 T>A) foi avaliada por VALLINOTO e cols (2010) em pacientes com TB e grupo controle. Neste estudo foi observada uma associação significativa entre a presença do alelo +874A e do genótipo +874AA com a tuberculose ativa, enquanto o alelo +874T e o genótipo +874TT foram mais frequentes no grupo controle. Estes resultados sugerem um papel protetor do

genótipo +874TT e um fator de predisposição do genótipo +874AA para a tuberculose. Em um estudo realizado no Paquistão foi demonstrada a associação do genótipo +874TT com a não progressão para formas graves da tuberculose (ANSARI et al., 2009). LÓPEZ-MADERUELO e cols (2003) demonstraram que indivíduos homozigóticos para o alelo A (+874) têm diminuição da produção de IFN- $\gamma$  o que pode ocasionar susceptibilidade para o desenvolvimento da tuberculose.

Outros resultados corroboram os achados acima (TSO et al., 2005; AMIM et al., 2008) e como também o estudo de meta-análise realizado por Pacheco e cols (2008) que indicam o polimorfismo do alelo +874T marcador de prognóstico da tuberculose.

### **2.3.2 Polimorfismo do Fator de Necrose Tumoral na Tuberculose**

O TNF é necessário para gerar uma resposta granulomatosa e para uma imunidade celular efetiva. Em grandes quantidades pode produzir febre, perda de peso, debilidade muscular e necrose nos pulmões. A eliminação intracelular de Mtb está controlada pela produção de NO induzida pelo TNF, sem esta indução o Mtb cresce sem controle. (KAUFMANN, 2001).

O gene TNF possui uma região transcricional rica em polimorfismos, associada com valores altos de expressão de TNF (KROEGER et al., 1999). Para o polimorfismo da posição -308G>A, foi designado TNF1 o alelo A e TNF2 o alelo G. O TNF2 foi associado ao fenótipo de alto produtor dessa citocina em diversos estudos (WILSON et al., 1993). Contudo, os efeitos dos alelos -238 G/A e -376 G/A são pouco conhecidos, os quais podem ter importância na patogênese das doenças infecciosas. Vários estudos não acharam associação entre polimorfismos do TNF e TB (AMIRZARGAR et al., 2004; HENAO et al., 2005; VEJBAESYA et al., 2007; ATES, 2008). Entretanto, alguns trabalhos encontraram associação entre polimorfismos do TNF e TB (OLIVEIRA et al., 2004; CORREA et al., 2005; HILL et al., 1996). Diferenças entre esses achados podem ser explicadas devido ao polimorfismo diferentes em cada população étnica e também a associação entre HLA e TNF em diferentes populações (LIO et al., 2001).

### 2.3.3 Polimorfismo da IL-10 na Tuberculose

A IL-10, uma citocina anti-inflamatória, produzida por macrófagos, possui atividades desativantes de macrófagos, incluindo a alteração da produção de IL-12, a qual por sua vez diminui a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T. (COOPER & KHADER, 2008.) A região flanqueadora 5' do gene da IL-10 é altamente polimórfica, com três pares de base em substituição na posição -1082 G>A, -819C>T e -592C>A, que resulta em produção diferente de IL-10. O alelo G na posição -1082 e haplótipos contendo este alelo tem sido associado com alta produção de IL-10, enquanto o alelo A e haplótipos tem sido associado com baixa produção de IL-10 (MÄURER et al., 2000).

A associação significativa entre os alelos e haplótipos -1082 G>A da IL-10 e a TB foi relatada por diversos autores, enquanto nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre diferentes formas clínicas da TB e IL-10 (ORAL et al., 2006; ATES et al., 2008). Contudo, outros estudos com boa casuística, não demonstraram associação entre a TB e o polimorfismo da IL-10 na posição -1082 (LOPEZ-MADERUELO et al., 2003; TSO et al., 2005; SHIN et al., 2005). Uma possível explicação para a inconsistência entre estes estudos é que variações genéticas étnicas específicas podem influenciar a imunidade do hospedeiro para a tuberculose (STEAD et al, 1990).

### 2.3.4 Polimorfismo da IL-6 na Tuberculose

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica originalmente identificada como fator de diferenciação de células B. É multifuncional e regula a resposta imune, a hematopoese, a resposta de fase aguda e a inflamação. É produzida por diversas células incluindo fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, células endoteliais, célula gliais e queratinócitos, em resposta a uma variedade de estímulos externos. (ISHIHARA & HIRANO, 2002; MOCELLIN *et al.*, 2003).

Estudos recentes têm demonstrado que a IL-6 desempenha um papel muito importante na regulação do equilíbrio entre as células Th17 produtoras de IL-17 e células T regulatórias (Treg). Estes dois subtipos celulares desempenham funções importantes na resposta imune. As células Th17 são fundamentais na patogênese das doenças autoimunes e de proteção contra as infecções bacterianas, enquanto

as células Treg contém a resposta exacerbada das células T efectoras (BETTELLI et al., 2006; KIMURA & KISHIMOTO, 2010).

Um polimorfismo na região flanqueadora 5' do gene da IL-6 na posição -174G>C parece afetar a transcrição da IL-6 (FISHMAN et al., 1987). Os indivíduos com genótipo+o homozigoto para o alelo G e heterozigoto GC, mostraram maiores valores de IL-6 no plasma, alta atividade transcricional e maior indução de resposta do que indivíduos homozigotos para o alelo C (OLIVIERE et al., 2002).

Os dados da literatura não relatam associação significativa entre o polimorfismo de IL-6 e TB (HENAO et al., 2005; ORAL et al., 2006).

### **2.3.5 Polimorfismo do Fator de Transformação do Crescimento- $\beta$ 1 na Tuberculose**

O Fator de Transformação do Crescimento- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) é um importante regulador da inflamação, atuando como pró-inflamatório em baixas concentrações, e anti-inflamatório em altas concentrações. Na condição de citocina pró-inflamatória promove a quimiotaxia dos leucócitos e fibroblastos até os locais de lesão. Uma parte dessa atividade depende do aumento da produção de moléculas de adesão intercelular e, desse modo, facilita a diapedese. O TGF- $\beta$ 1, em altas concentrações, suprime a produção de TNF e de óxido nítrico pelos macrófagos. Inibe também a produção de IFN- $\gamma$  e TNF pelas células NK e tem ação antagônica ao IFN- $\gamma$ . Todas estas ações podem modular as reações inflamatórias e facilitam a cicatrização das lesões tissulares (VODOVOTZ, 1997; OMER et al., 2000; BROWN et al., 2002).

Diversos polimorfismos já foram identificados no gene do TGF- $\beta$ 1, sendo três localizados na região à montante do primeiro nucleotídeo transcrito, nas posições -988C>A, -869G>A e -509C>T; um na região não traduzida, na posição +72(+C), três na região codificadora do gene que codifica uma sequência de resíduos de aminoácidos na forma ativa: Leu10/Pro (códon 10), Arg25/Pro (códon 25) e Thr263/Ile (CAMBIEN et al., 1996; AWAD et al., 1998).

As mutações no códon 10 (Leu/Pro) e no códon 25 (Arg/Pro) foram associadas com o fenótipo de alto produtor de TGF- $\beta$ 1, (HUTCHINSON et al., 1998; GRAINGER et al., 1999).

O TGF- $\beta$ 1 tem um importante efeito anti-inflamatório e está aumentado em soro de pacientes com TB avançada (FIORENZA et al., 2004). Monócitos de

pacientes com TB secretam quantidades aumentadas de TGF- $\beta$ 1 no início da estimulação *in vitro* com antígenos micobacterianos (OLOBO et al., 2001; TOOSI et al., 1995). Células gigantes de Langerhans e células epitelióides no granulomas de TB expressam valores altos de RNAm de TGF- $\beta$  sugerindo que a produção local resulta na inibição do macrófago (TOOSI et al., 1995).

Na tuberculose, TGF- $\beta$ 1 aumenta o crescimento intracelular do Mtb enquanto anticorpos neutralizantes para TGF- $\beta$ 1 reduzem o crescimento intracelular (HIRSCH et al., 1994). Portanto, é concebível que variações alélicas no gene promotor do TGF- $\beta$ 1 resultem em produção alterada desta proteína que pode ser responsável pela patogênese diferente da TB entre os indivíduos. O polimorfismo -509C>T no promotor do TGF- $\beta$ 1 está associado com valores circulantes desta citocina. O Alelo T é mostrado por estar associado com alta produção de TGF- $\beta$ 1 (GRAINGER et al., 1999).

## 2.4 IMUNODIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

### 2.4.1 Teste Tuberculínico

O Teste Tuberculínico (TST) foi desenvolvido a partir do lisado do Mtb, também chamado de Derivado Protéico Purificado (PPD), apresentando uma clássica resposta de hipersensibilidade do tipo tardia verificada após a injeção subcutânea. O PPD é composto de antígenos solúveis derivados do Mtb degradados por um processo de inativação pelo calor aplicado em caldo de cultura. A preparação do filtrado de cultura contém proteínas liberadas durante a primeira fase de crescimento da bactéria na cultura. O filtrado de cultura do Mtb compreende mais de 100 proteínas com múltiplos antígenos (HUEBNER et al., 1993; WEIR et al., 2008).

O PPD, ao longo dos tempos, sofreu pequenas modificações para se tornar mais específico, e, hoje é o padrão internacional para o TST, em que este teste tem a finalidade de identificar infecção pelo Mtb (HUEBNER et al., 1993; JASMER et al., 2002). O TST consiste na injeção intradérmica do PPD de Mtb, convencionalmente na face ventral do antebraço esquerdo. A injeção do antígeno tuberculínico causa uma reação de hipersensibilidade tipo IV, que se caracteriza por vasodilatação, edema e acúmulo de linfócitos e células inflamatórias no local, o que sugere o desenvolvimento da imunidade específica para a tuberculose. Esta imunidade pode

ser oriunda da sensibilização com a vacina BCG, contato com bactérias do meio ambiente ou pelo contato prévio com o bacilo Mtb (HOWARD & SOLOMON, 1988; FARHAT et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007). A leitura do teste é feita após 48 a 72 horas, onde se pode observar a formação de um nódulo, que corresponde à chamada resposta de hipersensibilidade tardia. O resultado do teste é expresso pela medida do maior eixo transversal deste nódulo, em milímetros, desprezando-se o eritema que se forma ao redor (SOARES et al., 2004; BRASIL, 2010). A resposta é então avaliada segundo o tamanho do eixo transversal do nódulo medido: 0 a 4 mm: não reator, 5 a 9 mm: reator fraco e maior ou igual a 10 mm: reator forte. No Brasil, o Ministério da Saúde indica profilaxia para tuberculose latente indivíduos que tiveram contato recente com caso confirmado de tuberculose e resultado de TST acima de 5mm (HOWARD & SOLOMON, 1988; SOUZA et al., 2006; BRASIL, 2010).

