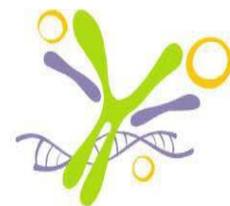




UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA
(PPGIBA/ICB/UFAM)

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE *TLR* EM PACIENTES
COM TUBERCULOSE**

MARCOS HENRIQUE GURGEL RODRIGUES

MANAUS

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA
(PPGIBA/ICB/UFAM)

MARCOS HENRIQUE GURGEL RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE *TLR* EM PACIENTES
COM TUBERCULOSE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Aya Sadahiro

Coorientador: Prof Dr. Mauricio Morishi Ogusku

MANAUS

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R696a Rodrigues, Marcos Henrique Gurgel
Avaliação dos polimorfismos em genes de TLR em pacientes com
tuberculose / Marcos Henrique Gurgel Rodrigues . 2021
92 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Aya Sadahiro
Coorientador: Mauricio Morishi Ogusku
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Tuberculose pulmonar. 2. Receptores do tipo toll. 3.
Interleucina-6. 4. Variantes de base única. I. Sadahiro, Aya. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os meus antepassados, sem os quais não poderia ter escrito essa dissertação, especialmente meu pai, Marcos Augusto de Aguiar Rodrigues, meu avô, Flávio Freire Rodrigues e minhas avós, Guiomar da Silva Freire e Maria das Graças Grijó de Nazaré. Agradeço à minha mãe, Tarciana Grijó Gurgel de Nazaré, que sempre me ensinou e me incentivou a percorrer um caminho justo e digno, cujos esforços, amor e dedicação me permitiram trilhar o caminho da educação. Agradeço às minhas avós Francisca de Aguiar Rodrigues e Ivaneide Rocha Gurgel de Nazaré, que para mim são o esteio familiar, a força, e também a doçura dos dias. Agradeço ao meu avô, Eriberto Gurgel de Nazaré, que sempre mostrou a importância da união familiar. Agradeço aos meus padrinhos, Flávia Rodrigues e Francisco Gurgel, e aos meus tios e tias, aqui cito Giselle Socorro de Aguiar Rodrigues e Anderson Barboza, Luciana Grijó Gurgel, Raquel Gurgel, Silvana Gurgel, Ana Cláudia Rocha e Daiana Gurgel. Agradeço meu companheiro dos dias Edison Vieira Kiss, que muito me ouviu sobre o tema desta pesquisa. Agradeço de todo coração à minha orientadora, Aya Sadahiro, que não me permitiu desistir, e ao meu Coorientador, Mauricio Morishi Ogusku, por todo apoio no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço aos meus colegas de laboratório, Mariana Brasil, Ângelo Barros, Mylla Menezes, Ariane Senna e Laianne Lopes. Agradeço aos técnicos e servidores do INPA e da UFAM, especialmente às técnicas do laboratório de micobacteriologia, e aos secretários do PPGIBA, Edson Brazão e Ana Paula. Agradeço a todo o corpo docente do PPGIBA-UFAM, em especial à Coordenadora Jerusa Araújo Quintão e ao vice-coordenador Antônio Luiz Ribeiro Boechat. Agradeço à banca examinadora que se dispôs a ler e avaliar essa dissertação. Agradeço à CAPES, à Universidade Federal do Amazonas, que é o nosso maior patrimônio, e também aos servidores da Policlínica Cardoso Fontes, bem como a todos os pacientes que cederam amostras para fins de pesquisa científica – que um dia possamos ter um mundo com menos desigualdades e mais justiça social, para que a tuberculose não seja mais esse problema tão grave que acomete especialmente os mais vulneráveis. Agradeço à espiritualidade, que me sustenta e me capacita para lutar as batalhas e persistir. Orí oò! Por fim, agradeço a todas as causas e consequências do Universo que me permitiram chegar até aqui, OBRIGADO!

*“Melhor é a sabedoria do que as
armas de guerra, mas um só pecador
destrói muitas coisas boas.”*

(Eclesiastes 9:18)

*“Quando eu não era ninguém, era
vento, terra e água, elementos em
amálgama no coração de Olorum.”*

(Orixá – Maria Bethânia)

Em memória de meu pai, **Marcos Augusto de Aguiar Rodrigues**, que sempre foi um homem feliz, justo, íntegro e jovem, e partiu em 2020 aos 45 anos de vida, deixando muita saudade. Em vida me ensinou apreciar música, também sobre a alegria de viver e sobre a importância de respeitar todos em nosso caminho. Te amo, meu pai.

