

Marilda Casela



Polimorfismo genético de citocinas e ensaio de liberação de interferon-gama- IGRA de profissionais da saúde com histórico de teste tuberculínico de repetição negativo

Salvador
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS



MARILDA CASELA

**POLIMORFISMO GENÉTICO DE CITOCINAS E ENSAIO DE
LIBERAÇÃO DE INTERFERON-GAMA- IGRA DE PROFISSIONAIS DA
SAÚDE COM HISTÓRICO DE TESTE CUTÂNEO TUBERCULÍNICO
DE REPETIÇÃO NEGATIVO**

Salvador

2016

MARILDA CASELA

POLIMORFISMO GENÉTICO DE CITOCINAS E ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE INTERFERON-GAMA- IGRA DE PROFISSIONAIS DA SAÚDE COM HISTÓRICO DE TESTE CUTÂNEO TUBERCULÍNICO DE REPETIÇÃO NEGATIVO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos órgãos e Sistemas, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Prof^a Dra. Songeli Menezes Freire

Coorientadora: Prof^a Dra. Maria Teresita Bendicho

Salvador

2016

C337 Casela, Marilda.

Polimorfismo genético de citocinas e ensaio de liberação de interferon-gama-igra de profissionais da saúde com histórico de teste cutâneo tuberculínico de repetição negativo / Marilda Casela. - Salvador, 2016

111 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Songeli Menezes Freire.

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Teresita Bendicho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2016.

Área de concentração: Estudo Integrado dos Órgãos e Sistemas.

Linha de pesquisa: Modulação dos órgãos e sistemas por agentes físicos, químicos e biológicos.

1. Tuberculose Latente - Pessoal de Saúde. 2. Pessoal de Saúde Exposição ocupacional. 3. Testes imunológicos - Técnicas de Laboratório Clínico. 4. Teste Tuberculínico. 5. Testes de Liberação de Interferon-gama. 6. Interferon gama. 7. Polimorfismo genético. 8. Citocinas. I. Freire, Songeli Menezes. II. Bendicho, Maria Teresita. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU:

577.27:616-002.5

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo incentivo;

À Dra. Songeli Menezes Freire pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação. Obrigada pelos ensinamentos, paciência e, principalmente, pela confiança na minha capacidade;

À Dra. Maria Teresita Bendicho pela coorientação, pelo incentivo, amizade e disponibilidade em ajudar sempre; colaboração de fundamental importância;

Aos colegas e funcionários do HEOM que voluntariamente participaram deste estudo, e sem os quais a realização do mesmo seria impossível;

À Dra. Ana Claudia Carneiro, pneumologista do setor de medicina ocupacional (HEOM), pela colaboração, apoio e incentivo à investigação científica;

A Silvânia, Ana Lúcia e Edna pelo apoio e ajuda na coleta das amostras;

A Rosa Guedes, Rogerio Reis, Thais Casela, Natália Fogagnoli, Eliane Menezes, Theomira Mauade, Sandra Waisel, Bruna Viana pela amizade e incentivo;

Aos estudantes de iniciação científica que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial Mariana Araújo Pereira e Samanta Queiroz dos Santos;

A todos os meus amigos, por sempre estarem presentes e pelo carinho;

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia do ICS e do HEOM;

Ao Laboratório de Imunologia do ICS (Instituto de Ciências da Saúde) por permitir a realização deste estudo e pelo suporte financeiro e técnico, em especial ao Prof. Roberto Meyer por sempre apoiar a pesquisa científica;

Ao INCT DT pelo suporte financeiro e técnico fornecido ao projeto;

Àqueles (as) cujos nomes involuntariamente não foram citados.

RESUMO

Introdução: A avaliação de risco para tuberculose (TB) em profissionais da saúde baseia-se no número de indivíduos doentes atendidos nas instituições, na evidência de sua transmissão entre pessoas dentro das instituições, ou cálculo de taxas de conversão do teste cutâneo tuberculínico (TCT). Sugere-se que os resultados negativos para este teste sejam repetidos periodicamente, de acordo com o risco que a instituição apresente e, ou, após exposições ocupacionais. O fato de apenas 10% das pessoas infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* desenvolverem a doença clínica sugere que diversos mecanismos podem desempenhar um papel importante na imunopatogênese da doença. Estudos genéticos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de identificar possíveis marcadores de predisposição ou proteção ao desenvolvimento desta doença e sugerem que o desequilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias tem um importante papel na TB.

Objetivo: Avaliar a liberação de interferon gama (IFN- γ) e o polimorfismo de citocinas nos PS com TCT de repetição, negativo e positivo, que trabalham em uma unidade de referência secundária e terciária em TB. **Métodos:** A população do estudo foi constituída por 48 profissionais TCT de repetição negativo, com resultado < 5 mm e 45 TCT positivo > 10 mm. O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total, utilizando o kit de extração de DNA mini spin Kasvi. Foi realizada a genotipagem das citocinas (IL6, IL10, TNF, IFN- γ , TGFB1) e a associação entre o polimorfismo +874T/A do gene IFN- γ ,o resultado do ensaio de liberação de interferon gama IGRA (QFT®) e o TCT. **Resultados:** Não foi observada diferença estatística no polimorfismo do gene IFN- γ +874 T/A e o resultado do IGRA e TCT. A concordância entre o TCT e IGRA foi feita utilizando o índice Kappa que mostrou $\kappa=0,24$. Os resultados relativos aos fenótipos previstos de alto (TT), intermediário (TA) e baixo produtor (AA) de IFN- γ , a partir do polimorfismo na posição +874T/A, em ambos os grupos mostrou que a maior frequência foi o de baixo produtor. Ao analisar o grupo TCT+ / IGRA +, os dados mostram correlação dos testes in vivo e in vitro para reatividade em 24 indivíduos. O polimorfismo desses indivíduos tem o perfil dos fenótipos previstos de baixo produtor, sendo apenas 6 de intermediário e 3 de alto produtor. **Conclusão:** A concordância entre o TCT e o IGRA na população estudada é mediana e não foi observada diferença no polimorfismo do gene IFN- γ +874T/A para frequência de fenótipo previsto de baixo produtor, comparando os grupos do estudo e seus respectivos IGRA. Os polimorfismos dos genes IFN γ +874T/A, TNF -308G/A, IL6 -174G/C IL10 - 1082G/A, -819C/T e -592C/A e TGF β 1 - 509 C/T não parecem ser marcadores de predisposição ou proteção ao desenvolvimento da TBIL. Foi encontrada diferença estatística no gene TGF1 +869 T/C.

Palavras-chave: Profissionais da Saúde TCT, Polimorfismo de citocinas IFN- γ , IGRA -QFT®.

ABSTRACT

Introduction: The evaluation risk for tuberculosis (TB) in health care workers is based on the number of individuals in medical attendance in health care institutions, the evidence of transmission between people inside an institution, or by the tuberculin skin test conversion. It is suggested that negative results in tuberculin skin test should be repeated periodically based on the risk of acquiring tuberculosis on each institution or after occupational exposition. The fact that only 10% of exposed people to *Mycobacterium tuberculosis* develop clinical illness suggests that several mechanisms can play an important role in the immunopathogenesis of the disease. Studies have been developed to try to identify genetic markers of predisposition on protection claiming that the production of cytokines may be implicated in the pathogenesis of tuberculosis and the development of clinical disease. **Objective:** To determinate the level of interferon gamma (IFN- γ) and the polymorphism of cytokine production on patients with repeatedly negative and positive tuberculin skin test in an unit of reference in tuberculosis treatment. **Methods:** The group of individuals is composed of 48 professionals with tuberculin skin test negative (< 5mm) and 45 professionals with tuberculin skin test positive (>10mm). The genetic DNA was extracted from serum, using extraction kit for DNA "mini spin Kasvi". Cytokines genotyping was performed of IL-6, TNF, IFN, TGFB1 and IL-10 as well as association between polymorphism +874T/A of IFN- γ gen and response to the tuberculin skin test or the IFN gamma essay. **Results:** No statistical significant difference was observed in the genetic polymorphism +874 T/A of the IFN- γ and tuberculin skin test results or IFN gamma essay. The currency of skin tuberculin test and IFN gamma was based on Kappa index shown $k=0,24$. The analysis of phenotypes as high (TT), intermediate (TA) or low (AA) producers of IFN gamma has shown that the highest frequency was of low producers. Skin tuberculin test patients with positive data showed correlation on *in vivo* and *in vitro* tests for reactivity in 24 individuals. The polymorphism of those individuals has the same profile of the phenotypes of low producers, 6 intermediate and 3 high producers. **Conclusions:** It was observed a median correlation level between the groups. It was also observed an statistic difference in genetic polymorphism for the phenotype TGF β 1 +869T/C ($p=0,0402$), but it was not observed difference in genetic polymorphism for the phenotype of low producers in comparison with study groups and their respective interferon gamma release assay (IGRA). The genetic polymorphism of IFN γ +874T/A, TNF -308G/A, IL6 -174G/C IL10 - 1082G/A, -819C/T e -592C/A e TGFB1 509 C/T does not seem to be predispositive markers or protection to develop TB.

Keywords: Health care professionals, tuberculin skin test, cytokines polymorphisms, IFN- γ , IGRA -QFT®.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de imune ativação da tuberculose: IFN- γ , interleucina; linfócito T, linfoxina; RN/OI, intermediários reativos de nitrogênio / oxigênio; TNF...	21
Figura 2 - . Mecanismos de imune ativação da TB;	23
Figura 3 - Mapa da Distribuição da Tuberculose Infecção Latente nos 113 países com renda alta ou de rendimento médio superior com uma taxa de incidência estimada de menos de 100/100.000 habitantes, que são o público principal das diretrizes da gestão de infecção	26
Figura 4- Fotografia representativa de um gel de agarose pós-eletroforese de produtos de DNA amplificados (PCR) de amostra de sangue de um dos indivíduos do estudo.....	51
Figura 5 -. Discriminação dos PS participantes do estudo por categoria profissional.....	58
Figura 6 - Frequência fenotípica do gene <i>IFN-γ +874A/T</i> e o teste IGRA de PS TCT negativo.....	81
Figura 7 - Frequência fenotípica do gene <i>IFN-γ +874A/T</i> e o teste IGRA de PS TCT positivo.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização sócio-demográfica dos participantes do estudo.....	57
Tabela 2 – Mediana e percentual de leucócitos e a média da PCR em sangue periférico dos participantes do estudo.....	59
Tabela 3 - Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas previstas para o polimorfismo +874 T/A (rs 2430561) do gene de <i>IFN-γ</i> dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo.....	61
Tabela 4 – Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas previstas para o polimorfismo -174 G/C (rs 1800795) do gene de <i>IL-6</i> dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo.....	64
Tabela 5 – Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas previstas para o polimorfismo -308 G/A (rs1800629) do gene <i>TNF</i> dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo.....	66
Tabela 6 – Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas previstas para os polimorfismos -1082 A/G (rs1800896); -592C/A (rs1800872), -819C/T (rs1800871) do gene <i>IL-10</i> dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo.....	69
Tabela 7 – Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas previstas para o polimorfismo -869T/C códon 10 (rs 1800470) do gene <i>TGFβ1</i> dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo.....	72
Tabela 8 – Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas previstas para o polimorfismo códon 25G/C (rs1800469) do gene <i>TGFβ1</i> -509 C/T dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo.....	73

Tabela 9 – Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas previstas para o polimorfismo do gene de *TGF-β1* códon 10T/C (rs 1800470) e códon 25G/C (rs1800469) do gene *TGFβ1* dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo.....74

Tabela 10 – Comparação entre os resultados de teste cutâneo tuberculínico (TCT) e ensaio de detecção de interferon gama (IGRA).....77

Tabela 11 - Fenótipo previsto e polimorfismo genético do *IFN-γ* +874A/T em relação ao IGRA e TCT.....80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente
- BCG – Bacilo de Calmette Guérin
- CFP-10 – Cultura de Proteína Filtrada 10 kDa
- DNA – Ácido desoxiribonucleico
- ESAT-6 – Antígeno Secretório 6 kDa
- ELISA – Ensaio de Absorção Imunoensaio
- IFN- γ – Interferon-Gama
- IGRA – Ensaio de Liberação de Interferon-Gama
- IL – Interleucina
- LT – Linfócito T
- M. – *Mycobacterium*
- MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
- NK – Células Matadoras Naturais
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PAMP – Padrão molecular associado a patógeno
- PCR-SSP – Reação de polimerização em cadeia
- PCR-SSP – Reação de polimerização em cadeia – SSP (*primers* sequência específico)
- PNCT – Programa Nacional de Controle de Tuberculose
- PPD – Derivado Protéico Purificado
- TB – Tuberculose
- QFT® – Quantiferon®-TB Gold in Tube
- SNP – Polimorfismo de um único nucleotídeo
- TBIL – Tuberculose infecção latente
- TCT – Teste Cutâneo da Tuberculina
- TGF- β – Fator de Transformação do Crescimento Beta
- Th – Células T Helper
- TNF – Fator de Necrose Tumoral
- Treg – T regulatória

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO	18
2.2 IMUNOPATOGENESE DA TUBERCULOSE	18
2.2.1 Tuberculose primária.....	21
2.2.2 Tuberculose secundária	22
2.2.3 Tuberculose Infecção latente	23
2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	27
2.3.1 Teste Cutâneo Tuberculínico - TCT	27
2.3.2 Ensaio de liberação de IFN- γ (IGRA)	29
2.3.3 Radiografia do tórax - RX.....	30
2.3.4 Baciloscopia	31
2.3.5 Cultura para microbactéria	31
2.3.6 Diagnóstico molecular	32
2.4 POLIMORFISMO GENÉTICO DE CITOCINAS	32
2.4.1 IFN- γ e o polimorfismo no gene <i>IFN-γ +874T/A</i> (rs 2430561).....	35
2.4.2 TGF- β 1 e o polimorfismo no gene <i>TGFβ1 -869T/C</i> códon 10 (rs 1800470) e <i>TGFβ1 -509C/T</i> códon 25 (rs 1800469).....	36
2.4.3 TNF e o polimorfismo no gene <i>TNF -308G/A</i> (rs1800629).....	38
2.4.4 IL-10 e o polimorfismo no gene <i>IL10 -819C/T</i> (rs1800871), <i>IL-10 -592C/A</i> (rs1800872), <i>IL-10 -1082A/G</i> (rs1800896);	40
2.4.5 IL-6 e o polimorfismo no gene <i>IL6 -174G/C</i> (rs 1800795)	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4 HIPÓTESES.....	45

5 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	48
5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5.3 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	48
5.3.1 Critérios de Inclusão.....	49
5.4 COLETA E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....	50
5.4.1 Extração do DNA Genômico.....	50
5.4.2 Genotipagem de Citocinas (<i>IL-6</i> , <i>IL-10</i> , <i>TNF</i> , <i>IFN-γ</i> e <i>TGF-β1</i>).....	51
5.4.3 Revelação do Resultado em Gel de agarose.....	52
5.4.4 Dosagem de IFN-γ- IGRA (QFT®).....	53
5.5 FLUXOGRAMA DO ESTUDO.....	55
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	56
6.1 DADOS SÓCIODEMOGRÁFICOS E LABORATORIAIS DOS GRUPOS DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE PARTICIPANTES DO ESTUDO.....	57
6.1.1 Grupo TCT de repetição negativo.....	57
6.1.2 Grupo TCT positivo.....	58
6.2. RESULTADOS DO HEMOGRAMA E PCR ULTRA SENSÍVEL.....	59
6.3 POLIMORFISMO EM GENES DE CITOCINAS.....	61
6.3.1 Polimorfismo do gene do <i>IFN-γ</i> +874 T/A (rs 2430561).....	61
6.3.2 Polimorfismo do gene <i>IL6</i> -174 G/C (rs1800795).....	64
6.3.3 Polimorfismo no gene <i>TNF</i> na posição -308 G/A (rs1800629).....	66
6.3.4 Polimorfismo no gene <i>IL10</i> nas posições -1082A/G (rs1800896); -592C/A (rs1800872), -819C/T (rs1800871).....	68
6.3.5. Polimorfismo no gene <i>TGFβ1</i> -869T/C códon 10 (rs 1800470) e <i>TGFβ1</i> - 509C/T códon 25 (rs 1800469).....	71
6.3.5.1 Códon 10 (rs 1800470) do gene <i>TGFβ1</i> -869T/C.....	71
6.3.5.2 Códon 25G/C (rs1800469) do gene <i>TGFβ1</i> -509 C/T.....	72

6.3.5.3 Distribuição das frequências fenotípicas códon 10T/C (rs 1800470) e códon 25G/C (rs1800469) do gene <i>TGFβ1</i>	73
6.4 CORRELAÇÃO ENTRE O TCT E IGRA	75
6.4.1 Resultados do TCT de repetição negativo e TCT positivo em comparação ao IGRA.	76
6.4.2. Associação entre o polimorfismo +874 A/T do gene <i>IFN-γ</i> e o resultado do IGRA e TCT.....	78
7 CONCLUSÕES	84
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.	86
9 REFERÊNCIAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), sendo considerada um problema de saúde global. Estima-se que em 2014 ocorreram 9,6 milhões de novos casos de TB levando a um milhão de óbitos. O Brasil ocupa o 16º lugar em número absoluto de casos, entre os 22 países que são considerados prioridade pela OMS e responsáveis por 80% do total de casos de TB (WHO, 2015a).

Em geral, a fonte de infecção é o indivíduo com a forma pulmonar da doença, ao eliminar bacilos para o exterior. Calcula-se que, durante um ano, numa comunidade, um indivíduo bacilífero poderá infectar, em média, de 10 a 15 pessoas (BRASIL, 2002a).

Entre os principais fatores de risco para a TB infecção latente (TBIL) e TB doença em profissionais de saúde (PS) destacam-se o tempo e a frequência de exposição ao bacilo, a atividade profissional e o contato com espécimes clínicas infectantes (BRASIL, 2011a).

Outros aspectos relacionados ao mecanismo de transmissão são a suscetibilidade, o estado imunológico do indivíduo exposto, a carga bacteriana e fatores ambientais (CDC, 2010).

O contato com o bacilo da TB pode resultar em três condições distintas no hospedeiro: a eliminação dos bacilos, impedindo a infecção; a TBIL, onde há controle, mas não eliminação da infecção e TB doença (GIDEON et al., 2011).

Desse modo, dentre as pessoas expostas a esse patógeno, 30-50% tornam-se infectadas – o que denominamos de TBIL – e 5 a 10% desenvolverão a doença. A TBIL pode ser contida por meio de uma resposta imune celular efetiva e persistir neste estágio de latência por muitos anos sem os indivíduos apresentarem os sintomas da doença. Entretanto, se houver condições de depressão imunológica, este equilíbrio pode ser rompido e o indivíduo desenvolver a TB ativa (MENZIES et al., 2011).

Os profissionais de saúde (PS) constituem uma das categorias para fatores de risco para TB, em comparação com a população geral. Estudos evidenciam que algumas categorias de PS têm maior probabilidade de infecção do que outras. Dentre estas, a equipe de enfermagem (três a vinte vezes), patologistas clínicos (seis a onze), técnicos de laboratório de bacteriologia (duas a nove), pneumologistas tisiologistas (seis vezes) e estudantes de medicina / enfermagem / fisioterapia (quatro a oito vezes), assim como o PS portador de alguma condição que afete sua

resposta imunológica, têm risco mais elevado de desenvolver a doença (ANDRADE, 2001; FÁVERO et al., 2012).

A investigação da TBIL em PS deve ser verificada através dos exames admissionais e periódicos por meio do teste cutâneo tuberculínico (TCT). Em 1999, foi elaborada uma portaria que instituiu uma lista de doenças relacionadas ao trabalho na qual inclui a TB (BRASIL, 2006; BRASIL, 2008).

A transmissão nosocomial da TB em unidades de saúde pode acometer tanto os PS como os pacientes atendidos. Diante de tal fato, ressalta-se que o risco de transmissão da doença não se relaciona com o tipo de unidade de saúde, mas sim com o fato do PS compartilhar o mesmo espaço físico com o portador de TB ou ter contato com espécimes clínicas infectantes (JENSEN et al., 2005).

Diversos estudos, realizados em diferentes etnias, têm identificado associações entre os polimorfismos de base única (SNPs) em diversos genes candidatos na modulação da resposta imune a TB, entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela suscetibilidade ao bacilo ainda não estão bem esclarecidos.

No presente estudo foi avaliado o teste de ensaio de liberação de interferon gama (IGRA) e o polimorfismo em genes de citocinas de profissionais da saúde com TCT de repetição negativo e TCT positivo e a caracterização do fenótipo previsto do polimorfismo do gene *IFN- γ* +874 T/A (rs 2430561) em relação ao IGRA e TCT de PS que trabalham em uma unidade de referência secundária e terciária para TB.

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

O *M. tuberculosis* pertence à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, e é a principal espécie do complexo *M.tuberculosis*.

O complexo *M.tuberculosis* refere-se ao grupo de espécies (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *M. bovis*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedi*) que são geneticamente muito semelhantes (FORRELLAD et al.,2013)

Geneticamente, as espécies do complexo *M. tuberculosis* têm 99,9% de homologia da sequência de nucleotídeos, assim como sequências idênticas do RNA ribossomal 16S. O genoma é rico em DNA repetitivo e sequências de inserção (IS) como IS6110 e IS1081 (SMITH, 2003).

A sequência do genoma melhor caracterizado é o *M. tuberculosis* H37Rv, que compreende 4.411.529 pares de bases, cerca de 4.000 genes, e possui alto teor de guanina e citosina. A partir da sequência do genoma, identificou-se que o bacilo da TB é capaz de sintetizar todos os elementos essenciais como: aminoácidos, vitaminas e cofatores enzimáticos, embora algumas das vias envolvidas possam ser diferentes daquelas encontradas em outras bactérias e também possa metabolizar uma variedade de fontes de carbonatos, hidrocarbonetos, álcoois, cetonas e ácidos carboxílicos (COLE et al.,1998).

2.2 IMUNOPATOGÊNESE DA TUBERCULOSE

Após a inalação do bacilo, as barreiras físicas como os pelos nasais, a angulação das vias aéreas são os mecanismos iniciais da resistência inespecífica.

No entanto, esse sistema de defesa pode não ser eficiente e os bacilos podem atingir os alvéolos pulmonares e a infecção tuberculosa tem início. A probabilidade de a infecção evoluir para TB doença depende das características do bacilo e dos fatores imunes do hospedeiro.

A imunidade mediada por células desempenha um papel importante no desenvolvimento dos sintomas da doença. Dentre os sintomas clássicos da TB

pulmonar destacam-se a tosse persistente, produtiva ou não (com muco e eventualmente sangue), febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento.