Vários estudos têm demonstrado que o TST não distingue, com segurança, pessoas vacinadas com BCG daquelas expostas a micobactérias do ambiente ou infectadas com Mtb (SALLES et al., 2007; WEIR et al., 2008). Além de apresentar resultados falso-negativos que podem ser decorrentes de uso de antígenos inadequados ou mal conservados, erros técnicos na aplicação ou na leitura do teste, necessidade de retorno do paciente (TEIXEIRA et al., 2007; NYENDAK et al., 2009). O fato do teste tuberculínico ainda continuar em uso, não obstante essas limitações, revela a necessidade urgente de viabilizar testes mais específicos para o diagnóstico da TB.

#### **2.4.2 Ensaio baseado na liberação de Interferon-gama**

Os Ensaio baseado na liberação de Interferon-gama (IGRA) se baseiam na resposta imune celular e liberação de IFN- $\gamma$ , uma vez que a liberação dessa citocina é usada como marcador de infecção. Esse teste utiliza antígenos da região RD-1 de *Mycobacterium tuberculosis* como ESAT-6 e CFP-10 (AREND et al., 2000; ANDERSEN et al., 2000; LALVANI et al., 2005). Dois testes estão sendo comercializados o QuantiFERON®-TB Gold *in Tube* (Cellestis Inc., Valencia, CA, EUA), o T SPOT-TB® assay (Oxford Immunotec, Abdingdon, Reino Unido). Os IGRAs oferecem algumas vantagens quando comparados ao TST. Os IGRA possuem uma maior especificidade, resultado em 24 horas, não necessita retorno do

paciente, não há subjetividade do operador e possui menos reatividade cruzada com a BCG e com outras infecções por micobactérias. (PAI et al., 2004; KUNST, 2005).

Alguns estudos que avaliam a sensibilidade diagnóstica dos IGRA em pacientes soropositivos, de áreas de baixa prevalência sugerem maior sensibilidade do que o TST (CHAPMAN et al., 2002; STEPHAN et al., 2008). Jones e colaboradores (2008) avaliaram a sensibilidade do QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT-IT) em 590 indivíduos HIV-positivos e demonstraram que os resultados estavam intimamente ligados com fatores de risco conhecidos como Tuberculose latente ou história pregressa de tuberculose. Os resultados indeterminados do QFT-IT foram significativamente correlacionados com a contagem baixa de células T CD4+, pois estas são a principal fonte produtora de IFN- $\gamma$ . PAI e colaboradores (2008), afirmam que a anergia devido à doença avançada, à desnutrição e à co-infecção com HIV associada à imunossupressão podem reduzir a sensibilidade dos IGRA, até mesmo do T SPOT-TB®.

Ewer e colaboradores relataram maior correlação do T SPOT-TB® com o tempo de exposição das crianças com casos confirmados de TB do que o TST. Neste trabalho foi também demonstrado maior positividade do TST em crianças vacinadas sem TB quando comparado às não vacinadas sem TB (EWER et al., 2003). Isto sugere que o TST pode apresentar resultados falso-positivos devido à interferência da BCG, em crianças e adolescentes que foram sensibilizadas há alguns anos atrás e, portanto, ainda mantém uma memória imunológica potente para os antígenos presentes na BCG. Neste caso, os IGRAs poderiam ajudar a elucidar casos de positividade do TST decorrentes de exposição prévia a BCG em crianças, e não devido a uma infecção por Mtb. Uma desvantagem, para os países em desenvolvimento, é o custo dos IGRA que é muito oneroso para ser usado na rotina do diagnóstico *in vitro* da tuberculose.

### 3 HIPÓTESES E OBJETIVOS

#### 3.1 HIPÓTESES

H01: Não há diferença na resposta imune celular aos antígenos do teste QuantiFERON®-TB Gold in-Tube de indivíduos com tuberculose ativa, TST positivo e TST negativo.

H1: Há diferença na resposta imune celular aos antígenos do teste QuantiFERON®-TB Gold in-Tube de indivíduos com tuberculose ativa, TST positivo e TST negativo.

H02: Não há associação entre o polimorfismo das citocinas IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF e TGF- $\beta$ 1 e a susceptibilidade à tuberculose.

H2: Há associação entre o polimorfismo das citocinas IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF e TGF- $\beta$ 1 e a susceptibilidade à tuberculose.

H03: Não há influência do polimorfismo +874 T>A do gene IFN- $\gamma$  na positividade do teste QuantiFERON®-TB Gold in-Tube.

H3: Há influência do polimorfismo +874 T>A do gene IFN- $\gamma$  na positividade do teste QuantiFERON®-TB Gold in-Tube.



### 3.2 OBJETIVO GERAL:

Analisar o efeito dos antígenos do QuantiFERON®-TB *Gold In-Tube* sobre a resposta imune, *in vitro*, de indivíduos com tuberculose e associar o polimorfismo genético de citocinas com a susceptibilidade à tuberculose pulmonar.

### 3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Em indivíduos com Tuberculose ativa, TST positivo e TST negativo

1. Quantificar os leucócitos e subtipos linfocitários (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD56+ e CD19+).
2. Comparar o resultado do teste QuantiFERON®-TB *Gold In-Tube* com o teste Tuberculínico.
3. Comparar a produção das citocinas do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF), IL-6 e regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ 1), *in vitro*, por células do sangue periférico após estímulo com antígenos do teste QuantiFERON®-TB *Gold In-Tube*.
4. Descrever as frequências alélicas, genótípicas e dos fenótipos previstos de polimorfismos genéticos das citocinas IL-6, IL-10, TNF, TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$ .
5. Investigar associação de alelos ou combinação de distintos alelos de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-6, IL-10, TNF, TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$ ) com a resposta de citocinas *in vitro*.
6. Investigar associação de alelos ou combinação de distintos alelos de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias com a menor susceptibilidade a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*
7. Investigar a influência do polimorfismo +874A>T do IFN- $\gamma$  sobre a positividade do teste QuantiFERON®-TB *Gold In-Tube*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram selecionados em unidades ambulatoriais específicas de atendimento à tuberculose (Instituto Brasileiro de Investigação para a Tuberculose–IBIT na Fundação José Silveira/Hospital Santo Amaro de Salvador-BA e do Hospital Especializado Otávio Mangabeira–HEOM, do Estado da Bahia), 181 indivíduos divididos em três grupos: com Tuberculose (Grupo TB), com teste tuberculínico positivo (Grupo TST positivo) e grupo com teste tuberculínico negativo (Grupo TST Negativo) no período entre agosto de 2010 e dezembro de 2011. Não foram incluídos neste estudo os indivíduos com suspeita clínica ou diagnóstico de gravidez, diabetes, câncer, imunodeficiências e doenças infecciosas como hepatites B e C, HIV, HTLV. Foi uma amostragem de conveniência.

**Grupo I (TB):** Cinquenta e um indivíduos com diagnóstico de tuberculose por esfregaço do escarro com presença do BAAR (bacilo álcool-ácido resistente) e/ou cultura para BK positiva.

**Grupo II (TST positivo):** Setenta indivíduos com teste tuberculínico positivo, baciloscopia e cultura negativas, quando indicativo, e ausência clínica da doença.

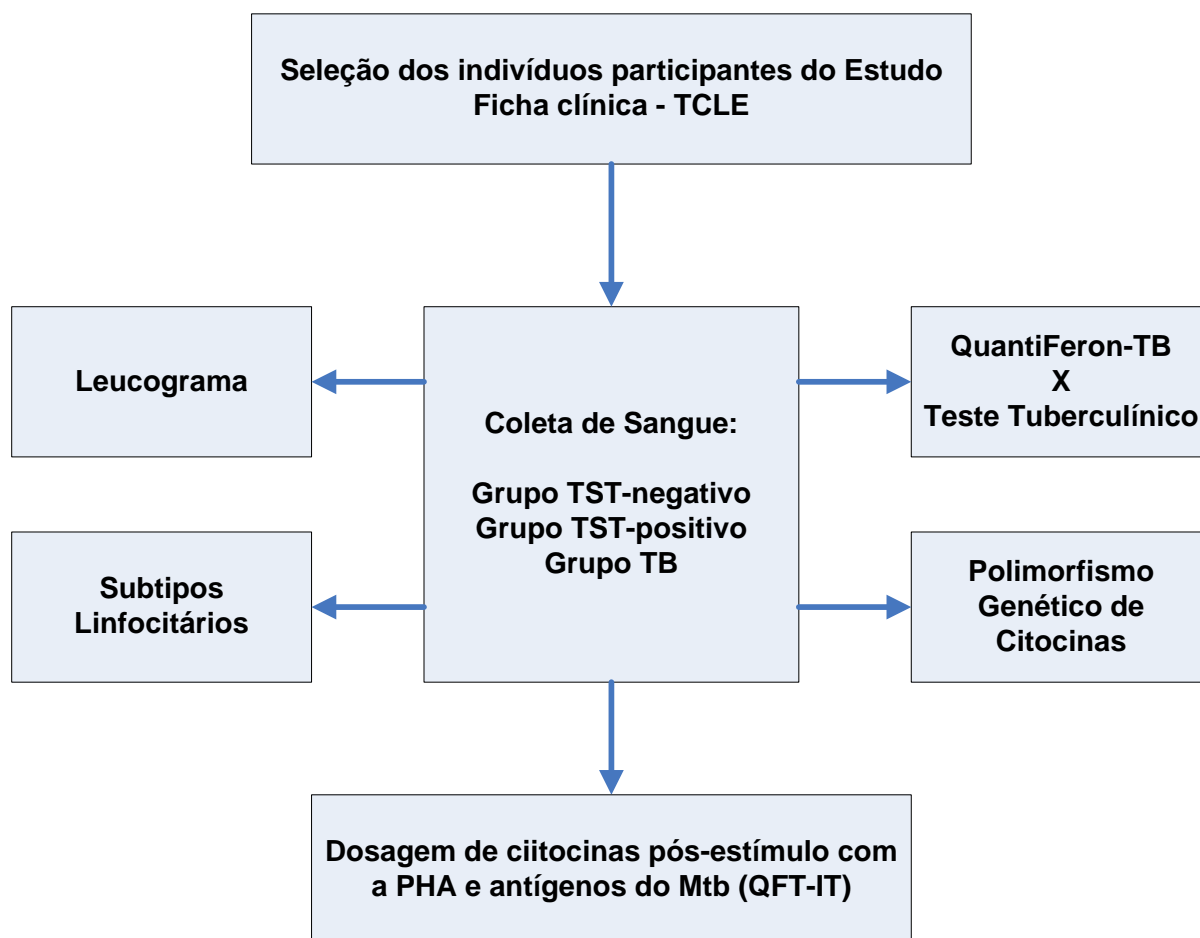
**Grupo III (TST negativo):** Sessenta indivíduos com teste tuberculínico negativo, sem história ou sintomatologia de tuberculose ou de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (estudantes e profissionais da área administrativa exames pré-admissionais).

