



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS E DO POLIMORFISMO**

**+874T/A NO GENE IFN- $\gamma$  EM PACIENTES COM DIFERENTES**

**FORMAS CLÍNICAS DA TUBERCULOSE**

EDNELZA DA SILVA GRAÇA

Belém-Pará  
2009  
EDNELZA DA SILVA GRAÇA

**CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS E DO POLIMORFISMO  
+874T/A NO GENE IFN- $\gamma$  EM PACIENTES COM DIFERENTES  
FORMAS CLÍNICAS DA TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto

Belém-Pará  
2009

EDNELZA DA SILVA GRAÇA

**CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS E DO POLIMORFISMO  
+874T/A NO GENE IFN- $\gamma$  EM PACIENTES COM DIFERENTES  
FORMAS CLÍNICAS DA TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto  
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Banca Examinadora: Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado  
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Profa. Dra. Antonia Benedita Rodrigues Vieira  
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Profa. Dra. Karla Ribeiro  
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Profa. Dra. Sheyla Mara de Almeida Ribeiro (Suplente)  
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Belém, 27 de março de 2009

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor.

Mas lutamos para que o melhor fosse feito.

Não somos o que deveríamos ser.

Não somos o que iremos ser.....

Mas, graças a Deus,

não somos o que éramos."

*Martin Luther King*

Dedico este trabalho aos meus maiores afetos: meu marido Paulo, minhas filhas queridas Amanda, Luciana e Aline, pelo amor incondicional, pelos momentos felizes e pelo companheirismo em todas as horas. Aceitem aqui o meu mais sincero obrigado e a certeza do meu amor infinito.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto, pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação. Obrigada pela acolhida, pela paciência, pela motivação, incentivo e, principalmente, pela confiança em minha capacidade.

Aos pacientes e colegas funcionários do HUIBB que voluntariamente participaram deste estudo, e sem os quais a realização do mesmo seria impossível.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ishak, pelo exemplo de dedicação, competência e apoio a todos os alunos do Laboratório de Virologia.

Ao farmacêutico Mauro, meu amigo e parceiro, que me ajudou a idealizar e realizar este estudo. Obrigada por estar sempre comigo nesta jornada.

Às biomédicas Renata e Lucinda, pela paciência nos primeiros dias quando estava totalmente perdida no laboratório.

À farmacêutica Rosimar, que com sua generosidade e paciência me ensinou as técnicas de biologia molecular utilizadas neste estudo, além de estar sempre disponível esclarecendo as minhas dúvidas.

Ao biólogo Felipe, amigo de todas as horas, que sempre com sua tranquilidade ajudava a tornar tudo menos complicado.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado e a Prof<sup>a</sup> MsC. Vânia Nakauth pelo apoio e sugestões, sempre muito importantes, desde a qualificação.

A todos os meus colegas do Laboratório de Patologia Clínica do HUIBB, pela compreensão e boa vontade que tiveram ao aceitarem participar deste estudo.

Ao Gabriel, técnico de laboratório do HUIBB, pela ajuda imprescindível que me deu na coleta das amostras dos pacientes.

A todos os colegas do Laboratório de Virologia, especialmente à Helena, Di Paula, Paula, Regiane, Sandra, Leonardo e Iran que sempre me proporcionaram uma convivência agradável e em algum momento me auxiliaram neste estudo.

À UFPA e ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários pelo acolhimento para o desenvolvimento deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
	<b>RESUMO</b> .....	11
	<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	A TUBERCULOSE.....	13
1.2	ETIOLOGIA E TRANSMISSÃO .....	15
1.3	ASPECTOS CLÍNICOS DA TUBERCULOSE .....	18
<b>1.3.1</b>	<b>Período de Infecção</b> .....	19
<b>1.3.2</b>	<b>A Tuberculose Primária</b> .....	20
<b>1.3.3</b>	<b>A Tuberculose Pós-Primária</b> .....	20
<b>1.2.4</b>	<b>Remissão</b> .....	21
1.4	DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE .....	21
<b>1.4.1</b>	<b>Métodos de detecção e identificação do <i>M. tuberculosis</i></b> .....	21
<b>1.4.2</b>	<b>Métodos Imunológicos</b> .....	23
<b>1.4.3</b>	<b>Métodos de imagem</b> .....	25
<b>1.4.4</b>	<b>Outros exames</b> .....	26
1.5	EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE .....	27
1.6	RESPOSTA IMUNE AO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	28
1.7	INTERFERON GAMA (IFN- $\gamma$ ) .....	32
<b>1.7.1</b>	<b>O gene <i>IFNG</i></b> .....	34
<b>1.7.2</b>	<b>Biossíntese e papel biológico do IFN-<math>\gamma</math></b> .....	36
<b>1.7.3</b>	<b>Polimorfismo do gene <i>IFNG</i></b> .....	37
1.8	OBJETIVOS .....	39
<b>1.8.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	39
<b>1.8.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	39



2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
2.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	40
2.1.1	<b>Pacientes com tuberculose</b> .....	40
2.1.2	<b>Grupo controle</b> .....	41
2.1.3	<b>Aspectos Éticos da Pesquisa</b> .....	41
2.2	MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR .....	41
2.2.1	<b>Extração do DNA</b> .....	41
2.2.2	<b>Determinação do polimorfismo do IFN-<math>\gamma</math></b> .....	43
2.2.3	<b>Interpretação dos resultados para tipificação dos alelos do <i>IFNG</i></b> .....	44
2.2.4	<b>Eletroforese</b> .....	44
2.3	QUANTIFICAÇÃO DO INTERFERON GAMA (IFN- $\gamma$ ) .....	45
2.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS .....	45
3	<b>RESULTADOS</b> .....	47
3.1	GENOTIPAGEM PARA O POLIMOFISMO <i>IFNG</i> (+874T/A) .....	47
3.1.1	<b>Freqüências alélicas do gene <i>IFNG</i> (+874T/A)</b> .....	47
3.1.2	<b>Freqüências genótípicas do gene <i>IFNG</i> (+874T/A)</b> .....	50
3.2	CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE IFN- $\gamma$ .....	53
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	59
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	67
6	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69
	<b>ANEXOS</b> .....	87

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visualização do <i>M. tuberculosis</i> após coloração de Ziehl-Nielsen .....	21
Figura 2 - Colônias de <i>M. tuberculosis</i> isoladas em meio de cultura Lowenstein-Jensen .....	23
Figura 3 - Resposta imunológica positiva do teste PPD .....	24
Figura 4 – Esquema representativo da resposta imunológica ao <i>M. tuberculosis</i> .....	32
Figura 5 - Estrutura tridimensional do IFN- $\gamma$ .....	33
Figura 6- Estrutura do gene <i>IFNG</i> .....	34
Figura 7 - Eeetroforese do produto amplificado da região intrônica +874T/A do gene <i>IFNG</i> .....	47
Figura 8 - Concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$ de pacientes com tuberculose comparadas com grupo controle.....	54
Figura 9 - Comparação das concentrações de IFN- $\gamma$ plasmático entre as formas clínicas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar .....	55
Figura 10 - Concentração plasmática de IFN- $\gamma$ nos indivíduos PPD+ e PPD- do grupo controle negativo.....	56
Figura 11 - Concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$ por genótipos, dos pacientes com tuberculose.....	57
Figura 12 - Concentrações de IFN- $\gamma$ por genótipos na população controle.....	58

## RESUMO

Considerando a importância do interferon gama (IFN- $\gamma$ ) na imunidade protetora contra o *Mycobacterium tuberculosis* e o papel funcional do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) *IFNG* +874T/A na produção de IFN- $\gamma$ , no presente estudo investigamos a relação desse polimorfismo genético com suscetibilidade à tuberculose. Fizeram parte do estudo um total de 129 pacientes com tuberculose pulmonar (TBP), 33 com tuberculose extrapulmonar (TBEP) e em 156 profissionais da saúde, negativos para tuberculose, com resultados tuberculínicos (PPD+ e PPD-) dos quais foi coletada uma amostra de 5 mL de sangue total. As concentrações séricas de IFN- $\gamma$  foram mensuradas usando um ensaio imunoenzimático. O polimorfismo na posição +874A no gene IFN- $\gamma$  foi investigado por meio da técnica de ASO-PCR (*allele specific oligonucleotide – polymerase chain reaction*). Verificamos uma associação entre a presença do alelo +874A e do genótipo +874AA com a tuberculose ativa ( $p < 0.0001$ , CI=95%, 1.64 - 3.22), ao mesmo tempo em que o alelo +874T e genótipo +874TT estiveram em maior frequência nos indivíduos do grupo controle. A média das concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  nos pacientes com tuberculose foi significativamente menor que aquela observada no grupo controle, como também foi menor no grupo com TBEP do que no grupo com TBP, sugerindo uma relação dos baixos níveis séricos dessa citocina na tuberculose ativa, bem como na progressão para as formas mais graves da doença. Ademais, foi observada a associação dos genótipos +874TT e +874AA com altas e baixas concentrações de IFN- $\gamma$ , respectivamente, tanto nos pacientes com tuberculose quanto no grupo controle. Assim sendo, os resultados sugerem uma associação do polimorfismo do gene *IFNG* +874T/A com suscetibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis* na população estudada.

## ABSTRACT

Regarding the importance of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) in protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* and the functional role of the single nucleotide polymorphism (SNP) IFNG +874T/A in the IFN- $\gamma$  production, in the present study, it was investigated the relationship of this genetic polymorphism with susceptibility to tuberculosis. A total of 129 subjects with pulmonary TB (TBP), 33 with extrapulmonary tuberculosis (TBEP) and 156 control group were investigated. Five microliters of blood sample was collected and the plasma was used to measure IFN- $\gamma$  serum concentration by enzyme-linked immunoassay. DNA samples were extracted from leucocytes and used to investigate the polymorphism +874T/A in the IFN- $\gamma$  gene using ASO-PCR (allele specific oligonucleotide - polymerase chain reaction). It was found an association between the presence of the allele +874 A and the genotype +874 AA with the active tuberculosis ( $p < 0.0001$ , CI = 95%, 1.64 - 3.22), at the same time that, the allele + 874T and genotype +874 TT were more frequent in the control group. The average IFN- $\gamma$  plasma concentrations in patient was significantly lower than that one observed in the control group, as well it was lower in the group with TBEP than in the group with TBP, suggesting a relationship of the low serum levels of this cytokine with the active tuberculosis and the progression to more serious forms of the disease. Furthermore, we observed the association of the +874 TT and +874 AA genotypes with high and low concentrations of IFN- $\gamma$ , respectively, both in TB patients and control groups. Thus, the results suggest an association of polymorphism +874T/A with the susceptibility to *M. tuberculosis* infection in the studied population.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. A TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa, grave, de evolução crônica e que tem afligido a humanidade nos últimos milênios. Existem evidências dessa doença em fragmentos ósseos da coluna vertebral em múmias do antigo Egito, a 5.000 a.C., que apresentavam deformidades características da tuberculose (Rosemberg, 1999). A idéia de que a tuberculose esteve amplamente distribuída pelo mundo vem de cadáveres encontrados, também, com deformidades ósseas, em varias regiões da Itália, Dinamarca e países do Oriente Médio, no período Neolítico (CDC, 2000; Smith, 2003).

Nos primórdios, a tuberculose atingiu os animais antes de alcançar o homem, provavelmente, por uma variante que antecedeu o *Mycobacterium bovis*. Possivelmente os primeiros humanos se infectaram por ingestão de leite ou carne contaminado, ou por via aerógena. Aos poucos, bacilos mutantes de localização pulmonar e de melhor transmissão por via respiratória, com uma virulência atenuada, o que favorecia sua disseminação, conseguiram se firmar como parasitos da espécie humana (Melo & Afiune, 1993).

A TB, doença endêmica na antiguidade, conhecida de povos egípcios, gregos, árabes e entre os povos do oriente, permaneceu, durante o feudalismo, como uma doença sem importância, até sua explosão como a “grande peste branca” da urbanização capitalista do século XIX. A disseminação pelo mundo foi resultado do processo de colonialismo e da expansão comercial (Bates & Stead, 1993).

Apesar de ser conhecida desde os inícios dos tempos, a transmissibilidade dessa doença foi evidenciada somente em 1865 por Jean-Antoine Villemin, médico militar

francês, que infectou experimentalmente animais de laboratório, inoculando material retirado de pacientes doentes de TB (Smith, 2003).

Os trabalhos do biologista alemão Robert Koch, em 1882, vieram estabelecer definitivamente a relação etiológica entre a TB humana e o *Mycobacterium tuberculosis*, conhecido como bacilo de Koch (Bignall, 1971; CDC, 2000). Entretanto, essas descobertas não foram suficientes para o controle dos índices de mortalidade e morbidade causados por essa doença, sendo a queda desses índices somente observados após a descoberta e utilização de antibiótico-terapia com a estreptomicina (1944), o ácido para-amino-salicílico (1949) e a isoniazida (1952) (Ducati *et al.*, 2005).

A partir de 1980 a associação da TB com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), somado aos problemas sócio-econômicos mundiais e ao aparecimento de cepas do *M. tuberculosis* multi-resistentes a drogas (TBMR), representou um novo desafio em escala mundial (Melo *et al.*, 2003). Ao contrário do que se imaginou nas décadas de 1960 e 1970, de que com a conquista de uma potente quimioterapia, a doença tenderia a um efetivo controle, a TB recrudescceu em todo o mundo e continua a merecer especial atenção dos profissionais de saúde e da sociedade como um todo (Melo *et al.*, 2003). Apesar de já existirem recursos tecnológicos capazes de promover seu controle, ainda não há perspectiva de obter-se, em futuro próximo, sua erradicação, a não ser que novas vacinas ou tratamentos sejam descobertos (Rufino & Souza, 2001).

A TB pode acometer vários sistemas e órgãos, entre esses o cérebro, os ossos, os rins e os linfonodos, porém, usualmente ataca os pulmões, causando uma condição conhecida como tuberculose pulmonar. A localização pulmonar é facilitada pela presença de oxigênio o que viabiliza a multiplicação do agente causador, o *M. tuberculosis*,

responsável pela TB humana. Ademais, a ligação desse órgão com o meio externo favorece a transmissão do bacilo (Melo & Afiune, 1993).

Por ser uma doença de evolução crônica ou subaguda, a sintomatologia tende a ser insidiosa e de intensidade crescente, podendo apresentar períodos de remissão e relativo bem-estar. A sintomatologia da TB está caracterizada por sintomas respiratórios como: (i) tosse, devido ao estímulo causado pelo processo inflamatório alveolar ou pelo comprometimento granulomatoso das vias aéreas; (ii) hemoptise, acontecendo em função da extensão do processo patológico, com comprometimento dos vasos alveolares; (iii) dispnéia, que aparece nas lesões avançadas e (iv) dor torácica e rouquidão. Além de outros sintomas gerais como: febre, sudorese e perda ponderal (Bates, 1980).

Entre as ações básicas de prevenção e controle da TB, duas são primárias: a vacinação BCG (Bacilo Calmette-Guerin) e a busca ativa de casos com diagnóstico precoce, ambas com objetivo de evitar o aparecimento de novas infecções. Uma terceira medida é a quimioprofilaxia realizada em crianças de zero a quatro anos comunicantes de casos bacilíferos, com resultado reator forte ou fraco à prova da tuberculina e não vacinadas com BCG (BRASIL/FUNASA, 2002).

## 1.2 ETIOLOGIA E TRANSMISSÃO

O agente etiológico da TB humana pertence à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*. É um dos componentes do complexo *M. tuberculosis*, juntamente com *M. bovis*, *M. bovis* (BCG), *M. microti*, *M. africanum* e *M. canetti* (Dunlap *et al.*, 2000; Ducati *et al.*, 2005).

O bacilo foi descoberto em 1882 por Robert Koch, que o isolou ao conseguir o seu cultivo e reproduzir a doença em animais de laboratório (Collins *et al.*, 1997).

O *M. tuberculosis* é um bacilo delgado, ligeiramente encurvado de 1,0 a 4,0 µm de comprimento e 0,3 a 0,6 µm de diâmetro, que não forma esporos e não produz toxinas. É uma espécie aeróbica estrita, cujo reservatório é o ser humano, necessitando de oxigênio para crescer e se multiplicar (Andersen, 1991). Por ser capaz de sobreviver no interior de células fagocitárias, é considerado um parasito intracelular facultativo, de crescimento lento, o qual se divide a cada 16 ou 20 horas, dependendo da oferta de oxigênio, o que é bastante lento quando comparado a outras bactérias cuja divisão se dá em minutos (Flynn & Chan, 2001). Esse crescimento lento do bacilo condiciona um curso lento e uma evolução crônica para a doença (Bates, 1980). O bacilo pode resistir a desinfetantes fracos e sobreviver em meio seco durante semanas, porém, só consegue se desenvolver no organismo de um hospedeiro (Melo & Afiune, 1993).

O bacilo da tuberculose possui uma parede celular que apresenta uma estrutura extremamente singular composta por peptídeoglicano, ácidos micólicos, arabinogalactano, proteínas e lipídeos livres que não estão ligados covalentemente a este esqueleto basal (complexo arabinogalactano-peptídeoglicano). Os lipídeos livres representam epítomos passíveis de serem reconhecidos pelo hospedeiro. Entre os lipídeos que constituem a parede celular da micobactéria destacam-se: (i) ácidos micólicos, moléculas hidrofóbicas localizadas ao redor do bacilo formando uma capa lipídica que o protege da ação de lisozimas, dos radicais livres de oxigênio e da lise osmótica via complemento; (ii) fator corda (6,6' dimicolato de trealose) responsável pelo crescimento em serpentina, por inibir a migração de polimorfonucleares (PMN) (Smith, 2003; Ducati *et al.*, 2005); (iii) lipoarabinomanana (LAM), complexo glicolipídico que contém repetidas subunidades dissacarídicas arabinose-manose, constituindo um dos maiores componentes da parede celular das micobactérias. Evidências sugerem que o LAM possui um importante papel



imunomodulador da resposta do hospedeiro, protegendo a micobactéria dos mecanismos letais como o “burts” respiratório dos macrófagos. Experimentos com camundongos demonstram que o LAM reduz a produção de IFN- $\gamma$ , bloqueando a expressão de genes que codificam esta citocina (Smith, 2003).

