

## Marcadores inflamatórios e imunogenéticos e sua relação com tuberculose pulmonar\*

Inflammatory and immunogenetic markers in correlation with pulmonary tuberculosis

Beatriz Lima Alezio Muller, Daniela Maria de Paula Ramalho, Paula Fernanda Gonçalves dos Santos, Eliene Denites Duarte Mesquita, Afranio Lineu Kritski, Martha Maria Oliveira

### Resumo

**Objetivo:** Descrever os níveis séricos das citocinas IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , assim como polimorfismos presentes em genes envolvidos na sua transcrição, e sua associação com marcadores de resposta inflamatória aguda em pacientes com tuberculose. **Métodos:** Estudo descritivo e longitudinal realizado em 81 pacientes com tuberculose pulmonar atendidos em dois hospitais de referência. Foram coletadas informações sociodemográficas, conversão bacteriológica na oitava semana de tratamento antituberculose, polimorfismos relacionados às citocinas estudadas, níveis séricos dessas citocinas, assim como de proteína C reativa (PCR). Também foram avaliados VHS e contagem de CD4+. **Resultados:** A mediana de idade dos pacientes era de 43 anos, sendo 67 (82,7%) do sexo masculino e 8 (9,9%) infectados por HIV. Os pacientes com níveis elevados de IFN- $\gamma$  e baixos níveis de IL-10 apresentaram valores mais elevados de VHS. Não houve associação dos polimorfismos do gene IFN- $\gamma$  na posição +874 e do gene TNF- $\alpha$  na posição -238 com os níveis das citocinas correspondentes. Houve uma associação entre polimorfismos do gene IL-10 nas posições -592 e -819 (mas não -1082) e baixos níveis de IL-10. Houve uma associação negativa entre a taxa de conversão bacteriológica na oitava semana de tratamento e níveis de PCR. **Conclusões:** Nossos resultados sugerem que marcadores genéticos e de resposta inflamatória aguda podem ser úteis na predição da resposta ao tratamento antituberculose.

**Descritores:** Tuberculose; Citocinas; Sistema imunológico; Polimorfismo de nucleotídeo único.

### Abstract

**Objective:** To describe serum levels of the cytokines IL-10, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ , as well as polymorphisms in the genes involved in their transcription, and their association with markers of the acute inflammatory response in patients with pulmonary tuberculosis. **Methods:** This was a descriptive, longitudinal study involving 81 patients with pulmonary tuberculosis treated at two referral hospitals. We collected data on sociodemographic variables and evaluated bacteriological conversion at the eighth week of antituberculosis treatment, gene polymorphisms related to the cytokines studied, and serum levels of those cytokines, as well as those of C-reactive protein (CRP). We also determined the ESR and CD4+ counts. **Results:** The median age of the patients was 43 years; 67 patients (82.7%) were male; and 8 patients (9.9%) were infected with HIV. The ESR was highest in the patients with high IFN- $\gamma$  levels and low IL-10 levels. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  gene polymorphisms at positions +874 and -238, respectively, showed no correlations with the corresponding cytokine serum levels. Low IL-10 levels were associated with IL-10 gene polymorphisms at positions -592 and -819 (but not -1082). There was a negative association between bacteriological conversion at the eighth week of treatment and CRP levels. **Conclusions:** Our results suggest that genetic markers and markers of acute inflammatory response are useful in predicting the response to antituberculosis treatment.

**Keywords:** Tuberculosis; Cytokines; Immune system; Polymorphism, single nucleotide.

\*Trabalho realizado no Centro de Pesquisas em Tuberculose, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Endereço para correspondência: Martha Maria Oliveira. Rua Porto Seguro, 54, Ilha do Governador, CEP 21931-060, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Tel. 55 21 2562-2426. Fax: 55 21 2562-2431. E-mail: martholiveira@yahoo.com.br

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação (CNPq/MCTI), processos CNPq/INCT 573548/2008-0 e 478033/2009-5; e da Fundação Estadual de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, processo E:26/110.974/2011.

Recebido para publicação em 3/4/2013. Aprovado, após revisão, em 10/10/2013.

## Introdução

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa crônica, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, e sua forma clínica mais comum caracteriza-se pelo comprometimento dos pulmões, podendo também atingir outros locais anatômicos (tuberculose extrapulmonar) ou ocorrer de maneira disseminada.<sup>(1)</sup>

Apesar de ser uma doença curável, a tuberculose permanece como um grande problema de saúde pública mundial. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o Brasil ocupa o 19º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo e o 108º lugar em incidência. Segundo o Ministério da Saúde, em 2010, foram notificados 71 mil novos casos de tuberculose no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, o que equivale a uma taxa de incidência de 37,2/100.000 habitantes.<sup>(2)</sup>

A inflamação sistêmica observada em pacientes com tuberculose é mediada por meio da ativação do sistema imune, com uma produção excessiva de citocinas, como IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .<sup>(3)</sup> Seguindo o processo inflamatório, verifica-se um aumento da síntese hepática e de níveis séricos de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa (PCR), e de VHS, que têm sido utilizadas na fase de diagnóstico e na monitorização da evolução dos pacientes, pois seus níveis no plasma refletem diretamente a intensidade do processo patológico.<sup>(4)</sup>