### 4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Bahiana para o desenvolvimento das Ciências de acordo com as normas vigentes na Resolução CNS no. 196/96 (Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos) com o número de ofício de aprovação 86/2009.

Todos os participantes receberam as devidas informações sobre a pesquisa e preencheram formulários para assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, permanecendo uma cópia com os mesmos.

#### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



#### 4.4 REALIZAÇÃO DO TESTE TUBERCULÍNICO (TST)

O TST foi realizado com a aplicação de 2 unidades internacionais do PPD RT 23 (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) intradermicamente de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde. A endureção foi medida após 72 horas. Foi considerado não reator diâmetro medindo de 0 a 4 mm, fraco reator de 5

a 9 mm e forte reator acima de 10 mm. As leituras e aplicações foram feitas por profissionais treinados e capacitados dos locais onde foram realizadas as coletas das amostras.

#### 4.5 LEUCOGRAMA

O Leucograma foi realizado em analisador automatizado de células sanguíneas modelo Cell-DYN 3000 (ABBOTT, ILLINOIS, USA) no IBIT ou HEOM.

#### 4.6 IMUNOFENOTIPAGEM DOS LINFÓCITOS

Amostra de sangue periférico de cada voluntário foi colhida em tubos de coleta a vácuo de 4mL com K<sup>3</sup>EDTA (BD Sciences). Os fenótipos linfocitários foram quantificados por ensaio citofluorimétrico utilizando o *kit* comercialmente disponível Lymphogram<sup>®</sup> e PerfectCount Microspheres<sup>™</sup> (ambos Cytognos – Salamanca – Espanha) segundo as instruções do fabricante. Os dados foram adquiridos pelo FACScalibur<sup>®</sup> (BD Biosciences) com dez mil eventos computados e analisados pelo CellQuest<sup>®</sup> software (BD Biosciences). As informações referentes aos aspectos como tamanho e granulosidade, identificados por gráficos com eixo de dispersão de luz frontal (FSC – *Forward Scatter*) e eixo de dispersão de luz lateral (SSC – *Side Scatter*) possibilitaram a seleção da população linfocitária (Figura 4). Para a identificação das subpopulações de linfócitos T, linfócitos B e células NK, por citometria de fluxo, foram consideradas suas propriedades morfológicas e a fluorescência consequente à presença de anticorpos monoclonais específicos para cada molécula: anti-CD8-FITC, anti-CD19-FITC, anti-CD3-PE, anti-CD56-PE e anti-CD4-PE/Cy5. As células marcadas por cada monoclonal exibem, em escala logarítmica, cores e intensidade de fluorescência distintos, permitindo a discriminação das subpopulações linfocitárias no histograma (Figura 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f).

A utilização do reagente PerfectCount Microspheres<sup>™</sup> (Cytognos, Salamanca, Espanha) permite o cálculo dos valores absolutos das subpopulações por microlitro de sangue. O fabricante fornece o número de *beads* por microlitro para servir de controle interno da quantificação das células.

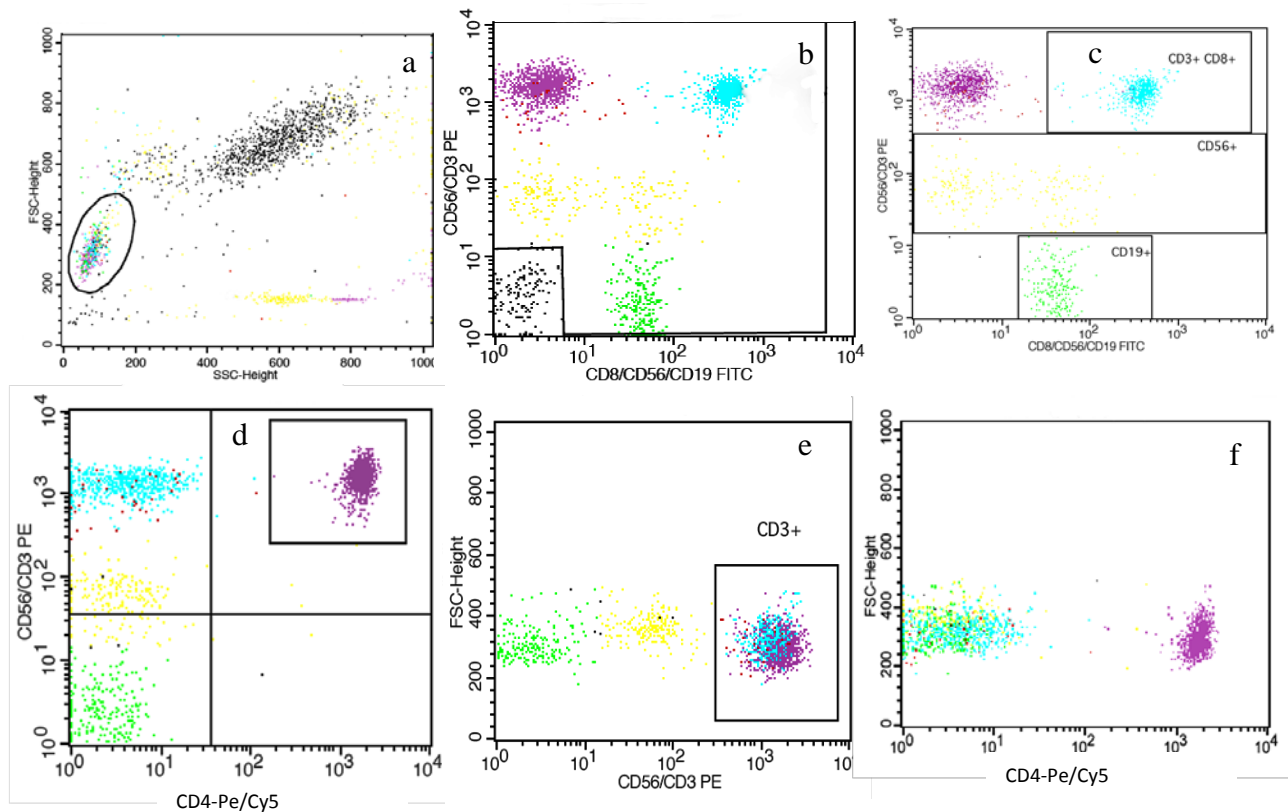


Figure 4: Identificação e caracterização das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo. Figura 4a *gated* de linfócitos. Figura 4b purificação. Figuras 4c e 4e apresentam a distribuição das células de acordo com intensidades de fluorescência emitidas pela ligação dos anticorpos monoclonais específicos, em ambos os eixos. As figuras 4d e 4f apresentam tamanho celular *versus* padrão de fluorescência (CD56/CD3-PE e CD4-Pe/Cy5, respectivamente).

#### 4.7 REALIZAÇÃO DO QUANTIFERON®-TB GOLD IN TUBE

O ensaio foi feito de acordo com as instruções do fabricante do teste Quantiferon®-TB Gold in Tube (QTF-IT) (Cellestis Ltda., Victoria, Australia). Foi adicionado 1 mL de sangue aos tubos Nil (controle negativo), Mitógeno (PHA- controle positivo ) e antígenos TB ( ESAT-6, CFP-10 e TB-7.7 antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis*). As amostras de sangue foram incubadas a 37°C por 24 horas, centrifugadas a 1500 rpm, coletado o plasma e estocado a -20 graus para dosagem posterior do IFN- $\gamma$  pelo método de ELISA com *kit* fornecido pelo

fabricante. O teste foi considerado positivo  $\geq 0,350$  (após a subtração dos valores de IFN- $\gamma$  antígenos do Mtb do Nil) e negativo para valores menores que  $< 0,350$ . Se Nil  $< 8,0$  e PHA  $> 0,5$  UI/mL, o teste foi validado, resultados diferentes desses foram considerados inválidos.

## 4.8 DOSAGEM DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

### 4.8.1 Dosagem de IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ e TNF

As concentrações de IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF em sobrenadante das amostras incubadas no kit QFT-IT foram determinadas utilizando o ensaio *Human Th1/Th2 11plex FlowCytomix Multiplex* (eBioscience, Viena, Austria) de acordo com as instruções do fabricante.