Os mecanismos envolvendo a integridade do sistema imune, a relação entre macrófagos e linfócitos T, a virulência da cepa infectante, a concentração do bacilo inalado, fatores genéticos, ou induzidos pela própria micobactéria como mecanismo de escape, têm papel importante na patogenia (SILVA et al., 2004; TEIXEIRA et al. 2007).

A fagocitose do *M. tuberculosis* mediada pelo macrófago alveolar e possivelmente pelas células dendríticas é um fator desencadeante de todo o processo de infecção-doença. Esse mecanismo tem seu início com a fusão do fagossoma contendo o bacilo com o lisossoma onde se encontram substâncias nocivas cujo objetivo é a destruição do bacilo. O fagolisossoma formado liga-se ao bacilo por meio de receptores de complemento e principalmente do receptor de manose. No entanto, a glicoproteína lipoarabinoman, presente na superfície do bacilo, pode mediar a interação entre os receptores de manose e a micobactéria. Dentro do fagolisossoma, o bacilo sofre a ação do pH ácido e de intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio de enzimas lisossômicas, de peptídeos tóxicos e do interferon gama (IFN- γ). Porém, o bacilo pode resistir aos mecanismos imunes e multiplicar-se dentro dos macrófagos (CAMPOS, 2006).

As células dendríticas e os macrófagos do tecido invadido têm uma variedade de receptores dentre esses o grupo do sistema inato, os receptores *Toll-Like* (TLRs), que desencadeiam uma grande variedade de moléculas de reconhecimento de patógenos (PAMPs). Os TRLs humanos abrangem uma família de proteínas da superfície celular que estimulam a transcrição de genes de citocinas inflamatórias em resposta a vários ligantes microbianos. Desse modo, estes receptores contribuem para o sistema imune inato através do reconhecimento de patógenos e induzem o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Quando estes receptores são ativados, inicia-se uma cascata de sinalização que envolve diversas proteínas intracelulares (YIM et al., 2010).

O reconhecimento do *M. tuberculosis* pelos TLRs inicia uma cascata de sinalização resultando na produção das citocinas tais como: o fator de necrose tumoral (TNF), a Interleucina 1 (IL-1), a IL-12 e os reativos intermediários do nitrogênio, contribuindo assim para uma rápida ativação dos mecanismos da resposta imune. Uma vez que somente a resposta imune inata não elimine o

patógeno, haverá necessidade da participação da resposta imune adaptativa que pode ser mediada por anticorpos ou células (ARANCIBIA et al.,2007).

Os macrófagos, além de serem células efetoras, funcionam como células apresentadoras de antígenos (APCs) que pode resultar na resposta imune adaptativa de células T em Th1 ou Th2, fundamentada no reconhecimento específico entre diferentes células e a secreção de fatores solúveis como as citocinas e quimiocinas. Células CD4⁺ de perfil 1 (Th1) exercem uma função efetora na resposta imune contra o bacilo (NORTH et al., 2004, RUSSELL et al., 2007).

As células NK, células citotóxicas da imunidade inata, são ativadas diretamente por bactérias ou, indiretamente, em resposta à citocina IL-12, proveniente de macrófagos ativados. As células NK ativadas induzem a produção de IFN- γ por linfócitos Th1, que resulta na morte do bacilo. Além disso, o IFN- γ estimula o monócito a produzir TNF, que por sua vez estimula a atividade bactericida intracelular (MOUTINHO et al.,2011).

Esta ativação resultará na produção de peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, óxido nítrico e enzimas lisossomais que sinergizam para destruir o patógeno. O macrófago ativado via IFN- γ pode ainda limitar o crescimento do bacilo por maturação do fagossoma através do fagolisossoma e autofagolisossoma. Entretanto, os macrófagos ativados via TLR2 induzem a resposta Th2, com liberação de IL-10, TGF β e IL-6, o que leva à inibição da resposta Th1.

A expressão de arginase 1 pelo macrófago via Th2 reduz o potencial microbicida por óxido nítrico e formação de granuloma. O equilíbrio inflamatório na formação do granuloma inclui células Th17 produtoras de IL-17 que potencializam a resposta Th1. A IL-17 também contribui para o recrutamento de neutrófilos, que aumentam o processo inflamatório e a formação do granuloma.

As células TCD8⁺ citotóxicas têm papel fundamental na eliminação das bactérias intracelulares, através da lise das células infectadas (TEIXEIRA et al.2007).

Dentre as citocinas liberadas pelos linfócitos na resposta Th1, que potencializam as defesas do hospedeiro, inclui-se o fator de necrose tumoral (TNF), que induz a necrose de caseificação, a Interleucina - 2 (IL-2) e o IFN- γ , que tornam os macrófagos ativados e mais letais para o bacilo. Por outro lado, se a diferenciação for para a resposta imune do perfil Th2, serão liberadas citocinas como o fator transformador de crescimento beta (TGF- β), citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, que

inibem a proliferação de linfócitos T e regulam negativamente o IFN- γ e o TNF, inibindo a ativação do macrófago e comprometendo as defesas contra a bactéria demonstrada na figura 1 (LOPES et al.,2006).

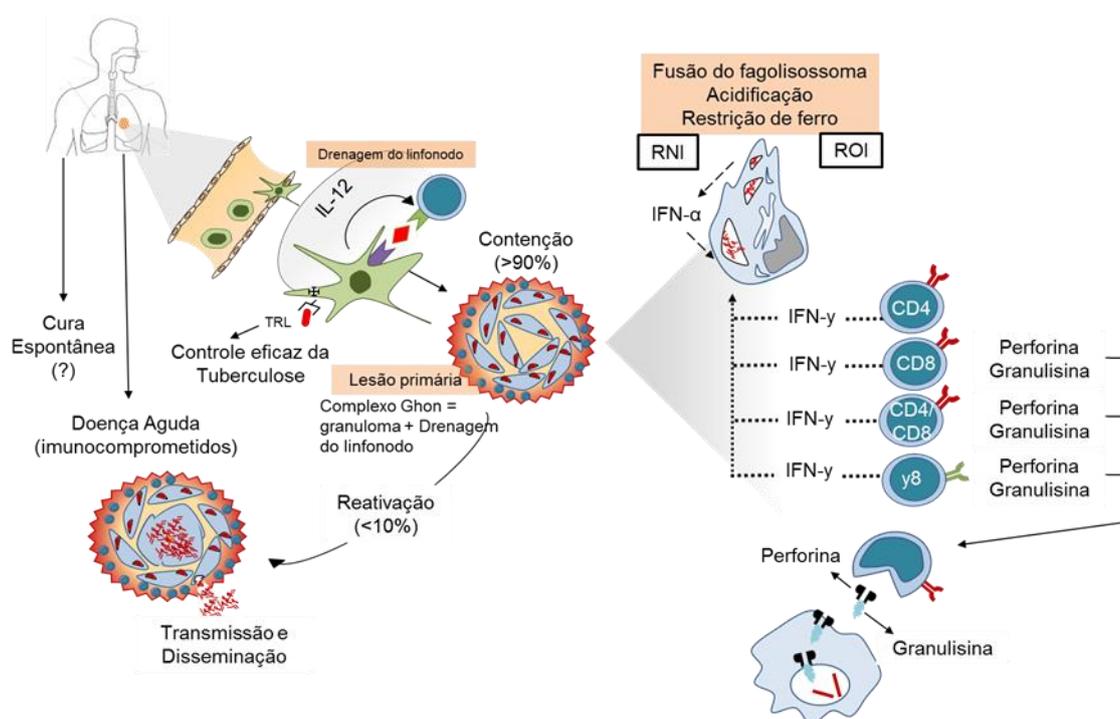


Figura 1 – Mecanismos de ativação imune da tuberculose: IFN- γ , interleucina; linfócito T, linfotóxina; RN/OI, intermediários reativos de nitrogênio / oxigênio; TNF.

Fonte: Adaptado de KAUFMANN, 2005.

2.2.1 Tuberculose primária

A TB primária ocorre quando o indivíduo entra em contato com o bacilo pela primeira vez e a principal via de transmissão é aérea. Dessa maneira, as barreiras naturais, a imunidade inata e adaptativa participa do mecanismo de defesa contra esse agente.

Cerca de duas semanas após o início da infecção há o desenvolvimento de uma resposta imune detectada por uma positividade no TCT. Uma vez o bacilo inalado, ele é fagocitado pelo macrófago alveolar e células dendríticas que circulam na mucosa. Estas células migram para o linfonodo mediastinal e iniciam a maturação das células T. Os macrófagos alveolares incapazes de conter a infecção

acabam produzindo citocinas que estimulam a migração de células sanguíneas para auxiliá-los. As primeiras células que chegam são os polimorfonucleares. Há formação de uma reação inflamatória inespecífica e em seguida mais macrófagos são direcionados para o local da infecção. Tanto os polimorfonucleares como os macrófagos são capazes de fagocitar os bacilos; porém, nesta etapa, estas células são incapazes de destruí-los totalmente (CRUVINEL et al., 2010).

Após 3 a 4 semanas da infecção, os macrófagos ativados secretam citocinas quimiotáticas, IFN- γ , TNF, cuja finalidade é atrair células T para formar um granuloma estável que conterá os bacilos. A TB primária pode evoluir para uma cura bacteriológica, permanecer latente ou ocorrer uma disseminação bacilar por via linfática ou hematológica, produzindo lesões em diversos órgãos (ARAUJO et al., 2008).

2.2.2 Tuberculose secundária

A doença secundária ocorre após uma infecção primária devido à reativação do bacilo por origem endógena ou por origem exógena, a partir de uma nova exposição à micobactéria. A formação de lesões cavitárias pulmonares é a característica mais importante da tuberculose secundária (KAUFMANN et al., 2005).

O mecanismo da imunopatogênese da TB e a sequência de eventos na TB pulmonar primária e secundária estão mostrados na figura 2.

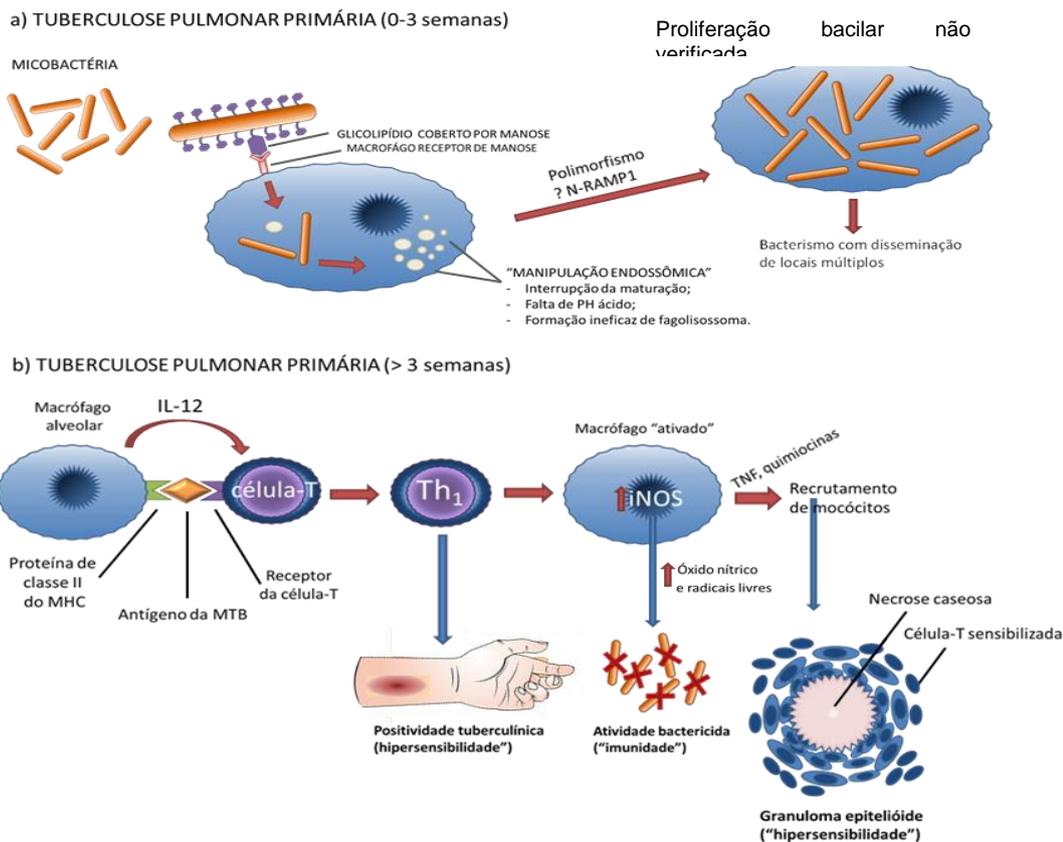


Figura 2 – Mecanismos da imunopatogênese da TB. A sequência de eventos na TB pulmonar primária, a inalação do *M.tuberculosis* e o desenvolvimento da imunidade mediada por células. **A:** Eventos que ocorrem nas primeiras três semanas após a exposição. **B:** Eventos posteriores. O desenvolvimento de resistência ao organismo é acompanhado pelo aparecimento de um TCT positivo.

Fonte: Adaptado de Robbins et al. J. Bases Patológicas das Doenças. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

2.2.3 Tuberculose Infecção latente

A TBIL compreende o período entre a entrada do bacilo no organismo e o aparecimento da TB doença. Não são evidenciados sinais e sintomas clínicos e radiológicos de atividade da doença. Contudo, apresentam TCT positivo (BRASIL, 2011).

As bactérias intracelulares dispõem de mecanismos de escape contra a resposta imune, sendo os macrófagos os alvos preferenciais. Assim, os macrófagos

que falham na eliminação das bactérias intracelulares podem levar ao estabelecimento de uma infecção crônica que resultará na formação de uma estrutura característica conhecida como granuloma, o qual tem como finalidade conter o agente infeccioso e evitar a disseminação (MIRANDA et al.,2012).

Após o encontro entre bacilo e macrófagos nas vias aéreas, o macrófago infectado inicialmente pode facilitar a propagação da doença por necrose celular para disseminar os bacilos para outras células e promover a migração para locais distantes dos pulmões. Estes macrófagos infectados podem recrutar macrófagos não infectados para formar um granuloma. O granuloma tuberculoso consiste de um acúmulo de células fagocitárias infectadas com o bacilo da tuberculose: células linfocíticas, células dendríticas, endoteliais, fibroblastos e células estromais (DAVIS et al., 2009).

Portanto, quando há formação de granuloma, mas a replicação das micobactérias no interior dos macrófagos é baixa, a infecção fica restrita ao mesmo, levando a um estado de “equilíbrio” entre bacilo e hospedeiro, o que caracteriza a TBIL. Desse modo, o granuloma funciona não só como uma barreira imunológica, mas também anatômica, ao encapsular e calcificar o bacilo que pode sobreviver no interior do granuloma por vários anos, tornando-se um reservatório de infecção. (TUFARIELLO et al. 2003).

O TCT consiste de proteínas e polissacarídeos do *M. tuberculosis* obtidos a partir de culturas inativadas por aquecimento e posterior purificação por precipitação. Sendo o TCT também conhecido como Derivado protéico purificado (PPD).

Seu mecanismo imune é fundamentado por uma hipersensibilidade que acontece em duas fases. Primeiramente, a fase de sensibilização, em que ocorre o contato inicial das células T auxiliares (Th) com o antígeno, seguido da proliferação e diferenciação em células Th1. Posteriormente, a fase efetora, em que as células Th1 sensibilizadas secretam citocinas, mediando a reação, ativando macrófagos e células inflamatórias inespecíficas.

Assim, à inoculação do PPD inicia-se uma resposta dependente da migração de células T CD4+ produtoras de INF γ para o local da aplicação do antígeno. Estes linfócitos T sensibilizados, após o segundo contato com esse mesmo antígeno tornam-se ativados e são expressas no local de aplicação do antígeno. Os macrófagos são provavelmente as principais células apresentadoras de antígenos (APC) na reação de hipersensibilidade tuberculínica. Estudos histológicos sugerem

que células de Langerhans e CD1⁺ também podem estar envolvidas (BRASIL, 2014a).

Doze horas após o estímulo ao antígeno em um indivíduo previamente sensibilizado, há uma migração de linfócitos para as regiões perivasculares. A população de células CD4⁺ excede as de células CD8⁺ em dois por um (2:1) e levam algumas células CD4⁺ a se infiltrarem na epiderme. Em 48 horas, células CD1⁺ também são encontradas, juntamente com macrófagos e células de Langerhans, que começam a migrar para fora da epiderme. Em seguida acontece um aumento da permeabilidade vascular, com exsudação de fluídos, originando um eritema e edema local na epiderme, chegando ao pico entre 72 - 96 horas após a administração, fato que pode ser comprovado com formação de uma reação de hipersensibilidade tardia tipo IV. Esse acúmulo de células mononucleares representa o quadro histológico típico do TCT visualizado macroscopicamente. (LUNA, 2003; BRASIL, 2014b).

Para aferir o risco para TBIL quando é avaliado apenas o TCT alguns critérios são fundamentais, tais como: o tamanho do diâmetro do endurecido, idade, probabilidade de risco para TBIL e critério clínico epidemiológico.

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectado pelo bacilo da TB e o risco de TB doença para uma pessoa com TBIL é estimado em 5 a 10%. A maior parte dos casos ocorre dentro dos primeiros cinco anos da infecção (WHO, 2015).

Os dados sobre a TBIL no Brasil ainda são insuficientes, em razão da inexistência da obrigatoriedade de notificação. Até 2010, apenas alguns casos de TBIL eram tratados com quimioprofilaxia, mas, a partir deste ano, a indicação foi ampliada com o objetivo de evitar adoecimento para aquelas pessoas com maior risco de desenvolver a TB entre esses os PS. Segundo o Ministério da Saúde, devem ser consideradas condições prioritárias no processo de avaliação de contatos e tratamento de TBIL: profissionais da saúde, crianças menores de 5 anos, pessoas portadoras de condições consideradas de alto risco (transplantados, uso de corticosteroides, insuficiência renal, dentre outras (BRASIL,2010).

Em 2015, a Organização Mundial da Saúde expandiu a coleta de dados relacionados com a TBIL enfatizando que é importante a realização de um estudo especial das políticas e das práticas existentes em países com uma renda alta e média e com uma taxa de incidência de menos de 100 por 100 000 habitantes. Os

objetivos específicos incluem identificar e priorizar os grupos de risco da população para a intervenção direcionada de testes e tratamento para TBIL, incluindo a definição e opções de tratamento. Os países de recursos limitados e outros países de renda média que não pertencem à categoria acima (como no caso o Brasil, por prática de vacina BCG e por sua alta epidemiologia) devem aplicar estas orientações às pessoas que vivem com HIV e crianças abaixo de 5 anos de idade que são contactantes de TB. Estas estratégias dependentes do resultado do TCT, como em contato recente de TB, HIV positivo, candidatos a transplantes, imunossuprimidos, uso de anti TNF, devem levar em conta um halo ≥ 5 mm, e para indivíduos com silicose, diabetes mellitus, neoplasia, entre outros, o tamanho do halo deve ser ≥ 10 mm. Também foi sugerido que essas estratégias podem ser usadas como base para diretrizes nacionais, conforme mostrado na figura 3.

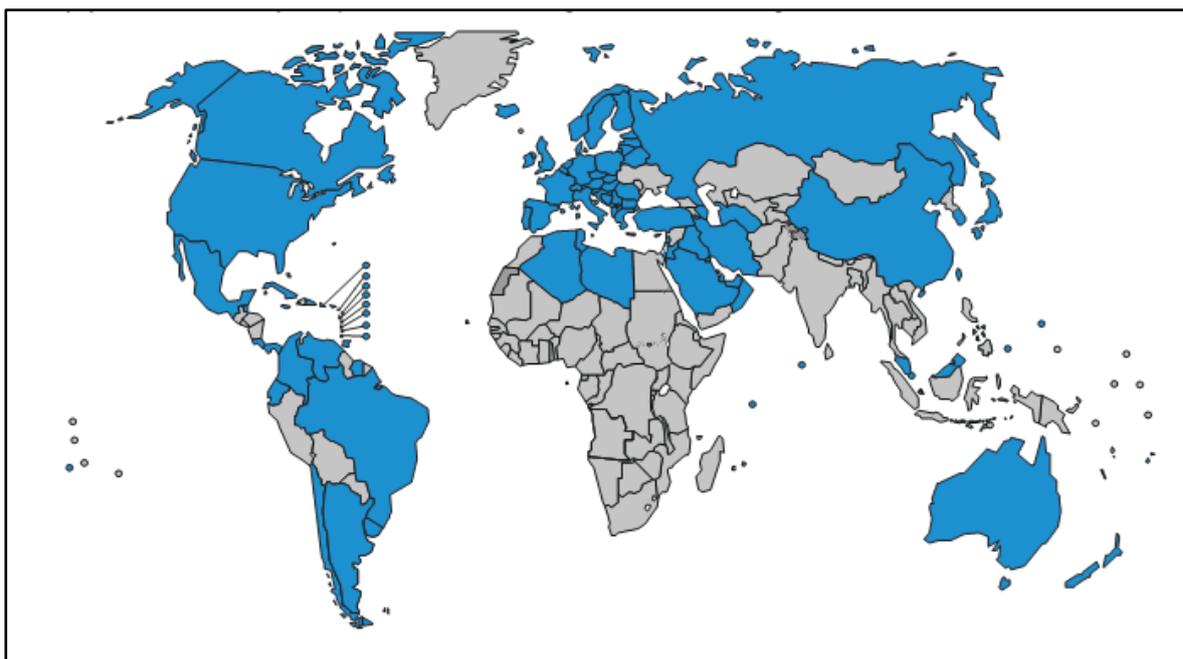


Figura 3 – Mapa da Distribuição da TBIL nos 113 países com renda alta ou de rendimento médio superior com uma taxa de incidência estimada de menos de 100/100.000 habitantes – público principal das diretrizes da gestão de TBIL.

Fonte: Global Tuberculosis Report: WHO,2015.

A referida estratégia sugere que o sistema de coleta e análise de dados de rotina para identificação de TBIL é necessário em todos os países e deve ser

notificada a falta de PPD para o TCT. Outra recomendação é que o teste do IGRA não deve substituir o TCT em países de baixa e média renda. Recomenda-se também a triagem dos sintomas e da radiografia de tórax, antes de iniciar o tratamento para a exclusão de TB ativa e inclusão de TBIL.

2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico precoce e o início de tratamento da TB interrompe o ciclo de transmissão do bacilo, que é fundamental para o controle da doença, além de reduzir a morbidade e a mortalidade.

Em um estudo sobre diagnóstico de TB no Brasil foi evidenciado que mais de um terço dos casos novos eram notificados sem confirmação diagnóstica laboratorial e que cerca de 20% desses casos não representavam casos verdadeiros da doença; situação essa que comprometia o correto diagnóstico, o uso de medicamentos tuberculostáticos, sem necessidade, e o risco de hepatotoxicidade (BELO et al., 2010).