Fatores genéticos têm sido associados à susceptibilidade ou à proteção da infecção pelo bacilo da tuberculose.<sup>(5)</sup> Na resposta imune contra o bacilo da tuberculose há uma considerável variação entre as frequências alélicas nos polimorfismos em genes de citocinas em diferentes populações, conforme relatado em meta-análises que avaliaram polimorfismos em genes de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$ .<sup>(6,7)</sup> Tem sido proposta a avaliação dos níveis de citocinas séricas e sua atuação como marcadores de resposta ao tratamento antituberculose.<sup>(8)</sup> A manutenção de baixos níveis séricos iniciais de IFN- $\gamma$  ou de elevados níveis séricos de TNF- $\alpha$  e do aumento de nível sérico de IL-17 está associada a um pior prognóstico, com maior proporção de mortalidade ou menor conversão bacteriológica ao final da 8ª semana de tratamento antituberculose. Recentemente, Lago et al.<sup>(9)</sup> descreveram uma possível associação entre a recidiva e a manutenção de níveis séricos elevados de IL-10 durante o

tratamento antituberculose. O estudo dos genes envolvidos nesses processos e suas interações com a resposta imune e inflamatória podem auxiliar na identificação de melhores marcadores de proteção contra a ocorrência de tuberculose.

Entretanto, são escassos os estudos que avaliam ao mesmo tempo os aspectos genotípicos e fenotípicos da resposta imune do hospedeiro humano a infecção por *M. tuberculosis*.<sup>(10,11)</sup> Dada a escassez de dados sobre a avaliação simultânea de biomarcadores genéticos, imunológicos e inflamatórios em pacientes com tuberculose pulmonar, no presente estudo, estimamos a prevalência dos polimorfismos que codificam IL-10 nas posições -592, -819 e -1082; TNF- $\alpha$  na posição -238; e IFN- $\gamma$  na posição +874. O estudo foi realizado em uma série de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, atendidos e internados em dois hospitais de referência da cidade do Rio de Janeiro. Adicionalmente, analisamos o nível sérico das citocinas correspondentes e a resposta inflamatória aguda por meio da dosagem de PCR, VHS e CD4+.

## Métodos

Estudo descritivo e longitudinal que envolveu 81 pacientes internados em dois hospitais de referência no atendimento de tuberculose no Estado do Rio de Janeiro (Hospital Estadual Santa Maria e Instituto Estadual de Doenças do Tórax Ary Parreiras), com diagnóstico de tuberculose pulmonar no período entre 23 de março de 2007 e 7 de agosto de 2009. Foram incluídos pacientes com baciloscopia e cultura positiva para micobactéria, com subsequente confirmação da espécie *M. tuberculosis* por meio de testes bioquímicos. Foram analisadas as seguintes variáveis: PCR, VHS, CD4+ e conversão bacteriológica na 8ª semana de tratamento antituberculose.

Para a extração de DNA, foi utilizado um kit comercial (DNAzol; Gibco BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), conforme instruções do fabricante. Após a extração, uma amostra de DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% para a verificação de integridade e a estimativa da concentração, sendo essa amostra posteriormente estocada a -20°C.

Para a análise dos polimorfismos na posição -238 do gene que codifica TNF- $\alpha$ , foram adicionados 100 ng de DNA, tampão 1x, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP, 1 U Taq DNA polimerase

(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e 15 pmol de cada *primer* para a reação em cadeia da polimerase. As condições da reação em cadeia da polimerase foram as seguintes: um ciclo a 94°C por 1 min, seguidos por 5 ciclos a 94°C, 67°C e 72°C (60 s cada) e 25 ciclos a 94°C, 62°C e 72°C (60 s cada). A genotipagem do polimorfismo +874 do gene que codifica IFN- $\gamma$  foi realizada com 200 mL de dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 8,5% sacarose, 0,25 U de ThermoPrime Plus DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), 5 mL de cada *primer* específico, 0,5 mL de *primer* de controle interno e 100 ng de DNA. A mistura foi incubada a 95°C por 1 min; em seguida foram realizados 10 ciclos a 95°C por 15 s, 10 ciclos a 62°C por 50 s, 10 ciclos a 72°C por 40 s, 20 ciclos a 95°C por 20 s, 20 ciclos a 56°C por 50 s e 20 ciclos a 72°C por 50 s. Para a detecção dos polimorfismos -819, -1082 e -592 no promotor do gene de IL-10, foram feitas as seguintes etapas: para a tipagem da mutação na posição -592 foi amplificado um fragmento de 480 pb posteriormente digerido com a enzima RsaI. Para a tipagem das mutações nas posições -1082 e -819 foi amplificado um fragmento de 360 pb posteriormente digerido com as enzimas BseRI e MsiI, respectivamente. Em resumo, 100 ng do DNA foram adicionados a reação em cadeia da polimerase em um volume final de 40  $\mu$ L (-819 e -1082) ou 30  $\mu$ L (-592), consistindo de 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP, 1,25 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, EUA) e *primers* específicos para cada mutação, 10 pmol para a posição -592 e 12,5 pmol para as posições -819/-1082. Todas as misturas foram incubadas por 10 min a 95°C e submetidas à amplificação a 94°C por 30 s, a 60°C por 30 s, a 72°C por 40 s e a 72°C por 7 min (IL-10 posição -592), seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 s, a 58°C por 30 s e a 72°C por 45 s mais um ciclo final a 72°C por 5 min (posições -819 e -1082). Os produtos amplificados foram avaliados em eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio (0,5 mL/mL).