O ensaio foi realizado em tubos do tipo *ependorf*. Inicialmente, foi realizada a reconstituição dos padrões para em seguida ser feita a mistura dos padrões (IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF). Na etapa seguinte, em um tubo de *ependorf*, foi realizada a mistura das *beads* marcadas com anticorpos monoclonais anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IFN- $\gamma$  e anti-TNF e a mistura de conjugado biotilado contendo anticorpos específicos contra as citocinas a serem dosadas, em outro tubo. Ao fim deste processo, tubos de *ependorf* foram numerados em branco, curva-padrão e amostras e a cada um deles foi adicionado a mistura de *beads*, a mistura de conjugado biotilado, as amostras e padrões correspondentes. Os tubos foram incubados por 2h e, então, feita a lavagem com tampão de ensaio, seguida de centrifugação. Foi adicionado a cada tubo Streptavidina-Ficoeritina seguido de incubação por 1h. Após esse período, foram feitas duas novas lavagens e centrifugações. Ao final deste processo, as soluções foram transferidas para tubos de citometria para ser realizada a aquisição no citômetro de fluxo FACScalibur<sup>®</sup> (BD Biosciences) com dez mil eventos computados e analisados pelo *software* FlowCytomix<sup>™</sup> Multiplex Technology (eBioscience, Viena, Austria)

#### 4.8.2 Dosagem de TGF- $\beta$ 1

A concentração de TGF- $\beta$ 1 dos sobrenadantes das amostras de sangue incubadas no kit QFT-IT foi medida com o teste *Human TGF-beta1 FlowCytomix Simplex* (eBioscience, Viena, Austria) de acordo com as instruções do fabricante.

Inicialmente, as amostras foram pré-diluídas 1:10 com tampão de ensaio. Foi adicionado a cada uma delas 20  $\mu$ L de HCl 1N, seguido de incubação por 1h. Ao final deste tempo adicionado 20  $\mu$ L de NaOH 1N, e, então realizado o procedimento como descrito no item 4.8.1.

### 4.9 POLIMORFISMO DE CITOCINAS

#### 4.9.1 Extração do DNA genômico

A purificação do DNA sanguíneo foi efetuada com o Kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em um tubo de *ependorf* de 1,5 mL foi adicionado 200  $\mu$ L de sangue, 20  $\mu$ L Proteinase K, 20  $\mu$ L RNase A e feita a mistura por turbilhamento (vórtex). A mistura foi incubada por 2 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 200  $\mu$ L Solução de Lise seguido de turbilhamento por 15 segundos e incubação por 30 minutos a 55°C em banho-maria. Na etapa seguinte, foi adicionado 200  $\mu$ L de Etanol 96-100% e a mistura transferida para uma coluna de sílica, para então ser centrifugada 10000g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna colocada dentro de um tubo coletor.

A lavagem do material foi realizada em duas etapas com 500  $\mu$ L da solução de lavagem I e II, respectivamente. Em seguida, a coluna-tubo coletor foi centrifugada por três minutos a 16000g. Então, a coluna de sílica foi transferida para um novo tubo coletor e aplicado 80  $\mu$ L do tampão de eluição diretamente na matriz de fibra de vidro da coluna. A incubação foi feita por um minuto. Em seguida, o tubo centrifugado a 16000g por um minuto, para recuperar o DNA purificado.

#### 4.9.2 Genotipagem de citocinas (IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 e TNF)

Foi usado o kit para genotipagem de citocinas da One Lambda Incorporation - "Cytokine Genotyping Tray", contendo, cada um, 16 tubos de PCR sendo um tubo

controle negativo e 15 tubos com dois pares de iniciadores: um par com sequências específicas que amplificam seletivamente regiões regulatórias polimórficas dentro de genes que codificam TNF (-308G>A), TGF- $\beta$ 1 (10C>T, 25C>G), IL-10 (-1082A>G, -819T>C, -592A>C), IL-6 (-174C>G) e IFN- $\gamma$  (874T>A); o segundo par de iniciadores amplifica uma sequência controle. O procedimento de PCR foi realizado conforme as instruções do fabricante em termociclador da Applied&Biosystems. Depois do processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose. O gel de agarose 2,5% foi preparado com 0,75g de agarose (Invitrogen), 30 mL de tampão TBE1X (Tris-Borato 89mM; EDTA 2mM pH 8.0) e 0,05  $\mu$ g/mL de brometo de etídio.

Após a eletroforese, os produtos amplificados foram visualizados usando luz ultravioleta e fotografados com auxílio de um transluminador. Os resultados foram interpretados usando mapas das placas de genotipagem de citocinas fornecidas pelo fabricante do *kit* de PCR.

#### 4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS

Inicialmente, foi realizada a análise descritiva dos dados relativos à idade, gênero e dados clínicos, visando à caracterização da amostra.

A análise dos subtipos de linfócitos e níveis de produção das citocinas pelos diferentes grupos do estudo foi feita utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os níveis de produção das citocinas entre os genótipos. O teste de Wilcoxon pareado foi usado para verificar diferenças na produção de citocinas estimulada e não estimulada para cada grupo do estudo.

As frequências genótípicas e alélicas observadas nos grupos foram calculadas por contagem direta. O equilíbrio de Hardy-Weinberg e a existência de diferença nas frequências dos genótipos e alelos entre os grupos foram avaliadas pelo teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando indicado.

A concordância global entre os testes QFT-IT e o TST foi avaliada utilizando o índice kappa ( $\kappa$ ).



As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico Prism versão 5 (GraphPad Inc. San Diego, CA) e o R Project versão 2.15.2 (GNU Project, Boston, MA). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

**5 CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1: Diferenças na Distribuição de Leucócitos e Subtipos de Linfócitos em Sangue Periférico de Pacientes com Tuberculose Pulmonar**

**EM PUBLICAÇÃO**

**6 CAPÍTULO 2: Artigo Científico 2: Polimorfismo e Produção *in vitro* de IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF e TGF- $\beta$ 1 em Pacientes com Tuberculose Pulmonar**

**EM PUBLICAÇÃO**

**7 CAPÍTULO 3: Artigo científico 3: Comparação entre um Teste de Liberação de Interferon-Gama e o Teste de Sensibilidade à Tuberculina em Pacientes com Tuberculose.**

**EM PUBLICAÇÃO**

## 8 CONCLUSÕES

Diferenças na distribuição dos tipos de leucócitos e subtipos linfocitários em sangue periférico de pacientes com TB pode ajudar no diagnóstico e monitoramento desta doença.

A concordância entre o teste tuberculínico e o QuantiFERON®-TB Gold in-Tube na população estudada é baixa e não justifica a substituição do teste tuberculínico no diagnóstico da tuberculose latente.

O estabelecimento de um ponto de corte de 0,30 UI/mL para o resultado do ensaio QuantiFERON®-TB *Gold in Tube* aumenta a sensibilidade para o diagnóstico da tuberculose latente, sem perda da especificidade.

Os antígenos do *Mycobacterium tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10 e TB7.7) modulam a resposta imune celular do hospedeiro inibindo a produção de IL-6 pelas células sanguíneas.

A imunossupressão sistêmica de indivíduos com TB pode levar a produção reduzida de IL-10, TNF e IFN- $\gamma$  por células do sangue periférico estimuladas com a PHA.

A maior frequência do alelo A e do genótipo AA de IFN- $\gamma$  (+874) nos pacientes com tuberculose pode determinar a diminuição na produção de IFN- $\gamma$  e, conseqüentemente, influenciar na patogênese da doença.

A capacidade de produção das citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-6) e regulatória IL-10 não foi influenciada pelos polimorfismos estudados.

O polimorfismo +874 T>A do gene IFN- $\gamma$  não influencia a positividade do teste QuantiFERON®-TB Gold in-Tube.

## REFERÊNCIAS

- ABE-SANDES, Kiyoko et al. Heterogeneity of the Y chromosome in Afro-Brazilian populations. **Human Biology**, v. 76, n. 1, p. 77-86, feb. 2004.
- ALMEIDA, Alexandre S. et al. Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung immune response that impairs Th1-type immunity. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 1, p. 718-31, jul. 2009.
- ADETIFA, Ifedayo Mo et al. Comparison of two interferon gamma release assays in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection and disease in The Gambia. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, n. 122, oct. 2007.
- AHMAD, Suhail. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. **Clinical Development Immunology**, v. 112, n. 1, p. 814-943, aug. 2011.
- AMIM, Lúcia Helena et al. Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. **Molecular Biology Rep.** v. 35, n. 4, p. 563-6, aug. 2008.
- AMIRZARGAR, Ali Akbar et al. The association of HLA-DRB, DQA1, DQB1 alleles and haplotype frequency in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. **International Journal Tuberculosis Lung Diseases**, v. 8, n. 8, p. 1017-121, jan. 2004.
- ANDERSEN, Peter et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. **Lancet**, v. 356, n. 9235, p. 1099-104, sep. 2000.
- ANTAS, Paulo R. et al. T cell immune responses to mycobacterial antigens in Brazilian tuberculosis patients and controls. **Transaction Real Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 99, n. 9, p. 699-707, sep. 2005.
- ANSARI, Ambreen et al. Cytokine gene polymorphisms across tuberculosis clinical spectrum in Pakistani patients. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. 4773-8, mar. 2009.
- ARAUJO, Zaída et al. Immunitary response in tuberculosis and the role of Mycobacterium tuberculosis secretion antigens in its protection, pathology and diagnosis. **Investigacion Clinica**, v. 49, n. 3, p. 411-41, 2008.
- AREND, Sandra M. et al. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. **Journal Infection Disease**, v. 181, p.1850-4, may. 2000.
- AREND, Sandra M. et al. Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing TB contacts. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, v. 175, n. 6, p. 529-31, mar. 2007.
- ARNOLD, Cath. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 2, p. 120-8, feb. 2006.

ATES, Ö et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in tuberculosis. **Journal Clinical of Immunology**, v. 28, n. 3, p. 232-6, may. 2008.

AWAD, Mohammed et al. Genotypic variation in the Transforming Growth Factor-[beta]<sup>1</sup> Gene: Association with Transforming Growth Factor-[beta]<sup>1</sup> Production, Fibrotic Lung Disease, and Graft Fibrosis after Lung Transplantation. **Transplantation**, v. 66, n. 8, p. 1014-20, oct.1998.