No Brasil, o diagnóstico da TB está fundamentado na avaliação clínica, realização de cultura para a micobactéria, exame de baciloscopia, radiografia do tórax, TCT, IGRA (BRASIL, 2011), e desde 2013 o Ministério da Saúde, por meio da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS, de acordo com o relatório nº 49, iniciou a implantação do teste rápido GeneXpert para o diagnóstico da TB, que utiliza técnicas de biologia molecular para identificar o DNA do *M.tuberculosis* e resistência à rifampicina.

2.3.1 Teste Cutâneo Tuberculínico - TCT

O TCT é o exame padronizado para o diagnóstico da TBIL no Brasil, na rede pública. Avalia a resposta imune celular *in vivo* contra o antígeno do *M. tuberculosis*. No Brasil é utilizado o PPD - RT 23 (*Statens Serum Institut* Copenhagen - Denmark), que é aplicado segundo técnica e material preconizados pela OMS e caracteriza-se por uma reação de hipersensibilidade cutânea tardia tipo IV.

A aplicação e a leitura do TCT devem ser feitas por profissionais treinados e deverá ser realizada de 48 a 72 horas, podendo em determinadas condições ser realizada com 96 horas. O resultado é registrado em milímetros.

A classificação isolada em não reator, reator fraco e reator forte não estão mais recomendadas, pois a interpretação do teste e seus valores de corte podem variar de acordo com a população e o risco de adoecimento. Recomenda-se como teste positivo uma endureção igual ou superior a 5 mm. Neste sentido, a interpretação clínica diante do resultado depende do risco de adoecimento por TB, tamanho do diâmetro do endurecido, idade, probabilidade de TBIL, critério epidemiológico. É importante ressaltar que a correta interpretação do teste é importante para tomada de decisão sobre a indicação do tratamento da TBIL (BRASIL, 2011).

Devido à especificidade e a sensibilidade serem variáveis e dependentes do ponto de corte, algumas limitações deverão ser relatadas: o antígeno utilizado neste teste compartilha vários epítomos antigênicos com a vacina BCG e com a maioria das micobactérias não tuberculosas, portanto incapaz de distinguir com segurança pessoas vacinadas com BCG daquelas expostas a micobactérias do ambiente ou infectadas com *M. tuberculosis*. Esses fatos podem ser interpretados como resultados falso-positivos (ANDERSEN et al., 2005).

Os resultados falso-negativos estão associados ao método de aplicação, à leitura e ou à anotação dos resultados, conservação e contaminação do PPD, idade maior que 65 anos, desidratação, desnutrição, imunossupressão, diabetes *mellitus* e outras condições metabólicas: febre no período da leitura, vacinação com vírus vivos, doenças linfoproliferativas, neoplasias, gravidez, crianças com idade inferior a 3 anos e anergia por HIV (FIOCRUZ, 2008).

Outro fato que deve ser considerado em relação ao TCT são os indivíduos anérgicos que mesmo infectados pelo *M tuberculosis* não reagem ao PPD. A explicação para o estado anérgico na TB ainda não está completamente compreendida, no entanto o teste anérgico pode ser encontrado em pacientes com

TB disseminada ou avançada, desnutrição severa, deficiência imune devido ao HIV e imunossupressão quimioterápica, e estima-se em 5% a população infectada que não responde ao TCT (SANT'ANNA et al., 2002).

Pode ocorrer o chamado efeito *booster*, que ocorre quando se procede a várias e subsequentes aplicações do PPD. A reação observada nesses casos representa a reativação da resposta ao antígeno devido à perda da resposta dos linfócitos T de memória (BCG ou infecção antiga por *M.tuberculosis*). Esse fato levaria algumas pessoas à resposta negativa da TCT, mesmo infectado, fato que está presente em cerca de 6% dos PS (BRASIL, 2011).

Os Critérios para interpretação do TCT em PS de acordo com o MS são os seguintes:

- a) TCT < 10 mm deverá ser repetido após uma a três semanas para avaliação do efeito *booster*;
- b) Efeito *booster* positivo recomenda-se não repetir o TCT;
- c) Persistência de TCT < 10 mm: repetir o TCT a cada 12 meses, quando o PS atuar em locais de elevado risco para TB e será considerada TBIL recente quando ocorrer conversão do TCT, caracterizado por um aumento de 10 mm em relação ao valor anterior, nesse caso, considerar o tratamento preventivo;
- d) TCT \geq 10 mm, documentar essa informação, afastar TB ativa. Nesse caso, não será necessária a repetição do teste se o PS já tiver documentado um TCT \geq 10 mm, mas, em caso de dúvida, ou de um TCT < 10 mm, este teste deve ser avaliado como se nunca tivesse sido testado.

2.3.2 Ensaio de liberação de IFN- γ (IGRA)

O princípio deste teste é a medida dos níveis do IFN- γ produzido *in vitro* por células T que tenham sido estimuladas por antígenos de TB purificados ou sintetizados, e recomenda-se que seja interpretado em conjunto com a avaliação de risco, radiografia do tórax, avaliações clínicas e de diagnóstico para a TBIL e TB doença.

A descoberta das proteínas antigênicas das micobactérias (*early secretory antigen target-6* KDa) ESAT-6 e *culture filtrate-10* KDa (CFP-10), que são

específicas e expressas pelo complexo *M. tuberculosis*, possibilitou o desenvolvimento de testes diagnósticos mais específicos para infecção por *M. tuberculosis*. O antígeno ESAT-6 é codificado e expresso pelo *M. tuberculosis* e também *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*. A CFP-10 é uma proteína específica do *M. tuberculosis*. Desse modo, esses antígenos são reconhecidos pelo sistema imune de pacientes com TB ativa pulmonar ou extrapulmonar e também com TBIL (RENSHAW et al, 2005; PENG et al., 2011).

Os antígenos ESAT-6 e CFP- 10 estão codificados na região de deleção 1 (RD-1) do genoma do *M. tuberculosis*, ausente no genoma do *M. bovis* / BCG e na maioria das micobactérias ambientais. Portanto, os antígenos codificados por essa região específica são a base destes testes e possuem sensibilidade maior que o TCT, pois não sofrem influência da vacina BCG (PAI et al., 2004).

Dentre os testes de IGRA, o mais testado clinicamente é a metodologia QuantiFERON-TB Gold In Tube (QFT®), (Cellestis, QIAGEN company, Austrália). Este teste realiza a quantificação do IFN- γ estimulados por antígenos específicos da TB, ESAT-6, CFP-10 e *antigens tuberculosis* (TB 7.7), e a detecção do IFN- γ é realizado por ELISA – do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*.

O QFT® é um exame laboratorial de sangue, *in vitro*, controlado, que não requer retorno do paciente ao laboratório para leitura. O resultado é objetivo e reproduzível, não é afetado por interpretações subjetivas, e o resultado está disponível em 24 horas. O teste apresenta elevada especificidade, acima de 98%, contra 35,4% do TCT, usando um ponto de corte de 10 mm em indivíduos saudáveis vacinados com BCG, e não discrimina TBIL e TB ativa (MORI et al.,2004).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2012), este teste deve ser recomendado no rastreio de TBIL em populações específicas com risco elevado para TB, onde se inclui os PS.

2.3.3 Radiografia do tórax - RX

A radiografia do tórax é um dos primeiros exames indicados para a investigação de sintomas respiratórios. Tem sua importância no diagnóstico da TB primária. Recomenda-se que o exame seja solicitado junto à pesquisa de *M. tuberculosis* em espécimes respiratórios para o diagnóstico de TB (SBPT, 2011).

Em um estudo realizado por Mello em 2001, na cidade do Rio de Janeiro, sobre modelos preditivos para o diagnóstico da tuberculose pulmonar paucibacilar, relatou que cerca de 30% dos pacientes foram tratados para TB com base apenas no quadro clínico-radiológico.

2.3.4 Baciloscopia

A baciloscopia, ou pesquisa de bacilo álcool ácido-resistente (BAAR), é o exame laboratorial mais utilizado no Brasil para diagnóstico da TB. O método padronizado é a técnica de Ziehl-Nielsen. Embora seja um exame rápido, de baixo custo, com alta especificidade e elevado valor preditivo positivo no Brasil, apresenta baixa sensibilidade (30 - 70%). A positividade varia de acordo com o tipo de lesão, o tipo e o número de amostras, e por este método não se diferencia as espécies de micobactérias (BRASIL, 2010).

2.3.5 Cultura para micobactéria

A cultura em meio sólido é o método considerado padrão-ouro para o diagnóstico da tuberculose e permite a identificação e a realização do teste de sensibilidade. Os meios sólidos mais utilizados são o Lowenstein Jensen e Ogawa Kudoh. Apesar de sua importância, é um processo demorado, somente é possível detectar o crescimento do bacilo entre 4 a 6 semanas após a inoculação. Há riscos de contaminação e nem sempre apresenta 100% de sensibilidade. Os sistemas automatizados BACTEC 460 TB ®, BACTEC 9000® são sistemas de detecção radiométrica que utilizam o meio líquido Middlebrook 7H12 acrescido de ácido palmítico marcado com um radioisótopo do carbono 14 (¹⁴C). Além do tempo

necessário para a execução da técnica, tanto a cultura quanto os testes de sensibilidade aos antibióticos exigem ambientes com biossegurança de nível 2 ou 3, de acordo com a metodologia utilizada, segundo recomendações para risco biológico do MS (BRASIL, 2008).

2.3.6 Diagnóstico molecular

Diversas técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas na prática laboratorial para diagnóstico da TB. Porém, essas técnicas exigem profissionais especializados; são complexas; o tempo de execução é variável; requerem uma infraestrutura diferenciada com separação de salas e procedimentos específicos para evitar contaminação, devido à sua sensibilidade.

Desde 2013, o Ministério da Saúde iniciou a implantação na rede pública de um teste rápido molecular, pela tecnologia *Point of Care*, denominado Gene Xpert MTB/RIF®, sendo utilizadas apenas amostras pulmonares. O teste detecta a presença do *M. tuberculosis* em duas horas e identifica a resistência à rifampicina como um marcador alternativo de TB multirresistente. A diferença deste para os demais testes de amplificação de ácidos nucléicos utilizados na detecção de TB é que a plataforma desse teste integra e automatiza os três processos (preparação de amostras, amplificação e detecção) necessários para a PCR em tempo real, baseada em testes moleculares. Sua metodologia utiliza um cartucho contendo todos os elementos necessários para a reação, incluindo reagentes liofilizados, tampões líquidos e soluções de lavagem (BRASIL, 2013).

2.4 POLIMORFISMO GENÉTICO DE CITOCINAS

Dentro de uma espécie os cromossomos homólogos são bastante análogos entre si, mas, em determinadas localizações do cromossomo (*loci*) pode haver variabilidade na sequência do DNA. Se a variação é localizada em uma frequência superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo. Polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos, já que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles (*linkage*); diferentes fenótipos são decorrentes de diferentes polimorfismos e podem ser fatores de risco associados à doença (KEEN et al , 2002).

Estudos de identificação de polimorfismo em genes de citocinas e seus receptores identificaram que estes genes são altamente polimórficos, mas que as sequências nos éxons são conservadas (BIDWELL et al., 1999).

O polimorfismo genético é a variação na sequência de DNA entre indivíduos que incluem o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) – uma simples troca de um nucleotídeo por outro, sequências repetitivas, inserções, deleções e recombinações, e são diferenciados pelas variações genéticas que podem ocorrer em um único nucleotídeo que pode ser a adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G).

A maioria dos SNPs não é responsável pelo estado de uma doença. Em vez disso, eles servem como marcadores biológicos para a identificação de uma doença sobre o mapa do genoma humano, porque estão geralmente localizados perto de um gene encontrado para ser associado com certas doenças.

Desta forma, um marcador genético associado a uma doença pode ser herdado pela prole. Os polimorfismos também são responsáveis pela diversidade humana, portanto, diferentes fenótipos são decorrentes de diferentes polimorfismos (GRIFFITHS et al,2005; TAKIFF et al.2007).

Fatores genéticos do hospedeiro, tais como os polimorfismos nos genes das citocinas, estão relacionados à suscetibilidade à TB. Diferenças no perfil de citocinas podem ser devidas, em parte, ao polimorfismo alélico em regiões reguladoras dos genes de citocina (BIDWELL et al., 1999).

As citocinas são proteínas produzidas em resposta a microrganismos e outros antígenos, que modulam as reações imunológicas. As respostas celulares para a maioria das citocinas consistem em alterações na expressão gênica em células-alvo, que resulta na expressão de diferentes funções e na proliferação dessas células. Portanto, se houver uma falha no mecanismo de interação das citocinas com seu receptor e na via de sinalização intracelular, impossibilitaria sua produção ou ação

nas células específicas e impediria a destruição de agentes infecciosos (ABBAS et al 2012).

A maioria dos polimorfismos de citocinas identificados até o momento está localizada nas regiões não transcritas dos genes (KEEN, 2002). Os polimorfismos nestas regiões do gene podem afetar a expressão, inibindo ou estimulando a transcrição, dependendo dos elementos regulatórios e do nível de regulação envolvido (HOPKINS, 2003).

Ainda que o determinante genético para uma patologia seja identificado, o início da doença e a variabilidade clínica existente entre indivíduos com a mesma mutação não está totalmente esclarecido. Uma hipótese seria a de que fatores ambientais, de risco, de proteção, ou mesmo uma segunda mutação pontual, poderiam interferir na evolução da doença (MÖLLER et al., 2010).

Embora as citocinas apresentem baixo grau de variação genética, o número de estudos sobre polimorfismos vêm aumentando principalmente em regiões promotoras ou codificadoras. Mutações pontuais nestes genes podem resultar em alterações nas transcrições, afetando a ativação celular e os níveis das citocinas produzidas. A diferença na produção de citocinas está relacionada aos diferentes genótipos, e os indivíduos, de acordo com esses genótipos, podem ter o fenótipo previsto de alto, intermediário ou baixo produtor da referida citocina (WARLÉ et al., 2003).

Na TB, assim como em outras doenças infecciosas, o mecanismo da resposta imune compreende diversos aspectos da interação parasito-hospedeiro. Deste modo, a suscetibilidade genética humana para a doença, após a exposição ao *M. tuberculosis*, pode estar relacionada aos fatores ambientais, epigenéticos e à mudança ao acaso das frequências alélicas (deriva genética). Tal fato explicaria as diferenças presentes entre diversas populações e, provavelmente, entre diferentes etnias. Entretanto, ainda há mecanismos mais complexos a serem esclarecidos (LOK et al.,2002).

Um estudo de meta-análise realizado por Zhang e colaboradores (2011) mostrou que fatores genéticos têm sido associados à suscetibilidade ou à proteção da infecção pelo bacilo da TB e que na resposta imune contra o *M. tuberculosis* existe uma variação entre as frequências alélicas nos polimorfismos em genes de IFN- γ , IL-10 e TNF em diferentes populações. Outros estudos têm associado o papel do polimorfismo de citocinas na patogênese da TB e sua relevância com relação às

respostas imune inata adaptativa e suas interações (LEANDRO et al.,2008; SIVANGALA et al., ,2014; HU et al.,2015).

Tem sido documentado que SNPs podem alterar a ligação dos fatores de transcrição aos sítios promotores no gene, resultando na alteração de quantidade de citocina produzida que levam a variações fenotípicas associadas a várias doenças. Algumas citocinas estão envolvidas na maior suscetibilidade à infecção por micobactérias, reconhecem padrões moleculares associados a agentes patogênicos específicos e ativam os mecanismos microbicidas em células fagocíticas. Os indivíduos com deficiência de uma dessas citocinas podem ser mais sensíveis à doença (TEIXEIRA et al., 2007).

Portanto, genes candidatos para suscetibilidade à TB e resistência aos antibióticos têm sido estudados e podem representar um avanço para a compreensão da doença, tratamento e vacina. Alguns genes já foram identificados como tendo um papel importante na doença, dentre esses se destacam os receptores do tipo *Toll* (*TLR*), *TNF*, *TGF- β* , *IFN- γ* , *IL-1b*, *IL-1Ra*, *IL-12*, *IL-10*, óxido nítrico sintetase e vitamina D (BIKMAEVA et al.,2002).

2.4.1 IFN- γ e o polimorfismo no gene *IFN- γ +874T/A* (rs 2430561)

O IFN- γ é a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce funções importantes na imunidade inata e adquirida ativando fagócitos mononucleares e células NK e IFN- γ aumentando a expressão de genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II. Induz a maturação dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. A ativação de linfócitos TCD4⁺e TCD8⁺ é responsável por promover a troca de isotipo das imunoglobulinas dos linfócitos B, portanto o IFN- γ age como uma citocina regulatória da imunidade inata e adquirida. As células T produzem IFN- γ em resposta ao reconhecimento antigênico e à produção acentuada de IL-12 e IL-18 (ABBAS et al., 2012). Desse modo, os genes induzidos pelo IFN- γ codificam moléculas diferentes envolvidas em aumentar respostas imunes adquiridas.

O gene responsável pela transcrição do IFN- γ está localizado no braço longo do cromossomo 12 na posição q24.1, com aproximadamente 5.961 pares de base, sendo composto por quatro exons e três íntrons; contém um estimulador não

específico dentro do primeiro íntron. O ácido ribonucleico (RNA) mensageiro transcrito pelo gene traduz um polipeptídeo de 166 aminoácidos que após ser processado passa a apresentar 143 aminoácidos, sendo considerado a forma ativa do IFN- γ (NAYLOR et al.,1983).

Os SNPs na posição +874 (T/A) estão localizados próximo à região 5'. O alelo T está ligado a 12 sequências repetidas (CA) no primeiro íntron e o alelo A está ligado a 12 CA não repetidos. O gene que codifica o *IFN- γ* tem no primeiro intron uma repetição curta em tandem (STR) de citosina-arginina (CA) que caracteriza diferentes alelos, como o *IFN- γ 1* com 12 repetições de CA, *IFN- γ 2* com 13 repetições, *IFN- γ 3* com 14 repetições e *IFN- γ 4* com 15 repetições. O polimorfismo destes microssatélites está associado com uma variável individual na produção dos níveis de IFN- γ em indivíduos homozigotos para *IFN- γ 2* e mostram uma produção expressivamente aumentada de IFN- γ , quando comparada com outras combinações alélicas. Desse modo, tem sido sugerido que o polimorfismo T/A na posição +874 associado com o marcador CA microssatélite influencia diretamente o nível da produção de *IFN- γ* (PRAVICA et al., 2000).

O alelo T está associado à alta expressão de IFN- γ , enquanto o alelo A está associado à baixa expressão deste gene. Dentre os SNPs encontrados no gene do *IFN- γ* , localizado próximo a região 5', destaca-se o +874 T/A. A frequência dos alelos T e A do locus IFN- γ +874 tem sido associada com a proteção ou a suscetibilidade da TB em indivíduos infectados (TSO et al. 2005).

O genótipo TT e a presença do alelo T foram também associados a menor risco de tuberculose em estudo de meta-análise de 11 estudos que compararam pacientes com tuberculose pulmonar com controles sadios, em populações de diferentes etnicidades (PACHECO et al., 2008).

2.4.2 TGF- β 1 e o polimorfismo no gene *TGF β 1* -869T/C códon 10 (rs 1800470) e *TGF β 1* -509C/T códon 25 (rs 1800469)

O TGF- β 1 é uma proteína homodimérica de 25 KDa sintetizada e secretada por células T estimuladas por antígenos, fagócitos mononucleares ativadas por lipopolissacarídeos e outras células. Algumas células T reguladoras produzem TGF-

$\beta 1$ e IL-10, que também possuem atividade imunossupressora. Dentre as suas ações biológicas, destacam-se a proliferação e a função efetora de células T, a ativação de macrófagos que estimula a produção de anticorpos IgA e regula a diferenciação de subconjuntos funcionais distintos de células T, assim como a reparação tecidual depois que as reações imunológicas ou inflamatórias locais regridem (ABBAS et al., 2012).

O TGF- $\beta 1$ atua como anti-inflamatório e reparador de lesões, estimulando os macrófagos e os fibroblastos a aumentarem sua capacidade de síntese de proteínas da matriz extracelular e inibindo células, uma vez ativadas essas células; suprime a produção de TNF e de óxido nítrico pelos macrófagos, inibe a produção de IFN- γ e TNF pelas células NK e possuem ação antagônica ao IFN- γ (BROWN, 2002).

O TGF- $\beta 1$ é um importante fator de desenvolvimento e atividade de células Treg, atuando como pró-inflamatório em baixas concentrações e anti-inflamatório em altas concentrações. Entretanto, é dependente do ambiente e da concentração de outras citocinas. Quando atua como citocina pró-inflamatória, promove a quimiotaxia dos leucócitos e fibroblastos até os locais de lesão e em altas concentrações suprime a produção de TNF e de óxido nítrico pelos macrófagos; inibe a produção de IFN γ e TNF pelas células NK e tem ação antagônica ao IFN- γ (VODOVOTZ, 1997; BROWN *et al.*, 2002).

Os genótipos TT/GG e TC/GG estão associados à alta produção de TGF- $\beta 1$, os TC/GC, CC/GG e TT/GC estão relacionados à produção intermediária e CC/GC, CC/CC, TT/CC e TC/CC associados à baixa produção dessa citocina. Os polimorfismos dessa citocina estão relacionados a uma variação nos níveis de produção de TGF- $\beta 1$ e ao fenótipo de alto, intermediário ou baixo produtor da mesma (GRAINGER et al., 1999).

O gene que codifica o *TGF- $\beta 1$* pertence a uma grande família gênica e participa no crescimento, diferenciação, migração celular, formação da matriz extracelular e na regulação da expressão de moléculas de superfície. Além disso, aumenta a expressão de moléculas de adesão e modula a síntese e deposição de componentes da matriz extracelular, pelo aumento da expressão de genes que codificam a fibronectina, vários colágenos e outras moléculas da matriz extracelular (GRANDE 1997; OMER et al., 2000).

A alteração na produção do TGF- β 1 pode resultar em doenças fibrosantes, geralmente por um depósito excessivo de proteínas da matriz extracelular e um aumento na síntese de moléculas de adesão intercelular (MANN et al., 2001).

Diversos polimorfismos já foram identificados no gene do *TGF- β 1*, sendo três localizados na região à montante do primeiro nucleotídeo transcrito, nas posições -988C/A, -869G/A e -509C/T; um na região não traduzida, na posição +72(+C), três na região codificadora do gene que codifica uma sequência de resíduos de aminoácidos na forma ativa: Leu 10/Pro (códon 10), Arg 25/Pro (códon 25) e Thr 263/Ile (CAMBIEN et al., 1996; AWAD et al., 1998). As mutações no códon 10 (Leu/Pro) e no códon 25 (Arg/Pro) foram associadas com o fenótipo de alto produtor de *TGF- β 1*, (HUTCHINSON et al., 1998; GRAINGER et al., 1999).