Na dosagem de citocinas, as populações de *beads* foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência. No sistema *cytometric bead array*, os *beads* de captura das citocinas são misturados com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo *phycoerythrin* e depois incubados com as amostras

para formar o ensaio “em conjugado”. Os tubos para aquisição foram preparados com 50  $\mu$ L de amostra, 50  $\mu$ L da mistura de *beads* e 50  $\mu$ L do reagente de detecção *human Th1/Th2 phycoerythrin*. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogeneizados e incubados por três horas em temperatura ambiente no escuro. Em seguida, a leitura foi realizada no equipamento BD™ Cytometric Bead Array (Thermo Fisher Scientific).<sup>(12)</sup>

A dosagem de PCR foi utilizada como um dos marcadores de resposta de fase aguda (RFA), ou seja, como um marcador para a resposta sistêmica à inflamação grave. Os níveis de PCR adotados que justificam uma RFA positiva foram classificados como maiores que 0,3 mg/dL, sendo considerados como RFA negativa valores inferiores a esse. A PCR foi dosada por nefelometria.

A dosagem de VHS também foi utilizada para a determinação de RFA, sendo considerados como RFA positiva valores acima de 2 mm/h e de 7mm/h para mulheres e homens, respectivamente. A dosagem foi realizada pelo método de Westergren.

Foram utilizadas análises estatísticas descritivas, tais como amplitude de variação (valores mínimo e máximo), média, desvio-padrão e IC95%. A normalidade das variáveis foi avaliada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov e o teste de Levene para se comparar a igualdade das variâncias. Para variáveis com distribuições não normais foi feita uma transformação logarítmica. Para médias com distribuição normal foi utilizado o teste t de Student. A ANOVA foi utilizada para estimar diferenças entre variáveis quantitativas. Para avaliar a associação entre variáveis categóricas foi utilizado o teste do qui-quadrado. Foi considerado estatisticamente significativo o valor de  $p < 0,05$ . Foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Sciences for Windows*, versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Utilizou-se nas análises a taxa de conversão bacteriológica, definido como o número de casos que converteram dividido pelo total de pacientes no início do tratamento, enquanto a taxa de mutação de polimorfismos foi definido como o número de casos que apresentaram a mutação estudada dividido pelo número total de casos.

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro em 28/04/2005 (Protocolo no. 004/05).

## Resultados

A mediana de idade dos pacientes foi de 43 anos (variação, 20-60 anos). Dos 81 pacientes estudados, 67 (82,7%) eram do sexo masculino, 54 (66,7%) eram não brancos, 8 (9,9%) apresentavam coinfeção por HIV, 52 (64,2%) relataram o uso regular de bebida alcoólica, 55 (67,9%) eram fumantes ou ex-fumantes, 20 (24,7%) declararam o uso de drogas ilícitas, e 64 (79,0%) apresentavam níveis de CD4+ normais. Todos os pacientes apresentavam formas pulmonares com baciloscopia positiva.

Na análise da prevalência de polimorfismos na região +874 do gene do IFN- $\gamma$ , na posição -238 do gene do TNF- $\alpha$  e nas posições -592, -819 e -1082 do gene do IL-10, observou-se uma

frequência alélica para os alelos mutantes de, respectivamente, 0,56; 0,56; 0,29; 0,43; e 0,68.

Na Tabela 1, estão apresentadas as estratificações em faixas de concentrações das dosagens séricas das citocinas e os respectivos polimorfismos. Para IFN- $\gamma$ , a concentração variou de 0 (zero) pg/mL a 20,5 pg/mL e não se observou uma relação entre valores baixos de IFN- $\gamma$  e presença de mutações. Em relação ao TNF- $\alpha$ , apesar de não terem sido observadas mutações homocigóticas, houve uma tendência de menores níveis séricos dessa citocina entre os heterocigotos. Observa-se uma relação negativa com polimorfismo no gene do IL-10 nas posições -592 e -819 em relação ao nível sérico de IL-10 ( $p < 0,001$ ; Figura 1).