Em memória de meu avô, **Flávio Freire Rodrigues**, que em 2021 partiu aos 70 anos de vida, tendo vivido uma vida gigante, deixando um legado de sabedoria e amor. Em vida me ensinou sobre a importância da ética e da fidelidade aos próprios princípios, além da importância do sono tranquilo após o dever cumprido. A dor da perda é grande, mas o orgulho e privilégio de ter usufruído de sua sabedoria e companhia são inestimáveis. Assim como ele, mais de meio milhão de brasileiros foram vítimas da COVID-19, que meus respeitos e condolências possam chegar ao coração de todas essas famílias.

RESUMO

A tuberculose pulmonar (TBP) é uma doença infecciosa causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Apesar de ser um vasto campo de estudo, muitos aspectos imunológicos e genéticos ainda carecem de esclarecimentos, principalmente devido a variados desfechos possíveis que ocorrem a partir da interação do patógeno com o hospedeiro. Em algumas pessoas os mecanismos da imunidade inata eliminam o bacilo durante a infecção primária, em outras, ocorre o desenvolvimento de resposta imune adaptativa que auxilia na contenção do patógeno no interior de granulomas iniciados pelas células imunes inatas. Com o intuito de contribuir para a elucidação de fatores ainda desconhecidos sobre a imunogenética da tuberculose, o presente estudo avaliou a presença de variantes gênicas em receptores do tipo Toll em pacientes com TB pulmonar, bem como as associações entre a presença destas variantes com a maior chance de desenvolver a doença. Avaliou também a relação dos genótipos de *TLR1* e *TLR9* com a concentração de interleucina-6 (IL-6), uma importante citocina pró-inflamatória na imunopatogênese da TBP. Foram avaliadas as variantes de base única (SNV) em genes de *TLR1* (rs5743618) e *TLR9* (rs187084) em pacientes com TBP. As amostras de indivíduos controle e de pacientes com TBP recrutados na Policlínica Cardoso Fontes, na cidade de Manaus, foram genotipadas por PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Ambos os SNVs tiveram frequência superior a 10,0% na população estudada e se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Verificou-se associação do genótipo G/G do SNV rs5743618 com proteção contra a TBP ($p=0.028$; OR= 0.52; IC95%= 0.28-0.95), e associação do alelo T de rs5743618 com o risco à TBP ($p=0.017$; OR=1.37; IC95%=1.07-1.74), porém não foram identificadas diferenças alélicas ou genótípicas significativas entre os grupos controles e de pacientes para a variante rs187084 de *TLR9*. Quanto à quantificação de IL-6, detectou-se maior produção da citocina entre os pacientes, em relação ao grupo controle, entretanto não houve associação dos genótipos estudados com a produção de IL-6. O presente estudo ressalta a funcionalidade da variante rs5743618 na TBP e corrobora com diversos autores ao destacar a IL-6 na imunopatogênese da TBP.

Palavras-chave: tuberculose pulmonar; receptores do tipo Toll; interleucina-6; variantes de base única.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Aids - Síndrome da imunodeficiência adquirida
- AMPc - Monofosfato cíclico de adenosina
- BAAR - Bacilo Álcool-Ácido Resistente
- BCG - Vacina do bacilo Calmette–Guérin
- CCL2 - C-C Motif Chemokine Ligand 2 (Ligante 2 de Quimiocina com Motivo C-C)
- CD - Grupo de diferenciação
- CTAB - Brometo de hexadeciltrimetilamônio
- CMTB - Complexo Mycobacterium tuberculosis
- DC - Célula dendrítica
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DTAB - Brometo de dodecil(trimethyl)amônio EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EHW - Equilíbrio de Hardy-Weinberg
- ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana
- Hsp65 - Heat shock protein 65 KDa (proteína do choque térmico 65 KDa)
- IFN- γ - Interferon-gama
- IL-1 - Interleucina-1
- IL-4 - Interleucina-4
- IL-6 - Interleucina-6
- IL-8 - Interleucina-8
- IL-12 - Interleucina-12
- IL-13 - Interleucina-13 IRAK-1 - Quinase 1 associada ao receptor da interleucina-1
- MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
- MyD88 - Myeloid differentiation primary response 88 (resposta primária da diferenciação mieloide 88)
- NF- κ B - Fator nuclear kappa B
- NK - Célula Natural Killer
- NLR - Receptores semelhantes a NOD
- NTM - Micobactérias não causadoras de TB
- OMS - Organização Mundial de Saúde