O alto teor lipídico presente na parede celular das micobactérias, cerca de 60%, confere a estes microrganismos características como a formação de película em meios líquidos, resistência à descoloração por álcool-ácido e a diversos agentes químicos e antibióticos (Ducati *et al.*, 2005).

Entre as diversas proteínas da micobactéria, as mais estudadas são aquelas envolvidas com a patogenia da doença e as que são reconhecidas por anticorpos de pacientes com tuberculose, entre elas destacam-se: DnaK, GroEs, proteína ligada ao fosfato, complexo antigênico 85, proteínas MPT 51 e MPT 64, superóxido dismutase, lipoproteína, alfa cristalina e ESAT-6/CFP10 (Andersen, 1991; Smith, 2003).

A infecção pelo *M. tuberculosis* ocorre através de gotículas de aerossóis, provenientes de pacientes com doença em atividade, contendo microrganismos viáveis, que são inalados por pessoa susceptível à infecção (Melo & Afiune, 1993).

### 1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA TUBERCULOSE

O *M. tuberculosis* entra no organismo humano pela rota respiratória e se estende do local de infecção inicial no pulmão, através da circulação linfática ou sangüínea, para outras partes do corpo, sendo o ápice do pulmão e os nódulos linfáticos, as regiões mais favorecidas. A fagocitose dessa bactéria por macrófagos alveolares é o primeiro evento na relação entre o patógeno e o hospedeiro que decidirá o resultado da infecção (Raja, 2004).

A localização pulmonar é a forma mais comum da doença e as formas extrapulmonares da tuberculose desenvolvem-se em órgãos com maior suprimento sanguíneo e, portanto, de oxigênio (Hernandez-Pando *et al.*, 1996; CDC, 2008). As formas extrapulmonares são resultado da disseminação do *M. tuberculosis* pelo organismo através de quatro vias possíveis: (i) via linfohematogênica, responsável pela maioria das formas extrapulmonares da doença, uma vez que é o caminho natural do bacilo após sua entrada no organismo: tuberculose ganglionar, renal, adrenal, óssea, meningoencefálica, genital feminina; (ii) via hematogênica, quando há ruptura da lesão diretamente no vaso, podendo ocasionar formas disseminadas agudas da doença; (iii) por contigüidade, responsável pelas formas pleural, a partir do pulmão; pericárdica, a partir de gânglios mediastinais; peritoneal, a partir de gânglios mesentéricos, alças intestinais ou trompas (por ruptura de pequenos divertículos) e algumas formas de tuberculose cutânea; (iv) intra-canalicular, comprometimento de diferentes locais do pulmão, através da árvore brônquica; trato urinário inferior e sistema genital masculino, a partir do rim; endométrio e peritônio (Hernandez-Pando *et al.*, 1996; Flynn, 2001).

### **1.3.1 Período de Infecção**

O organismo, após receber pela primeira vez (primo-infecção) uma carga infecciosa de *M. tuberculosis*, que se instala nos alvéolos pulmonares, após vencer as defesas da árvore respiratória, apresentará uma reação inflamatória e exudativa do tipo inespecífica. Em 15 dias, aproximadamente, os bacilos podem multiplicar-se livremente, uma vez que a imunidade adquirida inexistente. Nesse período, os bacilos podem alcançar número superior a 10<sup>5</sup> e, partindo da lesão pulmonar, atingir a via linfo-hematogênica,

comprometendo os linfonodos e os órgãos dos diversos sistemas e aparelhos, principalmente o fígado, o baço, a medula óssea, os rins e o sistema nervoso (Dannenberg, 1989). Essa disseminação é considerada "benigna", e com poucos bacilos, que ficarão latentes ou serão destruídos pela ação da imunidade que se instalará (Bates, 1980).

No início da segunda ou terceira semana, o organismo é capaz de mobilizar seu sistema imunológico específico visando a destruição ou inativação do bacilo. Passa a haver, então, no pulmão, no local da inoculação inicial, um foco pequeno de reação inflamatória. Esse foco é circundado por afluxo celular de linfócitos, células epitelióides (macrófagos ativados e modificados) e macrófagos (foco primário), localizado principalmente no terço médio, compreendendo a parte inferior do lobo superior, lobo médio e, particularmente, o ápice do lobo inferior do pulmão (Dannenberg & Rook, 1994). Normalmente, esse nódulo é único, mas há relatos da existência de múltiplos focos primários e de focos de maiores dimensões. A associação do foco primário aos gânglios satélites da sua região dá-se o nome de Complexo Primário de Ranke. O foco pulmonar regressivo, que pode ser visto nas radiografias, chama-se foco de Gohn (Dannenberg & Rook, 1994). Cerca de 90% da população infectada consegue bloquear o avanço do processo, a partir da formação do complexo primário de Ranke, permanecendo apenas como infectados (Manabe & Bishai, 2000).

### **1.3.2 A tuberculose primária**

Ocorre durante uma primo-infecção, podendo evoluir tanto a partir do foco pulmonar, quanto do foco ganglionar ou, então, em consequência da disseminação

hematogênica. Isso acontece em 5% dos primo-infectados, que ainda não desenvolveram resposta imunológica satisfatória contra o bacilo da tuberculose (Lima, 1993).

### **1.3.3 A tuberculose pós-primária**

Acontece no organismo que tem sua imunidade desenvolvida, tanto pela infecção natural quanto pela imunização com a vacina BCG. Dos primo-infectados, 5% adoecerão tardiamente, em consequência do recrudescimento de algum foco já existente no seu organismo (reativação endógena). Também pode ocorrer a reinfecção exógena, ou seja, o paciente adoecer por receber nova carga bacilar do exterior. Essa manifestação clínica da tuberculose é caracterizada por desenvolver lesões cavitárias com rápido crescimento das populações bacilíferas (Bates, 1980).

### **1.3.4 Remissão**

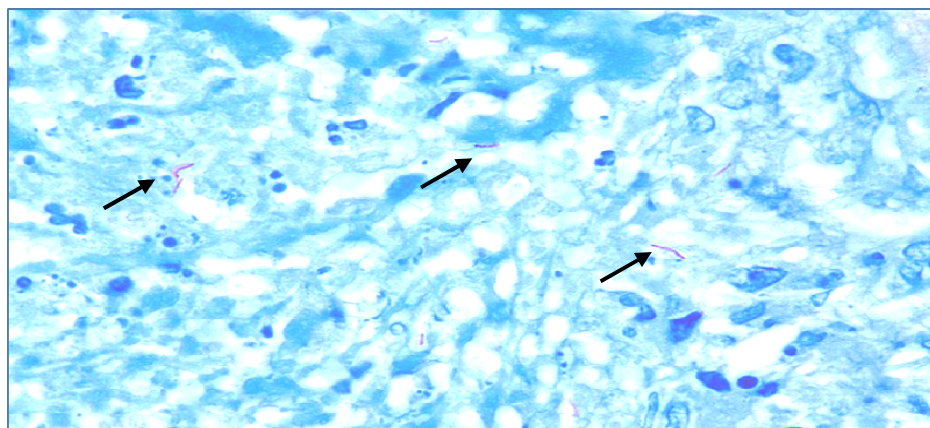
Apesar de ocorrer cura espontânea, em alguns casos, a remissão dos sintomas e a respectiva cura do paciente só ocorrem após o tratamento quimioterápico apropriado, que tem por fundamentos as bases bacteriológicas e farmacológicas, os estudos experimentais e os ensaios terapêuticos (Hijjar, 1994).

## **1.4 DIAGNÓSTICOS DA TUBERCULOSE**

A descoberta do agente etiológico da TB por Robert Koch definiu a base fundamental para o diagnóstico da doença, a identificação do bacilo, que permanece como a prova mais específica para o estabelecimento deste diagnóstico (Afiune & Ide Neto, 1993).

#### 1.4.1 Métodos de detecção e identificação do *M. tuberculosis*

Através da coloração de Ziehl-Neelsen é possível realizar pela microscopia a pesquisa direta de bacilos-álcool-ácido-resistentes (BAAR). É uma ferramenta importante na detecção de indivíduos bacilíferos, principalmente nas regiões de alta endemicidade da doença, por ser uma metodologia simples, rápida, de baixo custo que permite estimar o número de bacilos presentes em uma amostra clínica (Perkins, 2000) (Figura 1). Uma das limitações principais da baciloscopia é sua baixa sensibilidade. Somente 50 a 70% de pacientes com TB são baciloscopia do escarro positiva. Essa limitação se dá por diversos fatores, como o número de bacilos presentes nos espécimes clínicos, onde são necessários de 5.000 a 10.000 bacilos/mL de escarro para obter-se um resultado positivo na baciloscopia; a habilidade e experiência do microscopista; a forma de tratamento dado à amostra e o preparo da lâmina (Perkins, 2000; Ganguly, 2002; II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004; WHO/TDR/FIND, 2006)



**Figura 1** – Fotografia mostrando o *M. tuberculosis* (seta). Visualização após coloração de Ziehl-Nielsen (Fonte: Laboratório de Patologia Clínica HUIBB/2008).

O isolamento do bacilo da tuberculose pela cultura, a partir de espécimes clínicos do paciente, permanece até hoje como diagnóstico definitivo da doença (“gold-standar”). A cultura pode ser realizada em meios sólidos como Lowenstein-Jensen e o Middlebrook 7H10 e 7H11, ou em meios líquidos como Kirchner e o caldo Middle Brook 7H9 (Figura 2), que apresentam sensibilidade superior à baciloscopia (80-96%) detectando menos de 10 bacilos/mL de espécime clínico, e por testes bioquímicos, permite diferenciar *M. tuberculosis* de outras micobactérias. A suscetibilidade às drogas terapêuticas é também avaliada por meio do cultivo do bacilo em meios de cultura (Dunlap *et al.*, 2000; Perkins, 2000; Ganguly, 2002).

A cultura é um método de grande auxílio no diagnóstico em suspeitos de TB pulmonar com resultado negativo da baciloscopia, bem como em casos de tuberculose extrapulmonar (Dunlap *et al.*, 2002; BRASIL/FUNASA, 2002). Entretanto, o custo é muito alto, principalmente para os países mais acometidos pela tuberculose (Perkins, 2000). Técnicas de cultura tradicionais em meios sólidos são mais sensíveis que a baciloscopia de secreções, mas requerem até dois meses para demonstrar a presença do bacilo (Furin & Johnson, 2005).



**Figura 2** - Colônias de *M. tuberculosis* isoladas em meio de cultura Lowenstein-Jensen (Fonte:<http://www.wikipedia.org/wiki/Tuberculose>).

#### 1.4.2 Métodos Imunológicos

A prova tuberculina foi o primeiro teste de imunodiagnóstico empregado no homem e foi desenvolvido por Koch. Baseia-se na reação de hipersensibilidade do tipo tardia desenvolvida após a inoculação intradérmica de um derivado protéico purificado de *M. tuberculosis*, sendo mais utilizado o PPD (Purified Protein Derivative). No Brasil o antígeno usado é o PPD RT23, aplicada por via intradérmica, no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, na dose de 0,1ml, equivalente a 2UT (unidades de tuberculina). A técnica de aplicação empregada é a de Mantoux, e os materiais utilizados são padronizados pela Organização Mundial da Saúde e têm especificações semelhantes às usadas para a vacinação BCG. A injeção do líquido faz aparecer uma pequena área de limites precisos, pálida e de aspecto pontilhado, como casca de laranja. A leitura da prova tuberculínica é realizada de 72 a 96 horas após a aplicação, medindo-se com régua

milimetrada o maior diâmetro transverso da área de endurecimento palpável (II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004), (Figura 3).



**Figura 3** - Resposta imunológica positiva da prova tuberculínica PPD. (Fonte: [www.nlm.nih.gov/ency/fullsize](http://www.nlm.nih.gov/ency/fullsize))

O resultado, registrado em milímetros, define a classificação e a interpretação clínica:

- **0 a 4mm – não-reator:** indivíduo não infectado pelo *M. tuberculosis* ou por outra micobactéria; ou infectado pelo *M. tuberculosis* há menos de duas semanas (em fase de viragem tuberculínica) ou, ainda e excepcionalmente, em infectados ou doentes imunodeprimidos;
- **5 a 9mm – reator fraco:** indivíduo vacinado com BCG ou infectado pelo *M. tuberculosis* ou por outras micobactérias;



- **10mm ou mais – reator forte:** indivíduo infectado pelo *M. tuberculosis*, que pode estar doente ou não, e indivíduos recentemente vacinados com BCG.

### 1.4.3 Métodos de imagem

A evolução da tuberculose é acompanhada de anormalidades radiográficas na maioria dos casos. Por isso, a radiografia do tórax é importante auxiliar no diagnóstico, justificando-se sua utilização, quando possível, nos casos suspeitos. É sempre importante realizar o exame radiológico para um diagnóstico correto. Este exame permite a identificação de pessoas portadoras de imagens sugestivas de tuberculose devendo ser consideradas duas situações distintas: a tuberculose primária e a tuberculose secundária – que se manifestam clínica e radiologicamente de forma distinta. O exame radiológico, em pacientes com baciloscopia positiva, tem como função principal a exclusão de outra doença pulmonar associada, que necessite de tratamento concomitante, além de permitir avaliação da evolução radiológica dos pacientes, sobretudo daqueles que não responderam à quimioterapia (II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004).

A Tomografia computadorizada do tórax é útil, em alguns casos em que a radiografia do tórax apresenta resultados imprecisos, por alterações parenquimatosas mínimas ou por não permitir distinguir lesões antigas das lesões da tuberculose ativa. No entanto, é um método de maior custo e menor oferta, restrito aos centros de referência. Deve ser usado de forma individualizada, levando em consideração os recursos disponíveis e o custo-benefício, especialmente nos casos com baciloscopia negativa que exigem melhor diagnóstico diferencial com outras doenças (BRASIL/FUNASA, 2005; II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004).

A broncoscopia e os procedimentos a ela associados, a exemplo de lavado brônquico, lavado broncoalveolar, escovado brônquico, biópsia brônquica, biópsia transbrônquica e punção aspirativa com agulha podem ser úteis no diagnóstico da tuberculose nas seguintes situações: formas negativas à baciloscopia, suspeita de outra doença pulmonar que não a tuberculose, presença de doença que acomete difusamente o parênquima pulmonar, suspeita de tuberculose endobrônquica ou em pacientes imunodeprimidos, particularmente os infectados pelo HIV (II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004).

#### **1.4.4 Outros exames**

Sempre que possível, deve-se realizar a biópsia nas formas extrapulmonares. No material colhido será feito o exame direto, a cultura e o exame anátomo-patológico, para identificar o *M. tuberculosis* ou o processo inflamatório granulomatoso compatível com a tuberculose (BRASIL/FUNASA, 2005).

Alguns exames bioquímicos como a adenosina-deaminase (ADA) e o interferon gama são mais utilizados em casos de tuberculose extrapulmonar, principalmente no derrame pleural, derrame pericárdico e meningoencefalite tuberculosa (Kataria & Khurshid, 2001).

Os métodos sorológicos e de biologia molecular são estratégias de diagnóstico recente, de custo elevado e valores preditivos variáveis, sendo muitos ainda não definitivamente testados ou aprovados. Apesar das perspectivas futuras quanto à sua utilidade no diagnóstico precoce, não são recomendados para a rotina diagnóstica de tuberculose no Brasil, ficando seu uso restrito a alguns centros de referência e pesquisa

onde podem ser utilizados para casos que demandem diagnóstico rápido (II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004).

## 1.5 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

Nos últimos anos o número de casos de tuberculose recrudesciu em todo mundo, sendo uma das razões o advento da pandemia de AIDS, a alta correlação entre a doença e pobreza e, mais recentemente, o aparecimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas (TBMR) (WHO, 1998). Este último fator é preocupante, pois existem poucas drogas efetivas contra o *M. tuberculosis*, o que tornaria a doença sem tratamento (BRASIL/FUNASA, 2002; CDC, 2008).

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a situação da tuberculose como uma emergência mundial devido ao recrudescimento da doença nos países desenvolvidos, onde se previa que estivesse sob controle, e à expansão nos continentes asiáticos e americanos (WHO, 1998), sendo ainda hoje a maior causa de morte por doença infecciosa em adultos. Segundo estimativas da OMS, dois bilhões de pessoas, correspondendo a um terço da população mundial, está infectada pelo *M. tuberculosis*. Destes, oito milhões desenvolverão a doença e dois milhões morrerão a cada ano (WHO, 2007).

O Brasil ocupa o 16º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo (WHO, 2007). Estima-se uma prevalência de 50 milhões de infectados com cerca de 111.000 casos novos e 6.000 óbitos ocorrendo anualmente (BRASIL/FUNASA, 2007). Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/MS), são notificados, anualmente, 85 mil casos novos no Brasil. São

verificados cerca de seis mil óbitos por ano em decorrência da doença (MS/ FUNASA, 2007).

O Estado do Pará registra, em média, 3.000 novos casos de tuberculose por ano. A maioria encontra-se nos municípios de Altamira, de Ananindeua, de Belém, de Breves, de Itaituba, de Marabá, de Marituba, de Paragominas, de Redenção, de Santarém e de Tucuruí, que estão inseridos na lista de 315 municípios priorizados para o controle da tuberculose pelo Ministério da Saúde. Com uma incidência média de 47 ocorrências para cada 100 mil habitantes, o Pará é considerado como área endêmica (SESPA/ 2007).

A atividade prioritária do controle da tuberculose é o tratamento dos bacilíferos, o que anula rapidamente as maiores fontes de infecção, pois em poucos dias com a quimioterapia correta os bacilos da tuberculose perdem seu poder infectante, não sendo necessário, portanto, segregar os doentes do convívio comunitário e familiar (BRASIL/FUNASA, 2002). O Plano Nacional de Controle da Tuberculose tem como meta diagnosticar pelo menos 92% dos casos esperados, e tratar com sucesso no mínimo 85% deles. No Brasil, o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) e o Sistema de Informação em Mortalidade (SIM) são os sistemas oficiais de informação das doenças de notificação compulsória, inclusive da tuberculose e de óbitos, respectivamente (BRASIL/FUNASA, 2002).