AWOMOYI, Agnes et al. Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 12, p. 1808-14, dec. 2002.

BAFICA, André et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1715-24, dec. 2005.

BARNES, Peter et al. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. **Infection and Immunity**, v.61, n. 8, p. 3482-9, aug.1993.

BARRY, Clifton E. 3<sup>rd</sup> et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature Review Microbiology**, v. 7, p. 845-5, dec. 2009.

BEAMER, Gillian L. et al. Interleukin-10 promotes Mycobacterium tuberculosis disease progression in CBA/J mice. **Journal of Immunology**, v.181, n. 8, p. 5545-5, sep. 2008.

BECK, J .Swanson et al. T4 lymphopenia in patients with active pulmonary tuberculosis. **Clinical of Experimental Immunology**, v. 60, p. 49-54. 1985.

BEN-SELMA, Walid et al. Association of TNF-a and IL-10 polymorphisms with tuberculosis in Tunisian populations. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 837-43, aug. 2011(a).

BEN SELMA, Walid et al. Interferon gamma +874T/A polymorphism is associated with susceptibility to active pulmonary tuberculosis development in Tunisian patients. **DNA and Cell Biology**, v. 30, n.6, p. 379-87, 2011(b).

BETTELLI, Estelle et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, p. 235-8, may. 2006.

BIDWELL, Jeffrey et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. **Genes and Immunity**, v.1, p. 3-19, jun.1999.

BIDWELL, Jeffrey et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. **Genes and Immunity**, v. 2, n. 2, p. 61-70, dec. 2001.

BOUSSIOTIS, Vassiliki A. et al. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. **Journal Clinical Investigation**, v.105, n. 9, p. 1317-25, may. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle a Tuberculose. **Dados e indicadores da Tuberculose**, Brasília, 2011. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1527](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1527)> Acesso em: 15 abril. 2012

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. 2010. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_de\\_recomendacoes\\_controle\\_tub\\_novo.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tub_novo.pdf) (último acesso em 22 agosto 2012).

BRIGHTBILL, Hans, D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, 732-6. 1999.

BROSCH, René et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **The National Academy of sciences**, v. 99, n. 6, p. 3684-9, jan. 2002.

BROCK, Inger et al. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, v. 170, n. 1, p. 65-9, apr. 2004.

BROWN, Robert et al. Enhanced Fibroblast Contraction of 3D Collagen Lattices and Integrin Expression by TGF- $\beta$ 1 and  $\beta$ 3: Mechanoregulatory Growth Factors? **Experimental Cell Research**, v. 274, n. 2, p. 310-22, apr. 2002.

CAMBIEN, François et al. Polymorphisms of the Transforming Growth Factor- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1) Gene in Relation to Myocardial Infarction and Blood Pressure: The Etude Castemoin de l'infarctus du Myocarde (ECTIM) **Study Hypertension**, v. 28, n. 5, 881-7, 1996.

CARNEIRO, Valdirene Leão et al. Differences in the distribution of peripheral blood leukocyte and lymphocyte subsets in Pulmonary Tuberculosis Patients (dados não publicados)

CASANOVA Jean-Laurent & ABEL, Laurent. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. **Annual Review Immunology**, v. 20, p. 581-620, apr. 2002.

Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis. Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. Guidelines for using the QuantiFERON®-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. MMWR 2005: pp 1–57



CHAPMAN, Ann. L. et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. **AIDS**, v. 16, p. 2285–93, nov. 2002.

CHEE, C. B. et al. Quantitative T-cell interferon-gamma responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens in active and latent tuberculosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, n.6, p. 667-70, jun. 2009.

CHEN, Minjian et al. A mechanism of virulence: virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3707-16, mar. 2006.

COLE, Stewart et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537-44, jun.1998.

COLE, Stewart. Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **FEBS Letters**, v. 452, n. 2, p. 7-10, jun. 2003.

COOPER, Andrea et al. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. **Mucosal Immunology**, v. 4, n.3, p. 252-60, mar. 2011.

COOPER, Andrea & KHADER, Shabaana. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. **Immunology Review**, v. 226, n. 1, p. 191-204, oct. 2008.

COOPER, Andrea. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annual Review Immunology**, v. 27, p. 393-422, dec.2009(a).

COOPER, Andrea. T cells in mycobacterial infection and disease. **Current Opinion Immunology**, v. 21, n. 4, p. 378-84, aug. 2009(b).

COOPER, Andrea et al. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **Journal Experimental Medicine**, v.178, n. 6, p. 2243-47, dec.1993.

COROMINAS, Mercé et al. B-lymphocytes and co-stimulatory molecules in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **International Journal of Tuberculosis Lung Diseases**, v. 8, n. 1, p. 98-105, jul. 2004.

CORREA, Paula A. et al. Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. **Journal Rheumatology**, v. 32, n. 2, p. 219-24, 2005.

COSMA, Christine L. et al. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annual Review Microbiology**, v. 57, p. 641-76, oct. 2003.

DENKINGER, Claudia M. et al. Guidelines on interferon-gamma release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion? **Clinical Microbiology Infection**, v. 17, p. 806-14, apr. 2011.

DHEDA, Keertan et al. T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs. low-burden settings. **Current Opinion Pulmonary Medicine**, v. 15, n. 3, p.188-200, 2009.

DHEDA, Keertan et al. Expression of a novel cytokine, IL-4delta2, in HIV and HIV-tuberculosis co-infection. **AIDS**, v. 19, p. 1601-06, oct. 2005.

DIVANGAHI, Maziar et al. Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. **Nature Immunology**, v. 10, n. 8, p. 899-906, jun. 2009.

DOSANJH, Davinder P. et al. Improved diagnostic evaluation of suspected tuberculosis. **Annual Internacional Medicine**, v. 148, n. 5, p. 325-36, mar. 2008.

EUM, Seok-Yong et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. **Chest**, v.137, p. 122-28, sep. 2010.

EWER, Katie et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in a school tuberculosis outbreak. **Lancet**, v. 361, n. 9364, p.1168-73, apr. 2003.

FARHAT M, GREENAWAY C, PAIM, MENZIES D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 10, p. 1192–204, 2006.

FERNANDO, Suran L. & BRITTON. Warwick J. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. **Immunology Cell Biology**, v. 84, 125-37, oct. 2006.

FIORENZA, Rateni et al. TNF-alpha, TGF-beta and NO relationship in sera from tuberculosis (TB) patients of different severity. **Immunology Letters**, v. 98, n. 1, p. 45-8, aug. 2005.

FISHMAN, David et al. The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and association with Systemic-Onset Juvenile Chronic Arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 7, 1369-76, oct. 1998.

FLYNN, JoAnne L. & CHAN John. Immunology of tuberculosis. **Annual Review Immunology**, v. 19, p. 93-129, 2001(a).

FLYNN, JoAnne L. & CHAN John. Latent and reactivation tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4195-201. 2001(b).

GALLEGOS, Alena; PAMER, Eric; GLICKMAN, Michael. Delayed protection by ESAT-6-specific effector CD4+ T cells after airborne M. tuberculosis infection. **Journal Experimental Medicine**, v. 205, n.10, p. 2359-68, sep. 2008.

GARCIA, Gonzalez. Tuberculosis: pathogenesis and clinical manifestations. **Acta Científica Venezolana**, v. 52, n. 1, p. 5-9, sep. 2001.

GONG, Jonh, et al. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 3, p. 913-08, mar. 1996.

GONZALEZ-JUARRERO, Mercedes et al. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 69, n.3, p. 1722-28, mar. 2001.

GRAINGER DJ, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. **Human Molecular Genetics**, v.8, p.93-97, 1999.

GUIMARÃES, Tânia Mara Pinto et al. Evaluation of the Immune Response of Individuals Infected with Mycobacterium tuberculosis and Patients with Active Tuberculosis. **International Scholarly Research Network**, p.1-7, 2012.

HERNANDEZ, Jesus et al. Low number of peripheral blood B lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. **Immunological Investigation**, v.39, p.197-205, 2010.

HENAO, Marcela et al. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, n. 1, p. 11-19, 2006.

HILL, Lunec et al. The TNF-ligand and receptor superfamilies: controllers of immunity and the Trojan horses of autoimmune disease? **Molecular Aspects of Medicine**, v. 17, n. 5, p. 455-509, sep. 1996.

HIRSCH, Christina et al. Enhancement of intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis in human monocytes by transforming growth factor-beta 1. **Journal Infection Disease**, v. 170, n. 5, 1229-37, jun. 1994.

HOLLEGAARD, Martin & BIDWEL, Jeffrey. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. **Genes and Immunity**, 2006.

HOUGARDY, Jean-Michel et al. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v. 176, n. 4, p.409-16, aug. 2007.

HOPKINS, Stephen John. The pathophysiological role of cytokines. **Leg Médecine**, v. 5, supplement, p. S45-S47, mar. 2003.

HOWARD, Thomas & SOLOMON David. Reading the tuberculin skin test: Who, When and How? **Archives of Internal Medicine**, v. 148, n. 11, p. 2457-9, 1988.

HUEBNER, Robin E.; SCHEIN, Maybelle F.; BASS. John B. The tuberculin skin test. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, 968-75, aug.1993.

HUTCHINSON I.V. et al. Cytokine Genotypes in Allograft rejection: Guidelines for Immunosuppression. **Transplantation proceedings**, v. 30, 3991-2, aug. 1998.

ISHIHARA, Katsuhiko & HIRANO Toshio. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. **Cytokine Growth Factor**, v. 13, n.4-5, p. 357-68, aug-oct. 2002.

JONES, David et al. Notification of tuberculosis in an area of low TB incidence. **Clinical Medicine**, v. 8, n. 6, p. 637, aug. 2008.

JUNQUEIRA-KIPNIS, Ana Paula et al. NK cells respond to pulmonary infection with Mycobacterium tuberculosis, but play a minimal role in protection. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 6039-45, mar.2003.

KAHNERT, Antje et al. Mycobacterium tuberculosis triggers formation of lymphoid structure in murine lungs. **Journal Infectious Diseases**, v. 195, n. 1, p. 46-54, 2007.