O polimorfismo 509C/T (rs1800469) influencia na transcrição gênica do *TGF- β 1* e está envolvido no desenvolvimento de doenças. Localizado também na região promotora, este SNP resulta na troca de uma citosina (C) por uma timina (T). Desse modo, indivíduos que possuem o alelo C nesta posição podem apresentar menores concentrações plasmáticas de TGF- β 1 (GRAINGER et al., 1999).

No exon 1 do gene do *TGF- β 1*, o polimorfismo na posição +869 códon 10 (rs1800470) resulta na substituição de uma timina por uma citosina e na mudança do aminoácido leucina (apolar) para prolina (apolar). Esta substituição altera a região hidrofóbica do peptídeo, aumentando o seu padrão de ligação com o complexo de proteína associado à translocação desta proteína (translocon), e podem afetar o transporte de TGF β -1 para o retículo endoplasmático, contribuindo para a produção dessa citocina (SUSIANTI et al., 2014).

2.4.3 TNF e o polimorfismo no gene *TNF -308G/A* (rs1800629)

O TNF é uma proteína não glicosilada de 17 kDa e apresenta uma cadeia polipeptídica de 157 aminoácidos, produzida principalmente por macrófagos e monócitos, mas que podem ser secretada por outras células como os neutrófilos, células NK e mastócitos, linfócitos T, após estimulação por antígenos específicos (WILSON et al., 1997).

Esta citocina está envolvida nas reações imunes celulares e inflamatórias e é considerada a principal mediadora da resposta inflamatória aguda frente a microrganismos intracelulares. Portanto, esta citocina interfere na formação, organização e controle do granuloma tuberculoso. Em sinergismo com o IFN- γ , induz a produção de óxido nítrico, um dos principais agentes microbicidas para as micobactérias (XING et al.,2000). Assim, a produção elevada pode estar associada a uma maior gravidade da doença pulmonar e extrapulmonar e pode ser responsável por alguns sintomas como febre, perda de peso, debilidade muscular e necrose nos pulmões (KUPELI et al., 2008).

Tem sido relatada pela literatura a relação entre o TNF e o granuloma micobacteriano em pacientes com artrite reumatoide e doença de Crohn, em uso de terapia anti-TNF com o risco mais elevado de reativação da TB.(BOURIKAS et al., 2008).

A expressão do TNF na TB e em outras patologias infecciosas pode variar entre indivíduos e entre populações. Certas mutações pontuais na região promotora do gene podem promover uma alteração na síntese protéica e gerar uma diminuição ou aumento de produção desta citocina (CORREIA et al., 2004).

Em um estudo para o diagnóstico rápido de TB na população chinesa foi utilizado o TNF como um potencial biomarcador: células mononucleares foram estimuladas com antígenos específicos do *M. tuberculosis* e em seguida foi avaliado o TNF, onde foi possível diferenciar infecção TB ativa e latente e também TB ativa de pacientes não TB (WANG et al. ,2013).

O polimorfismo SNP do gene promotor para TNF resulta em duas formas alélicas. Na primeira, a guanina forma o alelo na posição -308, identificado como -308G e na segunda, configura a substituição de guanina por adenosina e resulta no alelo A, que é mais raro e identificado como -308 A. A presença do alelo A tem sido relacionada com o aumento espontâneo ou estimulado da produção de TNF, portanto, o polimorfismo encontrado na posição -308G pode estar associado ou não a doenças (MERZA et al., 2009).

O TNF é importante na resposta imune à infecção com *M. tuberculosis* e na formação do granuloma, além de contribuir para o *clearance* bacteriano e na modulação da inflamação pulmonar (SMITH et al.,2002).

Um estudo de meta-análise indicou que não houve associação significativa entre o polimorfismo no gene *TNF-238G/A* e suscetibilidade à TB (ZHANG et al., 2012).

A esse respeito, um estudo de meta-análise de 18 publicações, entre 2001 e 2010, envolvendo 2.584 casos de TB e 3.817 controles, mostrou que na análise estratificada por etnia, entre os asiáticos foi encontrado risco significativo para o alelo A, quando comparado com o alelo G, e não havendo riscos significativos encontrados entre os caucasianos (WANG et al., 2012).

Outros estudos mostram a não associação deste *locus* com suscetibilidade ou proteção à TB, enquanto outros demonstram suscetibilidade ao desenvolvimento da doença (VEJBAESYA et al., 2007; ATES et al., 2008); FAN et al., 2010).

2.4.4 IL-10 e o polimorfismo no gene *IL10 -819C/T (rs1800871)*, *IL-10 -592C/A (rs1800872)*, *IL-10 -1082A/G (rs1800896)*;

A IL-10 é uma citocina imunorregulatória de respostas inflamatórias, produzida por macrófagos, células B, células T e uma variedade de outras células como mastócitos, queratinócitos e algumas linhagens de células tumorais. Além disso, desempenha uma ação anti-inflamatória através da supressão da produção de citocinas, tais como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF em macrófagos ativados e IFN- γ . O efeito da IL-10 na resposta imune é principalmente a inibição da proliferação de células T e liberação de citocinas com propriedades antibacterianas dos monócitos e macrófagos e inibição da síntese e atividade de muitas citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF (MOCELLIN et al., 2003).

O gene *IL-10* está localizado no cromossomo 1 (1q31-1q32) com cinco exons e é altamente polimórfico, com 5 SNPs e vários VNTRs ou microssatélites, resultando em vários haplótipos conservados. Estes haplótipos entre -1082 e -592 representam alelos alto, intermediário e baixo produtores de IL-10 (ESKDALE et al., 1997).

Têm sido relatados três polimorfismos bialélicos no promotor do *IL10*: -1082 G/A, -819C/T e -592C/T. O alelo -1082G está associado à alta produção de IL-10, enquanto os indivíduos que possuem dois alelos -1082A estão associados com a baixa produção desta citocina. A IL-10 tem uma função importante na transição do estágio latente da TB para a doença ativa. A região promotora do gene de *IL-10* tem se mostrado altamente polimórfica e nos últimos anos tem sido relatado que os polimorfismos IL-10 -592A/C, -1082G/A e -819C/T podem contribuir para o risco de TB, por afetar o nível de transcrição de IL-10. Porém, os resultados são controversos, de acordo com um estudo de meta-análise (KE et al., 2015).

2.4.5 IL-6 e o polimorfismo no gene *IL6* -174G/C (rs 1800795)

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica de peso molecular 26 KDa, produzida por células B, células T, várias células não linfóides (incluindo macrófagos), células estromais de medula óssea, fibroblastos, células endoteliais e astrócitos, em resposta a uma variedade de estímulos. É considerada uma citocina com atividade multifuncional, pois regula as funções de células B e T, sendo indutora da resposta de fase aguda da inflamação, principalmente da Proteína C Reativa que é um dos principais marcadores de fase aguda e efeitos *in vitro* na hematopoese (DIEHL et al., 2002; CORREIA, et al., 2009; LOPES et al., 2013).

No que se refere à literatura, têm sido relatados poucos estudos relacionados ao polimorfismo de IL-6 -174G/C (rs 1800795) e TB isoladamente; alguns estudos avaliam esse polimorfismo em conjunto com o de outras citocinas.

Em um estudo experimental foram encontrados níveis séricos elevados de IL-6 relacionados com a resposta imune precoce e tardia. As concentrações de IL-6 foram medidas e comparadas com estudo histopatológico em modelo murino de TB em que foram administradas por via intraqueal espécies viáveis de *M.tuberculosis H37Rv* (HERNANDEZ-PANDO et al, 1998).

Outro estudo experimental com modelo murino depletados de IL-6 mostrou a importância da IL-6 na fase precoce da resposta imune e mostrou que a ausência de IL-6 induz um atraso da imunidade protetora e um aumento do número de bactérias (SAUNDERS et al., 2000).

A literatura relata a importância da produção aumentada de IL-6 em resposta à infecção em modelos murinos e em humanos. Ribeiro e colaboradores (2002) dosaram a IL-6 no escarro e no soro de pacientes com TB ativa e compararam os resultados com os obtidos de pacientes com pneumonia bacteriana e indivíduos saudáveis PPD positivo e encontraram elevação desta citocina nos pacientes com TB.

Estudos têm demonstrado que a IL-6 desempenha um papel importante na regulação do equilíbrio entre as células Th17 produtoras de IL-17 e células T regulatórias. Estes dois subtipos celulares desempenham funções importantes na patogênese das doenças autoimunes e de proteção contra as infecções bacterianas e contém a resposta exacerbada das células T efectoras (BETTELLI et al., 2006; KIMURA et al., 2010).

Um polimorfismo na região flanqueadora 5' do gene da IL-6 na posição -174G/C parece afetar a sua transcrição (FISHMAN et al., 1987).

A ocorrência de polimorfismo na região promotora de genes como o da IL-6 pode ser importante para a suscetibilidade à TB. O polimorfismo -174G/C (rs1800795) foi associado à diminuição dos níveis de IL-6. Assim, indivíduos com o genótipo GG teriam níveis mais elevados da citocina (MORSE et al., 1999). Desse modo, pacientes homozigóticos para o alelo C teriam uma resposta inflamatória menos intensa e, portanto, um melhor prognóstico nas doenças pulmonares.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a liberação de IFN- γ (IGRA) e o polimorfismo de citocinas nos PS com TCT de repetição negativo e TCT positivo que trabalham em uma unidade de referência terciária em tuberculose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliar a liberação *in vitro* de IFN- γ (IGRA) nos PS do estudo em relação ao TCT;

3.2.2 Descrever as frequências alélicas, genótípicas e dos fenótipos previstos observados para os polimorfismos dos genes *IFN- γ +874T/A*, *IL6 -174G/C*, *TNF -308G/A*, *IL10 -819C/T*, *IL-10 -592C/A*, *IL-10 -1082A/G* e *TGF β 1 -869T/C* códon 10 e *TGF β 1 -509* códon 25;

3.2.3 Associar os resultados dos testes IGRA e TCT com os genótipos observados para os polimorfismos do gene *IFN- γ +874T/A*;

3.2.4 Comparar os dados das análises laboratoriais dos PS com TCT positivo e TCT de repetição negativo.

4 HIPÓTESES

H01: Não se observa relação entre o TCT negativo de repetição, IGRA e o perfil de polimorfismo genético de IFN- γ +874 T/A entre os PS.

H1: Observa-se relação entre o TCT negativo de repetição, IGRA e o perfil de polimorfismo genético de IFN- γ +874 T/A entre os PS.

H02: Os polimorfismos dos genes *IFNG* +874T/A, *TNF* -308G/A, *IL6* -174G/C *IL10* -1082G/A, -819C/T e -592C/A e *TGFB1* +869 T/C e -509C/T não parecem ser marcadores de predisposição ou proteção para TBIL.

H2: Os polimorfismos dos genes *IFNG* +874T/A, *TNF* -308G/A, *IL6* -174G/C *IL10* -1082G/A, -819C/T e -592C/A e *TGFB1* +869 T/C e -509C/T parecem ser marcadores de predisposição ou proteção ao desenvolvimento da TBIL.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC) para avaliação dos aspectos éticos e bioéticos, de acordo com as normas vigentes na Resolução CNS nº. 196/96 (ANEXO 1), e com adendo/emenda aprovado em 11/2011 (ANEXO 2). Foi obtido o consentimento da Comissão de Ética em Pesquisa da instituição hospitalar para a realização do estudo (ANEXO 3).

5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Este é um estudo transversal, observacional, retrospectivo de base hospitalar com abordagem descritiva. A seleção para o grupo TCT positivo foi realizada de forma aleatória e do grupo TCT de repetição negativo, de forma não aleatória. A análise estatística foi feita utilizando o programa *Graph Pad Prism* versão 5.0, SPSS versão 19 e Excel®. Para a análise de concordância entre os testes TCT e IGRA foi utilizado o índice de Kappa. As frequências dos genótipos e alelos entre os grupos foram determinadas pelo teste exato de Fischer, e para a análise da associação dos polimorfismos genéticos com os desfechos TCT e IGRA. Para a avaliação do *Quantiferon®-TB Gold Test In Tube* (QFT®) foi utilizado o parâmetro do Kit com um ponto de corte $> 0,35$ UI/mL.

5.3 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM), localizado na cidade de Salvador–Bahia, no período de junho de 2014 a setembro de 2015. Foi utilizado o banco de dados do setor de medicina ocupacional do referido hospital.

Os indivíduos foram categorizados e distribuídos em dois grupos: Grupo TCT de repetição negativo com resultado < 5 mm no total de 48. Ressalta-se que durante o ano de 2014 houve problemas com a aquisição do PPD pelo Ministério da Saúde, o que ocasionou a falta do produto, impossibilitando a realização do teste. No entanto, esse grupo já tinha registro de TCT negativo de repetição.

O grupo TCT positivo foi composto por 45 PS com resultado > 10 mm e estes foram selecionados de forma aleatória, totalmente ao acaso, a partir de um grupo maior para equilibrar as variáveis. Portanto, todos os PS registrados na medicina ocupacional tiveram a mesma probabilidade de serem escolhidos para a amostra.

Ainda assim, com relação aos resultados do TCT, ressalta-se que foram encontrados dados correspondentes aos períodos de exames anteriores a 2011 cuja interpretação era feita pela leitura quantitativa padronizada da seguinte maneira: não reator (0 a 4 mm), reator fraco (5 a 9 mm) e reator forte (10 mm ou mais), e a partir de 2011 com registro de resultados somente em mm, de acordo com a nova padronização do MS. A interpretação do teste e seus valores de corte podem variar de acordo com a população e o risco de adoecimento (BRASIL, 2002; BRASIL 2011). Um fator importante é que mesmo entre técnicos experientes pode haver divergências em relação à aplicação e a leitura do TCT. Porém, os testes neste estudo foram realizados por profissionais treinados de acordo com o MS.

Os voluntários que atenderam aos critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo. Após a explicação do projeto, os que aceitaram assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 1). As informações de cada participante foram registradas em ficha individual e repassadas para um banco de dados para posterior análise estatística (APÊNDICE 2).

5.3.1 Critérios de Inclusão

- a) Ter idade entre 18 a 65 anos;
- b) TCT positivo maior que 10 mm, valor referenciado pela literatura para PS;
- c) TCT de repetição negativo menor que 5 mm e com no mínimo 8 anos de exposição ocupacional a pacientes com TB;
- d) Hemograma sem alterações laboratoriais;

- e) Proteína C Reativa ultrasensível com valor de referência normal;
- f) Não grávidas;
- g) Não diabéticos
- h) Sem uso de terapia imunossupressora.

5.4 COLETA E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

Foi coletado de cada indivíduo 10 mL de sangue por punção venosa, sendo 5,0 ml de sangue total em tubo contendo EDTA 0,5M para obtenção de DNA genômico e hemograma; 2 ml para obtenção de soro e dosagem de PCR ultrasensível. Para a realização do IGRA foram utilizados os tubos do *kit* (QFT®), nos quais foi colocado 1 mL de sangue na seguinte ordem: *Nil* (controle negativo), *TB Antigen* (antígeno da TB), *mitogen* (controle positivo).

5.4.1 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total utilizando o kit de extração de DNA mini spin Kasvi (Kasvi produtos laboratoriais, Curitiba, Brasil). Foram transferidos 200 µl de sangue total homogeneizado para um microtubo de centrifugação de 1,5 ml, em seguida foi adicionado 200 µl de tampão de lise A, 20 µl de proteinase K e agitado no vortex por 5 segundos. Essa solução foi incubada por vinte e cinco minutos a 56°C em agitação contínua. Na sequência, foram acrescentados 400µl de tampão de ligação B6 e homogeneizada no vortex. Após esta etapa, foi colocado o tubo spin em um tubo de reação de 2 ml e a solução foi transferida para esse tubo, fechado e incubado 1minuto. Após esse tempo, foi adicionado 500 µl de tampão de lavagem I, e centrifugado 1 minuto a 13 000g e descartado o filtrado. Ao sedimento foram adicionados 800 µl de tampão de lavagem II e centrifugado 1 minuto a 13 000g e descartado o filtrado, o tubo spin foi colocado no mesmo tubo anterior de reação, em seguida centrifugado por 4 minutos para eliminar o etanol. Em seguida foi colocado em novo tubo de reação de 1.5 mL,

identificado, adicionado 200 µL de tampão de eluição pré-aquecido a 56°C e incubado à temperatura ambiente por 1 minuto; logo após esse tempo a solução foi centrifugada a 8000g por 1 minuto. O tubo spin foi descartado e amostra foi armazenada a -20°C até o momento do uso.

5.4.2 Genotipagem de Citocinas (*IL-6*, *IL-10*, *TNF*, *IFN-γ* e *TGF-β1*)

Foi utilizado o kit para genotipagem de citocinas da One Lambda (One Lambda Incorporation, Canoga Park, Estados Unidos), contendo cada um 16 tubos de PCR, sendo um tubo controle negativo e 15 tubos com dois pares de iniciadores. Um par com sequências específicas que amplificam seletivamente regiões regulatórias polimórficas dentro dos genes *TNF* -308G/A, *TGF β1* (10T/C, 25G/C), *IL10* (-1082A/G, -819C/T, -592C/A), *IL6* -174G/C e *IFN-γ* +874T/A e o segundo par de iniciadores amplifica uma sequência controle.

A mistura para as reações de PCR (*Mix*) foi preparada conforme as instruções do fabricante: 180 µL de *D-Mix* (solução fornecida pelo fabricante, contendo dNTPs, sal sódico de vermelho de fenol, sacarose, gelatina, KCl, MgCl₂.6H₂O, Tris.HCl), aos quais foram adicionados cerca de 1,9 µg de DNA teste e 5 U de Taq polimerase. Após misturar os reagentes com auxílio de um agitador de tubos, 10 µl do *Mix* foram distribuídos em cada um dos tubos, exceto no tubo controle negativo, ao qual tinha sido adicionado o *Mix* sem DNA teste. Os tubos foram então selados com filme apropriado (termoresistente, fornecido pelo fabricante) e colocados no termociclador, o qual foi previamente programado com os seguintes parâmetros: um ciclo de 96°C por 130 segundos, seguidos de 63°C por 60 segundos; nove ciclos de 96°C por 10 segundos e 63°C por 60 segundos; vinte ciclos de 96°C por 10 segundos, 59°C por 50 segundos e 72°C por 30 segundos; ciclo final de 4°C.

5.4.3 Revelação do Resultado em Gel de agarose

Depois do processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. O gel de agarose 2,5% foi preparado com 0,75g de agarose (Invitrogen-Estados Unidos), 30 mL de tampão TBE1X (Tris-Borato 89 mM; EDTA 2mM pH 8.0) e 0,05 µg/ml de brometo de etídio. A cuba de eletroforese utilizada foi desenvolvida pela One Lambda de forma a permitir a análise concomitante de 96 produtos de PCR em um curto tempo de migração. Desse modo, em cada gel foram analisados os resultados de PCR de seis diferentes amostras de DNA (16 reações para cada amostra). O gel foi recoberto com 10,0 ml de TBE 1X contendo 0,05 µg/ml de brometo de etídio e todo conteúdo de cada reação de PCR (10 µL) foi transferido para o poço correspondente. A corrida eletroforética foi então realizada a 120-130 V (~30 mA), durante 4 a 5 minutos, ou até que o corante (vermelho de fenol) migrasse cerca de dois terços da distância entre duas linhas de poços no gel.

A interpretação dos resultados de PCR-SSP é baseada na presença ou ausência de um fragmento de DNA específico amplificado. A amplificação durante a PCR pode ser afetada por vários fatores (erro ao pipetar, baixa qualidade do DNA, presença de inibidores e outros), motivo pelo qual um par de iniciadores-controle é incluído em cada reação de PCR. O par de iniciadores-controle amplifica uma região conservada do gene da β-globina humana, que está presente em todas as amostras de DNA humano, e é usado para verificar a integridade da reação de PCR. Na presença de uma banda positiva de tipagem (amplificação de uma sequência específica de um alelo da citocina) o produto dos iniciadores-controle pode ser mais fraco ou ausente, devido à diferença na concentração e temperatura de hibridização entre o par de iniciadores específicos e o par de iniciadores do controle interno. Os fragmentos de DNA amplificados do par de iniciadores específicos da citocina foram menores do que o produto do par de iniciadores do controle interno. Desta forma, a reação positiva para um alelo ou grupo de alelos de citocina específico foi visualizada no gel como um fragmento de DNA amplificado entre a banda produto do controle interno e a banda de iniciadores não incorporados.

Após a eletroforese, os produtos amplificados foram visualizados usando luz ultravioleta e fotografados com auxílio de um transluminador. Os resultados foram interpretados usando mapas das placas de genotipagem de citocinas fornecidas pelo fabricante. A figura 4 mostra a fotografia de um gel de agarose após PCR e eletroforese dos produtos de DNA amplificados de um dos indivíduos do estudo.

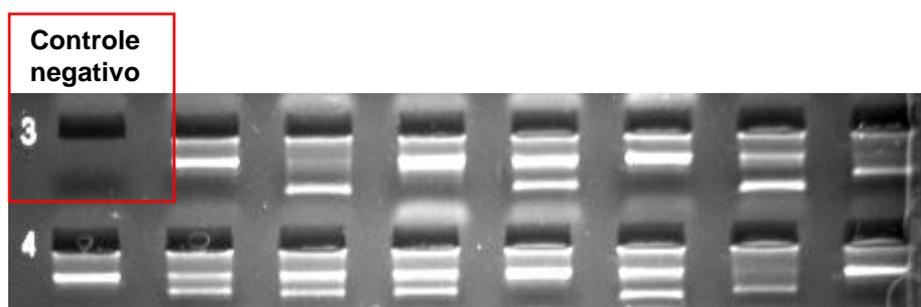


Figura 4: Fotografia representativa de um gel de agarose pós-eletroforese de produtos de DNA amplificados (PCR) de amostra de sangue de um dos indivíduos do estudo.

5.4.4 Dosagem de IFN- γ - IGRA (QFT®)

Foram coletados 3 mL de sangue de cada indivíduo utilizando os tubos do kit QFT® conforme orientação do fabricante: 1 mL de sangue em cada tubo assim discriminados: *Nil* (controle negativo), antígenos TB (ESAT 6, CFP-10 e TB7.7(p4) e mitógeno (controle positivo).

Após a coleta os tubos foram agitados por inversão 10 vezes à temperatura ambiente e incubados a 37°C por 24 horas. Após esse período os tubos foram centrifugados a 2000g por 15 minutos, o plasma separado e estocado a -20°C para dosagem posterior do IFN- γ produzido em resposta aos antígenos peptídeos.