**Tabela 1** - Distribuição dos polimorfismos nos pacientes estudados em relação aos níveis séricos das citocinas.

Polimorfismos	Pacientes, n (%)		
	Níveis séricos		
	0,0-4,9 pg/mL	5,0-9,9 pg/mL	10,0-39,9 pg/mL
IFN- $\gamma$			
TT	1 (1,2)	6 (7,4)	2 (2,4)
TA	14 (17,2)	29 (35,8)	10 (12,3)
AA	5 (6,1)	10 (12,3)	4 (4,9)
TA/AA	19 (23,3)	39 (48,1)	14 (17,2)
TNF- $\alpha$			
GG	10 (12,3)	1 (1,2)	0 (0,0)
GA	57 (70,3)	13 (16)	0 (0,0)
AA	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
GA/AA	57 (70,3)	13 (16)	0 (0,0)
IL-10 posição -592			
CC	22 (27,1)	12 (14,8)	0 (0,0)
CA	22 (27,1)	22 (27,1)	1 (1,2)
AA	1 (1,2)	1 (1,2)	0 (0,0)
CA/AA	23 (28,3)	23 (28,3)	1 (1,2)
IL-10 posição -819			
CC	7 (8,6)	4 (4,9)	0 (0,0)
CT	25 (30,8)	23 (28,3)	1 (1,2)
TT	1 (1,2)	8 (9,8)	0 (0,0)
CT/TT	26 (32)	31 (38,1)	1 (1,2)
IL-10 posição -1082			
GG	2 (2,4)	6 (7,4)	0 (0,0)
GA	22 (27,1)	13 (16)	0 (0,0)
AA	2 (2,4)	16 (19,7)	1 (1,2)
GA/AA	24 (29,5)	29 (35,7)	1 (1,2)

(IFN- $\gamma$ ): TT: genótipo homocigoto selvagem; TA: genótipo heterocigoto; e AA: genótipo homocigoto mutante. (TNF- $\alpha$ ): GG: genótipo homocigoto selvagem; GA: genótipo heterocigoto; e AA: genótipo homocigoto mutante. (IL-10 posição -592): CC: genótipo homocigoto selvagem; CA: genótipo heterocigoto; e AA: genótipo homocigoto mutante. (IL-10 posição -819): CC: genótipo homocigoto selvagem; CT: genótipo heterocigoto; e TT: genótipo homocigoto mutante. (IL-10 posição -1082): GG: genótipo homocigoto selvagem; GA: genótipo heterocigoto; e AA: genótipo homocigoto mutante.

Na Tabela 2, observa-se que houve uma tendência ( $p = 0,08$ ) a menor produção de PCR em pacientes com baixos níveis séricos de IFN- $\gamma$  (0,0-4,9 pg/mL) em comparação àqueles com níveis séricos mais elevados ( $> 5,0$  pg/mL). Em pacientes com baixos níveis séricos de TNF- $\alpha$  (0,0-4,9 pg/mL), houve uma tendência a maiores valores na VHS ( $p = 0,04$ ). Em pacientes com baixos níveis séricos de IL-10 (0,0-4,9 pg/mL), não houve associações com maiores níveis de VHS ou PCR. Entretanto, ao utilizar a taxa de mutação de polimorfismos, o VHS apresentou uma correlação negativa com a dosagem de IL-10 ( $p = 0,03$ ) e uma correlação positiva para IFN- $\gamma$  ( $p = 0,008$ ; Tabela 3)

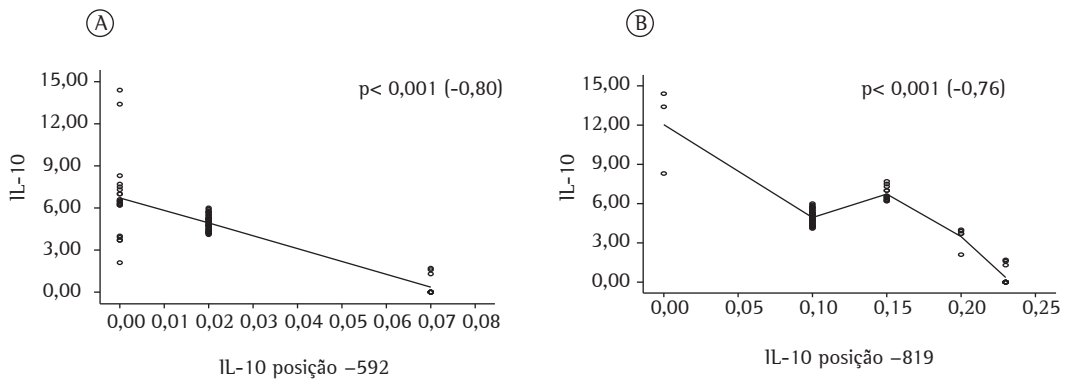
Na Tabela 4, observa-se que apenas o nível sérico mais elevado de PCR esteve associado à menor conversão bacteriológica. Entretanto,

ao utilizar a taxa de conversão bacteriológica, observa-se uma correlação negativa entre níveis séricos de TNF- $\alpha$  e conversão bacteriológica ( $r = -0,43$ ;  $p < 0,001$ ).

### Discussão

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo no qual foram avaliadas as relações entre marcadores bioquímicos, inflamatórios e imunogenéticos em pacientes com tuberculose pulmonar no Brasil. As características clínicas observadas em nossa casuística foram similares àquelas descritas em pacientes internados em hospitais especializados em tuberculose em países em desenvolvimento.<sup>(13)</sup>

Na maioria dos trabalhos disponíveis na literatura pertinente ao tema, evidencia-se a contribuição genética na resposta do hospedeiro à infecção por *M. tuberculosis* em populações



**Figura 1** – Coeficiente de regressão de IL-10 na posição –592 (em A) e –819 (em B).

**Tabela 2** – Distribuição dos níveis séricos de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 dos pacientes estudados em relação aos resultados laboratoriais.