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos

PE_PGRS - proline-glutamic acid polymorphic guanine-cytosine-rich sequence

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PPD - Derivado proteico purificado

PRR - Receptores de reconhecimento de padrões

qPCR - PCR quantitativo em tempo real

rRNA - Ácido ribonucleico ribossomal

SNV - Variantes de base única

STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription (transdutor de sinal e ativador da transcrição)

TB - Tuberculose

TBP - Tuberculose pulmonar

Tbet - T-box protein expressed in T cells (proteína T-box expressa em células T)

TGF-beta - Transforming growth factor beta (fator de transformação do crescimento beta)

TIR - Receptor Toll/interleucina-1

TIRAK - Molécula carreadora de TIR induzida por interferon- β (IFN- β)

TLR - Receptores semelhantes a Toll

TNF - Fator de necrose tumoral

TRAF - Fator relacionado a Fator de Necrose Tumoral- α

TRIF - Domínio TIR contendo INF-beta induzido por adaptador

TRM-TB - Teste rápido molecular para diagnóstico de tuberculose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curvas de amplificação geradas para a variante rs5743618 de <i>TLR1</i>	50
Figura 2. Curvas de amplificação geradas para a variante rs187084 de <i>TLR9</i>	51
Figura 3. Gráfico da discriminação alélica dos polimorfismos estudados.....	52
Figura 4. Concentração de IL-6 em amostra de plasma de pacientes e controles.....	63
Figura 5. Concentração de IL-6 em plasma com base nos genótipos de rs5743618.....	65
Figura 6. Concentração de IL-6 em plasma com base nos genótipos de rs187084.....	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Condições do mix utilizado nas reações de qPCR.....	44
Quadro 2. Característica das sondas utilizadas.....	45
Quadro 3. Valores de p -EHW das variantes nos grupos de pacientes e de controles.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos estudos de associação entre rs5743618 e TB publicados.....	29
Tabela 2. Resumo dos estudos de associação entre rs187084 e TB publicados.....	31
Tabela 3. Características gerais dos grupos estudados.....	46
Tabela 4. Análises de associação do SNV rs5743618 com TBP.....	53
Tabela 5. Análises de associação do SNV rs187084 com TBP.....	54
Tabela 6. Análises de associação do SNV rs5743618 com ajuste por ‘sexo’ e ‘idade’.....	55
Tabela 7. Análises de associação do SNV rs187084 com ajuste por ‘sexo’ e ‘idade’.....	56
Tabela 8. Análises de associação do SNV rs5743618 estratificado por sexo ‘M’ e ‘F’.....	57
Tabela 9. Análises de associação do SNV rs187084 estratificado por sexo ‘M’ e ‘F’.....	57
Tabela 10. Frequências dos alelos de rs5743618 e de rs187084 e análises de associação.....	58
Tabela 11. Comparação da frequência alélica de rs5743618 e de rs187084 com outras populações.....	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO NA LITERATURA	15
2.1 Epidemiologia	15
2.2 Forma de transmissão da TBP	16
2.3 Formas clínicas	17
2.4 Diagnóstico	18
2.5 Tratamento	20
2.6 O Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
2.7 Imunidade Inata no contexto de TB	23
2.7.1 Receptores do tipo Toll (TLR – Toll Like Receptor).....	26
2.7.2 SNV rs5743618 de TLR1	28
2.7.3 SNV rs187084 de TLR9.....	30
2.7.4 Interleucina-6	31
2.8 Imunidade adaptativa na TB	33
3. JUSTIFICATIVA	38
4. OBJETIVOS	40
4.1 Objetivo Geral.....	40
4.2 Objetivos específicos	40
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.1 Tipo de Estudo	41
5.2 População de Estudo	41
5.3 Critérios de Inclusão	41
5.4 Critérios de exclusão.....	41
5.5 Recrutamento dos pacientes.....	42
5.6 Seleção dos pacientes e contatos.....	42
5.7 Cálculo amostral	43
5.8 Amostras biológicas.....	43
5.9 Exames micobacteriológicos nas amostras de escarro.....	43