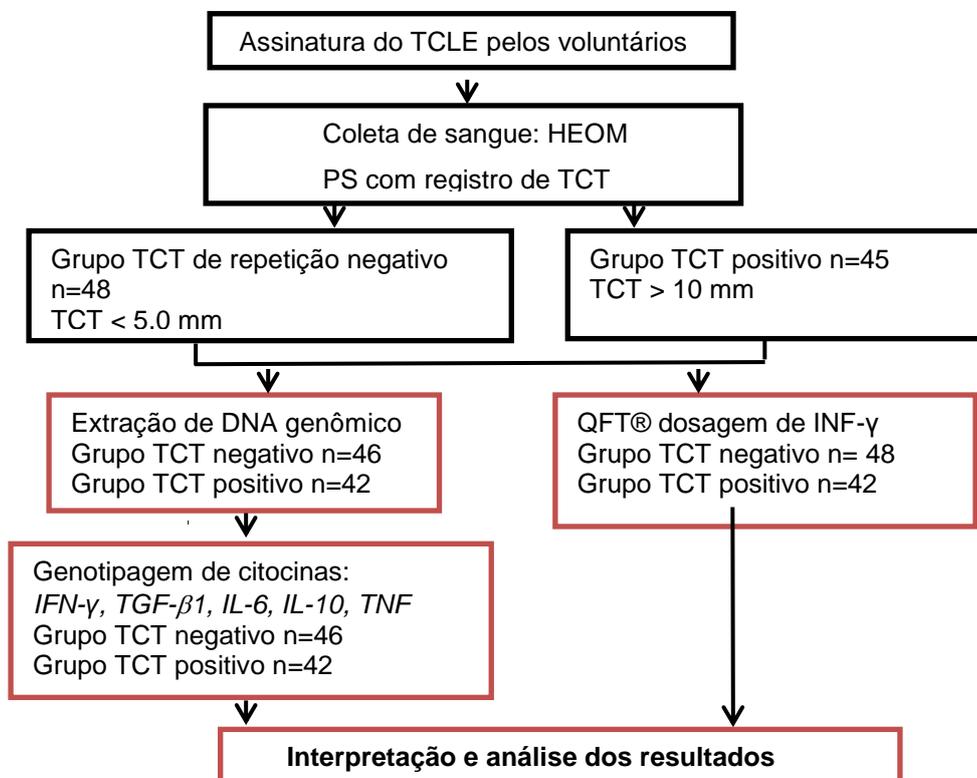
A quantidade de IFN- γ foi medida por ELISA em unidades internacionais por mililitro (IU/ml). A absorvância (OD) de cada poço foi medida até no máximo 5 minutos após a parada da reação e utilizou um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e um filtro de referência de 620 a 650 nm. Os valores de OD foram utilizados para calcular os resultados.

Os resultados da leitura do ELISA foram transcritos para o programa de análise fornecido pelo fabricante, para analisar dados não processados e para calcular resultados. Este programa executa uma avaliação de controle de qualidade do ensaio, gera uma curva padrão e fornece um resultado de teste para cada indivíduo que pode ser interpretado como positivo, negativo e indeterminado.

O teste é considerado positivo com uma resposta de IFN- γ ao tubo de antígeno de TB que esteja significativamente acima do valor de *Nil* IFN- γ IU/ml. Uma resposta baixa ao mitógeno (<0,5 IU/ml) indica um resultado indeterminado quando uma amostra também tiver uma resposta negativa aos antígenos de TB. Este padrão pode ocorrer com linfócitos insuficientes, atividade reduzida dos linfócitos, devido a manuseio inadequado da amostra, coleta insuficiente do tubo de mitógeno ou incapacidade dos linfócitos do paciente gerar IFN- γ . A amostra de *Nil* ajusta-se aos efeitos de fundo dos anticorpos heterófilos ou do IFN- γ não específico em amostras sanguíneas. O nível de IFN- γ do tubo de *Nil* é subtraído ao nível de IFN- γ do tubo de antígeno de TB e do de mitógeno.

O teste foi considerado positivo quando $\geq 0,350$ UI/mL (após a subtração do *NIL* e TB antígenos) e negativo para valores menores que 0,350. Se PHA > 0,5, o teste foi validado e os valores menores que esses foram considerados indeterminados.

5.5 FLUXOGRAMA DO ESTUDO



6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 DADOS SÓCIODEMOGRÁFICOS E LABORATORIAIS DOS GRUPOS DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE PARTICIPANTES DO ESTUDO

O grupo do estudo foi selecionado a partir de um banco de dados da medicina ocupacional do referido hospital. Havia registro nesse banco de dados de 75 PS com TCT de repetição negativo (inferior a 5 mm) e com exposição ocupacional de no mínimo 8 anos a indivíduos com diagnóstico de TB, tempo definido pelo pesquisador.

A média de idade dos dois grupos estudados foi de 50 anos, e tal fato impossibilitou a avaliação do dado de cicatriz vacinal de BCG, informação previamente coletada, tendo em vista que até 1968 a vacina era utilizada por via oral e só a partir dessa data foi substituída pela BCG via intradérmica. O primeiro calendário básico e o cartão de vacinas obrigatórias para os menores de um ano de idade foram introduzidos no Brasil em 1977, inclusive com a BCG. Há ainda a possibilidade que a cicatriz vacinal identificada nos participantes do estudo seja secundária à vacina da varíola (BRASIL, 2013).

6.1.1 Grupo TCT de repetição negativo

Foram inseridos no estudo 48 indivíduos, de acordo com os critérios estabelecidos de inclusão. Deste grupo, 85% eram mulheres com média de 52 ± 5 anos e 15% eram homens com média de 45 ± 10 anos. A classificação étnica foi autorreferenciada e constituída por 20 indivíduos brancos, 17 pardos, 11 negros. O tempo médio de contato foi de $18 \pm 7,2$ anos.

Em um estudo constituído por 663 PS de um hospital universitário, 261 (39%) apresentaram taxa de conversão no TCT, no período de 3 anos. De acordo com os autores há risco de infecção tuberculosa em unidades de saúde com incidência de casos de TB (COUTO et al., 2014)

6.1.2 Grupo TCT positivo

Foi composto por 45 PS selecionados de acordo com os critérios previamente descritos. Destes, 11% foram masculinos com a média de idade de 52 ± 8 anos, 89% femininos com média de idade 50 ± 5 anos. A classificação étnica foi autorreferenciada e constituída por 10 indivíduos brancos, 17 pardos, 17 negros e 1 indígena. O tempo médio de contato foi de 22 ± 5 anos.

A distribuição dos profissionais dos dois grupos por gênero, idade, classificação étnica e os resultados do TCT, durante o período de junho de 2014 a setembro de 2015, são mostrados na tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização sociodemográfica dos PS no período de junho de 2014 a setembro de 2015

Características	Grupo TCT de repetição negativo <5 mm	Grupo TCT positivo >10 mm
Idade	Anos \pm DP	Anos \pm DP
Feminino	52 ± 5	50 ± 5
Masculino	45 ± 10	52 ± 8
Gênero	N (%)	N (%)
Feminino	41 (85)	40 (89)
Masculino	7 (15)	5 (11)
Classificação étnica	N	N
Branco	20	10
Pardo	17	17
Negro	11	17
Indígena	0	1
Contato	Anos \pm DP	Anos \pm DP
	$18 \pm 7,2$	22 ± 5
Total (n=93)	48	45

Do total de 93 PS, o predomínio foi do grupo de enfermagem (técnicos e enfermeiros): 35 (37,6%), seguidos de técnico de laboratório: 13 (14,0%); técnico de

radiologia: 8 (8,6%); farmacêutico-bioquímico: 7 (7,5%) e outros profissionais: 30 (32,3%). A discriminação por categoria profissional dos participantes do estudo está representada na figura 5.

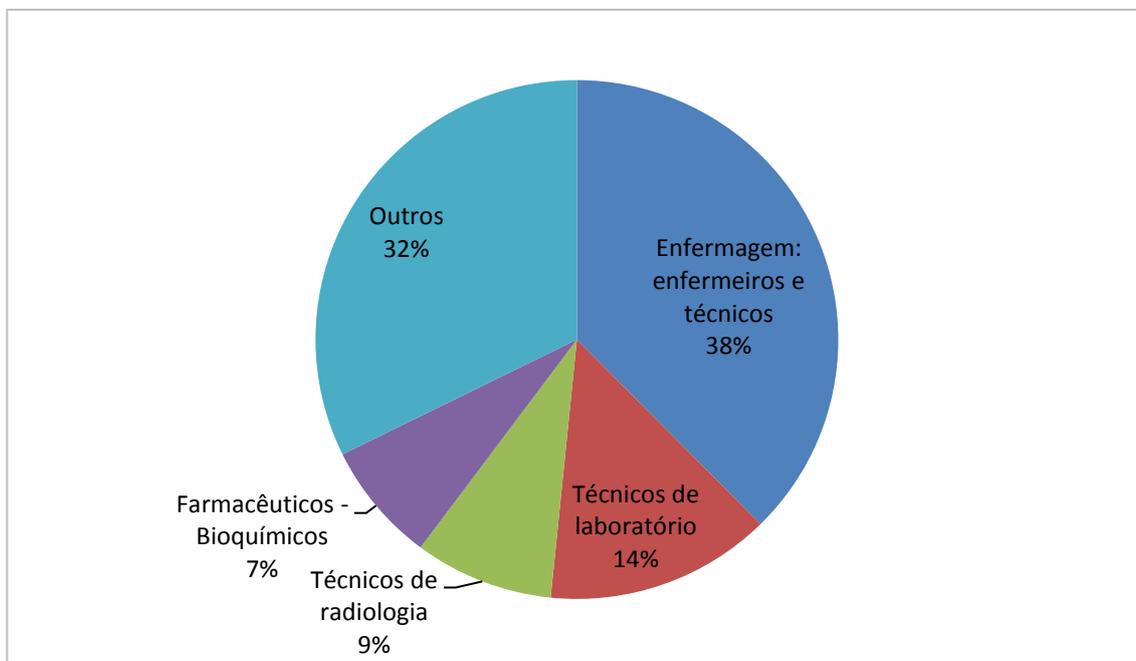


Figura 5 Discriminação dos PS participantes do estudo por categoria

Em um estudo exploratório, Lorenzi e Oliveira (2008) constataram que o coletivo de enfermagem pode ser tomado como categoria-índice da TB nosocomial, tendo em vista ser o grupo de maior representação do corpo hospitalar. De acordo com outro estudo realizado com estudantes de enfermagem e medicina em um hospital escola o TCT, poderia apresentar-se como um marcador adicional da transmissão hospitalar pelo *M. tuberculosis* (PEREIRA et al.,2013).

6.2. RESULTADOS DO HEMOGRAMA E PCR ULTRASSENSÍVEL

Para fins de melhor caracterização da condição de imunidade, foi realizado o hemograma e a PCR ultrasensível de todos os indivíduos participantes do estudo.

O hemograma foi realizado em analisador automatizado de células sanguíneas modelo Cell-DGN 3000 (ABBOTT, ILLINOIS, USA) e a PCR ultra sensível no *Ortho Clinical Vitros 250 Chemistry System* (Johnson & Johnson, USA).

Na avaliação hematológica as medianas do número de leucócitos encontradas foram: no grupo TCT de repetição negativo 6 415/mm³ e no grupo TCT positivo 6 510/mm³ (valor de referência: 3 500 a 10 500/mm³). Dessa maneira, verifica-se a ausência de leucometrias indicativas de processos infecciosos ou inflamatórios e o valor das hemácias encontra-se nos valores de normalidade, afastando a hipótese de anemia.

O teste da PCR ultrasensível foi de $8 \pm 1,2$ mg/L no grupo TCT de repetição negativo e de $5 \pm 1,7$ mg/L no grupo TCT positivo, sendo o valor de referência da PCR inferior a 10 mg/L. A PCR é uma proteína de fase aguda, ou seja, aumenta em processos infecciosos. Nesta avaliação, assim como na leucometria, não há indicativo de que os participantes estivessem com infecção, o que poderia comprometer este estudo. Os resultados da mediana dos leucócitos total, percentual de leucócitos e a média da PCR em sangue periférico dos participantes do estudo estão mostrados na tabela 2.

Tabela 2 Mediana de leucócitos e a média da PCR em sangue periférico dos participantes do estudo

Variáveis	TCT de repetição negativo: N = 48	TCT positivo N=45	Valores de referência
Leucócitos/mm ³	6.415	6.510	3.500 – 10.500
Neutrófilos	3.427	3.587	1.400 – 7.140
Eosinófilos	112	99	35 - 525
Linfócitos	1129	2250	700 – 4.410
Monócitos	459	478	70 – 1.260
Hemácias x 10 ⁶ / mm ³	4,56	4,43	4,0 – 5,2

PCR mg/dL	8 ±1,2	5 ± 1,7	< 10
-----------	--------	---------	------

6.3 POLIMORFISMO EM GENES DE CITOCINAS

Diversos estudos realizados em diferentes etnias têm identificado associações entre os SNPs em diversos genes candidatos na modulação da resposta imune a TB, entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela suscetibilidade ao bacilo ainda não estão bem esclarecidos.

A fim de compreender como o polimorfismo dos genes do hospedeiro poderia influenciar na resposta imune, selecionamos cinco SNPs em genes de citocinas relevantes para a suscetibilidade da TB: *IFN-γ* +874T/A (rs 2430561); *IL6* -174G/C (rs 1800795) *TNF* -308G/A (rs1800629); *IL10* -819C/T (rs1800871), *IL-10* -592C/A (rs1800872), *IL-10* -1082A/G (rs1800896); e *TGFβ1* -869T/C códon 10 (rs 1800470) e *TGFβ1* -509 códon 25 (rs 1800469). Para todos os SNPs analisados, as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

6.3.1 Polimorfismo do gene do *IFN-γ* +874 T/A (rs 2430561)

A distribuição das frequências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo +874 T/A do gene *IFN-γ* avaliada nos grupos estudados é mostrada na tabela 3. As frequências observadas para os alelos T e A foram, respectivamente, 0,322 e 0,678, no grupo de profissionais TCT de repetição negativo, e 0,214 e 0,786, no grupo de profissionais TCT positivo. A análise pelo teste exato de Fisher mostrou que não houve diferença estatística para o polimorfismo do *IFN-γ* +874 T/A entre os grupos deste estudo ($p= 0,1258$).

O número de indivíduos com os genótipos TT, TA e AA foram, respectivamente, 9, 11 e 25, no grupo de profissionais TCT de repetição negativo, e 3, 12 e 27, no grupo de profissionais TCT positivo. As frequências observadas dos genótipos TT, TA e AA foram, respectivamente, 0,200, 0,244 e 0,556 em ??? e 0,072; 0,286 e 0,642, no grupo de profissionais TCT positivo. A análise estatística

mostrou que as diferenças observadas entre os dois grupos não são significantes ($p=0.2517$).

As frequências dos fenótipos previstos foram 0,200, 0,244 e 0,556, para o grupo de profissionais TCT de repetição negativo, e 0,072; 0,286 e 0,642, no grupo de profissionais TCT positivo, para altos, intermediários e baixos produtores de *IFN- γ* , respectivamente. As diferenças observadas entre os grupos não foram estatisticamente significantes ($p=0.2517$).

Tabela 3 – Distribuição das frequências alélicas, genóticas e fenóticas previstas para o polimorfismo +874 T/A (rs 2430561) do gene de *IFN- γ* dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo.

Frequência do alelo			
	TCT de repetição negativo	TCT positivo	p
T	0,322	0,214	
A	0,678	0,786	0,1258
(N) Frequência do genótipo			
TT	(09) 0,200	(03) 0,072	
TA	(11) 0,244	(12) 0,286	0,2517
AA	(25) 0,556	(27) 0,642	
Frequências dos fenótipos previstos			
Alto produtor	(09) 0,200	(03) 0,072	
Intermediário	(11) 0,244	(12) 0,286	0,2517
Baixo Produtor	(25) 0,556	(27) 0,642	
Teste de Fischer			

Nesse estudo, verificamos que nos dois grupos avaliados o alelo A estava mais frequente que o alelo T e observamos também que o genótipo AA teve uma frequência maior que o genótipo TT e TA; nos grupos TCT de repetição negativo, 25 (56%) apresentaram o genótipo AA e no grupo TCT positivo, 27 (64%), demonstrando que o fenótipo previsto de baixo produtor foi encontrado com maior frequência que o fenótipo intermediário e alto produtor. Ainda que não fosse

encontrado valor estatisticamente significativo, tal fato poderia estar relacionado com a maior suscetibilidade à doença.

Resultados similares foram encontrados por Bendicho (2009), referentes ao genótipo +874 A/A de 210 indivíduos saudáveis doadores de sangue da mesma área geográfica, onde 45% apresentaram maior frequência de fenótipo previsto de baixo produtor.

Corroborando com o nosso estudo, Henao e colaboradores (2006) estudaram o polimorfismo do gene de citocinas em pacientes colombianos com diferentes apresentações clínicas: TB pulmonar (140), TB pleural (30) e TB miliar (20). O grupo controle foi composto de 140 adultos, sendo 54 TCT negativo e 81 TCT positivo, que foram recrutados de pessoal médico e de laboratório. Os resultados encontrados mostraram uma maior frequência do alelo A no grupo controle e pacientes TB pulmonar do que em TB pleural e miliar. Outro dado foi à diminuição do genótipo T/T homozigoto em TB pulmonar, mas não em TB pleural e miliar.

Um estudo discordante do nosso, realizado na região norte, cujo grupo controle era de 156 PS negativos para TB (TCT negativo e positivo), encontrou maior frequência do alelo +874T e o genótipo +874TT, assim como uma associação entre a presença do alelo +874A e do genótipo +874 AA com a TB ativa (GRAÇA,2009).

A literatura relata a presença do alelo A com a maior suscetibilidade para desenvolver a TB pulmonar em diferentes populações como a espanhola, egípcia, brasileira, tunisiana, iraniana e chinesa, assim como o alelo T está associado à proteção contra TB doença (LÓPEZ-MADERUELO et al., 2003; MOSAAD et al., 2010; VALLINOTO et al.,2010; BEN SELMA et al., 2011; HU et al. 2015).

A esse respeito, algumas explicações para as diferenças e semelhanças dos nossos dados: o pequeno tamanho da amostra e a caracterização étnica referenciada e de ancestralidade genética, que pode diferir entre grupos populacionais.

No que se refere à etnia autorreferenciada, foram encontrados 30 indivíduos brancos, 34 pardos, 28 negros e 1 indígena. Essa heterogeneidade parece não ter influenciado os dados deste trabalho, pois uma pesquisa realizada anteriormente na mesma área geográfica mostrou não haver diferença significativa entre o polimorfismo do IFN- γ (+874 T/A) e diferentes grupos étnicos (SILVA, 2003).

Quanto à classificação étnica, vale ressaltar que a cor da pele não determina a ancestralidade genética, sobretudo na população brasileira, altamente miscigenada. Um estudo da genética da população brasileira revelou que 27% dos negros de uma pequena cidade mineira apresentavam uma ancestralidade genética predominantemente não africana e 87% dos brancos brasileiros apresentaram pelo menos 10% de ancestralidade africana (PARRA et al.,2003).

6.3.2 Polimorfismo do gene *IL6* -174 G/C (rs1800795)

A distribuição das frequências alélicas, genótípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo -174G/C do gene *IL-6* observadas nos diferentes grupos estudados é mostrada na tabela 4. As frequências observadas para os alelos G e C foram, respectivamente, 0,696 e 0,304, no grupo de profissionais TCT de repetição negativo, e 0,810 e 0,190, no grupo de profissionais TCT positivo. Não foram encontradas diferenças significativas nas frequências dos alelos observadas entre os dois grupos ($p=0,1162$).

O número de indivíduos com os genótipos GG, GC e CC observados nos grupos foram, respectivamente, 24, 16 e 6, no grupo de profissionais com TCT de repetição negativo, e 31, 6 e 5, no grupo de profissionais com TCT positivo. As frequências genótípicas observadas nos dois grupos foram 0,522, 0,348 e 0,130, em profissionais com TCT de repetição negativo, e 0,739, 0,142 e 0,120, no grupo de profissionais com TCT positivo, para os genótipos GG, GC e CC, respectivamente. As diferenças observadas entre os dois grupos não foram estatisticamente significantes ($p=0.0687$).

As frequências dos fenótipos previstos foram 0,870 e 0,130, para o grupo de profissionais com TCT de repetição negativo, e 0,881 e 0,109, no grupo de profissionais com TCT positivo, para altos e baixos produtores de *IL-6*, respectivamente. Entre os dois grupos não foram encontrados diferenças estatísticas ($p=1,0$).

Tabela 4 – Distribuição das frequências alélicas, genóticas e fenóticas previstas para o polimorfismo -174 G/C (rs 1800795) do gene de *IL-6* dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo

Frequência do alelo			
	TCT de repetição negativo	TCT positivo	p
G	0,696	0,810	
C	0,304	0,190	0,1162
Frequência do genótipo (N)			
GG	(24) 0,522	(31) 0,739	
GC	(16) 0,348	(06) 0,142	0.0687
CC	(06) 0,130	(05) 0,120	
Frequências dos fenótipos previstos			
Alto produtor	(40) 0,870	(37) 0,881	
Baixo produtor	(06) 0,130	(05) 0,109	1,0000
Teste de Fischer			

Os resultados mostrados neste estudo são similares com os dados da literatura que não evidenciaram associação entre o polimorfismo da *IL-6* e TB (OLIVIERE et al., 2002; HENAO et al., 2005; ORAL et al., 2006; SELVARAJ et al., 2008).

Os dois grupos do nosso estudo apresentaram o perfil de alto produtor. Os resultados da frequência dos genótipos GG, GC e CC no grupo TCT de repetição negativo foram: 24 (52,2%), GC 16 (34,8%), CC 6 (13%); no grupo TCT positivo: 31 (73,8%), 6 (14,2%) e 5 (12%), respectivamente, e não houve diferença estatística.

No presente trabalho houve uma maior frequência do alelo G e do fenótipo previsto de alto produtor desta citocina. Como a *IL-6* estimula a produção de proteínas de fase aguda, seria esperado um aumento da PCR, o que não ocorreu.

Em concordância com um estudo realizado na região nordeste, que obteve os seguintes valores: pacientes TB, frequência dos genótipos GG, GC, CC 27 (64,3%), 10 (23,8%), 5 (11,9%), respectivamente, e nos indivíduos controle, doadores de sangue e submetidos a avaliação clínica a frequência dos genótipos GG, GC e CC foi de 45 (57%), 28 (35,4%) e 6 (7,6%), respectivamente, não houve diferença estatisticamente significativa entre estas frequências (CORREIA, 2009).

Resultados diferentes foram obtidos em um estudo de caso controle na região sul do Brasil, que avaliou os genes *IL6*-174G/C (rs1800795) e *IL17A* -197A/G (rs2275913) em grupos diferentes: grupo controle de 125 indivíduos saudáveis recrutados de um hemocentro, 50 contatos domiciliares e 191 pacientes do grupo TB. Os resultados mostraram que o genótipo G/C e o alelo C (CC+CG) apresentaram uma diminuição do risco para o desenvolvimento de TB entre os portadores do alelo C (MILANO et al.,2016).