KAUFMANN, Stefan H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature Review Immunology**, v. 1, p. 20-30, oct. 2001.

KAUFMANN, Stefan H. et al. Mycobacterium tuberculosis and the host response. **Journal Experimental Medicine**, v. 201, p. 1693-97, jun. 2005.

KEEN, Leigh J. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. **Transplant Immunology**, v. 10, p.143-6, 2002.

KIMURA, Akihio & KISHIMOTO, Tadamitsu. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 7, p. 1830-5, jun. 2010.

KINCAID, Eleanor Z. et al. Codominance of TLR2-dependent and TLR2-independent modulation of MHC class II in Mycobacterium tuberculosis infection in vivo. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 5, p. 3187-95, sep. 2007.

KONEMAN, Elmer W et al. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. 1760p.

KROEGER, Karen M. et al. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. **Cytokine**, v. 12, n. 2, p. 110-9, feb. 1999.

KRUTZIK, Stephan R. & MODLIN, Robert L. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. **Seminars in Immunology**, v. 16, p. 35-41, aug. 2004.

KUNST, Heinke. Diagnosis of latent tuberculosis infection: the potential role of new technologies. **Respiratory Medicine**, v. 100, n. 12, p. 2098-106, dec. 2006.

LADEL, Christoph et al. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. **Infection and Immunity**, v. 65, n.11, p. 4843-9, nov. 1997.

LALVANI, Ajit; RICHELDI, Luca; KUNST, Heinke. Interferon gamma assays for tuberculosis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 322-7, jun. 2005.

LEAL, Irene S. et al. Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 5747-54, nov. 1999.

LEE, Ju Yong et al. Comparison of two commercial interferon gamma assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. **European Respiratory Journal**, v. 28, n.1, p. 34–30, jul. 2006.

LEE, Wook-Bin et al. Neutrophils Promote Mycobacterial Trehalose Dimycolate-Induced Lung Inflammation via the Mincle Pathway. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 1-18, apr. 2012.

LIO, Domenico et al. Genotype frequencies of the +874T→A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon- $\gamma$  gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. **European Journal Immunogenetics**, v. 29, n. 5, p. 371-4, oct. 2002.

LOPEZ-MADERUELO, Dolores et al. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, v.167, n. 7, p. 970-5, jan. 2003.

LOWE, David M. et al. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? **Trends in Immunology**, v. 33, n. 1, p. 14-25, jan. 2012.

MA, Main-Juan et al. Toll-like receptors, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-10 gene polymorphisms in risk of pulmonary tuberculosis and disease severity. **Human Immunology**, v. 71, n. 10, p. 1005-10, jul. 2010.

MACHADO, Taísa Manuela Bonfim. Ancestralidade em Salvador-BA. 2008. 1v. 85f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fiocruz, Salvador, Bahia.

MACHADO-JÚNIOR, Almério et al. Analysis of discordance between the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 13, n. 4, p. 446-53, apr. 2009.

MAGLIONE, Paul; XU, Jiayong; CHAN; John. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 11, p. 7222-34, jun. 2007.

MARTINEAU, Adrian R. et al. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 7, p. 1988-94, jul. 2007.

MÄURER, Martin et al. Genetic variation at position -1082 of interleukin 10 (IL10) promotor and outcome of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 104, p. 98-100, aug. 2000.

MENZIES, Dick; PAI, Madhukar; COMSTOCK, George. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. **Annals of Internal Medicine**, v. 146, n.5, p. 340-54, aug. 2007.

METCALFE, John et al. Interferon-gamma release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 4, p. 1120-29, 2011.

MOCELLIN, Simone et al. The dual role of IL-10. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 1, p. 36-43, jan. 2003.

MODLIN, Robert L.; BRIGHTBILL, Hans D.; GODOWSKI, Paul J. The toll of innate immunity on microbial pathogens. **New England Journal Medicine**, v. 340, p. 1834-35, jun. 1999.

MORAN, Albert et al. No association between the +874T/A single nucleotide polymorphism in the IFN-gamma gene and susceptibility to TB. **Internacional Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, v. 11, n.1, p. 113-5, jan. 2007.

NIENHAUS, Albert; SCHABLON, Anja; DIEHL, Roland. Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent TB infection--analysis of discordant results, when compared to the tuberculin skin test. **PLoS One**, v. 3 n. 7, e2665, jul. 2008.

NORTH, Robert J. & JUNG, Yu Jin. Immunity to tuberculosis. **Annual Review Immunology**, v. 22, p. 599-623, apr. 2004.

NYENDAK, Melissa et al. New diagnostic methods for tuberculosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, n.2, p. 174-82, apr. 2009.

OLIVEIRA, Marta Maria et al. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the TNF- $\alpha$  (-238/-308) gene among TB and non TB patients: Susceptibility markers of TB occurrence? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, p. 461-6, aug. 2004.

OLIVIERE, Bonafe et al. The -174 C/G locus affects in vitro/in vivo IL-6 production during aging. **Experimental Gerontology**, v. 37, 309-14, sep. 2002.

OLOBO, John et al. Circulating TNF-alpha, TGF-beta, and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 53, n. 1, p. 85-91, jan. 2001.

OMER, Riley et al. Maintaining Immunological Balance in Parasitic Infections: A Role for TGF- $\beta$ ? **Parasitology Today**, v.16, p. 18-23, aug. 2000.

ORAL, Haluk B. et al. Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. **Cytokine**, v. 35, n. 3, p. 143-47, jul. 2006.

PACHECO, Antônio Guilherme; CARDOSO, Cynthia Chester; MORAES, Milton Ozório. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **Human Genetics**, v. 123, n. 5, p. 477-84, apr. 2008.

PAI, Madhukar; RILEY, Lee Wiley; COLFORD, John JR. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. **Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 12, p. 761-76, dec. 2004.

PAI, Madhukar et al. T-cell assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: moving the research agenda forward. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 428-38, jun. 2007(a).

PAI, Madhukar et al. Sensitivity of a whole-blood interferon-gamma assay among patients with pulmonary tuberculosis and variations in T-cell responses during anti-tuberculosis treatment. **Infection**, v. 35, n.2. p. 98-103, apr. 2007(b).

PAI, Madhukar; ZWERLING, Alice; MENZIES, Dick. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. **Annals of Internal Medicine**, v. 149, n. 3, p. 177-84, aug. 2008.

PILHEU, Jorge A. et al. CD4+ T-lymphocytopenia in severe pulmonary tuberculosis without evidence of human immunodeficiency virus infection. **Internacional Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, v.1, n. 5. P. 422-26, may.1997.

PRAVICA, Vera et al. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. **Human Immunology**, v. 61, n. 9, p. 863-6, sep. 2000.

RAVN, Pernille et al. Prospective evaluation of a whole-blood test using Mycobacterium tuberculosis-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 4, p. 491-6, apr. 2005.

REILEY, William W. et al. ESAT-6-specific CD4 T cell responses to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection are initiated in the mediastinal lymph nodes. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 105, n. 31, p. 10961-6, aug. 2008.

RIBEIRO-RODRIGUES, Renata et al. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clinical Experimental Immunology**, v. 144, p. 25-34, dec. 2006.

RODRIGUES, D.S.S. et al. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in Mycobacterium tuberculosis infection and disease. **Clinical Experimental Immunology** 128: 149-54, jan. 2002.

SALLAKCI, Nilgün et al. Interferon-gamma gene +874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. **Tuberculosis**, v. 87, n.3, p. 225-30, oct. 2007.

SALLES, Cristiane G. et al. The presence of a booster phenomenon among contacts of active pulmonary tuberculosis cases: a retrospective cohort. **BMC Public Health**, v. 7, n. 38, p.1-5, mar. 2007.

Saude.ba.gov.br [homepage on the Internet]. Bahia: Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde. Portal de Vigilância da Saúde <Casos Notificados de Tuberculose na Bahia>. [updated 2012 Aug 20; cited 2012 Aug 22]. Available from: <http://www3.saude.ba.gov.br/cgi/tabcgi.exe?tabnet/sinan/tube.def>

SAUNDERS, Bernadette M. et al. CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. **Cell Immunology**, v. 216, p. 65-72, jun. 2002.

SCANGA, Charles A. et al. MyD88-deficient mice display a profound loss in resistance to Mycobacterium tuberculosis associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. **Infection and Immunity**, v. 72, n.2, p. 2400-04, apr. 2004.

SCHREIBER, Heidi et al. Inflammatory dendritic cell migrate in and out of transplanted chronic mycobacterial granulomas in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 10, p. 3902-13, set. 2011.

SCHWANDER, Stephan & DHEDA, Keertan. Human lung immunity against Mycobacterium tuberculosis: insights into pathogenesis and protection. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, v. 183,n. 6, p. 696-707, nov. 2010.

SCOLA, Letizia et al. Allele frequencies of +874T>A single nucleotide polymorphism at the first intron of IFN-gamma gene in Alzheimer's disease patients. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 15, n. 4, p. 292-5, aug. 2003.

SELVARAJ, P. et al. Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. **Cytokine**, v. 43, n. 1, p. 26-33, aug. 2008.

SHAFIANI, Shahin et al. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. **Journal Experimental Medicine**, v. 207, n. 7, p. 1409-20, jul. 2010.

SHIN, Hyoung Doo et al. Interleukin-10 haplotype associated with total serum IgE in atopic dermatitis patients. **Allergy**, v. 60, n. 9, p. 1146-51, aug. 2005.

SILVA, Naíze Nara Pinheiro. Estudo do Polimorfismo de citocinas em uma amostra da população de Salvador-Bahia. 2003. 1v. 73f. Dissertação ( Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. Salvador.

SOARES, Luís Clóvis Parente; MELLO, Fernanda Queiroz; KRITSKI, Afrânio Lineu. Prevalência da prova tuberculínica positiva entre alunos da Faculdade de Medicina de Campos (RJ). **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, p. 440-7, 2004.



SOUZA, Anástácio Q. et al. Purified Protein Derivative – PPD. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 427, dec. 2006.