5.10	Processamento das amostras de sangue	43
5.11	Critérios de seleção dos SNVs	43
5.12	Extração de DNA a partir da amostra de sangue	44
5.12	Ensaio de Genotipagem de <i>TLR1</i> e <i>TLR9</i> por PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) – Ensaio TaqMan e/ou sequenciamento	44
5.13	Quantificação de IL-6 por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	45
5.14	Análise Estatística.....	45
5.15	Aspectos Éticos.....	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1	Características gerais da população estudada	46
6.2	Análise das variantes gênicas de <i>TLR1</i> e <i>TLR9</i>	50
6.3	Frequência alélica	61
6.4	Quantificação de interleucina-6	63
7	CONCLUSÃO.....	68
	EQUIPE DO PROJETO	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXOS.....	85
	Anexo 1 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	85

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose pulmonar é uma doença infecciosa causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, do qual fazem parte *M. tuberculosis* sensu stricto, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae*. Deste grupo, a espécie de maior relevância para a saúde pública é *M. tuberculosis* (BRASIL, 2019a). São bactérias álcool-ácido resistentes, que têm os lipídios como fonte de carbono e são intracelulares facultativas. A transmissão do bacilo se dá por via respiratória, a partir da inalação de aerossóis contaminados com bacilos, os quais foram liberados no ar por pacientes com a doença ativa, estes pacientes são denominados de bacilíferos. As micobactérias ao chegarem ao pulmão de um indivíduo saudável são reconhecidas pelas células da imunidade inata, tais como macrófagos e células dendríticas, que possuem receptores (PRR- receptores de reconhecimento de padrões do patógeno) para as moléculas da parede celular dos bacilos. Estes bacilos são internalizados pelos fagócitos, que liberam citocinas e quimiocinas para o recrutamento de neutrófilos e monócitos, dando início a uma resposta inflamatória aguda (BARBER-MAYER; BARBER, 2015; FURIN; COX; PAI, 2019).

A persistência de bacilos viáveis no interior de fagócitos estimula a formação do granuloma, com participação de macrófagos alveolares, macrófagos espumosos, células epitelioides e células gigantes multinucleadas. Após a infecção primária, os linfócitos T da imunidade adaptativa também são recrutados, circundando o granuloma. Apesar do desenvolvimento de resposta imune adaptativa, o organismo tende a falhar na eliminação do *M. tuberculosis*, mantendo-o apenas com taxas metabólica e proliferativa em níveis basais e controlando a infecção (latência) (RAMAKRISHNAN, 2012).

Em uma parcela dos indivíduos com os bacilos latentes, cerca de 3 a 10% dos infectados, ocorrem falhas na resposta imune ou há fatores imunogenéticos individuais de risco à TB, que contribuem para que os bacilos consigam evadir-se dos mecanismos de controle da infecção e estabeleçam doença ativa (SCHOREY; SCHLESINGER, 2016; COPPOLA; OTTENHOFF, 2018).

Os variados resultados que podem ocorrer a partir da infecção por *M. tuberculosis* têm sido atribuídos também a fatores imunogenéticos do hospedeiro, como variantes de base única (SNVs), os quais podem gerar alterações bioquímicas e funcionais nas proteínas envolvidas nos mecanismos efetores da imunidade, ou ainda regular a expressão dessas proteínas, implicando ora em um favorecimento do hospedeiro e do *clearance* do microrganismo, ora em favor do patógeno, causando prejuízos funcionais ao hospedeiro que acaba sendo mais suscetível ao

desenvolvimento da doença (SCHURZ et al., 2015; SCHOREY; SCHLESINGER, 2016; MUKHERJEE; HUDA; SINHA BABU, 2019).

Desse modo, o presente estudo avaliou a frequência de SNVs em genes que codificam receptores da imunidade inata, os receptores do tipo Toll (TLR), que estão envolvidos na resposta imunológica inicial do hospedeiro frente a *M. tuberculosis*, possibilitando o controle do bacilo ou até mesmo sua eliminação em alguns casos, além de atuar fornecendo alguns dos estímulos necessários para o surgimento de imunidade adaptativa. Avaliou-se também a correlação entre a presença das variantes gênicas e as concentrações de interleucina-6 em plasma de pacientes recrutados na cidade de Manaus-AM.