6.3.3 Polimorfismo no gene *TNF* na posição -308 G/A (rs1800629)

A distribuição das frequências alélicas, genótípicas e fenotípicas para o polimorfismo no gene de *TNF* -308G/A, nos grupos de profissionais TCT de repetição negativo e TCT positivo são mostradas na tabela 5. As frequências observadas para os alelos G e A foram, respectivamente, de 0,891 e 0,109, no grupo de profissionais TCT negativo, e de 0,786 e 0,214, no grupo de profissionais TCT positivo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p= 0.0650$).

As frequências absolutas dos genótipos GG, GA e AA foram, respectivamente, 37, 8 e 1, no grupo de profissionais TCT de repetição negativo, e 28, 10 e 4, no grupo de profissionais TCT positivo. As frequências observadas dos genótipos GG, GA e AA foram, respectivamente, 0,804, 0,174 e 0,022, em profissionais TCT de repetição negativo, e 0,667, 0,238 e 0,095, no grupo de profissionais TCT positivos. A análise estatística mostrou que as diferenças observadas entre os dois grupos não foram significantes ($p= 0.2130$).

As frequências dos fenótipos previstos de alto e baixo produtor são 0,196 e 0,804, no grupo de profissionais TCT de repetição negativo, e 0,333 e 0,667, no grupo de profissionais TCT positivo. A comparação das frequências entre os grupos não mostrou diferença estatística ($p= 0.1549$).

Tabela 5 – Distribuição das frequências alélicas, genótípicas e fenotípicas previstas para o polimorfismo – 308 G/A (rs1800629) do gene *TNF* dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo.

Frequência do alelo			
	TCT de repetição negativo	TCT positivo	P
G	0,891	0,786	0,0650
A	0,109	0,214	
Frequência do genótipo (N)			
GG	(37) 0,8043	(28) 0,667	0,2130
GA	(08) 0,1739	(10) 0,2381	
AA	(01) 0,0218	(04) 0,0950	
Frequências dos fenótipos previstos			
Baixo produtor	(37) 0,8043	(28) 0,6667	0,1549
Alto produtor	(09) 0,1957	(14) 0,3333	
Teste de Fischer			

Os dois grupos do nosso estudo apresentaram o perfil de baixo produtor, os resultados da frequência dos genótipos GG, GA e AA no grupo TCT de repetição negativo foram: 37 (80,4%), 8 (17,4%), 1 (2,2%), no grupo TCT positivo 28 (66,7%), 10 (23,8%) e 4 (9,5%), respectivamente, e não houve diferença estatisticamente significativa. Os nossos dados são semelhantes aos encontrados em outras populações que não demonstraram associação deste polimorfismo com suscetibilidade a TB (ORAL et al.,2006; ATES et al.,2007).

Em um estudo similar realizado no Brasil com 250 pacientes de TB não foi observado nenhuma diferença significativa das frequências genótípicas e alélicas nas diferentes formas de apresentação clínica da TB (OLIVEIRA et al.,2004).

6.3.4 Polimorfismo no gene *IL10* nas posições -1082A/G (rs1800896); -592C/A (rs1800872), -819C/T (rs1800871).

As possíveis combinações dos polimorfismos nas posições -1082 G/A, -819C/T e -592C/A formam os haplótipos GCC, ACC e ATA. O número de indivíduos com os genótipos possíveis GCC/GCC, GCC/ACC, GCC/ATA, ACC/ACC, ACC/ATA e ATA/ATA foram respectivamente 2, 10, 17, 3, 8 e 6, no grupo de profissionais TCT de repetição negativo, e 3, 7, 16, 5, 8, 3, no grupo de profissionais TCT positivo. Para a análise estatística, os genótipos foram agrupados de acordo com os fenótipos. Assim, foram agrupados os valores obtidos com os genótipos GCC/ACC e GCC/ATA (produtores intermediários), os valores obtidos com os genótipos ACC/ACC, ACC/ATA e ATA/ATA (baixos produtores) e o genótipo GCC/GCC, que corresponde a altos produtores. A análise mostrou não haver diferenças significantes entre os fenótipos previstos de alto produtor, intermediário e baixo nos grupos comparados ($p=0,4351$). Os dados estão representados na tabela 6.

Considerando-se os polimorfismos em cada posição separadamente, foram observadas as frequências alélicas e genotípicas a seguir: na posição -1082G/A, no grupo de profissionais TCT de repetição negativo, para os genótipos GG 0,043, GA 0,587 e AA 0,370 e os alelos G e A foram 0,337 e 0,663, respectivamente.

Para o grupo de profissionais TCT positivo, os resultados foram: GG 0,071, GA 0,547 e AA 0,391 e os alelos G e A 0,345 e 0,655, respectivamente. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nas frequências genotípicas para o polimorfismo -1082G/A ($p=0,8314$), nem na análise das frequências dos alelos G e A ($p=1$).

Na posição -819C/T, as frequências encontradas no grupo de profissionais TCT de repetição negativo foram: genótipos CC 0,326, CT 0,544 e TT 0,130 e os alelos C e T foram 0,598 e 0,402, respectivamente. No grupo de profissionais TCT positivo, as frequências encontradas foram: genótipos CC 0,358, CT 0,571, TT 0,071 e os alelos C e T 0,643 e 0,357, respectivamente.

Na posição -592C/A, as frequências encontradas no grupo de profissionais TCT negativo foram: genótipos CC 0,326, CA 0,544, AA 0,130 e os alelos C e A 0,598 e 0,402, respectivamente.

No grupo de profissionais TCT positivo as frequências encontradas foram CC 0,358, CA 0,571, AA 0,071 e os alelos C e A 0,643 e 0,357, respectivamente.

A análise da frequência alélica nas posições -819 e -592 nos dois grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,6412$), e nem na análise das frequências genotípicas ($p=0,6569$).

Tabela 6 – Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas previstas para os polimorfismos -1082 A/G (rs1800896), -592C/A (rs1800872), -819C/T (rs1800871) do gene *IL-10* dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo.

Frequência do alelo			
	TCT de repetição negativo	TCT positivo	p
-1082G	0,2619	0,3670	
-1082A	0,7381	0,6330	1,0
-819 C	0,6190	0,6383	
-819 T	0,3809	0,3617	0,6412
-592 C	0,6190	0,6383	
-592 A	0,3809	0,3617	0,6412
(N) Frequência do genótipo			
GCC/GCC	(02) 0,043	(03) 0,072	
GCC/ACC	(10) 0,218	(07) 0,167	
GCC/ATA	(17) 0,370	(16) 0,380	
ACC/ACC	(03) 0,065	(05) 0,119	
ACC/ATA	(08) 0,174	(08) 0,190	
ATA/ATA	(06) 0,130	(03) 0,072	
Frequências dos fenótipos previstos			
Alto produtor	(02) 0,043	(03) 0,071	
Intermediário	(27) 0,587	(23) 0,547	0,8314
Baixo produtor	(17) 0,370	(16) 0,382	
Teste de Fischer			

Um dos fatores genéticos envolvidos na suscetibilidade às doenças infecciosas é o polimorfismo das regiões promotoras que afetam a expressão de citocinas reguladoras da resposta imune. A IL-10 é uma citocina importante durante a fase latente/crônica da TB, onde a alta produção pode estar relacionada com suscetibilidade e reativação da doença (ZHANG et al.,2011).

Na região promotora do gene da *IL-10* podem ser encontrados três SNP localizado nas posições -1082G/A, -819C/T e -592A/C, que conferem a condição de alta, intermediária e baixa produção da citocina (TURNER et al., 1997).

Avaliando as frequências dos fenótipos previstos do gene *IL-10* -1082G/A, -819C/T e -592C/A foi verificado no grupo TCT de repetição negativo uma frequência de alto produtor 2 (4,3%), intermediário 27 (58,7%) e 17 (37%) e no grupo TCT positivo 3 (7,1%), 23 (54,8%) e 16 (38,1%), respectivamente.

Nos dois grupos, a maior frequência dos fenótipos previstos foi de intermediário. Os genótipos que apresentaram os maiores valores percentuais no grupo TCT de repetição negativo foram: GCC/ATA (36,9%), GCC/ACC (21,7) e ACC/ATA (17,4%); no grupo TCT positivo os genótipos GCC/ATA (38,0), ACC/ATA (19,0%) e GCC/ACC (16,7%), respectivamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa para o polimorfismo da *IL-10* -1082G/A, -819C/T e -592 A/C entre os grupos estudados, o que está em concordância com outros trabalhos publicados (TSO et al., 2005; HENAO et al., 2006). Porém, alguns estudos mostram suscetibilidade para TB na presença do alelo G e do polimorfismo *IL-10* -1082G em pacientes com TB, quando comparados a grupo controle sem TB (ORAL et al., 2006; ATES et al., 2008; BEN-SELMA et al., 2011).

Estudos de meta-análise sugerem que os indivíduos portadores do alelo G têm um maior risco para a TB, assim como o polimorfismo *IL-10* -1082G/A, *IL-819C/T* e *IL-592A/C* podem estar associados à suscetibilidade a TB em certas etnias. Referem também à associação do genótipo -1082GG de *IL-10* em pacientes com TB pulmonar, quando comparados com grupo controle. Tem sido descrito que a *IL-10* -819 T/C pode estar associada com fator de risco de TB em asiáticos e a *IL10* -592A/C nos europeus, porém os resultados ainda continuam controversos (LIANG et al.,2014; GAO et al.,2015).

No nosso estudo não foram analisadas as frequências genóticas em separado, de cada polimorfismo. Foi realizada a análise dos haplótipos que permitem a caracterização do fenótipo previsto, que era o interesse do estudo.

6.3.5. Polimorfismo no gene *TGFβ1*- 869T/C códon 10 (rs 1800470) e *TGFβ1* - 509C/T códon 25 (rs 1800469)

6.3.5.1 Códon 10 (rs 1800470) do gene *TGFβ1* -869T/C

A distribuição das frequências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo no códon 10 T/C do gene *TGF-β1*, observada nos grupos de profissionais TCT de repetição negativo e de profissionais TCT positivo, é mostrada na tabela 7. A frequência observada do alelo T foi 0,666 e 0,484, nos grupos de profissionais TCT de repetição negativo, e de profissionais TCT positivo, respectivamente. A frequência do alelo C foi 0,333 e 0,516, nos grupos de profissionais TCT de repetição negativo, e de profissionais TCT positivo, respectivamente. A análise estatística mostrou que as diferenças observadas entre os dois grupos foram significantes $p= 0,0402$.

O número de indivíduos com os genótipos TT, TC e CC observados nos dois grupos estudados foram 14, 17 e 15, respectivamente, no grupo de profissionais TCT de repetição negativo, e 14, 19 e 8 no grupo de profissionais TCT positivo. As frequências observadas para os genótipos TT e TC e CC foram 0,304, 0,370 e 0,326, respectivamente, no grupo de profissionais TCT de repetição negativo, e 0,341, 0,461 e 0,195, no grupo de profissionais TCT positivo. A análise estatística mostra que as diferenças observadas entre os dois grupos não foram significantes $p= 0.06859$.

Tabela 7 – Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas previstas para o polimorfismo -869T/C códon 10 (rs 1800470) do gene *TGFβ1* dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo.

Frequência do alelo			
	TCT de repetição negativo	TCT positivo	P
T	0,6667	0,4840	
C	0,3333	0,5160	0,0402
(N) Frequência do genótipo			
TT	(14) 0,304	(14) 0,341	
TC	(17) 0,370	(19) 0,461	0,0686
CC	(15) 0,326	(08) 0,195	
Teste de Fischer			

6.3.5.2 Códon 25G/C (rs1800469) do gene *TGFβ1* -509 C/T

A distribuição das frequências alélicas, genotípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo do gene *TGF-β1* no códon 25 (G/C) observada nos dois grupos é mostrada na tabela 8. As frequências observadas para os alelos G e C foram 0,9048 e 0,0952, no grupo de profissionais TCT de repetição negativo, e de 0,8351 e 0,1649, no grupo de profissionais TCT positivo. Foram encontradas diferenças significativas na frequência dos alelos observados entre os dois grupos ($p=0,0402$).

O número de indivíduos com os genótipos GG, GC e CC, observados nos dois grupos estudados foram 33, 12 e 1, no grupo de profissionais TCT de repetição negativo, e 32, 5 e 4 no grupo de profissionais TCT positivo, respectivamente. As diferenças entre os valores observados não são estatisticamente significantes ($p=0,1094$).

As frequências genotípicas observadas foram 0,717, 0,261 e 0,022, no grupo de profissionais TCT de repetição negativo, 0,781, 0,121 e 0,098, no grupo de profissionais TCT positivo, para os genótipos GG, GC e CC, respectivamente.

Tabela 8 – Distribuição das frequências alélicas, genótípicas e fenotípicas previstas para o polimorfismo códon 25G/C (rs1800469) do gene *TGFβ1* -509 C/T dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo.

Frequência do alelo			
	TCT de repetição negativo	TCT positivo	P
G	0,9048	0,8351	
C	0,0952	0,1649	0,3441
(N) Frequência do genótipo			
GG	(33) 0,717	(32) 0,781	
GC	(12) 0,261	(05) 0,121	0,1094
CC	(01) 0,022	(04) 0,098	

Teste de Fischer

6.3.5.3 Distribuição das frequências fenotípicas códon 10T/C (rs 1800470) e códon 25G/C (rs1800469) do gene *TGFβ1*

A distribuição das frequências dos fenótipos previstos para o polimorfismo do gene *TGF-β1* (códon 10T/C, códon 25G/C) observada nos grupos de profissionais TCT de repetição negativo e de profissionais TCT positivo é mostrada na tabela 9.

As frequências fenotípicas inferidas com base na análise dos genótipos foram 0,020, 0,270 e 0,170, para o grupo de profissionais TCT de repetição negativo, e 0,071, 0,547 e 0,382 no grupo de profissionais TCT positivo, para alto, intermediário e baixo produtor de *TGF-β1*, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas na frequência dos fenótipos previstos ($p= 0,8314$).

Tabela 9 – Distribuição das frequências alélicas, genótípicas e fenotípicas previstas para o polimorfismo do gene de *TGF-β1* códon 10T/C (rs 1800470) e códon 25G/C (rs1800469) do gene *TGFβ1* dos indivíduos com TCT de repetição negativo e positivo

Frequência do genótipo (N)			p
TCT de repetição negativo		TCT positivo	
T/T G/G ¹	(12) 0,261	(11) 0,268	
T/C G/G ¹	(12) 0,261	(16) 0,390	
T/C G/C ²	(04) 0,087	(01) 0,024	
C/C G/G ²	(09) 0,196	(05) 0,122	
T/T G/C ²	(02) 0,043	(01) 0,073	
C/C G/C ³	(06) 0,130	(03) 0,0851	
C/C C/C ³	(0) 0,0000	(0) 0,000	
T/T C/C ³	(0) 0, 0000	(02) 0,0049	
T/C C/C ³	(01) 0,022	(02) 0,0049	
Fenótipo previsto			
Alto produtor	(02) 0,020	(03) 0,071	0,83
Intermediário	(27) 0,270	(23) 0,547	
Baixo produtor	(17) 0,170	(16) 0,382	

¹Alto produtor; ² Intermediário; ³ baixo produtor

Teste de Fischer

Em nosso estudo não houve diferença entre as frequências alélicas e genótípicas e dos polimorfismos investigados entre os grupos.

Quando avaliamos as frequências dos fenótipos previstos, observamos que nos dois grupos a maior ocorrência foi de produtor intermediário e uma maior frequência do genótipo T/T G/G e T/C G/G. Este resultado foi similar a um estudo que observou uma redução do alelo T do códon 10 nos indivíduos com TB, em relação aos grupos controles, sugerindo um efeito protetor, enquanto no alelo C do códon 10 houve um aumento de expressão nos indivíduos TB, que pode estar associado à suscetibilidade a TB (ROLIM, 2009).

Pode ser que no grupo estudado não tenha sido identificada a prevalência de altos produtores de TGF- β , porque não eram doentes, e sim PS contactantes.

6.4 CORRELAÇÃO ENTRE O TCT E IGRA

Organizações globais estão começando a reconhecer que para combater de forma eficaz a TB é importante a identificação e o tratamento da TBIL. Na busca de um diagnóstico mais sensível e específico, novas tecnologias para substituir o TCT vêm sendo testado para detecção de TBIL. Apesar de nem todos os infectados com o bacilo desenvolverem a TB ativa, certos grupos têm um risco mais elevado de infecção por TB, dentre esses, os profissionais de saúde.

O TCT ainda é o exame mais utilizado na rotina para diagnóstico da infecção de TB que mede as respostas imunes ao PPD *in vivo*. Uma das maiores limitações do TCT é a baixa especificidade, especialmente em indivíduos que foram vacinados pelo BCG, ou naqueles infectados por micobactérias atípicas ou ambientais. O teste pode evidenciar ainda sensibilidade baixa, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. Outra limitação importante é a necessidade do paciente retornar ao laboratório no período de 48 a 96 horas, após a aplicação do PPD para leitura do resultado (DIEL et al.,2009).

Atualmente está disponível um novo teste de diagnóstico da infecção de TB *in vitro*, o IGRA, que é um exame de sangue controlado capaz de detectar a infecção TB com especificidade e sensibilidade maiores que a do TCT.

Em 2014, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária liberou o teste do IGRA para diagnóstico no Brasil. O uso anterior a essa data estava autorizado somente para pesquisa.

No presente estudo foi utilizado o QFT® para a dosagem de IFN- γ pelo método ELISA. Os resultados foram calculados usando o *software* do kit e cada amostra teve resultado de Positivo, Negativo ou Indeterminado.

Os dados do IGRA das amostras com valores diferentes aos encontrados nos registros de TCT foram reavaliados ou repetidos. Foram coletadas novas amostras para os seis resultados indeterminados para confirmação. Os resultados

confirmados como indeterminados após segunda coleta não foram incluídos na análise.

6.4.1 Resultados do TCT de repetição negativo e TCT positivo em comparação ao IGRA.

Dos 47 profissionais de saúde TCT de repetição negativo (ponto de corte <5 mm), 25 (53,2%) tinham IGRA negativo e 22 (46,8%), IGRA positivo. Dos 40 profissionais de saúde TCT positivo (ponto de corte > 10 mm), 13 (32,5%) apresentaram IGRA negativo e 27 (67,5%), IGRA positivo, conforme tabela 10.

Outro dado digno de nota foi o resultado do IGRA negativo em um participante voluntário com reação TCT flictenular (resultado=25 mm), tendo sido a amostra de sangue coletada no ato da leitura do teste cutâneo, para excluir qualquer dúvida.

Tabela 10 – Comparação entre os resultados de teste cutâneo tuberculínico (TCT) e ensaio de detecção de interferon gama (IGRA)

Variáveis	IGRA negativo n (%)	IGRA positivo n (%)	TOTAL
TCT negativo de repetição	25 / 53,2	22 / 46,8	47
TCT positivo	13 / 32,5	27 / 67,5	40
Total	38	49	87

Nesse trabalho, os parâmetros hematológicos de todos os indivíduos não indicavam processos infecciosos, inflamatórios ou desnutrição. A anergia, devido à doença avançada, e imunossupressão podem reduzir a sensibilidade do IGRA, dado que descarta a interferência desta natureza na nossa amostra (PAI et al., 2008).

Foi observada no presente estudo uma concordância entre os testes, interpretada como mediana com o valor de índice Kappa de 0,24 e índice de concordância de 95% (0,003 – 0,404). Dos indivíduos TCT positivo / IGRA negativo,

32,5% apresentaram níveis de IFN- γ detectáveis, porém abaixo do ponto de corte (0,35 UI/mL). Estes dados sugerem resultado falso negativo do IGRA, que talvez possa ser corrigido com a padronização de um ponto de corte em populações com alta prevalência da doença. Uma possível explicação para esse fato é a maior especificidade do IGRA. Por outro lado, em localidades com boas condições socioeconômicas e baixa prevalência da TB, verifica-se concordância superior a 80% (VAN PINXREREM et al.2000; AREND et al., 2007).

O grau de concordância razoável pode ser explicado também pela subjetividade do TCT, onde alguns fatores poderiam levar a um resultado falso negativo, tais como: erro técnico na aplicação do TCT, variabilidade de resposta imune devido a fatores intrínsecos ou extrínsecos (DIEL, et al.,2009). Alguns estudos sugerem que se deve pensar em resultado de TCT falso positivo devido a uma resposta cruzada com a vacina BCG, o que foi discutido previamente por Campos (2006), assim como a um aumento da área de endureção, fato este registrado em indivíduos que fizeram uso da vacina BCG (ADETIFA et al., 2007). Porém, no presente estudo, não podemos afirmar que esses indivíduos foram imunizados, pois os mesmos tinham idade superior à data em que a vacina passou a fazer parte do calendário vacinal.

Em um estudo realizado com profissionais de saúde em quatro cidades brasileiras com alta incidência de TB, cujos resultados corroboram com o nosso estudo, foi observado que quando utilizado o valor de corte para o TCT ≥ 10 mm a concordância entre IGRA e TCT foi de 69% ($K=0,31$) e o valor de corte ≥ 5 mm foi de 57%, com índice de $k=0,22$ (SOUZA et al., 2014).

Outro trabalho realizado na Austrália com 193 profissionais de saúde, média de idade de 35,6 anos e vacinados com BCG, a prevalência de TBIL foi de 88,8% no TCT e 14,5% no teste QFT®. A concordância entre os testes mostrou valor de kappa menor que 0,05 (HUNG et. al., 2013).

Similarmente a um estudo de coorte que analisou os testes do IGRA e TB subsequente em 643 contatos de TB, com um seguimento médio de 3,7 anos, a correlação dos resultados dos testes mostrou índice kappa = 0,35 (MOYO et al., 2015).

Naranjo e colaboradores (2010) avaliaram uma população heterogênea composta de imigrantes e população local e encontraram os seguintes resultados entre indivíduos contactantes: TCT (≥ 10 mm) $k= 0,53$ e contatos não bacilíferos TCT

(≥ 5 mm) $k= 0,28$. Os resultados apresentados diferem dos dados encontrados no nosso trabalho. Talvez a explicação para essa diferença seja o fato da heterogeneidade da amostra.

Uma pesquisa realizada na mesma área geográfica apresentou resultados diferentes. Em uma amostra composta de 255 indivíduos contactantes com TB, 100 (39,2%) eram TCT+ / IGRA+ e outros 94 (36,8%) indivíduos TCT- / IGRA-. De acordo com este estudo ($k=0,53$), em um cenário endêmico para a tuberculose, os resultados TCT parecem ser mais adequados na decisão de tratar a infecção por TBIL.