SOYSAL, Ahmet et al. Evaluation of cut-off values of interferon-gamma-based assays in the diagnosis of M. tuberculosis infection. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, v. 12, n. 1, p. 50-6, sep. 2008.

STEPHAN, Christoph et al. Comparing QuantiFERON-tuberculosis gold, T-SPOT tuberculosis and tuberculin skin test in HIV-infected individuals from a low prevalence tuberculosis country. **AIDS**, v. 30, n. 18, p. 2471-79, nov. 2008.

STEAD, William W. et al. Racial differences in susceptibility to infection by Mycobacterium tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 15, n. 7, p. 422-7, feb. 1990.

TEIXEIRA, Henrique Couto; ABRAMO, Clarice; MUNK, Martin Emílio. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 3, p. 331-4, may-jun. 2007.

TSO, Hoi W. et al. Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. **Genes and Immunity**, v. 6, n. 4, p. 358-63, apr. 2005.

TOOSSI, Zahra et al. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 1, p. 465-73, jan. 1995.

TORRADO, Egídio; ROBINSON, Richard T.; COOPER, Andrea. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. **Trends in Immunology**, v. 32, p. 66-72, feb. 2011.

TORRES, Alex Lima et al. Reference range for leukocytes and lymphocytes subsets in blood donors from Salvador, Bahia. (dados não publicados).

TSAI, Ming C. et al. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. **Cell Microbiology**, v. 8, n.2, p. 218-32, feb. 2006.

TURNER, DM et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European Journal of Immunogenetics**, v. 24, n.1, p.1-8, feb. 1997.

URDAHL, Ernst et al. Initiation and Regulation of T-cell in tuberculosis. **Nature Mucosal Immunology**, v. 4, p. 288-93, mar. 2011.

VALLINOTO, Antônio C. et al. IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis. **Human Immunology**, v. 71, n. 7, p. 692-6, apr. 2010.

VAN CREVEL, Reinot et al. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, n. 2, p. 294-309, apr. 2002.

VAN PINXTEREN, Laurens A. et al. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 2, p. 155-60, mar. 2000.

VAN PINXTEREN, Laurens A. et al. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells. **European Journal of Immunology**, v. 30, n.12, p. 3689-98, dec. 2000.

VEENSTRA, Hanne et al. Changes in leucocyte and lymphocyte subsets during tuberculosis treatment; prominence of CD3dimCD56+ natural killer T cells in fast treatment responders. **Clinical Experimental Immunology**, v. 145, n. 2, p. 252-60, aug. 2006.

VODOVOTZ, Yoram. Control of Nitric Oxide Production by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1: Mechanistic Insights and Potential Relevance to Human Disease. **Biology Chemistry**, v. 1, n.1, p. 3-17, feb. 1997.

VORDERMEIER, HM et al. Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice. **Clinical Experimental Immunology**, v. 106, n.2, p. 312-16, nov. 1996.

WEIR, Rosemary E. et al. Comparison of IFN-gamma responses to mycobacterial antigens as markers of response to BCG vaccination. **Tuberculosis**, v. 88, n. 1, p. 31-8, jan. 2008.

WELLS, Charles D. et al. HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis: the perfect storm. **Journal Infectious Diseases**, v. 196, n. 1, p. 86-107, aug. 2007.

WILSON, Anthony G. et al. An allelic Polymorphism within the Human Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ - Promotor Region Is Strongly Associated with HLA A1, B8, and DR3 Alleles. **Journal Experimental Medicine**, v. 177, p. 557-60, feb. 1993.

WILSON, Anthony G. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proceedings of National Academy Science**, v. 94, n. 7, p. 3195-9, apr. 1997.

WOLF, Andrea J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2509-19, aug. 2007.

WOLF Andrea J. et al. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. **Journal Experimental Medicine**, v. 205, n. 1, 105-15, jan. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: **WHO report 2011**. Geneva, Switzerland: WHO, 2011. Available at: [http://www.who.int/tb/advisory\\_bodies/stag\\_tb\\_report\\_2011.pdf](http://www.who.int/tb/advisory_bodies/stag_tb_report_2011.pdf)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Strategic and Technical Advisory Group (STAG-TB). 2010. Report of the 10th Meeting. Available at: [http://www.who.int/tb/advisory\\_bodies/stag\\_tb\\_report\\_2010.pdf](http://www.who.int/tb/advisory_bodies/stag_tb_report_2010.pdf)

YONEDA, Takahiro & ELLNER, Jerrold J. CD4(+) T cell and natural killer cell-dependent killing of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, v. 158, n. 2, p. 395-403, aug. 1998.

**APÊNDICE A – Ficha clínica**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
 LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR

FICHA CLÍNICA

**Sub-Projeto: “Padronização de testes imunodiagnósticos *in vitro* alternativo para tuberculose humana e avaliação da resposta *in vitro* a diferentes antígenos de *Mycobacterium sp* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*.”**

**Nome do entrevistador:** \_\_\_\_\_

**Data da coleta:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Identificação do paciente:

Registro		
Nome Completo		
Procedência	1.IBIT 2.HOM 3.OUTROS	
Gênero	1.MASCULINO 2.FEMININO	
Data de Nascimento		
Naturalidade		
Profissão		
Grau de Instrução	1.Fundamental Incompleto 2.Fundamental Completo 3.Nível Médio Incompleto 4.Nível Médio Completo 5.Superior Incompleto 6.Superior Completo	
Endereço		
Telefone		
Classificação Étnica (auto-referenciada)	1.BRANCO 2.MESTIÇO 3.NEGRO 4.ÍNDIO	

## Dados Clínico-Laboratoriais:

1. O paciente já realizou a BACILOSCOPIA? (Se <b>NÃO</b> , pular para a <b>questão 4</b> ) <b>OBS:</b> BACILOSCOPIA = Exame de escarro	1.SIM 2.NÃO 3.Não sei/Não lembro	
2. Resultado da BACILOSCOPIA (Se <b>NEGATIVO</b> , pular para a <b>questão 4</b> )	1.POSITIVO 2.NEGATIVO 3.Não sei/Não lembro	
3. Se <b>POSITIVO</b> , qual a classificação?	1.1+ 2.2+ 3.3+ 4.4+ 5.Não sei/Não lembro	
4. O paciente já realizou o exame CULTURA? (Se <b>NÃO</b> , pular para a <b>questão 6</b> )	1.SIM 2.NÃO 3.Não sei/Não lembro	
5. Se <b>SIM</b> , qual foi o resultado?	1.POSITIVO 2.NEGATIVO 3.Não sei/Não lembro	
6. O paciente já realizou o exame PPD? (Explicar ao paciente como é o exame) (Se <b>NÃO</b> , pular para a <b>questão 8</b> )	1.SIM 2.NÃO	
7. Qual foi o resultado do PPD?	1.0 a 4mm (Não reator) 2.5 a 9mm (Fraco reator) 3.>10mm (Forte reator) 4. Não sei/Não lembro	
8. O paciente já tomou a vacina BCG?	1.SIM 2.NÃO	
9. O paciente tem a cicatriz da BCG? (Olhar o braço direito do paciente)	1.SIM 2.NÃO	
10. O paciente está em tratamento? (Se <b>NÃO</b> , pular para a <b>questão 13</b> )	1.SIM 2.NÃO	
11. O tratamento atual tem quanto tempo?	1.Um mês 2.Dois meses 3.Três meses 4.Quatro meses 5.Cinco meses 6.Seis meses 7. Mais que seis meses	
12. Quais as drogas utilizadas no tratamento atual? (Pular para a <b>questão 17</b> )	1.Isoniazida 2.Rifampicina 3.Pirazinamida 4.Etambutol 5.Estreptomicina 6.Etionamida 7.Não sei/Não lembro 8.Outros(especificar)	
13. O paciente tem ou já teve contato com um possível COMUNICANTE da tuberculose? (Se <b>NÃO</b> , pular para a <b>questão 15</b> )	1.SIM 2.NÃO	
14. Qual tipo de contato?	1.Domiciliar 2.Trabalho 3.Vizinhos 4.Outros	
15. O paciente utiliza ou já utilizou profilaxia (isoniazida profilático)? (Se <b>NÃO</b> , pular para a <b>questão 17</b> )	1.SIM 2.NÃO	
16. Se <b>SIM</b> , por quanto tempo?	1.Um mês 2.Dois meses 3.Três meses 4.Quatro meses 5.Cinco meses 6.Seis meses 7.Não sei/Não lembro	
17. Grupo no estudo	1.Grupo I (Tuberculose sintomática – Baciloscopia + e/ ou cultura +) 2.Grupo II (Assintomático; PPD positivo) 3.Grupo III (Assintomático; PPD negativo ou sem PPD)	

**APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
 Instituto de Ciências da Saúde  
 Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, numa pesquisa científica. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra, do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Se tiver alguma dúvida, você deve procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do(a) Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (CEP/EBMSP), na Av. Dom João VI, 274 – Brotas / CEP 40285-001, telefone (71) 2101-1900 — falar com a senhora Maria de Lourdes.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

**1. Instituição.** Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde (Labimuno/ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA). Endereço: Rua Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela.

**2. Título do Projeto.** Padronização de teste imunodiagnóstico *in vitro* para tuberculose humana e avaliação *in vitro* a diferentes antígenos de *Mycobacterium sp* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

**3. Pesquisador Responsável.** Prof. Dr. José Roberto Meyer Nascimento no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Endereço: Rua Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela.

#### **4. Descrição da pesquisa**

**4.1 Justificativa.** Aproximadamente um terço da população mundial tem a tuberculose. Esta doença é causada por uma bactéria, chamada de *Mycobacterium tuberculosis*. Atualmente, para descobrir se uma pessoa tem tuberculose o médico solicita exames de Raios X e de laboratório. Muitas vezes com os exames de laboratório realizados não se consegue diagnosticar se o paciente tem ou não a tuberculose. Os exames atuais são demorados ou incômodos para o paciente pela necessidade do retorno alguns dias depois para a leitura do teste. Alguns países já utilizam um teste internacional para auxiliar no diagnóstico da tuberculose, mas para o Brasil este teste é muito caro. Por isso, os pesquisadores e médicos procuram alternativas mais baratas produzidas com qualidade e dentro da possibilidade do nosso país. Logo, os pesquisadores do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Universidade Federal da Bahia (LABIMUNO da UFBA), tentam o desenvolvimento de um exame de laboratório para uso nacional para ser usado, em substituição ao exame internacional disponível nos países mais ricos e que seja acessível a maior parte da população brasileira.