#### 1.6 RESPOSTA IMUNE AO *Mycobacterium tuberculosis*

A habilidade do *M. tuberculosis* para manter uma infecção crônica e causar doença em um grupo pequeno de pessoas infectadas depende de seus produtos (fatores de virulência) que capacitam o microrganismo a entrar e a sobreviver indefinidamente dentro de fagócitos mononucleares ao evadir-se dos mecanismos intracelulares microbianos (Raja,

2004). O *M. tuberculosis* entra nos macrófagos alveolares pela endocitose mediada por vários receptores do macrófago: os receptores da manose ligam-se à lipoarabinomannan (LAM), um glicolípido da parede celular bacteriana, e receptores do complemento ligam-se à bactéria opsonizada (Pieters & Garfield, 2002). Uma vez dentro do macrófago o *M. tuberculosis* replica-se dentro do fagossomo bloqueando fusão do fagossomo com o lisossomo, por meio de vários mecanismos, incluindo a inibição dos sinais de cálcio e o bloqueio do recrutamento e reunião das proteínas que medeiam a formação do fagolisossoma (Glickman & Jacobs, 2003).

Na resposta imune inata, a fagocitose e a secreção subsequente de IL-12 são processos iniciados na ausência de exposição anterior para o antígeno e, conseqüentemente, formam componentes dessa imunidade. Outros componentes são a proteína natural de resistência associada ao macrófago (Nrampl), os neutrófilos, as células *natural killer* (NK) e etc. Foi demonstrado que lisozimas e outras enzimas plasmáticas podem desempenhar um papel importante na primeira linha de defesa contra o *M. tuberculosis* (Selvaraj, *et al.*, 2001).

A resposta imune contra o *M. tuberculosis*, além de ser complexa, depende de uma resposta mediada por células, cuja interação de linfócitos e monócitos culmina com a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios. Muitos componentes da resposta imune parecem ser necessários ou importantes na resposta protetora. Estes incluem linfócitos T CD4+ e T CD8+, citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e ativação de macrófagos (Stenger & Modlin, 1999).

Aproximadamente três semanas após a infecção, uma resposta Th1 é montada contra o *M. tuberculosis* ativando os macrófagos a tornarem-se bactericidas (Young *et al.*, 2002). O macrófago é a chave para o controle da infecção pelo *M.*

*tuberculosis*, esse bacilo pode se multiplicar e ficar latente dentro desse fagócito, mas pode ser inibido ou morto quando o macrófago for ativado (Henderson *et al.*, 1997).

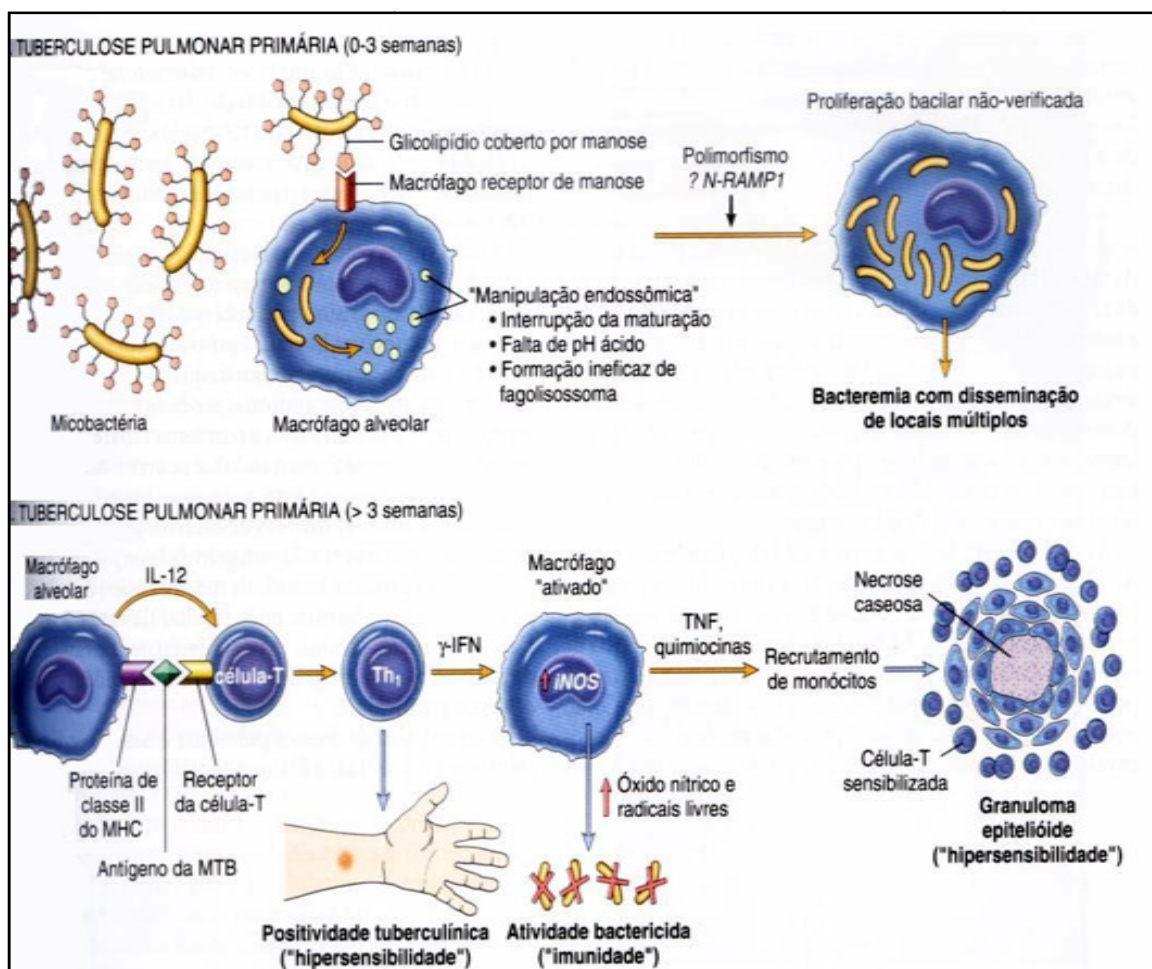
As células Th1 são estimuladas por antígenos microbianos drenados dos linfonodos, que são apresentados por meio de proteínas de classe II do MHC pelas células apresentadoras de antígenos (APC). A diferenciação das células Th1 depende da presença da IL-12, que é produzida pelas APC que encontraram as micobactérias. As células Th1 maduras, nos linfonodos e nos pulmões, produzem IFN- $\gamma$ , que é o mediador crítico que direciona os macrófagos para tornarem-se competentes no combate à infecção (Pieters & Garfield, 2002). O IFN- $\gamma$  ativa os macrófagos, estimulando a formação do fagolisossoma nas células infectadas, expondo a bactéria a um ambiente ácido. Essa citocina também estimula a expressão da síntese do óxido nítrico induzível (iNOS), que produz o óxido nítrico (NO). O NO gera mediadores do nitrogênio reativo e outros radicais livres capazes de destruição oxidativa de vários constituintes micobacterianos, da parede celular ao DNA (Pieters & Garfield, 2002).

Antes de estimular os macrófagos a destruírem as micobactérias, a resposta Th1 organiza a formação do granuloma e da necrose caseosa. Os macrófagos ativados, estimulados pelo IFN- $\gamma$ , produzem o TNF- $\alpha$ , que recruta os monócitos. Esses se diferenciam em “histiócitos epitelióides” que caracterizam a resposta granulomatosa (Pieters & Garfield, 2002) (Figura 4). Em alguns indivíduos essa resposta contém as bactérias e não causa destruição tecidual significativa, em outros, a infecção avança devido à idade ou imunossupressão, e a resposta imune continuada resulta em destruição do tecido devido a caseificação e cavitação (Glickman, 2003). O TNF- $\alpha$  tem importância enfatizada nessa destruição tecidual e na tuberculose, essa citocina tem papel importante tanto na resposta imune quanto na patológica (Flynn & Chan, 2001). Em camundongos deficientes

de TNF- $\alpha$  ou do receptor de TNF, a infecção por *M. tuberculosis* resultou em morte rápida desses animais, com carga bacteriana substancialmente mais alta quando comparado a camundongos controles (Flynn *et al.*, 1995).

O *M. tuberculosis* possui numerosas estratégias de evasão do sistema imune, inclusive modulação da apresentação de antígeno para evitar eliminação por células T (Andersen *et al.*, 1991). Proteínas secretadas por esse bacilo, como superoxide dismutase e catalase são antagonistas para intermediários reativos de oxigênio-ROI (Andersen *et al.*, 1991). Componentes micobacterianos como sulfatos, LAM e glicolipídeos fenólico I (PGLI) são potentes inibidores de radicais do oxigênio (Chan *et al.*, 1989). Macrófagos infectados com *M. tuberculosis* parecem ter diminuída sua habilidade de apresentar antígenos para linfócitos T CD4+, o que favorece a infecção persistente (Chan *et al.*, 1991).

Outro mecanismo pelo qual células apresentadoras de antígenos contribuem para a proliferação e a função defeituosa de células T é pela produção de citocinas antiinflamatórias, inclusive TGF- $\beta$ , IL-10 ou IL-6 (Rojas *et al.*, 1999). Além disso, foi também reportado que micobactérias virulentas podem evitar a fusão do fagolisossoma, o que favoreceria a multiplicação bacilar (Moreira *et al.*, 1997).



**Figura 4** – Esquema representativo da resposta imunológica ao *M. tuberculosis* (Adaptado de Robins & Cotran, 2002).

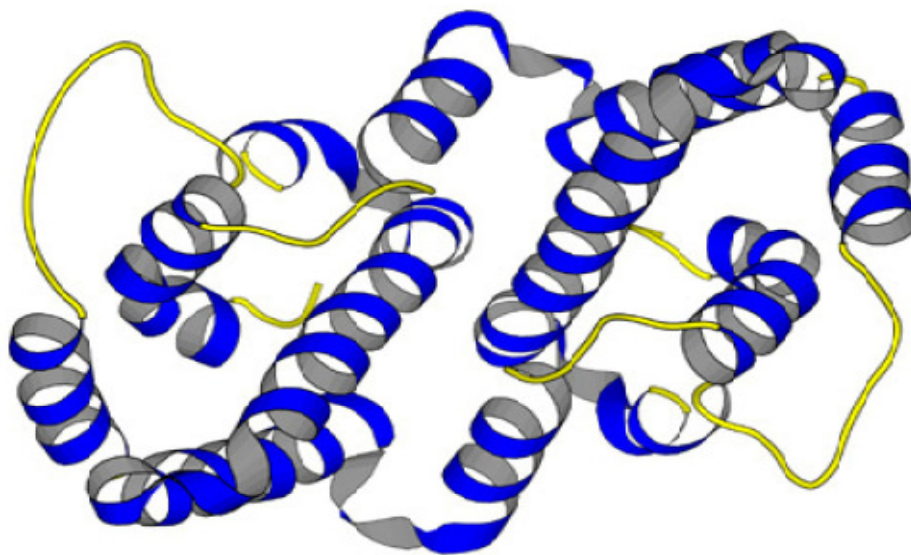
### 1.7 INTERFERON GAMA (IFN- $\gamma$ )

Wheelock relatou, em 1965, que a fito-hemaglutinina poderia induzir, a partir de leucócitos, a síntese de um inibidor viral semelhante ao interferon- $\alpha$ , e essa substância foi denominada interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que é uma citocina pró-inflamatória e imunorreguladora que atua virtualmente sobre todos os componentes da resposta imune. Seu campo de ação inclui a estimulação ou a inibição das funções celulares constitutivas, a indução de novas funções efetoras, propriedades proliferativa e anti-proliferativa, e



alterações em produtos celulares secretados e associados às membranas (Figura 5). O efeito regulador é dependente da dose, do tempo de exposição e da presença ou ausência de outros mediadores inflamatórios (Williams *et al.*, 1993).

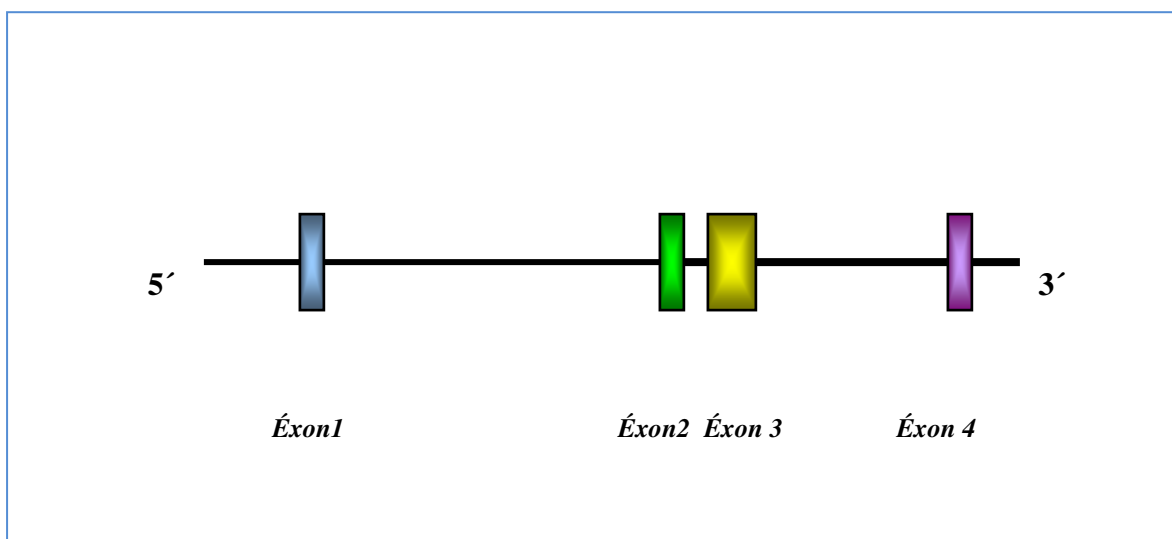
O IFN- $\gamma$ , um tipo de citocina Th1, cujo papel protetor na tuberculose está bem estabelecido, principalmente no contexto antígeno-específico na imunidade mediada por célula T é importante na resposta imune protetora inicial contra a infecção por *M. tuberculosis* (Flynn *et al.*, 1993). Indivíduos que tem defeitos nos genes de IFN- $\gamma$  ou do seu receptor têm se mostrado como sendo propensos às infecções micobacterianas, incluindo *M. tuberculosis* (Ottenhof *et al.*, 1998). Alguns estudos têm documentado um aumento na produção de IFN- $\gamma$  após um tratamento anti-tuberculose (Ellner *et al.*, 2000).



**Figura 5** - Estrutura tridimensional do IFN- $\gamma$  (Fonte: [http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2004/warwick\\_robinson/interdim.jpg](http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2004/warwick_robinson/interdim.jpg)).

### 1.7.1 O gene *IFNG*

O gene *IFNG* (Figura 6), está localizado no cromossomo 12 humano na região 12q24.1 em cópia única (Trent *et al.*, 1982). A estrutura do gene *IFNG* é altamente conservada, sendo constituída por quatro éxons e três íntrons (Gray & Goedel, 1982). Essa estrutura foi observada em todas as espécies analisadas, e a análise da seqüência de DNA tem mostrado maior identidade na região promotora do DNA do que na região codificadora da proteína. O DNAc e/ou o DNA genômico foi clonado de muitas espécies, inclusive a humana (Derynck *et al.*, 1982; Devos *et al.*, 1982). A proteína humana é constituída por 166 aminoácidos, dos quais 23 representam uma seqüência sinal hidrofóbicas (Rinderknecht *et al.*, 1984).



**Figura 6-** Estrutura do gene *IFNG* (adaptado de <http://www.atlasgeneticsoncology.org>).

A regulação da expressão do gene *IFNG* parece ser complexa e a análise da estrutura genômica revela elementos no promotor do gene e nos íntrons que podem atuar na regulação gênica (Ciccarone *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1991; Ye *et al.*, 1994). Esses

elementos podem ser: (i) induzidos por substâncias como fito-hemaglutinina/acetato miristato forbol (PHA/PMA), PMA/ionomicina, concavalina A, proteína tax do HTLV-1 e estrogênio; ou (ii) inibidos pela ciclosporina A (Brown *et al.*, 1992; Penix *et al.*, 1993) ou glicocorticóides (Cippitelli *et al.*, 1995).

O promotor e as regiões intrônicas provavelmente interagem na sinalização extracelular, resultando na ativação da transcrição do *IFNG* entre meia a duas horas após o evento de sinalização inicial. O IFN- $\gamma$ , tanto *in vitro* quanto *in vivo* aumenta a expressão do próprio RNAm do *IFNG* em humanos (Hardy & Sawada, 1989) e murinos (Cockfield *et al.*, 1993).

A metilação é um fenômeno importante de inibição da expressão gênica. Com relação ao *IFNG*, em células nas quais o promotor está metilado, a produção de IFN- $\gamma$  não é observada, enquanto que em células nas quais o promotor está hipometilado ou não metilado, o IFN- $\gamma$  é produzido (Young *et al.*, 1994). Em células T humanas, a completa metilação do promotor do *IFNG* e do primeiro íntron foi observada em timócitos, em células T neonatais, e em linfócitos T não-estimulados, além de substancial hipometilação ter sido, também, observada em linfócitos T CD8+ e T CD4+ efetores (Melvin *et al.*, 1995). A estabilidade do RNAm do *IFNG* pode ser importante no controle da expressão gênica e, de fato, a sinergia observada entre IL-2 e IL-12 na indução da expressão do *IFNG* pode ser atribuída, em grande parte, a um aumento da meia vida do RNAm (Chan *et al.*, 1992). Os níveis do RNAm do *IFNG* geralmente atingem o pico com 4 a 8 horas após indução e, posteriormente, decrescem rapidamente (Shaw & Kamen, 1986). Embora o controle da expressão do *IFNG* ocorra em muitos níveis, cada um deles depende da interação localizada das células produtoras com células efectoras e/ou seus produtos (Young & Hardy, 1995).