Níveis	Pacientes, n (%)								
	Níveis séricos								
	IFN- $\gamma$			TNF- $\alpha$			IL-10		
	0,0-4,9 pg/mL	5,0-9,9 pg/mL	10,0-39,9 pg/mL	0,0-4,9 pg/mL	5,0-9,9 pg/mL	10,0-39,9 pg/mL	0,0-4,9 pg/mL	5,0-9,9 pg/mL	10,0-39,9 pg/mL
<b>VHS</b>									
Baixo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Normal	1 (1,3)	6 (7,6)	1 (1,3)	4 (5,1)	4 (5,1)	0 (0,0)	4 (5,1)	3 (3,8)	0 (0,0)
Alto	19 (24,1)	37 (46,8)	15 (19)	61 (77,2)	10 (12,7)	0 (0,0)	41 (51,9)	30 (38)	1 (1,3)
<b>CD4+</b>									
Baixo	5 (6,6)	9 (11,8)	3 (4)	13 (17,1)	4 (5,3)	0 (0,0)	9 (11,8)	8 (10,5)	0 (0,0)
Normal	15 (19,7)	31 (40,8)	10 (13,2)	47 (61,8)	9 (11,8)	0 (0,0)	30 (39,57)	25 (32,9)	1 (1,3)
Alto	0 (0,0)	2 (2,6)	1 (1,3)	3 (3,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (3,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>PCR</b>									
Normal	1 (1,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,3)	0 (0,0)
Alto	19 (23,8)	45 (56,3)	15 (18,8)	66 (82,5)	13 (16,9)	0 (0,0)	45 (56,3)	33 (41,3)	1 (1,3)

PCR: proteína C reativa.



étnicas fechadas.<sup>(5)</sup> Observamos que a frequência do alelo mutante para IFN- $\gamma$  na posição +874 foi de 0,56, similar ao descrito por outros autores em vários países,<sup>(14-16)</sup> mas diferente ao relatado por Fitness et al. na África.<sup>(17)</sup> A frequência do alelo mutante para TNF- $\alpha$  na posição +238 foi de 0,56, similar ao descrito em outras séries.<sup>(18-20)</sup> Em nossa casuística, a frequência alélica observada nos polimorfismos para IL-10 nas posições -592, -819 e -1082 foram de, respectivamente, 0,29; 0,43, e 0,68, também similares ao relatado na maioria dos estudos incluídos em uma meta-

análise.<sup>(6)</sup> Embora nossos resultados estejam de acordo com aqueles relatados em vários estudos, quaisquer variações ou desacordos com relação à frequência desses polimorfismos poderiam ser explicadas pela variação étnica dessas populações.

A relação funcional do alelo -238A (TNF- $\alpha$ ) na regulação da expressão do gene de TNF- $\alpha$  foi descrita por Kaluza et al.,<sup>(21)</sup> os quais mostraram por meio de estudos in vitro a associação desse alelo com uma regulação negativa do gene e consequente diminuição na produção da proteína. Em nossa casuística, apesar de não termos identificado mutações homozigóticas, observamos uma tendência a menores níveis séricos de TNF- $\alpha$  em pacientes com perfil genotípico heterozigótico, como descrito por Abhimanyu et al.,<sup>(10)</sup> que identificaram essa relação em uma população da Índia com características étnicas muito distintas da nossa população. No entanto Haroon et al.<sup>(22)</sup> não identificaram essa associação

**Tabela 3** – Correlação entre os níveis séricos das citocinas estudadas e resultados laboratoriais.

Variáveis bioquímicas	p		
	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10
CD4+	0,59	0,11	0,47
PCR	0,43	0,32	0,33
VHS	0,008 (+)	0,31	0,03 (-)

(+): correlação positiva; e (-): correlação negativa.

**Tabela 4** – Níveis séricos de proteína C reativa, VHS, CD4+ e citocinas estudadas em relação à conversão bacteriológica e frequência de genótipos em relação à conversão bacteriológica.<sup>a</sup>

Variáveis	Conversão bacteriológica		p
	Sim	Não	
PCR, mg/dL	5,37 $\pm$ 3,96	8,6 $\pm$ 4,7	0,004
VHS, mm/h	60,3 $\pm$ 43,3	53,8 $\pm$ 37,6	0,57
CD4+, células/mm <sup>3</sup>	784,09 $\pm$ 699,44	657,5 $\pm$ 311,49	0,46
IL-10, pg/mL	4,6 $\pm$ 2,8	4,8 $\pm$ 1,21	0,73
TNF- $\alpha$ , pg/mL	3,6 $\pm$ 1,93	3,99 $\pm$ 1,36	0,42
IFN- $\gamma$ , pg/mL	7,17 $\pm$ 4,84	7,69 $\pm$ 3,99	0,68
IL-10 posição -592 <sup>b</sup>			
AA	2 (3,4)	0 (0,0)	0,42
CA/CC	57 (96,6)	18 (100,0)	
IL-10 posição -819 <sup>b</sup>			
TT	8 (13,6)	2 (11,1)	0,78
CT/CC	51 (86,4)	16 (88,9)	
IL-10 posição -1082 <sup>b</sup>			
AA	27 (45,8)	9 (50,0)	0,75
GA/GG	32 (54,2)	9 (50,0)	
TNF- $\alpha$ <sup>b</sup>			
AA	0 (0,0)	0 (0,0)	--
GA/GG	59 (100,0)	18 (100,0)	
IFN- $\gamma$ <sup>b</sup>			
AA	11 (18,6)	6 (33,3)	0,18
TA/TT	48 (81,4)	12 (66,7)	