2. REVISÃO NA LITERATURA

2.1 Epidemiologia

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2019 aproximadamente 10 milhões de pessoas adoeceram de TB, com taxa de incidência estimada em 130 casos por 100 mil pessoas, ocorrendo 1.21 milhão de óbitos entre pacientes HIV-negativos, e 208 mil óbitos entre pacientes HIV-positivos, evidenciando o quanto essa doença consiste em um problema grave de saúde pública. No continente africano, por exemplo, a doença acometeu cerca de 2.47 milhões de pessoas, com mortalidade estimada em 378 mil óbitos entre pacientes HIV-negativos, e em 169 mil óbitos entre HIV-positivos, ao passo que na Europa, o número de doentes em 2019 foi cerca de 10 vezes menor, com estimativa de 246 mil casos, e mortalidade estimada significativamente menor em relação ao continente africano (20 mil óbitos entre os pacientes HIV-negativos e 4.2 mil óbitos entre HIV-positivos) (WHO, 2020).

Nas Américas, a incidência estimada de TB foi de 290 mil casos, equivalendo a 29 casos a cada 100 mil habitantes no ano de 2019 (WHO, 2020). No Brasil, foram diagnosticados 66.819 casos de TB, com uma incidência de 31.6 casos/100 mil habitantes em 2020, sendo um dos 30 países com maiores cargas da doença. Quanto a taxa de mortalidade no país, vem ocorrendo reduções, indo de 2,57 óbitos/100 mil habitantes em 2008, até 2,18 óbitos/100 mil pessoas em 2017. Em 2019, segundo o dado oficial mais recente, o Brasil registrou 4.532 óbitos e taxa de mortalidade de 2.2/100 mil habitantes (BRASIL, 2021).

Os estados brasileiros com maiores números absolutos de novos casos de TB registrados em 2020 foram São Paulo e Rio de Janeiro, respectivamente com 15.823 e 10.421 casos de TB. O estado do Amazonas por sua vez, registrou 2.728 novos casos de TB nesse mesmo ano. No entanto, ao se levar em consideração o coeficiente de incidência da doença na população, o Amazonas passa a liderar o ranking nacional com 64.8 casos/100 mil habitantes, seguido do Rio de Janeiro, com 60 casos/100 mil habitantes. O Amazonas também registrou 170 óbitos por TB, e taxa de 4.1 mortes /100 mil habitantes em 2019 (BRASIL, 2021).

É importante frisar que a eliminação da TB passa pela atuação, por parte dos órgãos competentes, sobre determinantes sociais que favorecem a prevalência da doença e dificultam o seu controle, como a má nutrição, as condições de trabalho e moradias precárias, e o acesso desigual aos serviços de saúde, uma vez que tais fatores vulnerabilizam os mais pobres, dificultando que elas, caso doentes, tenham acesso ao diagnóstico e tratamento adequados, bem como favorecendo o contágio pela aglomeração entre pessoas (LÖNNROTH et al., 2009). Estima-se, por exemplo, que em 2019, 2.2 milhões de casos de TB no mundo estavam

associados à subnutrição, evidenciando a importância da erradicação da pobreza para o controle dessa doença (WHO, 2020).

Deve-se destacar que a TB possui uma importante associação com outras doenças e condições crônicas, sendo uma importante comorbidade entre pacientes convivendo com o HIV, com a diabetes, alcoólatras e tabagistas (especialmente entre os homens), de modo que a estimativa de casos associados a essas condições de saúde foi, em 2019, 760 mil, 350 mil, 720 mil e 700 mil casos respectivamente (WHO, 2020).

2.2 Forma de transmissão da TBP

A transmissão da TBP ocorre por via respiratória, através de aerossóis que são produzidos por indivíduos doentes, e que estão eliminando gotículas com bacilos no ar através da tosse, denominados de pacientes bacilíferos. Os aerossóis contaminados permanecem no ar e podem ser inalados por um novo indivíduo, permitindo que os bacilos cheguem aos alvéolos pulmonares e estabeleçam infecção, onde, dependendo do microambiente e da suscetibilidade do hospedeiro, poderá ocorrer o desenvolvimento da doença ativa, e a manutenção do ciclo de transmissão (CHURCHYARD et al., 2017; BRASIL, 2019a).