### 1.7.2 Biossíntese e papel biológico do IFN- $\gamma$

O IFN- $\gamma$  é produzido em larga escala principalmente por linfócitos T CD4+ e o principal estímulo fisiológico para a sua produção é o antígeno no contexto de moléculas MHC de classe II. Similarmente, os linfócitos T CD8+, produzem IFN- $\gamma$ , quando o antígeno está presente no contexto de moléculas MHC de classe I (Young & Hardy, 1995). Muitos outros estímulos podem induzir a síntese dessa citocina, porém a IL-12 é um dos principais indutores da produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4+ e células NK (Flynn *et al.*, 1993).

IFN- $\gamma$  também pode ser produzido por outros tipos de células, incluindo linhagens de células B (Benjamin *et al.*, 1986), macrófagos e suas linhagens celulares (DiMarzio *et al.*, 1994) e células mielomonocíticas (Ando *et al.*, 1988). O IFN- $\gamma$  tem efeito bifuncional sobre as células genitoras hematopoiética, em geral, um efeito supressivo, quando atuando isoladamente (Means *et al.*, 1994). No entanto, atuando sinergicamente com outras citocinas, incluindo a IL-3, estimula o desenvolvimento dessas células (Murohashi & Hoang, 1991).

O IFN- $\gamma$  é o principal fator de ativação de macrófagos (Schultz e Kleinschmidt, 1983), nos quais ativa numerosas funções, incluindo a citotoxicidade a tumores (Pace *et al.*, 1983) e a atividade anti-microbiana (Nathan *et al.*, 1983) incluindo potencial microbicida contra patógenos intracelulares (Torrico *et al.*, 1991), além do que, estimula a apresentação de antígenos aos linfócitos T através da indução de moléculas MHC de classe II (Basham & Merigan, 1983). Pode ter efeitos antagônicos sobre populações específicas de células T, suprimindo, eficazmente, o crescimento de células Th2, produtoras de IL-4 (Gajewski & Fitch, 1988 a, b), mas, juntamente com a IL-12, pode atuar como um fator de crescimento autócrino para células Th1 (Paul & Seder, 1994).

### 1.7.3 Polimorfismo do gene *IFNG*

O gene humano que codifica o IFN- $\gamma$  tem no primeiro íntron um STR (*Short Tandem Repeat* = Curtas Repetições em Tandem) de CA, caracterizando diferentes alelos: *IFNG\*1* com 12 repetições CA, *IFNG\*2* (13 CA), *IFNG\*3* (14 CA), *IFNG\*4* (15 CA). O polimorfismo desses microssatélites está associado com variação individual na produção de níveis de IFN- $\gamma$  (Perrey *et al.*, 1999). Indivíduos homocigotos para *IFNG\*2* apresentam produção significativamente aumentada de IFN- $\gamma$  quando comparada com indivíduos com as outras combinações alélicas (Pravica *et al.*, 1999).

Pravica *et al.* (2000) descreveram um polimorfismo bialélico (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*) T>A, na posição +874, no mesmo íntron onde se situam os microssatélites acima descritos. Neste estudo foi observada uma correlação absoluta entre o alelo *IFNG\*+874(T)* e o alelo *IFNG\*2* caracterizado por 13 repetições CA. Indivíduos +/+, +/- e -/- para o alelo *IFNG\*2*, foram seqüenciados, respectivamente, como TT, TA e AA com relação aos alelos *IFNG\*+874 (T>A)*. O polimorfismo na posição +874 coincide com o suposto sítio de ligação do fator de transcrição NF-kB, e poderia ser, em parte, responsável pela associação prévia encontrada entre o polimorfismo de microssatélite CA e a produção de IFN- $\gamma$ .

Em humanos, vários estudos têm indicado um componente genético na suscetibilidade do hospedeiro e resistência à ocorrência de TB infecção e TB ativa (Stead, 2001). Diferenças inter-individuais têm sido vistas na produção de IFN- $\gamma$  e alguns estudos mostraram uma produção deprimida de IFN- $\gamma$  na tuberculose ativa (Zhang *et al.*, 1995).

A resposta imune, protetora ou não, ao desenvolvimento da tuberculose ou mesmo ao prognóstico da doença, está ligada a uma rede de citocinas que são produzidas durante o curso da infecção. Por isso, reconhecer os mecanismos moleculares que

antecedem a produção destas citocinas e de outros mediadores inflamatórios representa um poderoso campo a ser explorado para investimentos em pesquisa de novas vacinas e tratamento medicamentoso. É nesse contexto que o presente estudo investiga a hipótese de associação de variantes polimórficas do gene da citocina IFN- $\gamma$  com diferentes formas clínicas de tuberculose em pacientes diagnosticados e atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUIBB) que é referência no tratamento de doenças infecciosas do Estado do Pará.

Estudos genéticos de doenças infecto-contagiosas são difíceis de conduzir, devido à natureza multifatorial destas doenças que incluem fatores do hospedeiro, do patógeno e as variáveis ambientais, em diferentes proporções para cada doença e para cada sujeito estudado. No entanto, uma das indicações para a realização desses estudos é a definição do papel do IFN- $\gamma$  no aparecimento das diferentes formas clínicas da tuberculose.

É particularmente difícil realizar trabalho com as formas extrapulmonares da tuberculose, devido à baixa incidência de algumas, tais como a tuberculose miliar, que é mais comumente encontrada em pacientes imunodeprimidos, população essa que foi excluída deste estudo.

## 1.8 OBJETIVOS

### 1.8.1 Geral:

Investigar a influência do polimorfismo de nucleotídeos único (SNP) na região intrônica +874A do gene *IFNG* em pacientes com diferentes formas clínicas da tuberculose.

### 1.7.2 Específicos:

- Estimar e comparar as frequências alélicas e genótípicas das variantes alélicas do gene *IFNG* (+874T/A) entre pacientes com diferentes formas clínicas da tuberculose e o grupo controle.

- Estabelecer a relação entre as diferentes formas clínicas da tuberculose com os polimorfismos na região +874A do gene da citocina IFN- $\gamma$ .

- Comparar as frequências alélicas e genótípicas do gene *IFNG* (+874T/A) entre os indivíduos PPD+ e PPD- do grupo controle.

- Correlacionar as concentrações plasmática de IFN- $\gamma$  com as frequências genótípicas do gene *IFNG* (+874T/A), encontradas nos pacientes com tuberculose.

- Avaliar a relação dos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  nas diferentes formas da tuberculose estudadas.

- Comparar as frequências dos genótipos responsáveis pelos diferentes níveis de produção de IFN- $\gamma$ , entre pacientes com diferentes formas clínicas da tuberculose e o grupo controle.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

#### **2.1.1 Pacientes com tuberculose**

O presente trabalho constitui-se em um estudo caso-controle transversal onde foi avaliado o perfil genético de um grupo composto por 162 indivíduos de ambos os sexos, residentes no Estado do Pará, atendidos no ambulatório e/ou internados no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUIBB) no período de 2006 a 2007, todos confirmados como positivos para tuberculose após exames de baciloscopia no escarro e/ou no lavado brônquico e/ou cultura específica e/ou biópsia positiva para *M. tuberculosis*. Para efeito de comparação o grupo de pacientes foi subdividido de acordo com as formas clínicas da tuberculose, tais como: tuberculose pulmonar, tuberculose pleural, tuberculose ganglionar, tuberculose miliar e tuberculose meníngea. Depois de agrupados tivemos um grupo de 129 pacientes com tuberculose pulmonar e outro grupo com 33 pacientes com tuberculose extrapulmonar. Foram excluídos deste estudo pacientes co-infectados com HIV.

As amostras de sangue foram coletadas através de um sistema de colheita a vácuo, em tubos contendo EDTA como anticoagulantes e em seguida encaminhadas ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. As amostras de plasma e de células totais foram separadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos de seus respectivos prontuários arquivados no Departamento de Arquivo Médico (DAME) do HUIBB, onde estão consolidadas as anotações relativas aos exames físicos, radiológicos, clínicos e laboratoriais.



### **2.1.2 Grupo controle**

Foram coletadas amostras de sangue de 156 indivíduos de ambos os sexos, residentes em Belém, Estado do Pará, profissionais da saúde do HUIBB, negativos para tuberculose, soronegativos para HIV-1, coletadas em um sistema de colheita a vácuo, em tubos contendo EDTA como anticoagulante e que foram utilizadas como grupo controle. As amostras de plasma e de células totais foram separadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Esses profissionais são avaliados semestralmente pelo Serviço de Saúde Ocupacional do mesmo hospital e submetidos a exames periódicos como: raios-X de tórax, baciloscopia do escarro, hemograma, VDRL, urina rotina, glicemia de jejum e prova tuberculina cutânea (PPD). Todos os participantes desse grupo possuíam cicatriz da vacina BCG.

### **2.1.3 Aspectos Éticos da Pesquisa**

Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram informados sobre os aspectos científicos da pesquisa de forma clara e simples, e ao aceitarem participar assinaram um termo de consentimento (Anexo).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, sob protocolo nº 099/07 CEP-ICS/UFPA (Anexo).

## **2.2 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR**

### **2.2.1 Extração do DNA**

O DNA foi extraído de leucócitos do sangue periférico, após centrifugação, a partir do método de Fenol-Clorofórmio.

O procedimento ocorreu de acordo com as seguintes etapas:

- **LISE DE HEMÁCIAS** (**Solução A:** Cloreto de Amônio [1.0M], EDTA [0.1M], H<sub>2</sub>O destilada; **Solução B:** Bicarbonato de Amônio [1.0M], H<sub>2</sub>O destilada).

1. Em um tubo de 2 mL adicionar 300 µL de sangue e 900 µL de solução de lise de hemácias.
2. Agitar por inversão por 20 minutos.
3. Centrifugar (14.000 rpm) por 3 minutos.
4. Descartar o sobrenadante e acrescentar 900 µL de lise de hemácias novamente.
5. Agitar por inversão por 20 minutos.
6. Centrifugar (14.000 rpm) por 3 minutos.
7. Descartar o sobrenadante.

- **LISE DE LEUCÓCITOS** (Tris-HCl [100mM], EDTA [20mM], NaCl [200mM], SDS 0,5 %, H<sub>2</sub>O destilada).

1. Acrescentar ao *pellet* 500 µL de lise de leucócitos.
2. Agitar em vortex até dissolver o *pellet*.
3. Incubar em “banho Maria” (55°C) por 30 minutos.

- **PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS** (Acetato de Amônio [7,5M], H<sub>2</sub>O destilada).

1. Acrescentar 200 µL de solução de precipitação de proteínas.
2. Agitar brevemente no vortex.
3. Levar ao banho maria (55°C) por 30 minutos.

4. Centrifugar (14.000 rpm) por 10 minutos.
5. Transferir o sobrenadante para um tubo de 2 ml limpo. (Descartar o tubo com o precipitado de proteínas).
6. Adicionar 500  $\mu$ L de fenol-clorofórmio álcool isoamílico.
7. Agitar por inversão por 10 minutos.
8. Centrifugar (14.000 rpm) por 10 minutos.
9. Transferir o sobrenadante para um tubo de 2ml limpo.
10. Acrescentar ao sobrenadante 1,5ml de isopropanol (2-propanol).
11. Visualizar o *pellet* de DNA. (Verificar conforme a quantidade de DNA formado a quantidade de H<sub>2</sub>O para hidratá-lo).
12. Centrifugar (14.000 rpm) por 10 minutos.
13. Desprezar o sobrenadante.
14. Adicionar 200  $\mu$ L de Etanol a 70% lavando a parede do tubo.
15. Desprezar o etanol e deixar secando até evaporar completamente o álcool.
16. Adicionar H<sub>2</sub>O para hidratá-lo.

### 2.2.2 Determinação do polimorfismo do IFN- $\gamma$

O polimorfismo do INF- $\gamma$  na posição +874 foi investigado por meio da técnica de ASO-PCR (*allele specific oligonucleotide – polymerase chain reaction*), a partir do DNA de pacientes diagnosticados com tuberculose pulmonar e extrapulmonar e de indivíduos saudáveis que formaram o grupo controle. As amplificações foram realizadas no equipamento termo-ciclador *Peltier Thermal Cyler Biocycler*.

A reação de amplificação foi realizada um volume final de 30  $\mu$ L, contendo 500 ng de DNA total extraído, 0,2  $\mu$ M de cada dNTP, 5 pmol/ $\mu$ L de cada iniciador, MgCl<sub>2</sub>

2,0 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 1,0 U de *Taq* DNA polimerase. Os iniciadores empregados nesta reação foram: INF- $\gamma$  (+874) PC: 5'-tca aca aag ctg ata ctc ca-3'; INF- $\gamma$  (+874) T: 5'-ttc tta caa cac aaa atc aaa tct-3' ou INF- $\gamma$  (+874) A: 5'-ttc tta caa cac aaa atc aaa tca-3', os quais amplificam um segmento de 262 pb (Pravica *et al.*, 1999).

A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 40 segundos à 94°C (desnaturação), 40 segundos à 56°C (hibridização), 50 segundos à 72°C (extensão) e uma extensão final de 5 minutos à 72°C.

A interpretação do resultado foi determinada pela presença ou ausência do produto amplificado conforme o iniciador alelo específico utilizado.

### **2.2.3 Interpretação dos resultados para tipificação dos alelos do gene *IFNG***

Para o gene *IFNG*, os produtos amplificados apresentam 262 pb, estando os SNPs localizados no íntron 1(+874T/A). Um dos pares de iniciadores (*primers*) detecta o alelo *IFNG*\*874T e o outro detecta o alelo *IFNG*\*874A.

### **2.2.4 Eletroforese**

Os produtos das amplificações foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 2,0%, em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque – TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na<sub>2</sub> 40 mM/1000 mL água deionizada), contendo 5  $\mu$ L de brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta.

### 2.3 QUANTIFICAÇÃO DO INTERFERON GAMA (IFN- $\gamma$ )

Para a detecção e quantificação do IFN- $\gamma$  nas amostras de plasma dos pacientes com tuberculose e do grupo controle, foi utilizado o kit comercial IFN- $\gamma$  EASIA (*BioSource Europe S.A./Belgium*). O princípio deste teste é baseado na detecção quantitativa de IFN- $\gamma$  plasmático, por ensaio imunoenzimático do tipo ELISA (EIE).

### 2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS

As frequências alélicas e genóticas do gene *IFNG* (+874T/A) observados nos grupos de pacientes e indivíduos foram calculadas por meio de contagem direta. O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg e a comparação das frequências dos alelos no gene de IFN- $\gamma$  nos grupos amostrais de pacientes positivos para tuberculose e grupo controle saudável foram efetuados por meio do programa *Tools For Population Genetic Analyses* – TFPGA 1.3v (Miller, 1997).

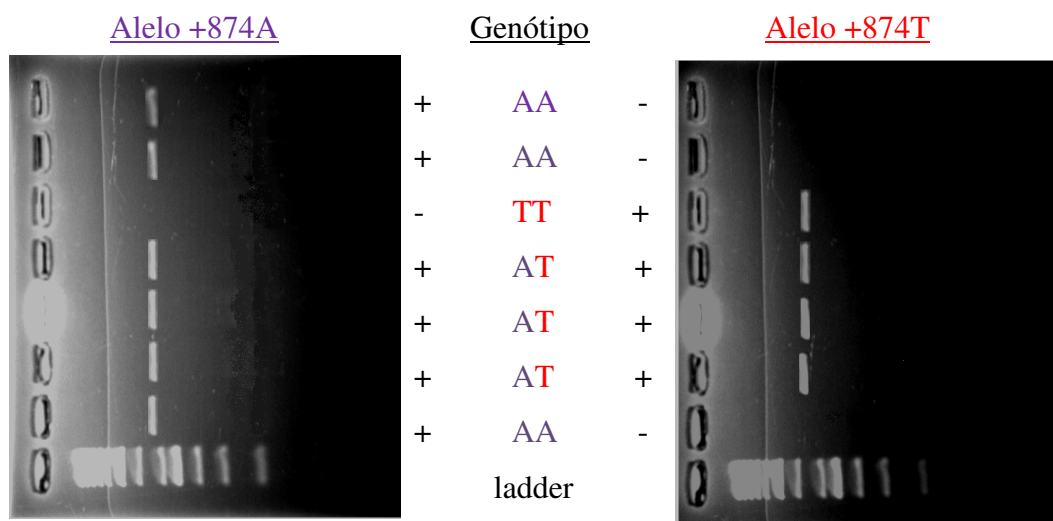
A avaliação das associações entre a prevalência das mutações no gene *IFNG*, as formas clínicas da doença e o grupo controle foi efetuada pelo teste de  $\chi^2$  e o risco relativo (*Odds Ratio*) para a suscetibilidade ou curso clínico da doença foi calculado utilizando-se o programa BIOSTAT 5,0 (Ayres, *et al.*, 2007).

Para correlacionar as concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  entre as formas clínicas da tuberculose com o grupo controle e os genótipos do IFN- $\gamma$  +874T/A, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney, programa BIOSTAT 5,0 (Ayres, *et al.*, 2007). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0.05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 GENOTIPAGEM PARA O POLIMORFISMO DO GENE *IFNG* (+874T/A)

Amostras de 162 pacientes com diferentes formas clínicas da tuberculose e de 156 controles negativos, foram genotipadas para o polimorfismo do gene *IFNG* (+874T/A) (Figura 7).



**Figura 7** – Fotografia da eletroforese do produto amplificado por ASO-PCR de 262pb da região intrônica +874T/A do gene *IFNG* (Fonte: Laboratório de Virologia/ICS/UFPA).

A análise da distribuição das frequências alélicas e genotípicas nas amostras dos pacientes assim como do grupo controle, nos permite concluir que ambas os grupos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

##### 3.1.1 Frequências alélicas do gene *IFNG* (+874T/A)

No grupo de pacientes com tuberculose as frequências alélicas do gene *IFNG* (+874T/A) não mostraram diferenças estatísticas significativas quando analisadas as

formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar, estando o alelo +874T/AA mais freqüente nas duas populações (Tabela 1).

**Tabela 1** – Distribuição das freqüências alélicas do gene *IFNG* (+874T/A) nas populações de pacientes com tuberculose pulmonar e tuberculose extrapulmonar.