PCR: proteína C reativa; (IFN-  $\gamma$ ): TT: genótipo homozigoto selvagem; TA: genótipo heterozigoto; e AA: genótipo homozigoto mutante. (TNF- $\alpha$ ): GG: genótipo homozigoto selvagem; GA: genótipo heterozigoto; e AA: genótipo homozigoto mutante. (IL-10 posição -592): CC: genótipo homozigoto selvagem; CA: genótipo heterozigoto; e AA: genótipo homozigoto mutante. (IL-10 posição -819): CC: genótipo homozigoto selvagem; CT: genótipo heterozigoto; e TT: genótipo homozigoto mutante. (IL-10 posição -1082): GG: genótipo homozigoto selvagem; GA: genótipo heterozigoto; e AA: genótipo homozigoto mutante. <sup>a</sup>Valores expressos em média  $\pm$  dp, exceto onde especificado.

<sup>b</sup>Valores expressos em n (%).

entre a mutação e a expressão da citocina em uma população de caucasianos.

A presença de polimorfismos de base única localizados no primeiro íntron do gene do IFN- $\gamma$  (na posição +874) tem apresentado associações com tuberculose<sup>(8,14)</sup> e tuberculose grave.<sup>(23)</sup> O gene que codificador de IFN- $\gamma$  é altamente conservado, e poucos polimorfismos são encontrados na região intragênica. Em nossa casuística, não observamos uma associação do polimorfismo na posição +874 do gene IFN- $\gamma$  com níveis séricos da citocina correspondente, semelhante ao observado por Abhimanyu et al.<sup>(10)</sup> e Vidyarani et al.,<sup>(24)</sup> mas diferente do observado por Vallinoto et al.,<sup>(11)</sup> que confirmaram menores níveis séricos de IFN- $\gamma$  entre pacientes com genótipo homozigótico mutante na posição +874A/A.

Em nossa casuística, foi significativa a relação entre níveis elevados de IFN- $\gamma$  e níveis elevados de VHS, similar ao descrito por Peresi et al.<sup>(4)</sup> Uma possível explicação para essa associação pode decorrer do fato de que a presença dessa mutação tem sido associada com a diminuição da produção de IFN- $\gamma$ , citocina que exerce um papel importante no controle da defesa contra o patógeno e, portanto, um menor grau de resposta inflamatória aguda.

Em nossa casuística, observou-se uma associação entre polimorfismos nas posições -819 e -592 (mas não -1082) e baixo nível sérico de IL-10, similar ao relatado por Abhimanyu et al.<sup>(10)</sup> e Edwards-Smith et al.,<sup>(25)</sup> que, ao avaliarem o polimorfismo na posição -1082, mostraram que indivíduos carreadores do genótipo AA são baixos produtores de IL-10, enquanto aqueles carreadores do genótipo GA são produtores intermediários, e os carreadores do genótipo GG são altos produtores de IL-1, IL-10; entretanto, o haplótipo ATA está associado com baixos níveis de produção de IL-10. Esses resultados discrepantes poderiam ser explicados, em parte, pela escolha dessas populações estudadas, com características étnicas distintas e heterogêneas.

Entre os carreadores de mutação IL-10 na posição -592 (CA/AA) e na posição -819 (CT/TT), observou-se uma tendência de haver maiores níveis séricos de VHS. Em uma recente meta-análise (que incluiu 18 estudos, sendo que nenhum deles incluiu pacientes da América Latina), não se confirmou um maior risco da ocorrência de tuberculose entre pacientes com polimorfismos do gene para IL-10 nas posições -592, -819 e -1082, exceto a identificação de um maior risco entre

européus para a posição -1082.<sup>(6)</sup> Naquela meta-análise, entre os estudos que também analisaram os níveis séricos de IL-10, houve uma proposta de se avaliar a fração de níveis séricos de IFN- $\gamma$  e IL-10. Os autores demonstraram que quanto maior essa relação, menor era a gravidade da tuberculose.

Nos relatos de Jamil et al.<sup>(26)</sup> e Lago et al.,<sup>(9)</sup> foi sugerido que a manutenção de níveis séricos elevados de IL-10 durante o tratamento antituberculose poderiam estar associados a um maior risco de recidiva, enquanto níveis séricos baixos de IL-10 usualmente ocorrem nas formas mínimas de tuberculose. Nossos resultados são limitados para qualquer inferência nesse sentido, pois avaliamos os níveis dessa citocina apenas no tempo zero e não no seguimento clínico após o término do tratamento antituberculose.

Adicionalmente, observamos que pacientes com baixos níveis séricos de TNF- $\alpha$  (0,0-4,9 pg/mL) apresentaram valores elevados dos marcadores de resposta inflamatória aguda (PCR) em relação aos pacientes que apresentavam TNF- $\alpha$  com níveis acima de 5,0 pg/mL. Esses dados indicam que possivelmente a presença de baixas concentrações de TNF- $\alpha$  no momento inicial da resposta contra a doença poderia estar associada com pior prognóstico e evolução clínica; porém, dados com um maior número amostral e estudos de associação deveriam ser realizados para testar essas hipóteses na nossa população, como mencionado na revisão de Wallis et al.<sup>(8)</sup> O papel do TNF- $\alpha$  na fisiopatologia da tuberculose tem sido associado à defesa por ativação macrófágica e à reação inflamatória subsequente.<sup>(3)</sup> Nossos achados reforçam a relevância dessa citocina na resposta do hospedeiro contra *M. tuberculosis* em nossa população.