Em outro estudo realizado na cidade de Vitória, Espírito Santo, Brasil, foi avaliada a concordância entre os testes TCT e IGRA e a eficácia do IGRA no diagnóstico de nova infecção por *M. tuberculosis*, em contatos domiciliares de TB pulmonar. Os contatos que apresentaram TCT negativo foram submetidos a um segundo teste após 8 a 12 semanas. Concluíram que para contactantes expostos recentemente é recomendado o uso dos dois testes e um valor de corte inferior para IGRA, para permitir um acompanhamento mais próximo para a conversão em potencial, $k=0,57$ (MACHADO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2014).

6.4.2. Associação entre o polimorfismo +874 A/T do gene *IFN- γ* e o resultado do IGRA e TCT

A literatura relata estudos que buscam avaliar a associação entre polimorfismos e proteção ou suscetibilidade à TB e comparam a frequência dos genótipos em pacientes com TB ativa, com a frequência em indivíduos saudáveis e com TBIL.

Fatores genéticos do hospedeiro como o polimorfismo nos genes das citocinas têm sido muito estudados na patogênese da TB e têm apresentado resultados discordantes.

Em algumas populações não é possível associar o polimorfismo do *IFN- γ* +874T/A com proteção ou suscetibilidade à TB ativa. Alguns estudos mostram que a ausência de associação possa ser devido à heterogeneidade nas características das frequências genóticas ou pelo fato do polimorfismo não ter efeito mensurável sobre

a proteção contra a TB nestas populações (MORAN, et al., 2007). Por outro lado, estudos em outras populações, mesmo com pequeno número de indivíduos avaliados, foram capazes de demonstrar significância na ocorrência de polimorfismos relevantes associados à suscetibilidade à TB (MOTSINGER-REIF, et al, 2010).

Mesmo o IFN- γ sendo importante para o diagnóstico da TB, encontram-se poucos registros de estudos que relacionam o polimorfismo e a produção *in vitro* dessa citocina. A hipótese de associação entre estes polimorfismos e a suscetibilidade à TB foi sugerida com base na importância destas citocinas na resposta imuno-inflamatória e de evidências que sugerem que mecanismos envolvidos com a regulação da resposta inflamatória têm um papel importante na TB e TBIL.

No presente estudo, os resultados relativos aos fenótipos previstos de alto (TT), intermediário (TA) e baixo produtor (AA) de IFN- γ , a partir do polimorfismo na posição +874A/T em ambos os grupos, mostraram que a maior frequência foi a de baixo produtor. Foram observados nos indivíduos com TCT- / IGRA- os seguintes resultados para os fenótipos previstos de alto produtor (7) intermediário (6) e baixo (15); TCT- / IGRA+: alto (0), intermediário (4), baixo (12), TCT- / IGRA indeterminado: alto (0), intermediário (0) e baixo (1). Os indivíduos com TCT+ / IGRA – nos resultados foram: alto (0), intermediário (3) e baixo (11); TCT+ / IGRA +: alto (3), intermediário (6) e baixo (15); TCT+ / IGRA+ TCT indeterminado: alto (0), intermediário (1) e baixo (3). Foram excluídas do estudo 6 amostras por apresentarem problema de qualidade. Os resultados em números e porcentagens são mostrados na tabela 11.

Tabela 11 - Fenótipo previsto e polimorfismo genético do IFN- γ +874A/T em relação ao IGRA e TCT

Grupos	IGRA			Produtor
	Resultados n	Alto n %	Intermediário n%	Baixo n%
Negativo (n=45)	Negativo (n=28)	7 / 15,6	6 / 13,6	15 / 33,0
	Positivo (n=16)	0	4 / 8,9	12 / 26,7
	Indeterminado (n=1)	0	0	1 / 2,2
Positivo (n=42)	Negativo (n=14)	0	3 / 7,1	11 / 26,2
	Positivo (n=24)	3 / 7,1	6 / 14,3	15 / 35,7
	Indeterminado (n= 4)	0	1 / 2,5	3 / 7,1

TCT = Teste cutâneo tuberculínico

IGRA= Ensaio de liberação de Interferon gama.

Ao analisar o grupo TCT- / IGRA-, verificou-se que o fenótipo previsto de intermediário foi de 6 (13,6%) e de baixo produtor 15 (33%). Talvez não tenha reagido no teste diagnóstico *in vivo*, mas o sistema imune é eficiente, porque não tem história de doença. Sob estímulo, apesar de baixo produtor, o sistema imune consegue reagir conforme observado na reatividade inespecífica (com o mitógeno do IGRA).

Dos profissionais pesquisados no grupo de indivíduos TCT de repetição negativo com IGRA negativo, 7 (15,6%) apresentaram perfil de alto produtor. Uma das justificativas seria que apesar da exposição ao bacilo, devido ao setor de trabalho, talvez esse profissional não tenha tido contato com o agente, o que pode ser explicado por medidas preventivas, como o controle administrativo baseado na busca e identificação precoce de casos bacilíferos e na agilidade de iniciar o tratamento. Outra hipótese seria o controle ambiental, cuja finalidade é diminuir a concentração de aerossóis infectantes em áreas de risco, e talvez, uma das medidas mais importantes, principalmente onde as duas medidas anteriores tenham sido insuficientes, seria o uso de equipamentos de proteção individual ou respiratória. É ainda importante que todos os profissionais sejam informados sobre o risco a que estarão expostos, sobre os sintomas da doença e da importância de seu diagnóstico precoce.

Provavelmente pela conduta de longa experiência em trabalho hospitalar com agente de contato por via aérea, há pelo menos 8 anos, e por medidas de biossegurança eficientes, supostamente o sistema imune destes indivíduos reagiram à infecção ou ela foi controlada no estado assintomático, pela formação de um granuloma eficaz em conter o bacilo e prevenir a disseminação. O controle desta infecção crônica resulta de um equilíbrio permanente do hospedeiro e a micobactéria. A distribuição dos grupos em relação ao resultado do IGRA e do fenótipo previsto do polimorfismo do gene *IFN- γ +874A/T* encontram-se nas figuras 6 e 7.

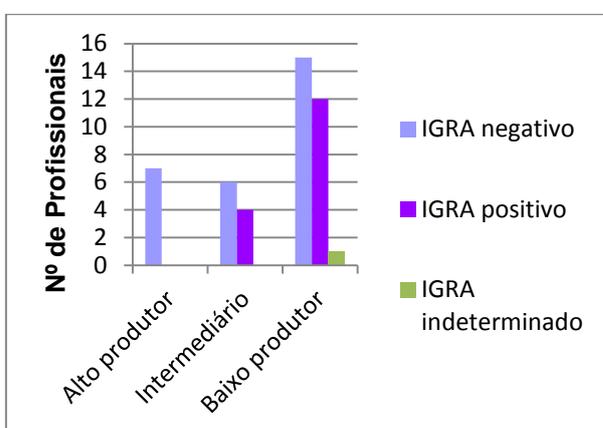


Figura 6 - Frequência fenotípica do gene *IFN- γ +874A/T* e o teste IGRA de PS TCT de repetição negativo
IGRA= Ensaio de liberação de Interferon gama.

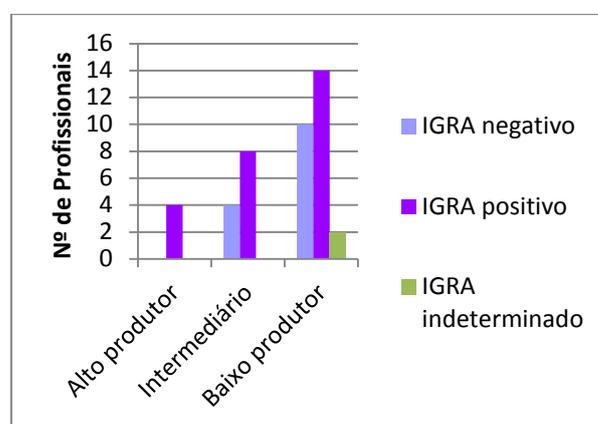


Figura 7 - Frequência fenotípica do gene *IFN- γ +874A/T* e o teste IGRA de PS TCT positivo
IGRA= Ensaio de liberação de Interferon gama.

Na população TCT- / IGRA-, composta por indivíduos com reatividade mitogênica, sendo o teste validado pelo critério do fabricante, verificou-se que o fenótipo previsto de alto produtor no estímulo inespecífico (mitógeno) obteve o valor da média de densidade ótica (OD) do IFN γ (2,6), comparado ao intermediário (2,1) e baixo produtor (2,1). Pode-se atribuir a isso uma condição basal de resposta e defesa com eliminação do agente ao contato, sem infecção ou não contato prévio, devido às exigências do uso de equipamentos de proteção individual do trabalhador, ou ainda o eventual contato com micobactérias atípicas.

Entre os indivíduos TCT+ / IGRA- não foi encontrado o perfil de alto produtor, o que nos leva a questionar se o alto produtor que reage *in vivo* deveria também

exercer a mesma reação *in vitro*. Assim, podemos inferir que esses profissionais não tem fenótipo previsto de alto produtor de IFN γ .

A distribuição no grupo TCT+ / IGRA indeterminado apresentou os seguintes resultados para os fenótipos previstos de intermediário e baixo produtor: intermediário 1 (2,5%) e baixo 3 (7,1%), sendo considerado pouco representativo para maiores conclusões. Nenhum PS IGRA negativo foi alto produtor.

Foi observado que a maior frequência nos profissionais de saúde de fenótipo previsto de baixo produtor para IFN- γ , apenas um indivíduo foi IGRA indeterminado, sendo considerado pouco representativo para maiores conclusões. Nenhum IGRA positivo foi alto produtor.

Porém, ao analisar os indivíduos TCT positivos, esperava-se que produzissem maiores quantidades da citocina, já que são referidos na literatura como produtores de IFN- γ *in vivo*, o qual é responsável pela enduração no teste. Contrariamente, foi verificado que 26,2% dos PS TCT positivos foram negativos no IGRA e tiveram fenótipo previsto de baixo produtor de IFN- γ , dado este não condizente com o esperado.

Uma das possibilidades da diferença entre a produção desta citocina *in vivo* e não *in vitro* poderia ser a presença de micobactérias ambientais que poderiam levar a resultados falso-positivos no TCT, pois geram reações cruzadas. No IGRA são usadas frações antigênicas específicas do *M. tuberculosis* que detectam a infecção TB com especificidade e sensibilidade maior que o TCT com menor possibilidade de reações falso-positivas. Alguns trabalhos relatam os dados de correlação, mas não o fazem concomitantemente ao estudo de polimorfismo.

Ao analisar o grupo TCT+ / IGRA+, os dados mostram correlação dos testes *in vivo* e *in vitro* para reatividade em 24 indivíduos. O polimorfismo desses indivíduos tem o perfil dos fenótipos previstos de baixo produtor, sendo apenas 6 de intermediário e 3 de alto produtor. Isso mostra concordância com os dados de um trabalho de tese realizado na mesma cidade deste estudo (CARNEIRO, 2012).

Entre as análises de reatividade e não reatividades discutidas, outro ponto a ser analisado é a vacinação da BCG que possui na sua composição uma complexidade de proteínas bacterianas que é partilhada com muitas bactérias ambientais. Isto levaria a uma resposta falso-positiva no TCT. Neste estudo, como já referendado a BCG parece não ter interferido no resultado.

Este estudo foi realizado com um critério de base na medicina e na saúde ocupacional, com foco no teste diagnóstico de TBIL. Do total de cerca de 1.200 profissionais vinculados ao hospital de referência secundária e terciária para TB, havia registro de cerca de 300 PS, sendo de 87 TCT negativos. Desses 48 (55,0%) participaram do estudo. O que caracteriza interesse e representativa da população alvo neste ambiente de trabalho de risco de infecção de TB.

Não foram encontrados dados na literatura com a abordagem de estudos e acompanhamento de PS com capacidade de resposta *in vivo* e *in vitro* e polimorfismo genético de citocina associado ao diagnóstico de infecção pelo *M.tuberculosis*.

7 CONCLUSÕES

Nesse estudo foi encontrada uma concordância mediana entre o TCT e o IGRA, na análise dos grupos de profissionais da saúde.

Não foi observada diferença estatística no polimorfismo do gene *IFN- γ +874T/A* para frequência de fenótipo previsto de baixo produtor, comparando os grupo do TCT de repetição negativo e TCT positivo e seus respectivos IGRA.

Foi observada diferença estatística no polimorfismo do gene *TGF β 1 +869 T/C* entre os dois grupos.

Os polimorfismos dos genes *IFN γ +874T/A*, *TNF -308G/A*, *IL6 -174G/C* *IL10 -1082G/A*, *-819C/T* e *-592C/A* e *TGF β 1-509 C/T* não parecem ser marcadores de predisposição ou proteção ao desenvolvimento da TBIL.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Os PS constituem um grupo de risco para a TB pelo constante contato com todos os tipos de pacientes. Mesmo diante dos avanços científicos e tecnológicos, a

diversidade e complexidade dos processos de trabalho existentes em um hospital traduzem-se em um ambiente potencialmente de risco à saúde.

Pela importância desses para a saúde pública, procurou-se com esta tese uma análise da saúde destes trabalhadores e, a partir dos dados coletados, levantar uma discussão sobre TCT / IGRA e polimorfismo genético de citocinas.

Estudos epidemiológicos em nível nacional poderiam contribuir para identificar e rastrear o risco dos profissionais de saúde para TBIL e TB, de acordo com a atividade profissional e as características do ambiente de trabalho, com uma maior amostragem populacional.

Ressaltamos que este estudo pode contribuir para estudos de meta-análise no futuro.

9 REFERÊNCIAS

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, H. A.; PILLAI S. **Imunologia celular e molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda., 2012.

- ADETIFA, I. M. et al. Comparison of two interferon gamma release assays in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection and disease in The Gambia. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, n. 122, oct. 2007.
- ANDERSEN, P.; DOHERTY, T. M. The success and failure of BCG – implications for a novel tuberculosis vaccine. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 3, n. 8, p. 656-662, aug. 2005.
- ANDRADE, M.K.N. Avaliação do risco de tuberculose para os profissionais de saúde. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 1-4, 2001.
- ARANCIBIA, S. A. et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. **Biol. Res.**, London, v. 40, n. 2, p. 97-112, 2007.
- ARAUJO, Z. et al. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de Mycobacterium tuberculosis em la protección, patología y diagnóstico. **Invest. Clin.**, Maracaibo, v. 49, n. 3, p. 411-441, 2008.
- AREND, S. M. et al. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. **Journal Infection Disease**, v. 181, p.1850-4, may. 2000.
- ATES, O. et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in tuberculosis. **J. Clin. Immunol.**, New York, v. 28, p. 232–236, 2008.
- AWAD, M. et al. Genotypic variation in the transforming growth factor- [beta]1 gene: association with transforming growth factor-[beta]1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. **Transplantation**, London, v. 66, n. 8, p. 1014-20, oct. 1998.
- BELLAMY, R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. **Genes Immun.**, New York, v. 4, n. 1, p. 4–11, jan. 2003.
- BELO, M. T, et al. Tuberculosis and gender in a priority city in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 621-625, 2010.
- BENDICHO, M. T. **Estudo do polimorfismo de genes das citocinas TGF- β , IFN- γ , IL-6, IL-10 e TNF- α nas pancreatites agudas e crônicas**. 2008. Tese de doutorado – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.
- BEN-SELMA, W. et al. Association of TNF- α and IL-10 polymorphisms with tuberculosis in Tunisian populations. **Microbes and Infection**, Paris, n. 13, p. 837-843, 2011.
- BETTELLI, E., et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**. v.441, n.7090, p.235-238,2006
- BIDWELL, Jeffrey et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. **Genes and Immunity**, v.1, p. 3-19, jun.1999.

BIKMAEVA, A. R. et al. Polymorphism of the tumor necrosis factor α gene in patients with infiltrative tuberculosis from the Bashkortostan populations. **Mol. Biol. (Mosk.)**, Moscow, v. 36, n. 5, p. 777-784, sep/oct. 2002.

BIN L. et al. Association between IL-10 gene polymorphisms and susceptibility of tuberculosis: evidence based on a meta-analysis. **Plos one**, San Francisco, v. 9, n. 2, 2014

BOURIKAS, L.A. et al. Disseminated tuberculosis in a Crohn's disease patient on anti-TNF alpha therapy despite chemoprophylaxis. **Gut**, London, v. 57, p. 425, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Saúde Suplementar e Associação Médica Brasileira. Tuberculose infecção latente: diagnóstico. **Diretrizes Clínicas na Saúde Suplementar**. 2011. 14 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas em Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para controle da tuberculose**. Brasília, 2002a. 62 p.

_____. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. **Tuberculose guia de vigilância epidemiológica**. 1. ed. Brasília, 2002b. 98 p.

_____. Ministério da Saúde. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde. CONITEC. **Proposta de incorporação do XPERT MTB/RIF como teste para diagnóstico de tuberculose e para indicação de resistência à Rifampicina**. Relatório nº 49. Brasília, 2013. 26 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de recomendações para controle da tuberculose no Brasil**. Brasília, 2011. 284 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Endêmicas. **Programa nacional de controle da tuberculose**. Brasília, 2006. 28 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Técnicas de aplicação e leitura da prova tuberculínica**. Brasília, 2014a. 58 p.

_____. Ministério da Saúde. **Portaria n.º 1.339/GM, de 18 de novembro de 1999**. pg. 45, 4 ed. Brasília, 2008.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. **Boletim Epidemiológico**, v. 45, n. 2. Brasília, 2014. 13 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Boletim Informativo Decit**, v. 3. Brasília, 2008. 4 p.

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

CAMBIEN, F. et al. Polymorphisms of the transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) gene in relation to myocardial infarction and blood pressure: the estude casemoin de l'infarctus du myocarde (ECTIM). **Hypertension**, Dallas, v. 28, n. 5, p. 881-7, nov. 1996.

CAMPOS H. S. Etiopatologia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 29-35, 2006.

CARNEIRO, V. L. Tese de doutorado – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008. Perfil de resposta imune *in vitro* a antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* e do polimorfismo de genes de citocinas na tuberculose. Tese de doutorado – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection . **Recommendations and Reports**, Atlanta, v. 59, n. 5, United States, 2010.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, London, v. 393, p. 537-544, jun. 1998.

CORREIA, P. A. et al. Polimorfismo del TNF-alpha en autoinmunidad y tuberculosis. **Biomédica**, Bogotá, v. 24, 1, p. 43-51, 2004.

CORREIA, J. W. **Polimorfismo -174 G/C do gene de interleucina- 6 na tuberculose pulmonar**. 2009. Tese de doutorado (Programa de pós-graduação em ciências médicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

CORREIA, J. W. et al. Interleukin-6 blood levels in sensitive and multiresistant tuberculosis. **Infection**, München, v. 37, n. 2, p. 138-41, 2009.

COUTO I.R.R et al. Frequência de taxa tuberculínica entre os trabalhadores do Hospital Antônio Pedro. **J. Res. Fundam. Care Online**, Rio de Janeiro, v.6, n.3, p. 958-965,2014.

Disponível em:

<https://www.seer.unirio.br/index.php/cuidadofundamental/article/.../pdf_1339>.

Acesso em: 20 dez. 2015.

CRUVINEL, et al. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, n. 50, v. 4, p. 434-61, 2010.

DAVIS, J. M.; RAMAKRISHMAN, L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. **Cell**, v. 136, p. 37-49, 2009.

DIEHL, S.; RINCON, M. The two faces of IL-6 on TH1/TH2 differentiation. **Mol Immunol**, v.39: 531-6, 2002.

DIEL R. et al., **Comparative Performance of Tuberculin Skin Test, QuantiFERON-TB-Gold In Tube Assay and T Spot Test in Contact Investigations TB for Tuberculosis**. *Chest*.v.135, p.1010-1018, 2009.

ESKDALE, J. et al. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. **Immunogenetics**.v.46, n.2,p. 120-128, 1997.

FAKSRI K. et al. T-cell responses assessed using Igra and TCT are not correlated with afb grade and chest radiograph in pulmonar tuberculosis patients. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, Bangkok, v. 45, n. 6, 2014.

FAN, H. M. et al. Association of TNF- α -238G/A and 308 G/A genep with pulmonary tuberculosis among patients with coal worker's pneumoconiosis. **Biomed. Environ. Sci.**, San Diego, v. 23, n. 2, p. 137-145, apr. 2010.

FAVERO, J. L. et al. Prevalência de tuberculose em profissionais da área de enfermagem obtida por método de relacionamento de bancos de dados, 2000 a 2008, Espírito Santo, Brasil. **Rev. Bra. de Pesquisa em Saúde.**, Vitória, v.14, n.2, p.31-37, 2012.

FISHMAN, D. et al. The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and association with Systemic Onset Juvenile Chronic Arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 7, p.1369-1376, 1998.

Forrellad, M.A. et al. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. **Virulence**, v.4, n.1, p.3-66.2013

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Educação a Distância. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 6. ed. Rio de Janeiro, p. 158-162, 2008.

GAO, X. et al. Interleukin-10 promoter gene polymorphisms and susceptibility to tuberculosis: a meta analysis. **Plos One**, China, n. 10, v. 6., p.1-16, 2015.

GIDEON, H. P.; FLYNN, J. L. Latent tuberculosis: what the host "sees"?. **Immunol. Res.**, New York, v. 50, p. 202-212, 2011.

GRAÇA, E. S. **Caracterização dos níveis plasmáticos e do polimorfismo +874 T/A no gene IFN- γ em pacientes com diferentes formas clínicas da tuberculose**. 2009. v. 1. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários). – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Belém, 2009.

GRANDE, J.P. Role of Transforming Growth Factor- β in Tissue Injury and Repair. *Exp Biol Med*. v. 214, n.1,p.27-40,1997.

- GRAINGER, D. J. et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 8, p. 93-97, 1999.
- HASHEMI , M.et al. Functional polymorphism of interferon- γ (IFN- γ) gene +874T/A polymorphism is associated with pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. **Prague Med. Rep.**, Czech Republic, v. 112, n. 1, p. 38-43, 2011.
- HENAO, M. I. et. al. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. **Tuberculosis**, Edinburgh, v. 86, n. 1, p.11-19. 2006.
- HERNANDEZ-PANDO, R. et al. The response of hepatic acute phase proteins during experimental pulmonar tuberculosis. **Exp. Mol. Pathol.**, New York, v. 65, n. 1, p. 25-36, 1998.
- HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Leg Médecine**, v. 5, supplement, p. S45-S47, 2003.
- HUTCHINSON I, V. et al. Cytokine genotypes in allograft rejection: guidelines for immunosuppression. **Transplant. Proc.**, New York, v. 30, n. 8, aug. 1998.
- HU, Y. et al. Association between cytokine gene polymorphisms and tuberculosis in a Chinese population in Shanghai: a case–control study. **BMC Immunology**, London, v. 16, n.8, p. 1-10, 2015.
- HUNG, W. T. et al. Prevalence of latent tuberculosis infection in BCG-vaccinated healthcare workers by using an interferon-gamma release assay and the tuberculin skin test in an intermediate tuberculosis burden country. **J of Microbiology, Immunology and Infection** v.48, n.2,p.147-152, 2013.
- JENSEN, P.A et al. Guidelines for Preventing the Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Health-Care Settings. **MMWR Recomm Rep**. v.54,p.1-14, 2005.
- KAUFMANN, S. H.; MCMICHAEL, A. J. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. **Nature Medicine**, v. 11, p. 33-44, 2005.
- KE, Z. et al. *IL-10* Polymorphisms and Tuberculosis Susceptibility:An Updated Meta-Analysis.**Yonsei Med J**. v.56, n.5,p.1274-1287,2015 .
- KEEN, L. J. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. **Transplant Immunology**, v. 10, p.143-6, 2002. Bristol.
- KIMURA A.,KISHIMOTO T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. **Eur J Immunol**. V.40,n.7,p,1830-1835, 2010

KUPELI, E. Diagnostic accuracy of cytokine levels (TNF- α , IL-2 and IFN- γ) in bronchoalveolar lavage fluid of smear-negative pulmonary tuberculosis patients. **Respiration**, v. 75, n. 1, p. 73-78, 2008.