O ciclo de transmissão da tuberculose possui elementos catalisadores que precisam ser considerados para o melhor entendimento da dinâmica de transmissão. Neste ciclo, os diferentes níveis de exposição a aglomerações (como pessoas que trabalham em centros urbanos, moradores de favelas, ou os profissionais da saúde), os diferentes níveis de virulência do bacilo (como cepas Beijing e outras cepas multirresistentes), a maior transmissibilidade do hospedeiro (como os indivíduos que produzem aerossóis com mais facilidade), e as diferentes suscetibilidades dos hospedeiros (como a infecção pelo HIV e a desnutrição), contribuem para que se tenham populações mais propensas à infecção/transmissão (DOWDY et al., 2014; CHURCHYARD et al 2017).

Desse modo, para um controle mais efetivo, e posteriormente a erradicação dessa doença, precisa-se de atuações diretas sobre esses fatores, como a busca ativa nos locais de maior aglomeração, o incentivo àqueles que não têm facilidade de acesso aos serviços de saúde, para que procurem atendimento médico, e o uso de ferramentas diagnósticas mais eficientes, como os métodos moleculares. Somente assim, com o aumento da abrangência diagnóstica e a disponibilização mais eficiente e igualitária do tratamento, será possível reduzir a incidência dessa doença no mundo (DOWDY et al., 2014; CHURCHYARD et al 2017).

2.3 Formas clínicas

Embora tradicionalmente se entenda que a TBP possa se apresentar na forma latente, caracterizada pela ausência de sintomas (com bacilos viáveis confinados no interior de granulomas, e as taxas proliferativas do patógeno mantidas em níveis baixos pela ação protetiva do sistema imune), ou na forma de TBP ativa, que se manifesta clinicamente a partir da inabilidade do sistema imune em conter o patógeno, devemos considerar que os fatores individuais que levam os indivíduos a apresentarem diferentes susceptibilidades, por exemplo imunodeficiências e variações genéticas, sugerem que a dicotomia entre forma latente e forma ativa é melhor aplicada a realidade quando entendida fundamentalmente como dois espectros opostos de uma doença, havendo entre um polo e outro, uma série de manifestações clínicas que podem ser apresentadas por cada indivíduo a depender de condições pré-existentes (BARRY et al., 2009; DOWDY et al., 2014).

A partir do primeiro contato com o patógeno (primo-infecção), no trato respiratório inferior, os bacilos estabelecem infecções localizadas na periferia do pulmão, onde se depositaram através da inalação. Nesse contexto, há poucos ou mesmo nenhum sinal ou sintoma clínico da doença, e, a depender da capacidade imunológica de cada indivíduo, a infecção pode ser controlada ou dar início a forma ativa da TBP. É o que ocorre na infecção primária com uma parcela pequena de pessoas (cerca de 5%), que não conseguem conter a proliferação do bacilo e, portanto, desenvolvem formas ativas da doença após esse primeiro contato. Uma outra parcela, também de aproximadamente 5%, permanece com os bacilos viáveis no interior de granulomas, e em situações de comprometimento imunológico, passam a manifestar sinais e sintomas da doença ativa por reativação dos bacilos. A maioria dos indivíduos infectados, no entanto, pode permanecer com os bacilos latentes nos focos quiescentes, desenvolvendo resistência parcial ao adoecimento, e a infecção sendo controlada pelo sistema imune, na forma latente da TBP (BARRY et al., 2009; BRASIL, 2014; LYON; ROSSMAN, 2017).

A maioria dos casos de TB ativa em indivíduos imunocompetentes apresenta a forma clínica pulmonar (cerca de 85% dos casos), dado que a porta de entrada do bacilo no organismo é, geralmente, o trato respiratório. No entanto, em pacientes imunocomprometidos, como aqueles acometidos por HIV/Aids, os casos extrapulmonares podem ser mais recorrentes, chegando a um índice superior a 50% dos casos, quando há concomitantemente Aids e TB. Nesses casos a infecção pode ser encontrada nos gânglios linfáticos, pleura, meninges, ossos, dentre outros sítios anatômicos (GOLDEN; VIKRAM, 2005; DHEDA; BARRY; MAARTENS, 2016; LYON; ROSSMAN, 2017).