Alelos	Tuberculose pulmonar <i>n</i> (%)	Tuberculose extrapulmonar <i>n</i> (%)	$\chi^2$	<i>p</i>
A	192 (74.4)	52 (80.0)		
T	66 (25.6)	13 (20.0)		
<b>Total</b>	<b>258 (100)</b>	<b>65 (100)</b>	0.769	0.4749

*n* = número de cromossomos analisados

Na análise das freqüências alélicas entre o grupo de pacientes com tuberculose e os controles negativos, foi verificada uma diferença estatística significativa entre os dois grupos, sendo a presença do alelo +874A mais freqüente nos doentes com tuberculose e do alelo +874T nos indivíduos não infectados (Tabela 2).

**Tabela 2** - Distribuição das frequências alélicas do gene *IFNG* (+874T/A) no grupo de pacientes com tuberculose e no grupo controle.

Alelos	Paciente <i>n</i> (%)	Controle <i>n</i> (%)	$\chi^2$	<i>p</i>	OR (IC 95%)
A	244 (75.3)	178 (57,1)			2.29 (1.64 - 3.22)
T	79 (24.7)	134 (42,9)			0,43 (0,31- 0,61)
<b>Total</b>	<b>323 (100)</b>	<b>312 (100)</b>	23.730	<0.0001	

*n* = número de cromossomos analisados

Também foi observado que as variações nas frequências alélicas foram estatisticamente significativas na análise conjunta do grupo controle com os grupos de pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar, sendo o alelo +874A mais freqüente nos doentes e o alelo +874T com maior freqüência nos indivíduos saudáveis (Tabela 3).

**Tabela 3** – Distribuição das frequências alélicas do gene *IFNG* (+874T/A) nos indivíduos com tuberculose pulmonar, tuberculose extrapulmonar e no grupo controle.

Alelos	Tuberculose pulmonar <i>n</i> (%)	Tuberculose extrapulmonar <i>n</i> (%)	Controle <i>n</i> (%)	$\chi^2$	<i>p</i>
A	192 (74.4)	52 (80.0)	178 (57,1)	18.702	<0.0001 <sup>a</sup>
T	66 (25.6)	13 (20.0)	134 (42,9)	11.428	0.0007 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>258 (100)</b>	<b>65 (100)</b>	<b>312 (100)</b>		

*n*=número de cromossomos analisados; a) tuberculose pulmonar x controle; b) tuberculose extrapulmonar x controle



As distribuições das frequências alélicas foram semelhantes entre os indivíduos com resposta tuberculínica PPD+ e PPD- que formaram o grupo controle, (Tabela 4).

**Tabela 4** – Distribuição das frequências alélicas do gene *IFNG* (+874T/A) nos indivíduos com resposta PPD+ e PPD- do grupo controle.

Alelos	PPD+ <i>n</i> (%)	PPD- <i>n</i> (%)	$\chi^2$	<i>p</i>
A	80 (59,7)	98 (55,0)		
T	54 (40,3)	80 (45,0)		
<b>Total</b>	<b>134 (100)</b>	<b>178 (100)</b>	0.683	0.4808

*n* = número de cromossomos analisados

### 3.1.2 Frequências genotípicas do gene *IFNG* (+874T/A)

Na análise da distribuição das frequências genotípicas do gene *IFNG* (+874T/A) dos indivíduos doentes, não foram significativas estatisticamente as diferenças encontradas os grupos com tuberculose pulmonar e tuberculose extrapulmonar, o genótipo +874AA esteve mais freqüente nas duas formas da tuberculose (Tabela 5).

**Tabela 5** – Distribuição das frequências genótípicas *IFNG* (+874T/A) nos pacientes com formas da tuberculose pulmonar e tuberculose extrapulmonar.

Genótipos	Tuberculose pulmonar <i>n</i> (%)	Tuberculose extrapulmonar <i>n</i> (%)	$\chi^2$	<i>p</i>
AA	73 (56.6)	20 (62.5)		
AT	46 (35.6)	12 (34.4)		
TT	10 (7.8)	1 (3.1)		
<b>Total</b>	<b>129 (100)</b>	<b>33 (100)</b>	0.970	0.6156

*n* = número de indivíduos investigados

As variações das frequências genótípicas entre os pacientes com tuberculose e os indivíduos do grupo controle mostraram uma diferença estatística significativa entre esses grupos, sendo que o genótipo homocigoto +874AA foi mais frequente nos pacientes com tuberculose e o genótipo homocigoto +874TT mais presente na população controle (Tabela 6).

**Tabela 6** – Distribuição das frequências genótípicas do gene *IFNG* (+874T/A) nos pacientes com tuberculose e grupo controle.

Genótipos	Tuberculose <i>n</i> (%)	Controles <i>n</i> (%)	$\chi^2$	<i>p</i>
AA	93 (57.4)	46 (29.5)		
AT	58 (35.8)	86 (55.1)		
TT	11 (6.8)	24 (15.4)		
<b>Total</b>	<b>162 (100)</b>	<b>156 (100)</b>	26.061	0.0001

*n* = número de indivíduos analisados

Foram observadas diferenças estatísticas significativas nas distribuições das frequências genótípicas entre os grupos com tuberculose pulmonar e os controles negativos, assim como entre os grupos de tuberculose extrapulmonar e os controles negativos, o genótipo homozigoto +874AA foi mais freqüente nas duas formas da tuberculose, enquanto o genótipo homozigoto +874TT esteve mais presente na população controle (Tabela 7).

**Tabela 7** – Distribuição das frequências genótípicas do gene *IFNG* (+874T/A) nas formas da tuberculose pulmonar, tuberculose extrapulmonar e grupo controle.

Genótipos	Tuberculose pulmonar <i>n</i> (%)	Tuberculose extrapulmonar <i>n</i> (%)	Controle <i>n</i> (%)	$\chi^2$	<i>p</i>
AA	73 (56.6)	20 (62.5)	46 (29.5)	21.648	<0.0001 <sup>a</sup>
AT	46 (35.6)	12 (34.4)	86 (55.1)	12.546	0.0019 <sup>b</sup>
TT	10 (7.8)	1 (3.1)	24 (15.4)		
<b>Total</b>	<b>129 (100)</b>	<b>33 (100)</b>	<b>156 (100)</b>		

*n* = número de indivíduos analisados; a) tuberculose pulmonar x controle; b) tuberculose extrapulmonar x controle

Na análise das frequências genótípicas entre os indivíduos com resposta PPD+ e PPD- do grupo controle, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre esses grupos (Tabela 8).

**Tabela 8** – Distribuição das frequências genotípicas do gene *IFNG* (+874T/A) nos indivíduos PPD+ e PPD- do grupo controle.

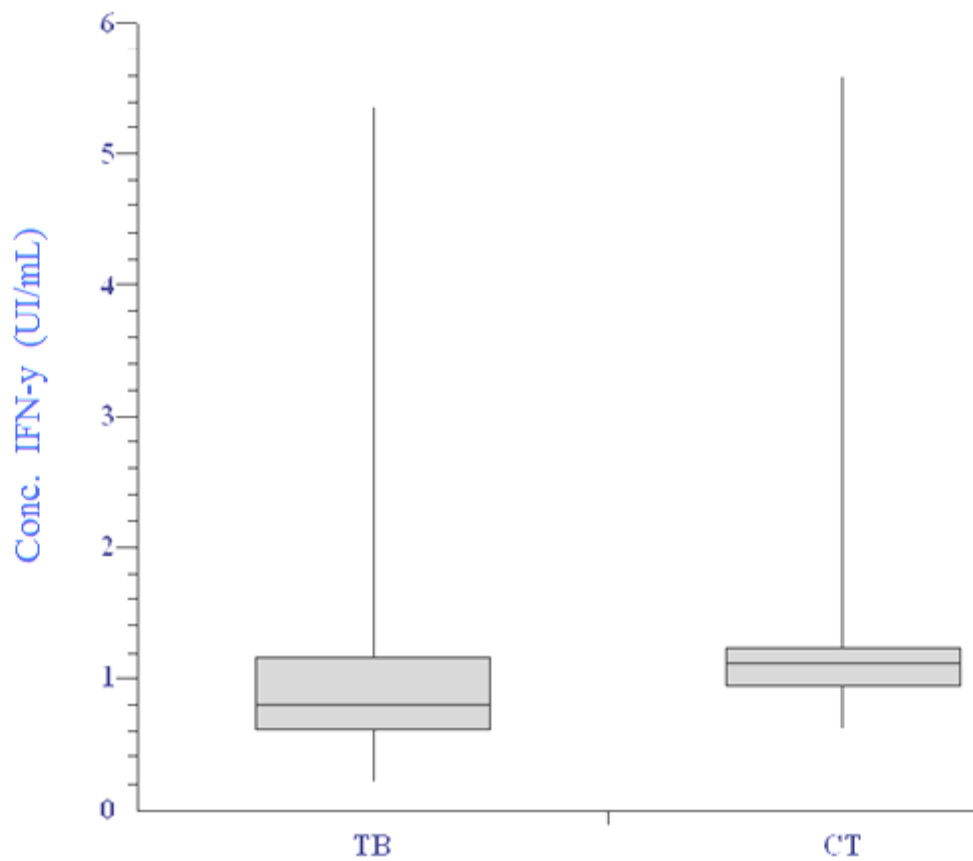
<b>Alelos</b>	<b>PPD+ <i>n</i> (%)</b>	<b>PPD- <i>n</i> (%)</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b><i>p</i></b>
AA	21 (31.3)	25 (28.0)		
AT	38 (56.7)	48 (54.0)		
TT	8 (12.0)	16 (18.0)		
<b>Total</b>	<b>67 (100)</b>	<b>89 (100)</b>	0.576	0.7497

*n* = número de indivíduos analisados

### 3.2 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE IFN- $\gamma$

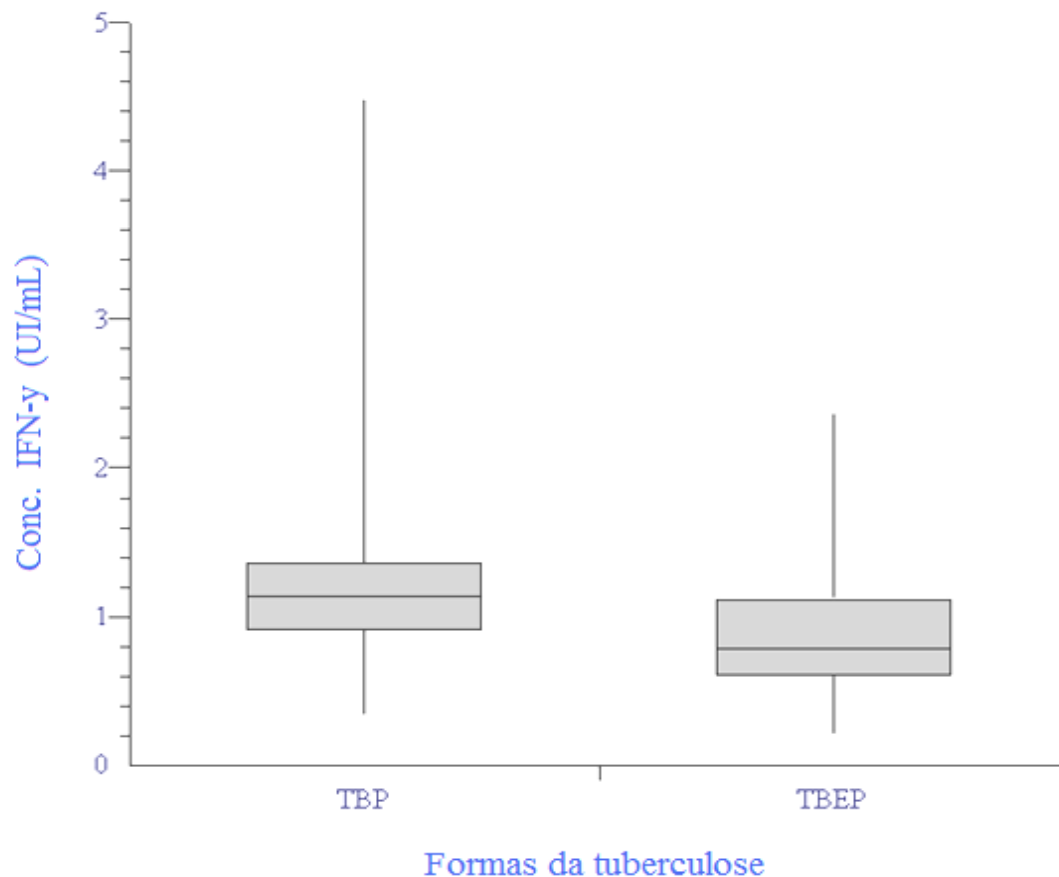
Os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  dos pacientes com tuberculose e do grupo controle foram correlacionados com as formas clínicas da doença, com o estado de não doente (controles PPD+ e PPD-), assim como com a presença dos três genótipos do gene *IFNG* (+874T/A).

Foram observadas diferenças estatísticas significativas quando comparados os valores das concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  entre os pacientes com tuberculose e os indivíduos do grupo controle ( $p < 0.0001$ ) (Figura 8).



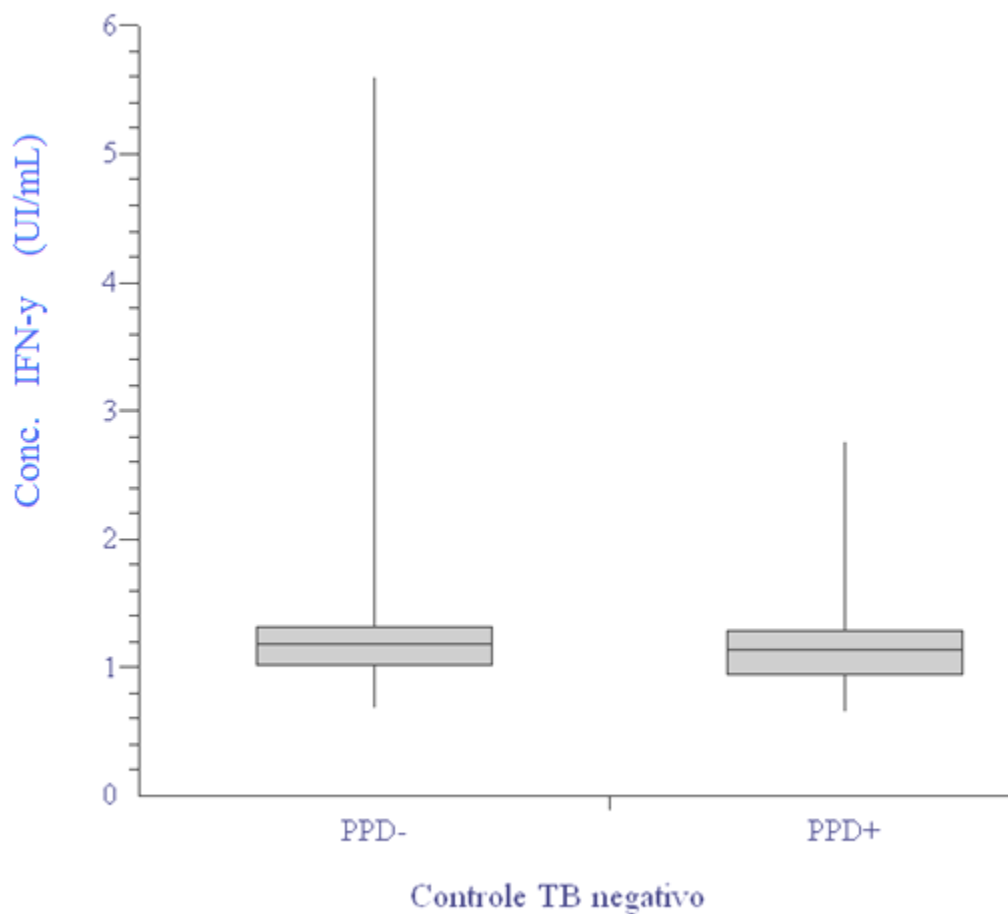
**Figura 8** - Concentrações de IFN- $\gamma$  plasmática de pacientes com tuberculose-TB (média = 0.949UI/mL) comparada com os controles - CT (média = 1.348UI/mL).

A avaliação dos valores das concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  entre as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar demonstrou uma diferença estatística significativa ( $p < 0.0001$ ) (Figura 9).



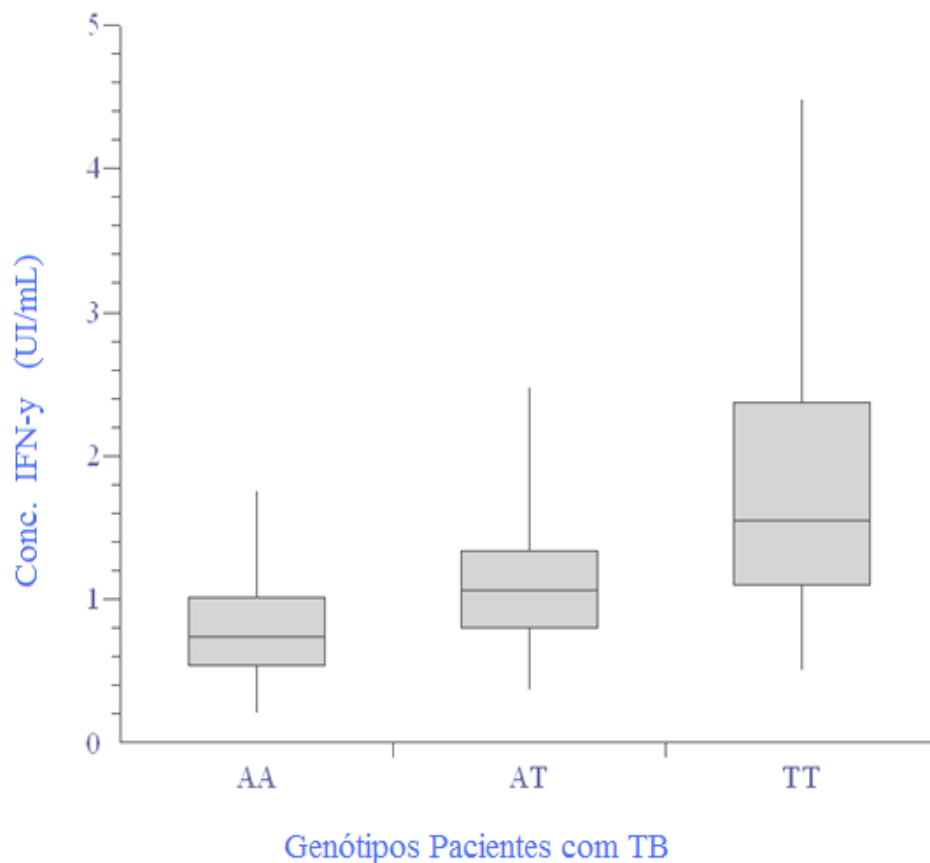
**Figura 9** - Comparação das concentrações de IFN- $\gamma$  plasmático entre as formas clínicas de tuberculose pulmonar - TBP (média = 1.219 UI/mL) e tuberculose extrapulmonar - TBEP (média = 0.892 UI/mL).