**4.2 Objetivos.** Desenvolver um exame de laboratório mais barato e adequado à nossa realidade para auxiliar no diagnóstico da tuberculose humana.

**4.3 Metodologia.** Você está sendo convidado a participar porque você tem queixas e sintomas (febre, tosse e emagrecimento) que sugerem que você tem tuberculose (Grupo I da pesquisa), ou por que você tem exame de PPD positivo (grupo II da pesquisa) ou porque você faz parte do terceiro grupo que não tem tuberculose e também não apresenta PPD positivo. Caso concorde em participar faremos a coleta de 25 mL do seu sangue (1/2 copinho de café) que serão utilizados para contagem das células do sangue (leucograma), para os testes laboratoriais de capacidade de resposta às bactérias e microrganismos causadores de doenças relacionadas com a tuberculose e para o desenvolvimento de testes que substituam os atuais usados no diagnóstico da tuberculose.

**5. Riscos, prejuízos, desconfortos, lesões que possam decorrer da pesquisa.** Os riscos associados a esta coleta de sangue são limitados a pequenos desconfortos no local da punção sanguínea, ou no máximo uma pequena mancha roxa no local da coleta.



**6. Benefícios derivados da participação nesta pesquisa.** Você não terá nenhum benefício financeiro por sua participação neste estudo, entretanto, caso durante a pesquisa com nossos testes seja identificado alterações, você será encaminhado a atendimento em unidade especializada de saúde pública. Você será encaminhado para tratamento no Instituto Brasileiro de Investigação para a Tuberculose (IBIT), se for descoberto que você sofre de tuberculose, e se já recebe cuidados contra a tuberculose continuará seu tratamento normalmente, tudo isso mesmo que desista, em qualquer momento, de participar deste estudo. Caso concorde você poderá buscar os resultados do leucograma no local e período indicados no protocolo que lhe será entregue no momento da coleta para esse projeto. A comunidade poderá futuramente usufruir dos benefícios da melhoria no diagnóstico da tuberculose.

**8. Canais de esclarecimento (antes, durante e após a execução do estudo) sobre a própria pesquisa.** Sempre que desejar você poderá esclarecer suas dúvidas através do telefone (71) 3235-9682, ramal 223 (ligações a cobrar se necessário)

**9. Sigilo em relação à privacidade do sujeito de pesquisa e confidencialidade de seus dados.** Além do sangue precisaremos ter acesso aos dados do seu prontuário médico para melhor análise da pesquisa e para divulgação em congressos e revistas médicas, mas seus dados serão protegidos e jamais será divulgada sua identidade.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do PESQUISADOR RESPONSÁVEL

<b>CONSENTIMENTO DO SUJEITO DE PESQUISA</b>
---

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG nº \_\_\_\_\_ e CPF nº \_\_\_\_\_, prontuário nº \_\_\_\_\_,  
abaixo assinado, concordo de maneira livre e esclarecida em participar, na condição de sujeito de pesquisa, do estudo intitulado "Padronização de teste imunodiagnóstico *in vitro* para tuberculose humana e avaliação *in vitro* a diferentes antígenos de *Mycobacterium sp* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*". Fui devidamente informado(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como sobre os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me assegurado o sigilo, em relação à privacidade do sujeito de pesquisa, e garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência e/ou tratamento.

Cidade do Salvador, Bahia, ..... de ..... de 2010.

\_\_\_\_\_  
Nome completo e legível

\_\_\_\_\_  
Assinatura (ou impressão digital) do sujeito e/ou de seu representante legal

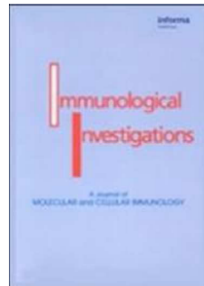
**Nós, testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores, presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos detalhados sobre o estudo e aceite do sujeito de pesquisa em participar deste protocolo.**

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_ CPF nº: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_ CPF nº: \_\_\_\_\_

**ANEXO A - Submissão do Artigo: Differences in the distribution of peripheral blood leukocyte and lymphocyte subsets in pulmonary tuberculosis patients**

Immunological Investigations



**Differences in the distribution of peripheral blood leukocyte and lymphocyte subsets in Pulmonary Tuberculosis Patients**

Journal:	<i>Immunological Investigations</i>
Manuscript ID:	LIMM-2012-0121
Manuscript Type:	Original Papers
Date Submitted by the Author:	25-Sep-2012
Complete List of Authors:	Carneiro, Valdirene; Universidade do Estado da Bahia, ; Universidade Federal da Bahia, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular. ICS Santos, Rosalina; Universidade Federal da Bahia, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular. ICS Sampaio, Geraldo; Universidade Federal da Bahia, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular. ICS Batista, Marilda; Universidade Federal da Bahia, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular. ICS Carvalho, Lucas; Universidade Federal da Bahia, Hospital Universitário Prof. Edgar Santos Netto, Eduardo; Universidade Federal da Bahia, Hospital Universitário Prof. Edgar Santos Meyer, Roberto; Universidade Federal da Bahia, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular. ICS Freire, Songeli; Universidade Federal da Bahia, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular. ICS
Keywords:	leucocytes, lymphocyte subsets, tuberculosis

SCHOLARONE™  
Manuscripts

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/limm> Email: [krolson@buffalo.edu](mailto:krolson@buffalo.edu)

**ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética**



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Salvador, 24 de julho de 2009.

**OFÍCIO Nº. 86/2009**

**REFERENTE AO PROTOCOLO Nº.119/2008**


**“PEDRONIZAÇÃO DE TESTE IMUNODIAGNÓSTICOS INVIRO ALTERNATIVOS PARA TUBERCULOSE HUMANA E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INVITRO A DIFERENTES ANTÍGENOS MYCOBACTERIUM SP E CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS”**

Pesquisador: Profº. JOSÉ MAYER NASCIMENTO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências, após a análise do ponto de vista bioético das correções de pendências do Protocolo acima citado, recebidas em 26.03.09, considera que o Protocolo atende aos princípios éticos em pesquisa em seres humanos, segundo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP CNS-MS). Diante do exposto julga o protocolo supracitado **APROVADO**.

Lembramos a necessidade do envio de relatório anual do andamento da pesquisa, dentro do cronograma citado no mesmo protocolo.

Saudações,

  
 Profa. Dra. Lucíola Maria Lopes Crisóstomo  
 Coordenadora do CEP/EBMSP/FBDC

Ilmo.. Sr.  
**PROF. JOSÉ MAYER NASCIMENTO**  
 Rua Amazonas, 499 – Apt. 402- Pituba  
 CEP. 41.830.980 – Salvador - Bahia

Salvador, 24 de julho de 2009.

**ANEXO C - *Worksheet* Genotipagem**

**WORKSHEET**  
Cytokine Genotyping Tray, Lot 4



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

Sample ID \_\_\_\_\_ Race \_\_\_\_\_ Birthdate \_\_\_\_\_ ASG/PR \_\_\_\_\_

Disease \_\_\_\_\_ Relationship to Patient \_\_\_\_\_

TNF- $\alpha$  Results \_\_\_\_\_  
TGF- $\beta$ 1 Results \_\_\_\_\_  
IL-10 Results \_\_\_\_\_  
IL-6 Results \_\_\_\_\_  
IFN- $\gamma$  Results \_\_\_\_\_

Tray Exp Date \_\_\_\_\_  
Tray Det # \_\_\_\_\_  
Donor Lot #/Batch # \_\_\_\_\_

POSITIONS	PRODUCT SIZE (bp) (mark positive locations)															
	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
<b>RESULTS</b>																
<b>SPECIFICITY</b>																
TNF- $\alpha$	G/G (low)	G/A (high)	A/A (high)	T/T G/G (high)	T/C G/G (high)	C/C G/G (intermediate)	T/T G/C (intermediate)	C/C G/C (low)	T/T C/C (low)	T/C C/C (low)	G/C/G/C (high)	G/C/C/C (intermediate)	G/C/C/A/T/A (intermediate)	A/C/G/A/T/A (low)	A/T/A/A/T/A (low)	
TGF- $\beta$ 1	G/G (low)	G/A (high)	A/A (high)	T/T G/G (high)	T/C G/G (high)	C/C G/G (intermediate)	T/T G/C (intermediate)	C/C G/C (low)	T/T C/C (low)	T/C C/C (low)	G/C/G/C (high)	G/C/C/C (intermediate)	G/C/C/A/T/A (intermediate)	A/C/G/A/T/A (low)	A/T/A/A/T/A (low)	
IL-10	G/G (low)	G/A (high)	A/A (high)	T/T G/G (high)	T/C G/G (high)	C/C G/G (intermediate)	T/T G/C (intermediate)	C/C G/C (low)	T/T C/C (low)	T/C C/C (low)	G/C/G/C (high)	G/C/C/C (intermediate)	G/C/C/A/T/A (intermediate)	A/C/G/A/T/A (low)	A/T/A/A/T/A (low)	
IL-6	G/G (low)	G/A (high)	A/A (high)	T/T G/G (high)	T/C G/G (high)	C/C G/G (intermediate)	T/T G/C (intermediate)	C/C G/C (low)	T/T C/C (low)	T/C C/C (low)	G/C/G/C (high)	G/C/C/C (intermediate)	G/C/C/A/T/A (intermediate)	A/C/G/A/T/A (low)	A/T/A/A/T/A (low)	
IFN- $\gamma$	T/A (intermediate)	T/A (intermediate)	A/A (low)													

Photo Documentation

Test Performed by \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_  
Read by \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_  
Reviewed by \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_