LIANG, B. et al. Association between IL-10 gene polymorphisms and susceptibility of tuberculosis: evidence based on a meta-analysis. *Plos one*. v.9,n.4, p.1-10, 2014.

LIO, D. et al. Genotype frequencies of the +874T→A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon- γ gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. **Eur J Immunogenet**, Palermo, v. 29, n. 5, p. 371–374, oct. 2002.

LIU, Q. et al. The association of interleukin-10 -1082, -819, -592 polymorphisms and tuberculosis risk. **Saudi Medical Journal**, China; v. 36, n. 4, p. 407-417, 2015.

LORENZI, L.R.; OLIVEIRA, I.M. Tuberculose em trabalhadores de Enfermagem: uma abordagem epidemiológica de base populacional. **Rev. bras. Saúde ocup.** v.33, n.117, p.06-14, 2008.

LOK, K. H. et al. Molecular differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains without. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 1310-1313, nov 2002.

LOPES, J.; JANSEN, J. M.J.; CAPONE, D.; Patogenia e imunologia. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto-UERJ**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 27-34, 2006.

LOPES, F.H.A. Serum levels of interleukin-6 in contacts of active pulmonary tuberculosis. **J Bras Patol Med Lab**, v. 49, n. 6, p. 410-414, 2013.

LOPEZ-MADARUELO, D. et al. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v.167, n. 7, p. 970-5, 2003.

LUNA, J. A. C. Diagnóstico de la infección tuberculosa Prueba de la tuberculina. In: **Guía de la tuberculosis para médicos especialistas**. Francia: UICTER, cap.6, p.60-74, 2003.

MACHADO, P. C. et al. Comparação do Teste Cutâneo Tuberculínico e do ensaio de liberação de interferon-gama para diagnóstico de tuberculose latente em agentes comunitários de saúde do Sul do Brasil, Rio Grande do Sul, 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 4, p. 675-681, 2014.

MACHADO, A. et al. Analysis of discordance between the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.13, n.4, p.446–453, 2009.

MORAN, A. et al. No association between the +874T/A single nucleotide polymorphism in the IFN-gamma gene and susceptibility to TB. **Int J Tuberc Lung Dis**. v. 11, n.1, p. 113-115, 2007

Moyo, N.; TAY, E. L.; Tay, J. T.; Denholm, J.T. Evaluation of tuberculin skin testing in tuberculosis contacts in Victoria, Australia, 2005–2013. **Public Health Action**. v.5, n. 3, p.188-193, 2015.

MOTSINGER-REIF, A.A. et al., Polymorphisms in IL-1b, vitamin D receptor Fok1, and Toll-like receptor 2 are associated with extrapulmonary tuberculosis. **BMC Medical Genetics**, v. 11, n.37, p. 1-10, 2010.

MANN, A. Et al. Keratinocyte derived granulocytemacrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation and vascularization. **J. Invest. Dermatol.**, v. 117, p. 1382-1390, 2001.

MENZIES, D.; AL JAHDALI, H.; AL OTAIBI, B. Recent developments in treatment of latent tuberculosis infection. **Indian Journal of Medical Research**, v. 133, n. 3, p. 257-266, 2011.

MERZA, M. et al. The NRAMPI, VDR and TNF- α gene polymorphisms in Iranian tuberculosis patients: the study on host susceptibility. **Brazilian Journal of Medical And Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 4, p. 252-256, 2009.

MILANO et al. Single Nucleotide Polymorphisms in IL17A and IL6 are associated with Decreased Risk for Pulmonary Tuberculosis in Southern Brazilian Population. **Plos One**. p.1-11,2016.

MIRANDA et al. The Tuberculous Granuloma: An Unsuccessful Host Defense Mechanism Providing a Safety Shelter for the Bacteria?. **Journal of Immunology Research**. v.2012,p.1-14,2012.

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

MÖLLER, et al. Analysis of eight genes modulating interferon gamma and human genetic susceptibility to tuberculosis: a case-control association study. **BMC Infectious Diseases**, v. 154, p. 1-10, 2010.

MORI. T. et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 170, p. 59-64, 2004.

MORSE, H.R. et al. Induced heteroduplex genotyping of TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 and IL-10 polymorphisms associated with transcriptional regulation. **Cytokine**, n. 10, v. 11, p. 789-795, 1999.

MOSAAD, Y. M. et al. Interferon-gamma +874 T/A and Interleukin-10 -1082 A/G single nucleotide polymorphism in Egyptian children with tuberculosis. **Scandinavian journal of immunology**, v.72, p. 358-364, 2010.

MOUTINHO, I. L. D. et al. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Rev. Med. Minas Gerais**, v. 21, n. 1, p. 42-48, 2011.

NAYLOR, S. L. et.al. Human immune interferon gene is located on chromosome 12. **J Exp Med.** v.157, n.3, p.1020-1027, 1983.

NARANJO, J. D. et, al. Estudio comparativo de QuantiFERON1-TB Gold IT frente a tuberculina para el diagnostico de la infeccion tuberculosa latente en estudios de contatos. **Med Clin (Barc).** V.137, n.7, p.289-296, 2009.

NORTH, R.J, JUNG, Y.J. Immunity to Tuberculosis. **Annual Review of Immunology.** v. 22, p. 599-623, 2004.

OLIVEIRA, S. M. V. L. de et al. Efeito booster na prova tuberculínica em um hospital universitário de Mato Grosso do Sul. **Rev Bras Saúde Ocup,** São Paulo,v. 33,n. 117, p. 72-76, 2008.

OMER, R. et al. Maintaining Immunological Balance in Parasitic Infections: A Role for TGF- β ? **Parasitology Today,** v.16, p. 18-23, 2000.

ORAL H.B.et al., Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. **Elsevier.Turkey,** v.35, p.143-147,2006.

OLIVIERE, .B. et al. The -174 C/G locus affects in vitro/in vivo IL-6 production during aging. **Experimental Gerontology,** v. 37, p.309-314, 2002.

PAI. M. et al. Interferon-gamma assays in the Immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. **Lancet,** v.4, n.12, p.761-76, 2004.

PACHECO, A. G.et al. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **Human Genetics,** v. 123, n. 5, p. 477-84, 2008

PARRA, F. C, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** .v.100, n1, p 177-182, 2003.

PENG, H. et al. The mycobacterium tuberculosis early secreted antigenic target of 6 kDa inhibits T cell interferon - γ production through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **J. Biol. Chem, Baltimore,** v. 286, n. 27, p. 1-26, 2011.

PEREIRA, R. W. et al . Prevalência de infecção latente pelo Mycobacterium tuberculosis entre estudantes da área da saúde de uma universidade pública em Vitória, ES, Brasil. **Ciênc. saúde col,** Rio de Janeiro , v. 18,n. 5,p. 1331-1339, 2013 .

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

RAFIZA, K. G. RAMPAL. Serial testing of Malaysian health care workers with QuantiFERON®-TB Gold In-TubeINT.**Int J Tub Lung Disease,** v.16, n.2, p. 163–168, 2012.

RAJA, A. Immunology of tuberculosis: review. **Indian Journal of Medical Research**, v. 120, p. 213-232, oct. 2004.

RENSHAW, P. S. et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 24, n.14, p. 2491-2498, 2005.

RIBEIRO-RODRIGUES, R. et al. Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis early markers of micobacterial clearance. **Clin. Diagn. Lab. Immunology**, v.9, n.4, p. 818-823, 2002.

RUSSELL, D.G. Who puts the tubercle in tuberculosis?. **Nature Reviews Microbiology**, n. 5, p. 39-47, jan. 2007) | DOI: 10.1038/nrmicro1538

RODRIGUES et al. Discordance of tuberculin skin test and interferon gamma release assay in recently exposed household contacts of pulmonary TB cases in Brazil. **Plos one**. v.9, n.5, p.1-10, 2014.

ROLIM, P.G. Estudo do polimorfismo dos genes de citocinas em pacientes com tuberculose pulmonary. 2009- Dissertação (Mestrado em Patologia)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

SANT'ANNA C. C. et al. Diagnóstico e terapêutica da tuberculose infantil: uma visão atualizada de um antigo problema. **Journal of Pediatrics**, v. 78, n. 2, p. 205-214, 2002.

SAUNDERS, B. M. et al. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to mycobacterium tuberculosis infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3322-3326, 2000.

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

SILVA, Claudia Maria de Melo. Polimorfismos genéticos e associação com a produção de Interferon gama (IFN- γ) em pacientes com tuberculose pulmonar. 2014. 1v. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2014.

SIVANGALA, R. et al. Association of cytokine gene polymorphisms in patients with tuberculosis and their household contacts. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 79, p. 197–205, 2014.

SMITH, I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. **ClinMicrobiolRev**, v. 16, n. 3, p. 463-496, 2003.

SOUZA, F. M. et al. Comparison of Interferon- γ Release Assay to Two Cut-Off Points of Tuberculin Skin Test to Detect Latent Mycobacterium tuberculosis Infection in Primary Health Care Workers. **Plos one** v.9, n. 8, p.1-21, 2014

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

SUSIANTI H, H. K. Changes to signal peptide and the level of transforming growth factor- β 1 due to T869C polymorphism of TGF β 1 associated with lupus renal fibrosis. **Springerplus**. v.10, n.3, p.514, 2014.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 3, p. 323-334, 2007.

TOOSSI, Z. et al. Enhanced productions of TGF β by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF β in tuberculosis granulomas lung lesions. **J.Immunol.**,v.154, p.465-473, 1995.

TSO, W. H.; CHONG, W. P.; TAM, C. M. *et al.* Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. **Genes and Immunity**, v. 6, p. 358–363, 2005.

TUFARIELLO, et al. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. **Lancet Infectious Diseases** v. 3, p. 578-590, 2003.

TURNER et. Al., An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur. J. Immunogenetics**. v. 24, p. 1-8,1997.

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

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

VAN DE VOSSE, E.; VAN DISSEL, J. T.; OTTENHOFF, T. H. M. Genetic deficiencies of innate immune signaling in human infectious disease. **Lancet Infectious Diseases**, v. 9, p. 688-98, nov. 2009.

VEJBAESYA, et al., NRAMP1 and TNF- α polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Thais. **Respirology** v. 12,n..2, p.202-206,2007. Asian

VIDYARANI, M. et al. Interferon gamma (IFN gamma) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 10, p. 403-410, 2006.

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

WANG, F. et al. Mycobacterium tuberculosis-specific TNF- α is a potential biomarker for the rapid diagnosis of active tuberculosis disease in chinese population. **PLoS ONE**, v.8, n.11, 2013 DOI:10.1371/journal.pone.0079431

WANG, Q. et al TNF-308 gene polymorphism and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis involving 18 studies. **Mol.Biol Rep.** v. 39, n. 4, p. 393-400, 2012.

WILSON, A. G, et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proc Natl Acad Sci.** v.94, n.1,p. 3195-3199, 1997.USA

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on the management of latent tuberculosis infection: the end TB strategy.** Geneve: WHO, 2015.

_____. A review of current epidemiological data and estimation of future tuberculosis incidence and estimation of future tuberculosis incidence and mortality. 1993.

_____. Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAS) in low- and middle-income countries. **Policy statement.** Geneve, Swizerland: WHO, 2011.

_____. **Tuberculosis Programme:** framework for effective tuberculosis control. Geneve, Swizerland: WHO, 1994.

_____. **Global tuberculosis control:** surveillance, planning, financing: WHO. Geneve, Swizerland: WHO; 2005.

_____. **Global tuberculosis report 2012.** Geneva, Swizerland: WHO, 2012.

_____. **Guideline for isolation precautions:** preventing transmission of infectious agents in health care settings. Geneva, Swizerland: WHO.

_____. **Guidelines for preventing the transmission of mycobacterium tuberculosis in health-care settings.** Geneva, Swizerland: WHO, 2005.

WU, L. et al. Screening toll-like receptor markers to predict latent tuberculosis infection and subsequent tuberculosis disease in a Chinese population. **BMC Medical Genetics**, v. 16, n. 19, 2015.

WU, M. Inhibition of *M. tuberculosis* induced signaling by transforming growth factor- β in human mononuclear phagocytes. **Scand J Immunol**, v. 75, n. 3, p. 301–304, 2012.

XING, Z.; SANTOSUOSSO, M. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF- α and

nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. **Journal Leukoc Biology**, v. 68, p. 897-902, 2000.

ZHANG, J. et al. Interleukin-10 polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, 2011.

ZHANG, Z. et al. Association between tumor necrosis factor alpha-238G/a polymorphism and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 328, p. 1-8, 2012.

ZUNQIONG K. et al. IL-10 polymorphisms and tuberculosis susceptibility: an updated meta-analysis. **Yonsei Medical Journal**, v. 56, n. 5, p. 1274-1287, sep. 2015.

XING, Z.; SANTOSUOSSO, M. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. **Journal Leukoc Biology**, v. 68, p. 897-902, 2000.

YIM, J. J.; SELVARA, J. P. Genetic susceptibility in tuberculosis. **Respirology**, India, v. 15, p. 241-256, oct. 2010.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Salvador, 24 de julho de 2009.

OFICIO N°. 86/2009

REFERENTE AO PROTOCOLO N°. 119/2008

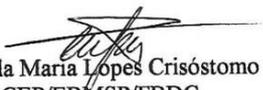
“PEDRONIZAÇÃO DE TESTE IMUNODIAGNÓSTICOS INVIVO ALTERNATIVOS PARA TUBERCULOSE HUMANA E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INVITRO A DIFERENTES ANTÍGENOS MYCOBACTERIUM SP E CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS”

Pesquisador: Prof. JOSÉ MAYER NASCIMENTO

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

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

Saudações,


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

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

Salvador, 24 de julho de 2009.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Salvador, 24 de julho de 2009.

OFICIO N°. 86/2009

REFERENTE AO PROTOCOLO N°. 119/2008

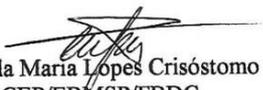
“PEDRONIZAÇÃO DE TESTE IMUNODIAGNÓSTICOS INVIRO ALTERNATIVOS PARA TUBERCULOSE HUMANA E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INVITRO A DIFERENTES ANTÍGENOS MYCOBACTERIUM SP E CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS”

Pesquisador: Prof. JOSÉ MAYER NASCIMENTO

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

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

Saudações,


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

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

Salvador, 24 de julho de 2009.



GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA
Secretaria da Saúde do Estado da Bahia
Hospital Especializado Octávio Mangabeira

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO

Eu, Leandro Gomes Lobo, diretor do Hospital Especializado Octávio Mangabeira, estou ciente e autorizo os pesquisadores José Roberto Meyer, Sogeli Menezes Freire, Marilda Casela e Silvana M^a Andrade Cerqueira a desenvolver nesta instituição o projeto de pesquisa intitulado "Padronização de teste imunodiagnóstico in vitro a diferentes antígenos de Mycobacterium sp e Corynebacterium pseudotuberculosis", após aprovação pelo Núcleo de Pesquisa em Pneumologia da Unidade.

Salvador, 09 de julho de 2015.

Dr. Leandro Gomes Lobo
Diretor Geral



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



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

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

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

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

4. Descrição da pesquisa

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

desenvolvimento de um exame de laboratório para uso nacional para ser usado, em substituição ao exame internacional disponível nos países mais ricos e que seja acessível a maior parte da população brasileira.

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

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

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

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

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

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

Assinatura do PESQUISADOR RESPONSÁVEL

CONSENTIMENTO DO SUJEITO DE PESQUISA

Eu,

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

Cidade do Salvador, Bahia, de de 2015.

Nome completo e legível

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

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

Nome: _____ Assinatura: _____ CPF nº: _____

Nome: _____ Assinatura: _____ CPF nº: _____



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

FICHA CLÍNICA

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

Nome do entrevistador: _____ Data da coleta: ___/___/___

Identificação do paciente:

Parametro	Possibilidades	Resposta
Registro		
Nome Completo		
Procedência	1.IBIT 2.HOM 3.OUTROS	
Gênero	1.MASCULINO 2.FEMININO	
Data de Nascimento ___/___/19__		
Naturalidade		
Profissão		
Grau de Instrução	1.Fundamental Incompleto 2.Fundamental Completo 3.Nível Médio Incompleto 4.Nível Médio Completo 5.Superior Incompleto 6.Superior Completo 7. Outro _____	
Endereço		
Telefone		
Classificação Étnica (auto-referenciada) –IBGE	1.BRANCO 2.MESTIÇO 3.NEGRO 4.ÍNDIO	

Dados Clínico-Laboratoriais:

Parametro/Pergunta	Possibilidades	Resposta
1. O paciente já realizou a BACILOSCOPIA? OBS: BACILOSCOPIA = Exame de escarro (Se NÃO , pular para a questão	1.SIM 2.NÃO 3.Não sei/Não lembro	

4)		
2. Resultado da BACILOSCOPIA (Se NEGATIVO , pular para a questão 4)	1.POSITIVO 3.Não sei/Não lembro	2.NEGATIVO
3. Se POSITIVO , qual a classificação? – Preferencia COLOCAR A PARTIR DO LAUDO / Prontuário	1. (1+) 2. (2+) 3.(3+) 4.(4+) 5.Não sei/Não lembro	
4. O paciente já realizou o exame CULTURA? (Se NÃO , pular para a questão 6)	1.SIM lembro	2.NÃO 3.Não sei/Não
5. Se SIM , qual foi o resultado? Preferencia COLOCAR A PARTIR DO LAUDO / Prontuário/Cadastro	1.POSITIVO 3.Não sei/Não lembro	2.NEGATIVO
6. O paciente já realizou o exame PPD? (Explicar ao paciente como é o exame) (Se NÃO , pular para a questão 8) Preferencia COLOCAR A PARTIR DO LAUDO / Prontuário /Cadastro	1.SIM	2.NÃO
7. Qual foi o resultado do PPD? Em mm Preferencia COLOCAR A PARTIR DO LAUDO / Prontuário /Cadastro	Em mm_____	
8. O paciente já tomou a vacina BCG? Preferencia COLOCAR A PARTIR DA CICATRIZ VACINAL NO BRAÇO	1.SIM	2.NÃO
9. O paciente tem a cicatriz da BCG? (Olhar o braço direito do paciente)	1.SIM	2.NÃO
10.O paciente está em tratamento? (Se NÃO , pular para a questão 13)	1.SIM	2.NÃO
11.O tratamento atual tem quanto tempo? Preferencia COLOCAR A PARTIR DO LAUDO / Prontuário/Cadastro	1.Um mês 3.Três meses 4.Quatro meses 6.Seis meses 7. Mais que seis meses	2.Dois meses 5.Cinco meses

<p>12. Quais as drogas utilizadas no tratamento atual? (Pular para a questão 17)</p>	<p>1. Isoniazida 2. Rifampicina 3. Pirazinamida 4. Etambutol 5. Estreptomicina 6. Etionamida 7. Não sei/Não lembro 8. Outros (especificar)</p> <hr/> <p>OBS: Comprimidos "vermelhos" = Isoniazida e Rifampicina; Comprimidos "brancos" = Pirazinamida</p>	
<p>13. O paciente tem ou já teve contato com um possível COMUNICANTE da tuberculose? (Se NÃO, pular para a questão 15)</p>	<p>1. SIM 2. NÃO OBS: Explicar comunicante como escola, companheiro, residência,</p>	
<p>14. Qual tipo de contato?</p>	<p>1. Domiciliar 2. Trabalho 3. Vizinhos 4. Escola 5. Outros</p>	
<p>15. O paciente utiliza ou já utilizou profilaxia (isoniazida profilático)? (Se NÃO, pular para a questão 17)</p>	<p>1. SIM 2. NÃO</p>	
<p>16. Se SIM, por quanto tempo?</p>	<p>1. Um mês 2. Dois meses 3. Três meses 4. Quatro meses 5. Cinco meses 6. Seis meses 7. Não sei/Não lembro</p>	
<p>17. O paciente faz uso de algum medicamento que não seja para tuberculose? (Se NÃO, pular para a questão 19)</p>	<p>1. SIM 2. NÃO</p>	
<p>18. Se SIM, qual ou quais? (especificar)</p>		
<p>19. Grupo no presente estudo</p>	<p>1. Grupo I (Tuberculose sintomática sem tratamento com Baciloscopia +; e/ou cultura +; e/ou TRM (detectado ou +). 2. Grupo II (Assintomático; PPD positivo) 3. Grupo III (Assintomático; PPD negativo) OBS: PPD positivo = maior que 5mm (PNCT)</p>	
<p>20- RAIO_X</p>	<p>1- SIM 2- NÃO 3- NÃO SABE</p>	

21 – Coleta de Escarro e ou saliva-	1- Baciloscopia 2- Cultura para BK 3- Teste Rápido Molecular (TRM) - <i>Gene Xpert® MTB/RIF</i> 4- PCR- Teste Molecular 5-PCR Multiplex – Teste Molecular	
22-Coleta de Lavado brônquico alveolar	1- Baciloscopia 2- Cultura para BK 3- Teste Rápido Molecular (TRM) - <i>Gene Xpert® MTB/RIF</i> 4- PCR- Teste Molecular 5-PCR Multiplex – Teste Molecular	
23-Coleta de Líquidos Cavitários Qual:	1- Baciloscopia 2- Cultura para BK 3- Teste Rápido Molecular (TRM) - <i>Gene Xpert® MTB/RIF</i> 4- PCR- Teste Molecular 5-PCR Multiplex – Teste Molecular	
24- Coleta de Sangue : Soro e Plasma	1-PCR Ultra Sensível 2-Dosagem de Citocinas 3-Cultura para estudo de estímulo Celular 4-IGRA 5-Hemograma 6- Multitest para LT (FACS) 7-Polimorfismo Genético	



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>