A comparação entre as concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  na população controle, não mostrou nenhuma diferença estatística significativa na distribuição dos quartis entre os indivíduos PPD+ e PPD- deste grupo (Figura 10).



**Figura 10** – Concentração plasmática de IFN- $\gamma$  nos indivíduos PPD+ (média=1.232UI/mL) e PPD- (média = 1.299UI/mL) do grupo controle negativo.

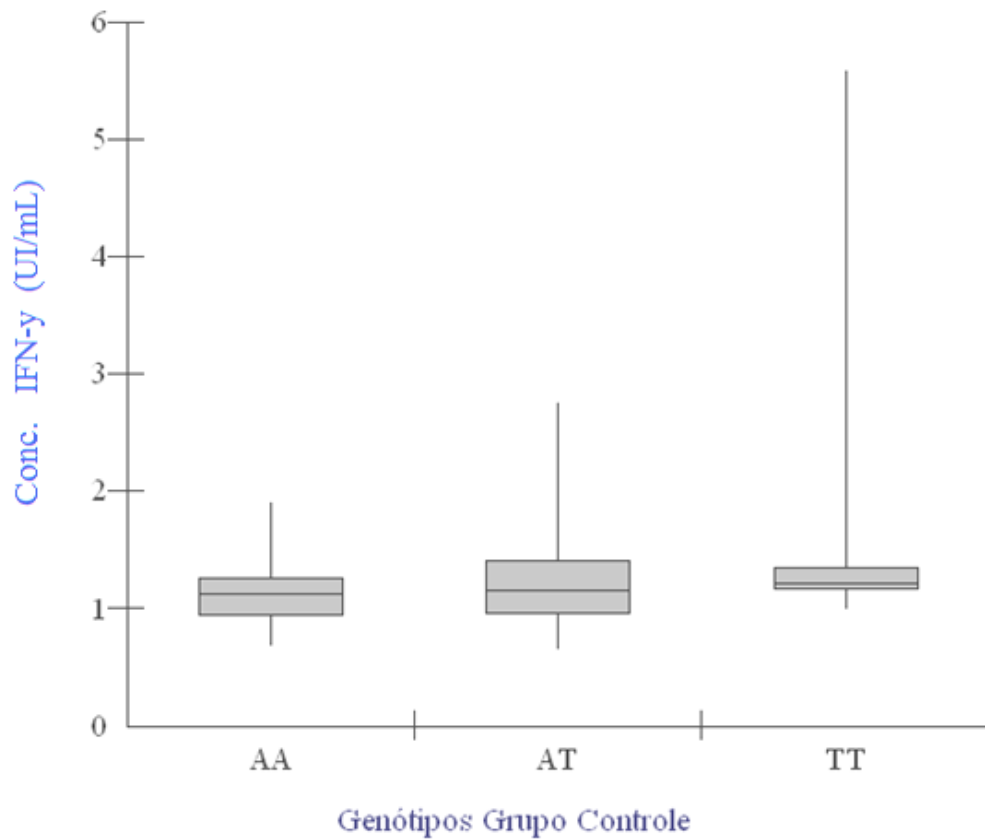
Na correlação das concentrações de IFN- $\gamma$  entre os genótipos AA, AT e TT nos pacientes com tuberculose, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os mesmos, AA vs. AT ( $p<0.0001$ ), AA vs. TT ( $p<0.0001$ ) e AT vs. TT ( $p=0.0222$ ) (Figura 11).



**Figura 11** - Concentrações de IFN- $\gamma$  por genótipos, dos pacientes com tuberculose. Genótipo AA (média=0.768 UI/mL), genótipo AT (média = 1.179UI/mL) e genótipo TT (média = 1.840UI/mL).

Quando comparadas as concentrações de IFN- $\gamma$  entre os genótipos AA, TA e TT na população controle, foi verificada uma diferença estatisticamente significativa entre os genótipos AA vs. AT ( $p=0.0015$ ) e AA vs. TT ( $p=0.0089$ ), por outro lado, entre os genótipos AT vs. TT não foi observada nenhuma diferença significativa estatisticamente (Figura 12).





**Figura 12** - Concentrações de IFN- $\gamma$  por genótipos na população controle, genótipo AA (média=1.131UI/mL), genótipo AT (média = 1.478UI/mL) e genótipo TT (média = 1.511UI/mL).

## 4 DISCUSSÃO

Uma rede funcional de citocinas é o elemento central na homeostase da resposta imunológica e sua alteração pode conduzir a uma resposta imune anormal ou ineficaz, como na infecção humana por *M. tuberculosis*, que exhibe um espectro de manifestações que refletem a deficiência da resposta imune frente a essa bactéria (Flynn, 2001). O *M. tuberculosis* tem a habilidade de disseminar-se dos pulmões até locais extrapulmonares diferentes durante a fase inicial da infecção, onde pode permanecer oculto na forma assintomática ou reativar-se (Sharma *et al.*, 2005).

No presente estudo, objetivamos investigar a variação genética na região intrônica do gene *IFNG* (+874T/A) e sua relação com as formas clínicas da tuberculose, uma doença crônica, granulomatosa, de alta incidência no Brasil, caracterizada por uma deficiência da imunidade predominantemente celular do hospedeiro, onde há evidências de uma alteração no balanço das citocinas que participam ativamente dessa resposta imune. Para efeito de comparação utilizamos um grupo controle de indivíduos saudáveis, expostos, constituído por profissionais da saúde, com resultados tuberculínicos tanto PPD+ como PPD-. Também quantificamos as concentrações plasmáticas do IFN- $\gamma$  dos dois grupos estudados para mostrarmos o quanto este polimorfismo em particular, afeta a habilidade de células mononucleares para produzir IFN- $\gamma$ , cujo papel protetor na tuberculose está bem estabelecido, principalmente no contexto antígeno-específico na imunidade mediada por célula T (Casanova & Abel, 2002).

A incidência de tuberculose extrapulmonar tem sido descrita entre 15 a 20% de todos os casos de tuberculose ativa (Weir & Thornton, 1985).

Com o intuito de observamos a associação desse polimorfismo na evolução da tuberculose pulmonar para as formas extrapulmonares, comparamos as frequências alélicas e genóticas do gene *IFNG* (+874T/A) entre esses dois grupos e não observamos diferença estatística significativa. Por outro lado, verificamos que em ambos os grupos houve uma frequência maior do alelo +874A assim como do genótipo homozigoto +874A/A. O que demonstra que somente a presença desse polimorfismo (+874A) do IFN- $\gamma$  não é fator determinante para uma evolução mais grave da infecção.

Resultados semelhantes aos nossos foram observados por Sallakçı *et al.* (2007), que demonstraram o alelo +874T e o genótipo +874T/T em menor frequência em pacientes turcos portadores de TB pulmonar e extrapulmonar.

Contudo, diferente dos nossos resultados, em que o genótipo mais frequente nas formas de tuberculose miliar e pleural foi o genótipo +874A/A, Henao *et al.* (2006), na Colômbia, ao avaliarem o perfil do gene *IFNG* (+874T/A) de controles saudáveis (PPD- e PPD+), TB pulmonar, TB pleural e TB miliar, observaram que genótipo homozigoto +874T/T esteve aumentado nos casos de tuberculose miliar e tuberculose pleural, sendo que essas diferenças podem ser reflexo do perfil genético das populações investigadas.

No presente estudo, também avaliamos as frequências alélicas e genóticas, do gene *IFNG* (+874T/A), entre todos os casos de pacientes com tuberculose e os indivíduos saudáveis do grupo controle, e observamos uma associação significativa entre a presença do alelo +874A e a tuberculose ativa, ao mesmo tempo em que o alelo +874T esteve com maior frequência entre os indivíduos do grupo controle. Os resultados sugerem um papel protetor ao alelo +874T no risco de infecção. Sendo a presença do alelo +874A um possível fator de predisposição a infecção pelo *M. tuberculosis*.

Da mesma forma, foram estatisticamente significativas as diferenças encontradas entre as frequências dos genótipos +874A/A, +874A/T e +874T/T, entre esses dois grupos. O genótipo homozigoto +874A/A esteve mais presente nos casos de tuberculose ativa, enquanto os genótipos heterozigotos +874A/T e homozigoto +874T/T foram mais frequentes no grupo controle, o que parece reforçar a associação do genótipo +874A/A com a suscetibilidade à tuberculose e do genótipo +874T/T com a proteção à infecção pelo *M. tuberculosis*.

Essa relação entre a suscetibilidade à tuberculose e o polimorfismo +874A do IFN- $\gamma$  já foi observada em estudos com diversas populações do mundo. Na Espanha, López *et al.*, 2003, em estudo de associação da tuberculose com o polimorfismo +874T/A do IFN- $\gamma$  em um grupo de pacientes com cultura positiva para TB pulmonar e controles saudáveis, demonstrou que a baixa produção de IFN- $\gamma$  em indivíduos homozigotos para o alelo +874A contribui para um risco aumentado de desenvolver a tuberculose pulmonar.

A associação do genótipo +874T/T com resistência à tuberculose ativa, também foi verificada em estudo de Lio *et al.* (2002) na Sicília, comparando as frequências genotípicas do polimorfismo IFN- $\gamma$  +874T/A entre pacientes com tuberculose pulmonar e um grupo controle saudável. Resultados semelhantes foram evidenciados no estudo realizado por Tso *et al.*, (2005) em pacientes com tuberculose/HIV negativo em Hong Kong, China e por Etokebe *et al.* (2005) na Croácia.

Por outro lado, alguns estudos não mostraram associação do polimorfismo do gene *IFNG* (+874T/A) com a forma ativa da tuberculose. Em Karonga, distrito de Malawi na África, Fitness *et al.* (2004) não encontraram tal associação quando estudaram um grupo de casos de tuberculose ativa e um grupo controle de indivíduos saudáveis. Tais resultados demonstram que a suscetibilidade genética para tuberculose em africanos parece

poligênica, e que os genes e variantes relevantes podem variar significativamente entre as populações. Estes resultados também podem ter sido “mascarados” pela co-infecção HIV/tuberculose presente nos casos estudados, diferente do nosso estudo, em que essa co-infecção foi um critério de exclusão dentro do grupo de doentes estudados. Nesse caso, pode-se inferir que a tuberculose se caracterize por uma infecção oportunista em pacientes imunologicamente deprimidos, e não somente relacionada com o polimorfismo genético em estudo.

Em coreanos, Hwang *et al.* (2007), também não encontraram associação entre o polimorfismo do gene *IFNG* (+874T/A) com o desenvolvimento da tuberculose ativa em um grupo de 80 pacientes positivos para tuberculose pulmonar e 80 indivíduos controle saudáveis, mas essa ausência de associação talvez seja resultado do reduzido tamanho amostral.

Estudo realizado por Vidyarani *et al.* (2006) no sul da Índia, sugere uma ausência de associação funcional do polimorfismo no  $\text{IFN-}\gamma$  +874A nos casos de tuberculose pulmonar na população do sul da Índia. Moran *et al.* (2007), também não encontraram associação entre o polimorfismo em estudo com suscetibilidade à tuberculose, assim como com as formas extrapulmonares, em três etnias (africana americana, branca e hispânicos) na população residente em Houston, Texas. A falta de associação poderia ser explicada pela heterogeneidade genética populacional ou estratificação dentro de cada etnia nesses estudos, em comparação com as populações avaliadas em outros estudos.

Ao analisarmos os resultados encontrados no grupo controle não observamos diferença estatística significativa nas frequências alélicas e genótípicas do gene *IFNG* (+874T/A) entre os indivíduos com resultados PPD+ e PPD-. Nossos resultados coincidem com outros estudos como de Henao *et al.* (2006) e Lopes *et al.* (2003).

Nas respectivas interpretações da prova tuberculínica PPD, não reator é o indivíduo não infectado ou que é portador de um estado de supressão imunológica que o impede de reagir ao teste, como acontece em portadores de AIDS (MS/BRASIL/FUNASA, 2002). Na situação de reator forte, com ressalva a influência da vacina BCG tomada recentemente, interpreta-se que o indivíduo testado passou pela experiência da infecção pelo *M. tuberculosis*, sem que isto signifique a ocorrência da doença. Em 95% dos casos, a previsão é de que estes indivíduos infectados não evoluam para a enfermidade, mas em crianças este aspecto evolutivo “benigno” é menos freqüente (BRASIL/FUNASA, 2002).

Vários estudos reportam que as formas clínicas da tuberculose cursam com produção deprimida de IFN- $\gamma$  por células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Sendo que nas formas mais severas da doença esses níveis são mais baixos ainda (Onwubalili *et al.*, 1985). Outros sustentam a hipótese de que os indivíduos com tuberculose-doença, ao invés de uma resposta Th1 como ocorre na tuberculose-infecção, apresentariam uma resposta polarizada para Th2. Rojas *et al.* (1999), baseados na importância da ativação macrofágica pelo IFN- $\gamma$  e sua inibição pela IL-10 e TGF- $\beta$ , estudaram os efeitos dessas citocinas sobre células TCD4 e células T $\gamma\delta$  reativas aos antígenos micobacterianos, constatando que os indivíduos com tuberculose-doença apresentam aumento dessas duas últimas citocinas e redução do IFN- $\gamma$ , levando a uma inabilidade dos macrófagos e das células Th1 em controlar a infecção.

Levando-se em conta essa importância imperativa do IFN- $\gamma$  na ativação do macrófago e na polarização de uma resposta imunológica Th1, em nosso estudo avaliamos a relação entre as concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  dos pacientes com diferentes formas clínicas da tuberculose e do grupo controle (PPD+ e PPD-), com o objetivo de associarmos as variações plasmáticas individuais de IFN- $\gamma$  com os genótipos +874A/A, +874A/T e

+874T/T, assim como com as diferentes formas clínicas da tuberculose e indivíduos saudáveis.

Nossos resultados mostram que as concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  dos pacientes com tuberculose ativa tiveram uma média significativamente menor quando comparadas com a do grupo controle; relacionando, de maneira relevante, os baixos níveis plasmáticos dessa citocina com o desenvolvimento da tuberculose doença. Por outro lado, as concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  nos indivíduos do grupo controle deste estudo, não mostraram nenhuma diferença significativa entre os indivíduos PPD+ e PPD-.

Esses dados demonstram a importância do IFN- $\gamma$  no controle da infecção nos expostos não infectados, onde foi observada uma média mais elevada na concentração do IFN- $\gamma$ , em oposição aos infectados onde há uma deficiência dessa citocina e, conseqüentemente, um quadro de tuberculose-doença instalado. Essa análise permite concluir que a produção insuficiente de IFN- $\gamma$  resulta em fracasso na ativação do macrófago podendo levar à progressão da tuberculose ativa.

Os resultados aqui apresentados corroboram os achados de Bhattacharrya *et al.* (1999) que verificaram, *in vitro*, a maior produção de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4) por linfócitos estimulados com antígenos micobacterianos em indivíduos sadios contactantes de pacientes com tuberculose. A mesma relação foi observada por Vidyarani *et al.* (2006), quando analisaram os níveis de IFN- $\gamma$  espontâneo e após estimulação em PBMC de pacientes com tuberculose pulmonar e de grupo controle saudável no sul da Índia.

Entre as formas clínicas da tuberculose analisadas neste estudo, as concentrações plasmáticas do IFN- $\gamma$  estiveram significativamente mais baixas nos pacientes com tuberculose extrapulmonar do que nos casos de tuberculose pulmonar, demonstrando a

relação dos baixos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  com uma resposta imune desfavorável frente ao *M. tuberculosis* já instalado no pulmão. Essa deficiência comprometeria também a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos levando à formação de um granuloma “pouco viável”, o que facilitaria a disseminação do *M. tuberculosis* para outros órgãos fazendo com que houvesse uma evolução para as formas mais severas da tuberculose, as formas extrapulmonares.

No Paquistão, Bushra *et al.* (2007), realizaram um estudo comparativo utilizando a estimulação em PBMC de IFN- $\gamma$  e IL-10 como biomarcadores para avaliar o espectro severo da tuberculose ativa pulmonar e extrapulmonar. Em seus resultados observaram que havia uma depleção dos níveis de IFN- $\gamma$  com uma elevação concomitante da IL-10, tanto nos pacientes com tuberculose pulmonar como naqueles com tuberculose extrapulmonar, e que a relação IFN- $\gamma$ /IL-10 diminuía nas formas extrapulmonares.

Observamos em nossos resultados, que pacientes com tuberculose, tanto pulmonar como extrapulmonar, com genótipo homozigoto +874A/A, possuem níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  significativamente menores do que com as outras combinações alélicas +874A/T e +874T/T. Isto significa que neles, esse polimorfismo diminui a produção de IFN- $\gamma$  o que provocaria uma diminuição da ativação da imunidade celular e, por conseguinte, facilitaria adquirir a infecção com uma maior probabilidade de evolução para formas mais severas da doença. López *et al.* (2003), na Espanha, obtiveram resultados semelhantes quando avaliaram a produção estimulada de IFN- $\gamma$  em culturas de células do sangue periférico de pacientes com tuberculose pulmonar e contatos PPD+.