No presente estudo, observamos uma associação entre níveis elevados de PCR e menor conversão bacteriológica na 8ª semana de tratamento antituberculose, indicando o potencial papel desse mediador como possível marcador para o acompanhamento do quadro de evolução da doença. Há autores que relatam a normalização da VHS como um marcador de boa resposta ao tratamento em doenças subagudas e crônicas, como a tuberculose.<sup>(27,28)</sup> Em diversos relatos, observaram-se níveis aumentados dos marcadores de resposta imunológica, PCR e VHS na fase inicial, com sua diminuição ao longo do tratamento.<sup>(29,30)</sup> Resultados similares foram relatados no estudo de Peresi et al.,<sup>(4)</sup> no qual uma queda significativa

da PCR ocorreu apenas no 3º e no 6º mês de tratamento. Esses achados sugerem que a PCR poderia ser utilizada para avaliar a RFA do paciente com tuberculose e também ser utilizada como um marcador de resposta ao tratamento antituberculose, juntamente com o histórico clínico e epidemiológico do paciente.

Em nossa casuística, não houve uma associação entre os níveis séricos de IFN- $\gamma$  e a conversão bacteriológica, de forma similar ao relatado em outro estudo,<sup>(8)</sup> mas foi possível mostrar uma associação entre baixos níveis séricos iniciais de TNF- $\alpha$  e maior conversão bacteriológica. Tais dados são similares ao relatado por Su et al.<sup>(30)</sup> Em relação à conversão ou não conversão e as variáveis imunológicas e bioquímicas, observamos que houve uma correlação positiva entre o marcador inflamatório PCR e a ausência de conversão; o mesmo não foi observado para os demais marcadores inflamatórios (VHS e CD4+).

Entre as limitações do presente estudo, citamos a ausência de análise dos haplótipos relacionados a IL-10, a não inclusão de outras citocinas relevantes na resposta imune frente à ocorrência de tuberculose ativa e a falta de um acompanhamento da resposta clínica e bacteriológica dos pacientes durante todo o tratamento antituberculose.

É importante enfatizar que, até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a ser realizado no Brasil que explorou a presença de citocinas pró e anti-inflamatórias, mediadores de resposta inflamatória aguda (por meio dos níveis séricos de PCR e VHS) e o *background* genético dos pacientes na tentativa de elucidar alguns mecanismos relacionados à imunopatogênese da tuberculose. Como se trata de um estudo descritivo, não houve um grupo controle e, por esse motivo, tomamos o cuidado de apresentar as associações estatísticas observadas sem nos referirmos a qualquer variável como sendo um “fator de risco” de um evento qualquer.

## Referências

1. World Health Organization. Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing - WHO Report 2009. Geneva: World Health Organization; 2009.
2. Ministério da Saúde. PNCT - Tuberculose - Situação no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.
3. Ottenhoff TH. New pathways of protective and pathological host defense to mycobacteria. Trends Microbiol. 2012;20(9):419-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2012.06.002> PMID:22784857
4. Peresi E, Silva SM, Calvi SA, Marcondes-Machado J. Cytokines and acute phase serum proteins as markers of inflammatory regression during the treatment of pulmonary tuberculosis. J Bras Pneumol. 2008;34(11):942-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132008001100009> PMID:19099101
5. Takiff HE. Host Genetics and Susceptibility. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, editors. Tuberculosis 2007 - From Basic Science to Patient Care. Amedeo Challenge; 2007. p. 207-62.
6. Zhang J, Chen Y, Nie XB, Wu WH, Zhang H, Zhang M, et al. Interleukin-10 polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. Int J Tuberc Lung Dis. 2011;15(5):594-601. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.09.0703> PMID:21756510
7. Wang Q, Zhan P, Qiu LX, Qian Q, Yu LK. TNF-308 gene polymorphism and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis involving 18 studies. Mol Biol Rep. 2012;39(4):3393-400. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-1110-x> PMID:21735105
8. Wallis RS, Kim P, Cole S, Hanna D, Andrade BB, Mauerer M, et al. Tuberculosis biomarkers discovery: developments, needs, and challenges. Lancet Infect Dis. 2013;13(4):362-72. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70034-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70034-3)
9. Lago PM, Boéchat N, Miguez DP, Almeida AS, Lazzarini LC, Saldanha MM, et al. Interleukin-10 and interferon-gamma patterns during tuberculosis treatment: possible association with recurrence. Int J Tuberc Lung Dis. 2012;16(5):656-9. PMID:22410761 PMID:PMC3729476
10. Abhimanyu, Mangangcha IR, Jha P, Arora K, Mukerji M, Banavaliker JN, et al. Differential serum cytokine levels are associated with cytokine gene polymorphisms in north Indians with active pulmonary tuberculosis. Infect Genet Evol. 2011;11(5):1015-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.03.017> PMID:21463712
11. Vallinoto AC, Graça ES, Araújo MS, Azevedo VN, Cayres-Vallinoto I, Machado LF, et al. IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis. Hum Immunol. 2010;71(7):692-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2010.03.008> PMID:20353805
12. BD™ Cytometric Bead Array (CBA). Human Th1/Th2 Cytokine Kit II - Instruction Manual. San Jose: Becton, Dickinson and Company BD Biosciences; 2008.
13. Oliveira HM, Brito RC, Kritski AL, Ruffino-Netto A. Epidemiological profile of hospitalized patients with TB at a referral hospital in the city of Rio de Janeiro, Brazil. J Bras Pneumol. 2009;35(8):780-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132009000800010> PMID:19750331
14. Amim LH, Pacheco AG, Fonseca-Costa J, Loredó CS, Rabahi MF, Melo MH, et al. Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. Mol Biol Rep. 2008;35(4):563-6. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-007-9123-1> PMID:17682837
15. Sallakci N, Coskun M, Gürkan F, Kocamaz H, Uysal G, et al. Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. Tuberculosis (Edinb). 2007;87(3):225-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2006.10.002> PMID:17276141
16. Lio D, Marino V, Serauto A, Gioia V, Scola L, Crivello A, et al. Genotype frequencies of the +874T-->A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon-gamma gene in a sample of Sicilian