Como descrito por Pravica *et al.* (1999/2000), foi possível observar em nossos resultados tanto nos doentes como no grupo controle saudável, uma associação do genótipo +874T/T com altas concentrações de IFN- $\gamma$  e do genótipo +874 A/A com baixa



produção desta citocina, assim como valores intermediários foram detectados nos indivíduos heterozigotos +874 A/T.

Apesar da mistura de etnias observada em populações brasileiras, os dados presentes concordam com observações relatadas em outras populações estudadas e, portanto, demonstram que existe uma associação de um SNP do gene *IFNG* (+874T/A) com a tuberculose em diferentes populações.

Baseado na importância do IFN- $\gamma$  na imunidade protetora contra a tuberculose, uma doença que ainda vitima quase dois milhões de pessoas por ano, segundo a OMS, outras análises genéticas com associações entre a tuberculose e o IFN- $\gamma$ , bem como com seus receptores se fazem necessários. Entretanto, uma vez que o controle genético da resposta imune na tuberculose deve ser poligênico, é possível que a inclusão de outras citocinas, por exemplo, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10, IL-2 e IL-4, ou de outros genes, por exemplo, HLA, que são conhecidas por participar da resposta imune na tuberculose, venham complementar nosso estudo.

No Brasil este é o primeiro estudo relacionando uma possível associação do polimorfismo no gene *IFNG* +874T/A com as formas clínicas da tuberculose junto com as concentrações plasmáticas individuais do IFN- $\gamma$ . Ademais, nossos resultados mostram associações da tuberculose e suas formas clínicas, com baixa produção de IFN- $\gamma$ , demonstrando que a defesa contra o *M. tuberculosis* depende de uma intensa resposta imune celular de perfil Th1, caracterizada pelo predomínio de produção de IFN- $\gamma$ .

## 5 CONCLUSÕES

(i) Foi observada uma associação significativa entre a presença do alelo +874A e do genótipo +874AA com a tuberculose ativa, ao mesmo tempo em que o alelo +874T e o genótipo +874TT estiveram em maior frequência nos indivíduos do grupo controle, sugerindo uma associação do alelo +874A com suscetibilidade à tuberculose e do alelo +874T com resistência ou proteção à doença.

(ii) Foi observado que tanto as formas pulmonares como as extrapulmonares da tuberculose evoluem com uma frequência maior do alelo +874A e do genótipo homocigoto +874AA.

(iii) No grupo controle, não houve diferença estatística significativa nas frequências alélicas e genóticas do gene *IFNG* (+874T/A) entre os indivíduos com resultados PPD+ e PPD- .

(iv) Os pacientes com tuberculose ativa tiveram uma média das concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  significativamente menor, quando comparados ao grupo controle, sugerindo a relação dos baixos níveis dessa citocina com o desenvolvimento da tuberculose ativa e a importância do IFN- $\gamma$  para a ativação da imunidade celular frente à infecção pelo *M. tuberculosis*.

(v) As concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  nos indivíduos do grupo controle não mostraram nenhuma diferença significativa entre os indivíduos PPD+ e PPD-.

(vi) As concentrações plasmáticas do IFN- $\gamma$  estiveram significativamente mais baixas nos pacientes com tuberculose extrapulmonar do que nos casos de tuberculose pulmonar sugerindo a relação dos baixos níveis de IFN- $\gamma$  com uma resposta imune desfavorável frente ao *M. tuberculosis* já instalado no pulmão.

(vii) Nossos resultados evidenciaram uma associação do genótipo +874TT com altas concentrações de IFN- $\gamma$  e o genótipo +874AA com baixas concentrações dessa citocina, tanto nos doentes de tuberculose quanto nos indivíduos saudáveis.

(viii) Finalmente, concluímos que existe uma associação do polimorfismo do gene *IFNG* +874T/A com suscetibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis* na população do presente estudo.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular** 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 251p, 2005.
- AFIUNE, J. B., IDE N. J. Diagnóstico da tuberculose pulmonar escarro negativo. **Jornal de Pneumologia**, **19**: 37-41, 1993.
- AGUILLON, G., JUAN, C., CRUZAT, C., CUENCA, M., JIMENA C. El polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral alfa como factor de riesgo en patología. **Revista Médica del Chile**, **130** (9): 1043-1050. ISSN 0034-9887, 2002.
- ANDERSEN, P., ASKGAARD D., LJUNGQVIST, L., BENNEDSEN, J., HERON, I. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. **Infection and Immunity**, **59**(6): 1905-1910, 1991.
- ANDO, S., OHTA, T., TANIMOTO, T., SANO, O., YAMAUCHI, H., ANDOH, O., TORIGOE, K., KURIMOTO, M. Natural human interferon- $\gamma$  derived from lipopolysaccharide-stimulated human myelomonocytic HBL-38 cells. **Japanese Journal of Cancer Research**, **79**: 757-765, 1988.
- AYRES, M., AYRES, J. R., AYRES, D. L., SANTOS, A. S. BIOSTAT 4.: Aplicação estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. **Sociedade Civil Mamirauá**, 193p, 2007.
- BASHAM, T. Y., MERIGAN, T. C. Recombinant interferon- $\gamma$  increases HLA-DR synthesis and expression. **Journal of Immunology**, **130** (4): 1492-1494, 1983.
- BATES, J. H. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. **Clinics in Chest Medicine**, **1**(2): 167-174, 1980.

- BATES, J. H., STEAD, W. W. The history of tuberculosis as a global epidemic. **Medical Clinics of North America**, **77**(6): 1205-1217, 1993.
- BENJAMIN, D., HARTMANN, D. P., BAZAR, L. S., JACOBSON, R. J. Burkitt's cells can be triggered by teleocidin to secrete interferon-gamma. **American Journal of Hematology**, **22** (2): 169-177, 1986.
- BHATTACHARYYA, S., SINGLA, R., DEY, A. B., PRASAD, H. K. Dichotomy of cytokine profiles in patients and high-risk healthy subjects exposed to tuberculosis. **Infection and Immunity**, **67**:5597-5603, 1999.
- BIGNAL J. R. Tuberculosis in England and Wales in the next 20 years. **Postgraduate Medical Journal**; **47**:759-62, 1971.
- BRASIL. Ministério da Saúde/ Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, 5ª edição. Brasília:MS, p. 18, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde/ Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, 6ª edição. Brasília:MS, p. 738, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde/ Fundação Nacional de Saúde. **Situação da doença tuberculose no Brasil**. Disponível em: < [http:// portal.saude. gov.br /portal /saude/area](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area)>. Acesso em 06/02/2007.
- BROWN, D.A., KONDO, K.L., WONG , S.W., DIAMOND, D.J. Characterization of nuclear protein binding to the interferon- $\gamma$  promoter in quiescent and activated human T cells. **European Journal of Immunology**, **22** (9): 2419-2428, 1992.
- BROWN, D. A., NELSON, F. B., REINHERZ, E. L., DIAMOND, D. J. The human interferon-gamma gene contains an inducible promoter that can be transactivated by tax I and II. **European Journal of Immunology**, **21**, (8):1879-1885, 1991.

- BUSHRA, J., FIRDAUS, S., ZAHRA, H., NOSHEEN, N., TASHMEEM, R., GHAFFAR, D., RABIA, H. Interferon- $\gamma$ /IL10 ratio defines the disease severity in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. **Tuberculosis**, **87**(4): 279–287, 2007.
- CASANOVA, J.L., ABEL, L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. **Annual Review Immunology**, **20**:581–620, 2002.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION-U.S. **Department of Health and Human Services, TB notes N° 1**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nchstp/tb>. 2000.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION-U.S. **Department of Health and Human Services, Division of Tuberculosis Elimination**. Atlanta, Geórgia. Disponível em: <http://www.cdc.gov>. 2008.
- CHAN, S. H., KOBAYASHI, M., SANTOLI, D., PERUSSIA, B., TRINCHIERI, G. Mechanisms of IFN- $\gamma$  induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. **The Journal of Immunology**, **148** (1): 92-98, 1992.
- CHAN, J., FUJIWARA T., BRENNAN, P., McNEIL M., TURCO, S. J., SIBILLE J. C. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **86** (7): 2453-2457, 1989.
- CHAN, J., FAN, X. D., HUNTER, S. W., BRENNAN, P. J., BLOOM, B. R. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. **Infection and Immunology**, **59** (5): 1755-1761, 1991.

- CICCARONE, V. C., CHRIVIA, J., HARDY, K. J., YOUNG, H. A. Identification of enhancer-like elements in human IFN $\gamma$  genomic DNA. **Journal of Immunology**, **144** (2): 725-730, 1990.
- CIPPITELLI, M., SICA, A., VIGGIANO, V., YE, J., GHOSH, P., BIRRER, M. J., YOUNG, H.A. Negative transcriptional regulation of the interferon- $\gamma$  promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun. **The Journal of Biological Chemistry**, **270** (21): 548-556, 1995.
- COCKFIELD, S. M., RAMASSAR, V., NOUJAIM, J., VAN DER MEIDE, P. H., HALLORAN, P. F. Regulation of IFN- $\gamma$  expression *in vivo*: IFN- $\gamma$  up-regulates expression of its mRNA in normal and lipopolysaccharide-stimulated mice. **The Journal of Immunology**, **150** (3): 717-725, 1993.
- COLLINS, C. H., GRANGE, J. M., YATES, M. D. Identification of species. *In: Tuberculosis bacteriology: organization and practice*. 2. ed. Oxford: **Butterworth-Heinemann**, 139p. 1997.
- CONSENSO BRASILEIRO DE TUBERCULOSE II. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, **30** (Suppl 1): 4-23, 2004.
- COOPER, A. M., DALTON, D. K., STEWART, T. A., GRIFFIN, J. P., RUSSELL, D. G., ORME, I. M. Disseminated tuberculosis in interferon- $\gamma$  gene-disrupted mice. **The Journal of Experimental Medicine**, **178** (6): 2243–2247, 1993.
- DANIEL, T. M., ELLNER, J. J. Immunology of tuberculosis. *In: Lee BR, Earl SH, editors. Tuberculosis. A comprehensive international approach. Lung biology in health and disease*, New York: Marcel Dekker: 1993.
- DANNENBERG, A. M., ROOK, G. A. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay between tissue-damaging and macrophage-activating immune responses:

dual mechanisms that control bacillary multiplication, p. 459–484. *In* B. R. Bloom (ed.), **Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control**. ASM Press, Washington, D.C. 1994.

DANNENBERG, A. M., Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. **Review of Infectious Disease** 2 (2):369-378, 1989

DERYNCK, R., LEUNG, D. W., GRAY, P. W., GOEDDEL, D. V. Human interferon gamma is encoded by a single class of mRNA. **Nucleic Acids Research**, 10 (12): 3605-3615, 1982.

DEVOS, R., CHEROUTRE, H., TAYA, Y., DEGRAVE, W., VAN HEUVERSWYN H., FIERS, W. Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukaryotic cells. **Nucleic Acids Research**, 10 (8): 2487-2501, 1982.

DI MARZIO, P., PUDDU, P., CONTI, L., BELARDELLI, F., GESSANI, S. Interferon- $\gamma$  upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, 179 (5): 1731-1736, 1994.

DUCATI, R. G., BASSO, I.A., SANTOS, D.S. **Micobactérias**. In: Trabulsi I.R., Alterthum F. Microbiologia. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu; 2005.

DUNLAP, N. E., BASS, J., FUJIWARA, P., HOPEWELL, P., HORSBURG, C. R., SALFINGER, M., SIMONE, P. M. Diagnostic Standard and classification of tuberculosis in adults and children. **American Journal Respiratory and Critical Care Medicine**, 161:1376-1395, 2000.

EIGLER, A., SINHA, B., HARTMANN, G., ENDRES S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunology Today**, 18: 487-492, 1997.



- ELLNER, J. J., HIRSCH, C. S., WHALEN, C. C. Correlates of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. **Clinical Infectious Disease**, **30**: S279-282, 2000.
- ETOKEBE, G. E., BULAT-KARDUM, L., JOHANSEN, M. S., KNEZEVIC, J., BALEN, S., MATAKOVIC-MILEUSNIC, N. Interferon-g gene (T874A and G2109A) polymorphisms are associated with microscopypositive tuberculosis. **Scandinavian Journal Immunology** **63**:136–141, 2006.
- FARRAH, T., SMITH, C. A. Emerging cytokine family. **Nature**, **358** (26): 1038-3580, 1992.
- FELDMANN, M., MAINI, R. N. Anti-TNF- $\alpha$  therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? **Annual Review Immunology** **19**: 163–196, 2001.
- FERRAZOLI, L., PALACI, M., MARQUES, L. R. M., JAMAL L. F., AFIUNE, J. B., CHIMARA, E. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. **The International Journal Tuberculosis Lung Disease**, **4** (1): 18-25, 2000.
- FITNESS, J., FLOYD, S., WARNDORF, D. K. Large-scale candidate gene study of tuberculosis susceptibility in the Karonga District of Northern Malawi. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, **71** (3):341–349, 2004.
- FLYNN, J. L., GOLDSTEIN, M. M., CHAN J., KARLA J., TRIEBOLD K. P., LOWENSTEIN C. J., SCHRELBER R., MAK T. W., BLOOM B. R. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**, **2** (6): 561–572, 1995.
- FLYNN, J. L., CHAN, J., TRIEBOLD, K. J., DALTON, D. K., STEWART, T. A., BLOOM, B. R. An essential role for interferon gamma in resistance to

- Mycobacterium tuberculosis infection. **The Journal of Experimental Medicine**, **178** (6): 2249–2254, 1993.
- FLYNN, J. L., CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, **19**: 93-129, 2001.
- FURIN, J. J., JOHNSON, L. J. Recent Advances in the Diagnosis and Management of Tuberculosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, **11** (3): 189-194, 2005.
- GAJEWSKI, T. F., FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of IFN- $\gamma$  in immune regulation, I. IFN- $\gamma$  inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **The Journal of Immunology**, **140**: 4245-4252, 1988a.
- GAJEWSKI, T. F., FITCH, F. W. The proliferative effect of IFN- $\gamma$  gamma in immune regulation. I. IFN-  $\gamma$ gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **The Journal of Immunology**, **140**: 4245- 4252, 1988b.
- GANGULY, N. K., Wath is new s the diagnosis of tuberculosis? Part II: Techniques for diagnosis of tuberculosis. **ICMR Bulletin**, **32** (8), 2002.
- GERCKEN, J., PRYJMA, J., ERNST M., FLAD, H. D. Defective antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. **Infection and Immunity**, **62** (8): 3472–3478, 1994.
- GELUK, A., MEIJGAARDEN, K. E. VAN, FRANKEN K. L., DRIJFHOUT, J. W., D'SOUZA S., NECKER A., HUYGEN K., OTTENHOFF T. H. Identification of major epitopes of mycobacterium tuberculosis AG85B that are recognized by HLA-A\*0201-restricted CD8+ T cells in HLA-transgenic mice and humans. **Journal of Immunology**, **165** (11): 6463–6471, 2000.
- GLICKMAN, M. S., JACOBS W. R. Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline. **Cell**, **104** (4): 477-485, 2003.

- GRAY, P. W., GOEDEL, D. V. Structure of the human immune interferon gene. **Nature**, **298**: 859-863, 1982.
- HARDY, K. J., SAWADA, T. Human  $\gamma$  interferon strongly upregulates its own gene expression in peripheral blood lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, **170** (3): 1021-1026, 1989.
- HENAO, M. I., MONTES, C., PARI'S, S. C., GARCIA, L. F. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. **Tuberculosis**, **86** (1): 11-19, 2006.
- HENDERSON, R. A., WATKINS, S. C., FLYNN, J. L.. Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Immunology**, **159** (2): 635-643, 1997.
- HERNANDEZ-PANDO, R., OROZCOE, H., SAMPIERI, A., PAVON, L., VELASQUILLO, C., LARRIVA-SAHD, J., ALCOCER, J. R., MADRID, M. V. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**, **89** (1): 26-33, 1996.
- HIJJAR, M. A. Controle das doenças endêmicas no Brasil. Tuberculose, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** (Sup.III):23-36, 1994.
- HILL, A. V. The immunogenetics of human infectious diseases. **Annual Review of Immunology** **16**:593-617, 1998.
- HWANG J., EUN, J. K., SU Y. K., SHIN-HYE, L., GEE, Y. S., O JUNG, K., YONGICK, J. I., MIYEON, K., DUK-HWAN, K., WON-JUNG, K. Polymorphisms of interferon- $\Upsilon$  and interferon- $\Upsilon$  receptor 1 genes and pulmonary tuberculosis in Koreans. **Journal Asian Pacific Society of Respirology**, **12** (6): 906-910, 2007.

- KATARIA, Y. P., KHURSHID I. Adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusion. **Chest**, **120** (2):334-336, 2001.
- LIMA, F. M. T. Patogenia da tuberculose. **Jornal de Pneumologia**, **10**: 11-18, 1993.
- LIN, Y., ZHANG, M., HOFMAN, F. M., GONG, J., BARNES, P.F. Absence of a prominent TH2 cytokine response in human tuberculosis. **Infection and Immunity**, **64** (4): 1351-1356, 1996.
- LIO, D., MARINO, V., SERAUTO A., GIOIA, V., SCOLA, L., CRIVELLO, A., FORTE, G.I., COLONNA-ROMANO, G., CANDORE, G., CARUSO, C. 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 of Immunogenetics**, **29** (5):371–374, 2002.
- LOPEZ, D. M., ARNALICH, F., SERANTES, R., GONZALEZ, A., CODOCEO, R., MADERO, R., VAZQUEZ, J. J., MONTIEL, C. Interferon- $\gamma$  and Interleukin-10 Gene Polymorphisms in Pulmonary Tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, **167**: 970–975, 2003.
- MANABE, Y. C., BISHAI, W. R. Latent *Mycobacterium tuberculosis* persistence, patience, and winning by waiting. **Nature Medicine**, **6**: 1327–1329, 2000.
- MANTOVANI, A., BUSSOLINO, F., INTRONA, M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. **Immunology Today**, **18**: 231-240, 1997.
- MEANS, R. T., KRANTZ, S. B., LUNA, J., MARSTERS, S. A., ASHKENAZI, A. Inhibition of murine erythroid colony formation in vitro by interferon- $\gamma$  and correction by interferon receptor immuno-adhesin. **Blood**, **83** (4): 911-915, 1994.