- patients affected by tuberculosis. *Eur J Immunogenet.* 2002;29(5):371-4. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2370.2002.00327.x> PMID:12358843
17. Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Malema S, Crampin AC, et al. Large-scale candidate gene study of tuberculosis susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(3):341-9. PMID:15381817
  18. Oh JH, Yang CS, Noh YK, Kweon YM, Jung SS, Son JW, et al. Polymorphisms of interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis. *Respirology.* 2007;12(4):594-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1843.2007.01108.x> PMID:17587429
  19. Oliveira MM, Da Silva JC, Costa JF, Amim LH, Loredó CC, et al. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the TNF- $\alpha$ (-238/-308) gene among TB and non TB patients: Susceptibility markers of TB occurrence? *J Bras Pneumol.* 2004;30(4):461-7.
  20. Ates O, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarikaya A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in tuberculosis. *J Clin Immunol.* 2008;28(3):232-6. <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-007-9155-2> PMID:18071881
  21. Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR, et al. Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol.* 2000;114(6):1180-3. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00001.x> PMID:10844563
  22. Haroon N, Tsui FW, Chiu B, Tsui HW, Inman RD. Serum cytokine receptors in ankylosing spondylitis: relationship to inflammatory markers and endoplasmic reticulum aminopeptidase polymorphisms. *J Rheumatol.* 2010;37(9):1907-10. <http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.100019> PMID:20595269
  23. Paletta RM. Fatores de risco associados a ocorrência de tuberculose. [dissertation]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2010.
  24. Vidyarani M, Selvaraj P, Prabhu Anand S, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, Narayanan PR. Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2006;124(4):403-10. PMID:17159260
  25. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology.* 1999;30(2):526-30. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510300207> PMID:10421663
  26. Jamil B, Shahid F, Hasan Z, Nasir N, Razzaki T, Dawood G, et al. Interferon gamma/IL10 ratio defines the disease severity in pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2007;87(4):279-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2007.03.004> PMID:17532265
  27. Dubost JJ, Soubrier M, Meunier MN, Sauvezie B. From sedimentation rate to inflammation profile [Article in French]. *Rev Med Interne.* 1994;15(11):727-33. [http://dx.doi.org/10.1016/S0248-8663\(05\)81398-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0248-8663(05)81398-0)
  28. Sahiratmadja E, Alisjahbana B, de Boer T, Adnan I, Maya A, Danusantoso H, et al. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment. *Infect Immun.* 2007;75(2):820-9. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00602-06> PMID:17145950 PMID:PMC1828524
  29. Suzuki K, Takashima Y, Yamada T, Akiyama J, Yagi K, Kawashima M, et al. The sequential changes of serum acute phase reactants in response to antituberculous chemotherapy [Article in Japanese]. *Kekkaku.* 1992;67(4):303-11. PMID:1376373
  30. Su WL, Perng WC, Huang CH, Yang CY, Wu CP, Chen JH. Association of reduced tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukin-1beta (IL-1beta) but increased IL-10 expression with improved chest radiography in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(2):223-31. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00381-09> PMID:20007364 PMID:PMC2815523

## ***Sobre os autores***

### ***Beatriz Lima Alezio Muller***

Doutoranda. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Programa Acadêmico de Tuberculose, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

### ***Daniela Maria de Paula Ramalho***

Doutoranda. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Programa Acadêmico de Tuberculose, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

### ***Paula Fernanda Gonçalves dos Santos***

Doutoranda. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Programa Acadêmico de Tuberculose, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

### ***Eliene Denites Duarte Mesquita***

Diretora. Instituto Estadual de Doenças do Tórax Ary Parreiras, Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro; e Mestranda. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Programa Acadêmico de Tuberculose, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

### ***Afranio Lineu Kritski***

Professor Titular. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Programa Acadêmico de Tuberculose, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

### ***Martha Maria Oliveira***

Pesquisadora. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Programa Acadêmico de Tuberculose, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.