- MELVIN, A. J., MCGURN, M. E., BORT, S. J., GIBSON, C., LEWIS, D. B.  
Hypomethylation of the interferon- $\gamma$  gene correlates with its expression by primary T-lineage cells. **European Journal of Immunology**, **25** (2): 426-430, 1995.
- MELO, F. A. F., AFIUNE, J. B., IDE NETO. Epidemiological features of multidrug-resistant tuberculosis in a reference service in São Paulo city. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36** (10): 27-34. 2003.
- MELO, F. A. F., AFIUNE, J. B. Transmissão e imunopatogenia da tuberculose. **Jornal de Pneumologia**, **19**: 19-24, 1993.
- METCALF, D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. **Nature**, **339** (6219): 27-30, 1989.
- MILLER, M. P. *Tools For Population genetic Analyses – TFPGA*, 1.3, Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, UFA, 1997.
- MORAN, A., MA, X., REICH, R. A., GRAVISS, E. A. No association between the +874T/A single nucleotide polymorphism in the IFN-gamma gene and susceptibility to TB. **International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, **11**(1):113-5, 2007.
- MOREIRA, A. L., WANG, J., TSENOVA-BERKOVA, L., HELLMANN, W., FREEDMAN V. H., KAPLAN, G. Sequestration of *Mycobacterium tuberculosis* in tight vacuoles *in vivo* in lung macrophages of mice infected by the respiratory route. **Infection and Immunity**, **65**: 305-308, 1997.
- MUROHASHI, I., HOANG, T. Interferon- $\gamma$  enhances growth factor-dependent proliferation of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. **Blood**, **78** (4): 1085-1095, 1991.

- NATHAN, C. F., MURRAY, H. W., WIEBE, M. E., RUBIN, B. Y. Identification of interferon- $\gamma$  as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and anti-microbial activity. **Journal of Experimental Medicine**, **58** (3): 670-689, 1983.
- NEDWIN, G. E., NAYLOR, S. L., SAKAGUCHI, A. Y., SMITH, D., JARRETTNEDWIN, J., PENNICA, D., GOEDDEL, D.V., GRAY, P. W. Human lymphotoxin and tumor necrosis genes: structure, homology and chromosomal localization. **Nucleic Acids Research**, **13**: 6361-6372, 1985.
- ONWUBALILI, J. K., SCOTT, G. M., ROBINSON, J. A. Deficient immune interferon production in tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, **59**(2): 405–413, 1985.
- OTTENHOF, T. H., KUMARARATNE, D., CASANOVA, J. L. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Immunology Today**, **19**: 491-494, 1998.
- OTTENHOFF T. H., VERRECK, F. A., HOEVE, M. A., VAN DE VOSSE E. Control of human host immunity to mycobacteria. **Tuberculosis**, **85**: 53–64, 2005.
- PACE, J. L., RUSSELL, S. W., TORRES, B. A., JOHNSON, H. M., GRAY, P.W. Recombinant mouse  $\gamma$ -interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. **Journal of immunology**, **130** (5): 2011-2013, 1983.
- PAUL, W. E., SEDER, R. A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell**, **76** (2): 241-251, 1994.
- PENIX, L., WEAVER, W. M., PANG, Y., YOUNG, H. A., WILSON, C. B. Two essential regulatory elements in the human IFN- $\gamma$  promoter confer activation specific expression in T cells. **Journal of Experimental Medicine**, **178** (5): 1483-1496, 1993.

- PERKINS, M. D. New diagnostic tools for tuberculosis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, 4(12 Suppl 2): 182–188, 2000.
- PERREY, C., PRAVICA, V., SINNOTT, P. J., HUTCHINSON, I. V. Genotyping for polymorphisms in Interferon- $\gamma$ , Interleukin-10, Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  gene: a technical report. **Transplant Immunology**, 6 (3): 193-197, 1998.
- PERREY, C., TURNER, S. J., PRAVICA, V., HOWELL, W. M., HUTCHINSON, I. V. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  and TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms. **Transplant Immunology**, 7 (2): 127-128, 1999.
- PETERS, P. M., ORTALDO, J. R., SHALABY, M. R., SVEDERSKY, L. P., NEDWIN, G. E., BRINGMAN, T. S., HASS, P. E., AGGARWAL, B. B., HERBERMAN, R. B., GOEDDEL, D.V. Natural killer-sensitive targets stimulate production of TNF-alpha but not TNF-beta (lymphotoxin) by highly purified human peripheral blood large granular lymphocytes. **Journal of Immunology**, 137 (8): 2592-2598, 1986.
- PIETERS J., GARFIELD J. Hijacking the host: survival of pathogenic mycobacteria inside macrophages. **Trends in Microbiology**, 10 (3): 142-146, 2002.
- POCIOT, F., BRIANT, L., JONGENEEL, C. V., MOLVIG, J., WORSAAE, H., ABBAL, M., THOMSEN, M., NERUP, J., CAMBON-THOMSEN, A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. **European Journal of Immunology**, 23: 224-231, 1993.
- PRAVICA, V., ASDERAKIS, A., PERREY, C., HAJEER, A., SINNOTT, P. J., HUTCHINSON I.V. In vitro production of IFN-gamma correlates with Ca repeat

- polymorphism in the human IFN-gamma gene. **European Journal of Immunogenetics**, **26** (1): 1-3, 1999.
- PRAVICA, V., PERREY, C., STEVENS, A., LEE, J. H., HUTCHINSON I. V. A singlenucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFNgamma production. **Human Immunology**, **61** (9): 863-866, 2000.
- RAJA, A. Immunology of tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, **120**: 213-232, 2004.
- RICH, E. A. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)- stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. **Tubercle Lung Disease**, **78**: 247-255, 1997.
- RICHARDS, A. L., OKUNO, T., TAKAGAKI, Y., DJEU, J. Y. Natural cytotoxic cell specific cytotoxic factor produced by IL-3-dependent basophilic/mast cells. Relationship to TNF. **The Journal of Immunology**, **141**: 3061-3066, 1988.
- RINDERKNECHT, E., O'CONNOR, B. H., RODRIGUEZ, H. Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. **Journal of Biological Chemistry**, **259**: 6790-6797, 1984.
- ROBERTSON, S. A., SEAMARK, R. F., GUILBERT, L. J., WEGMANN, T. G. The role of cytokines in gestation. **Critical Reviews in Immunology**, **14**: 239-292, 1994.
- ROJAS, R. E., BALAJI, K. N., SUBRAMANIAN, A., BOOM, W. H. Regulation of human CD4+  $\alpha\beta$  T cell receptor positive (TCR+) and  $\gamma\delta$  TCR +T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor  $\beta$  . **Infection and Immunity**, **67** (12): 6461-6472, 1999.



- ROSEMBERG, J. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, **7**: 5-29, 1999.
- ROY, S., MCGUIRE, W., MASCIE TAYLOR, C. G., SAHA, B., HAZRA, S. K., HILL, A.V. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepomatous leprosy. **Journal of Infectious Disease**, **176**: 530-532, 1997.
- RUFFINO, A. N. Tuberculosis: the neglected calamity. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, **35** (1): 51-58, 2002.
- RUFINO, A. N., SOUZA, A. M. A. F. Evolution of the health sector and tuberculosis control in Brazil. **Revista Panamericana Salud Publica**, **9** (5), 2001.
- SARVESTANI, E. K., MERAT, A., TALEI, A. R. Polymorphism in the genes of alpha and beta tumor necrosis factors (TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$ ) and gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) among Iranian women with breast cancer. **Cancer Letters**, **223** (1): 113-119, 2005.
- SALLAKCI, N., COSKUN, M., BERBER, Z., GURKAN, F., KOCAMAZ, H., UYSAL, G., BHUJU, S., YAVUZER, U., SINGH, M., YEGIN, O. Interferon-gamma gene +874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. **Tuberculosis**, **87** (3): 225-230, 2007.
- SCHULTZ, R. M., KLEIN SCHMIDT, W. Functional identity between murine interferon and macrophage activating factor. **Nature**, **305** : 239-240, 1983.
- SELVARAJ, P., KANNAPIRAN, M., KURIAN, S. M., NARAYANAN, P. R. Effect of plasma lysozyme on live *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Science**, **81** (2): 201-203, 2001.
- SELVARAJ, P., SRIRAM, U., MATHAN, C., KURIAN, S., REETHA, A. M., NARAYANAN, P. R. Tumour necrosis factor alpha (-238 and -308) and beta gene

- polymorphisms in pulmonary tuberculosis: haplotype analysis with HLA-A, B and DR genes. **Tuberculosis**, **81**: 335-41, 2001.
- SESPA. Secretaria Executiva do Estado de Saúde Pública/Departamento de Controle de Endemias, Belém-Pará, 2007.
- SHAW, G., KAMEN, R. A conserved AU sequence from 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. **Cell**, **46**: 659-667, 1986.
- SHARMA S., MOHAN A., SHARMA A., MITRA D. Miliary tuberculosis: new insights into an old disease. **The Lancet Infectious Diseases**, **5**(7); 415-430, 2005.
- SMITH, J. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulences. **Clinical Microbiology Reviews**, **16** (3): 463-496, 2003.
- SMITH, S., LIGGITT, D., JEROMSKY, E., TAN, X., SKERRETT, S. J., WILSON C. B. Local role for tumor necrosis factor alpha in the pulmonary inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Infectious Immunology**, **70**: 2082-2089, 2002.
- STEAD, W. W. Variation in vulnerability to tuberculosis in America today: random, or legacies of different ancestral epidemics? **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, **5** (9): 807-814, 2001.
- STENGER, S., MODLIN, R. L. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Opinion in Microbiology**, **2** (1): 89-93, 1999.
- STITES, D. P., TERR, A. I., PARSLOW, T. G. **Imunologia Médica**. 9<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 689p., 2000.
- TAKANASHI, S., NONAKA, R., XING-ZHOU, O., BYRNE, P., DOLOVICH, J. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production

- by human peripheral blood eosinophils. **The Journal of Experimental Medicine**, **180**: 711-714, 1994.
- TORRICO, F., HEREMANS, H., RIVERA, M. T., VAN MARCK, E., BILLIAU, A., CARLIER, Y. Endogenous IFN- $\gamma$  is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **The Journal of Immunology**, **146**: 3626- 3632, 1991.
- TRENT, J. M., OLSON, S., LAWN, R. M. Chromosomal localization of human leukocytes, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **79**: 7809-7813, 1982.
- TSO, H. W., IP, W. K., CHONG, W. P., TAM, C. M., CHIANG, A. K. Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. **Genes and Immunity**, **6**: 358–363, 2005.
- TURNER, D. M., GRANT, S. C. D., LAMB, W. R., BRENCHLEY, P. E. C., DYER, P. A., SINNOTT, P. J., HUTCHINSON, I. V. A genetic marker of high TNF- $\alpha$  production in heart transplant recipients. **Transplantation**, **60** (10): 1113-1117, 1995.
- VIDYARANI, M., SELVARAJ, P., PRABHU, S., ANAND, M. S., ADHILAKSHMI, A. R., NARAYANAN, P.R. Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. **Indian Journal Medicine Research**, **124**: 403-410, 2006.
- VILCEK, J. The cytokines: an overview. **The Cytokine Handbook**, 4. Ed., Angus W Thomson & Michael T. Avon: Lotze editors, 1396 p., 2003.
- WEBB, G. C., CHAPLIN, D. D. Genetic variability at the human Tumor Necrosis Factor loci. **The Journal of Immunology**, **145**: 1278-1285, 1990.

- WEIR, M. R., THORNTON, G. F. Extrapulmonary tuberculosis: Experience of a community hospital and review of the literature. **American Journal of Medicine**, **79** (4): 467-478 1985.
- WHEELOCK, F. F. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. **Science**, **149**: 310-311, 1965.
- WILLIAMS, J. G., JURKOVICH, G. J., MAIER, R.V. Interferon-gamma: a key immunoregulatory lymphokine. **Journal of Surgical Research**, **54**: 79-93, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANISATION. **Global Tuberculosis Control**. WHO Report, WHO/TB/98.237, 1998.
- WORLD HEALTH ORGANISATION. The World Health Report 2000. **Health Systems: Improving Performance**. 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report 2002: **Global tuberculosis control, surveillance, planning, financing**. 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diagnostic for tuberculosis: global demand and market potential / TRD, FIND SA**. Disponível em: <http://www.who.org>. 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global and regional incidence. Disponível em: <http://www.who.org.int/topics/tuberculosis/en/>. Acesso em 04/02/2007.
- YE, J., GHOSH, P., CIPPITELLI, M., SUBLESKI, J., HARDY, K. J., ORTALDO, J. R., YOUNG, H.A. Characterization of a silencer regulatory element in the human IFN- $\gamma$  promoter. **Journal of Biological Chemistry**, **269**: 25728-25734, 1994.
- YOUNG, H. A., GHOSH, P., YE, J., LEDERER, J., LICHTMAN, A., GERARD, J. R., PENIX, L., WILSON, C. B., MELVIN, A. J., MCGURN, M. E., LEWIS, D. B., TAUB, D. D. Differentiation of the T helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN- $\gamma$  gene. **Journal of Immunology**, **153**: 3603-3610, 1994.

- YOUNG, H. A., HARDY, K. J. Role of interferon- $\gamma$  in immune cell regulation. **Journal of Leukocyte Biology**, **58**: 373-381, 1995.
- YOUNG, D., HUSSEL, T., DOUGAN, G.: Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. **Nature Immunology**, **3**: 1026-1032, 2002.
- ZHANG, M., LIN, Y., IYER, D. V., GONG, J., ABRAMS, J. S., BARNES, P. F. T cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, **63**: 3231-3234, 1995.

ANEXOS



Universidade Federal do Pará  
Centro de Ciências Biológicas  
Laboratório de Virologia

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(Baseado na Resolução Nº 196 de 10/10/1996 do Conselho Nacional de Saúde)

1. Estou sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa *sobre avaliação dos polimorfismos nos genes das citocinas INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e o seu impacto na infecção pelo Mycobacterium tuberculosis*, que está sendo desenvolvida no Laboratório de Virologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.
2. Para que eu decida em participar ou não da pesquisa me foram prestadas as seguintes informações.
3. O título do projeto é: **“Caracterização dos polimorfismos nos genes das citocinas INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em pacientes com diferentes apresentações clínicas da tuberculose”**
4. Esta pesquisa está sendo realizada pela discente Ednelza da Silva Graça aluna do curso de Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, sob a orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto, Biomédico, Professor Adjunto III da Universidade Federal do Pará, como trabalho de Dissertação de Mestrado.
5. O objetivo da pesquisa é descrever a associação dos polimorfismos nos genes das citocinas INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e o seu possível impacto na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*.
6. Essa pesquisa não oferece riscos, porque as práticas são de uso rotineiro. Uma pequena quantidade de sangue (5mL) será coletada e posteriormente encaminhadas e estocadas a -20°C no Laboratório de Virologia da UFPA para a detecção dos polimorfismos nos genes das citocinas INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em pacientes portadores de tuberculose e para pesquisas futuras acerca do perfil imunogenético do hospedeiro humano e a infecção por este bacilo.
7. Serão utilizados materiais esterilizados descartáveis, como agulhas e seringas, não oferecendo risco para a pessoa.
8. Ninguém é obrigado a participar das pesquisas, assim como qualquer pessoa poderá deixar as pesquisas no momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa. Não haverá nenhum tipo de despesas para participação da pesquisa, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.
9. Este estudo é importante, pois não há qualquer registro na literatura avaliando a possível associação dos polimorfismos nos genes das citocinas INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e a susceptibilidade a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Avaliando o nível de associação entre esse perfil imunogenético do hospedeiro humano e a infecção por este bacilo, indo, portanto, enriquecer a literatura médica, favorecendo a comunidade científica e a sociedade de modo geral, possibilitando avanços no conhecimento sobre os mecanismos da resposta imune à tuberculose.
10. A participação na pesquisa é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de sua participação. Os dados utilizados na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação individual do participante.

Assinatura dos Pesquisadores Responsáveis.

Prontuário: \_\_\_\_\_

Protocolo: \_\_\_\_\_

#### CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, ficando claro para mim, quais são os propósitos da pesquisa, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com todas as informações, podendo retirar meu consentimento a qualquer momento sem necessidade de justificar o motivo da desistência, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízos ou perda no meu atendimento no HUIBB - UFPA.

Belém, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do(a) participante ou responsável legal

**Laboratório de Virologia**, Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Tel./Fax: (91) 3201-7587, Campus Universitário do Guamá, 66075-110, Guamá, Belém, Pará, Brasil. E-mail: [vallinoto@ufpa.br](mailto:vallinoto@ufpa.br)

**Comitê de Ética em Pesquisa CEP-CCS/UFPA**

Universidade Federal do Pará – Complexo de Aulas/CCS – Sala 14 – Campus Universitário do Guamá, 66075-110 – Belém, Pará, Tel.: (91) 3201-8028, E-mail: [cepccs@ufpa.br](mailto:cepccs@ufpa.br)



Universidade Federal do Pará



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**

Carta: 070/07 CEP-ICS/UFPA

Belém, 24 de agosto de 2007.

Ao: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto.

Senhor Pesquisador,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa intitulado: **“Caracterização dos polimorfismos nos genes das citocinas INF-y e TNF-a em pacientes com diferentes apresentações clínicas da tuberculose”** sob o protocolo nº 099/07 CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará na reunião do dia 22 de agosto de 2007.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar o relatório do mesmo até o dia 30 de dezembro de 2007, no CEP-ICS/UFPA, situado no Campus Universitário do Guamá, Campus profissional, no Complexo de sala de aula do ICS – sala 13 (Altos).

Atenciosamente,

Handwritten signature of Prof. M. Sc. Maria da Conceição S. Fernandes.

Profª. M. Sc. Maria da Conceição S. Fernandes.  
Coordenadora do CEP-ICS/UFPA