Os sintomas clássicos da TBP podem ser constitutivos e respiratórios. Os constitutivos envolvem febre vespertina (que pode ser moderada no início da doença, mas que fica cada vez mais intensa conforme a doença progride), sudorese noturna, emagrecimento, mal-estar, fadiga e dores de cabeça. Os sintomas respiratórios são representados pela tosse seca ou produtiva (frequentemente associada à hemoptise leve), dor no peito e dificuldade para respirar, que fica mais intensa conforme o comprometimento do parênquima pulmonar (LYON; ROSSMAN, 2017; BRASIL, 2019a).

Outros sintomas apresentados pelo paciente devem receber atenção, pois pode ser que outros órgãos estejam acometidos nos casos de TB extrapulmonar. A forma como o bacilo se dissemina a partir de um foco pulmonar, para outros sítios anatômicos, não é completamente compreendida, no entanto, a via linfo-hematogênica exerce um papel fundamental para o transporte do patógeno. A entrada do bacilo na corrente sanguínea pode ocorrer pela ruptura da camada de células alveolares, permitindo a disseminação do bacilo através de veias pulmonares. Além disso, os bacilos podem usar os próprios mecanismos imunes para a disseminação, como o transporte por meios de células fagocíticas para os linfonodos. Esse transporte é fundamental para a produção de linfócitos T específicos, porém, pode contribuir também para a disseminação extrapulmonar. Os granulomas também exercem papel importante na disseminação da doença, uma vez que macrófagos infectados podem deixar um granuloma primário, possibilitando o transporte hematogênico do bacilo para outros tecidos (KRISHNAN, ROBERTSON, THWAITES, 2010; RAMAKRISHNAN, 2012; KHAN, 2019).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico bacteriológico é de fundamental importância tanto para o início de uma antibioticoterapia segura quanto para o acompanhamento da evolução da doença. O método mais empregado no país é a baciloscopia do escarro pela pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), corados pelo método de Ziehl Neelsen, que sendo bem executado, da coleta do material à execução da técnica, permite o diagnóstico de até 80% dos casos de TB em adultos. Já em crianças, o método possui sensibilidade diminuída, muitas vezes pela dificuldade de se coletar amostras desses pacientes em quantidade e qualidade desejáveis (BRASIL, 2019a).

A baciloscopia do escarro é recomendada em estratégias de busca ativa de pacientes sintomáticos, em pacientes com suspeita clínica e radiológica de TBP independente da duração da tosse, e em pacientes diagnosticados com TBP, para acompanhamento da evolução do tratamento. Para realização do método, recomenda-se a coleta da amostra ao despertar, com o objetivo de se recolher uma quantidade significativa de escarro que se acumula durante a noite.

As análises devem ser feitas em duas amostras coletadas em dias diferentes, e, caso haja suspeita de TBP e as análises forem negativas, pode-se solicitar novas amostras. Nos Estados Unidos da América, inclusive, a prática recomendada pelo *Center for Disease Control* (CDC) é a análise de pelo menos 3 amostras diferentes a fim de se aumentar a sensibilidade do diagnóstico (JAMIL et al., 2017; BRASIL, 2019a).

O diagnóstico de confirmação microbiológica e padrão ouro, é o exame de cultura, que deve sempre ser solicitado, pois permite o diagnóstico de TB mesmo em situações quando não há sinais clínicos ou radiológicos da doença, e, ainda que a baciloscopia dê resultados negativos, o crescimento de *M. tuberculosis* em cultura permite a definição diagnóstica da TB, quando descartada todas possibilidades de contaminação da amostra (COSTA et al., 2018; BRASIL, 2019a).

No exame de cultura podem ser utilizados meios sólidos ou líquidos; os meios sólidos mais comumente empregados para isolamento de micobactérias são o Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh, que apresentam custos menores e menores taxas de contaminação, entretanto, o tempo de desenvolvimento do bacilo é bastante elevado (entre 14 e 30 dias), sendo um ponto negativo, principalmente quando se precisa de um diagnóstico rápido. Os meios líquidos, por sua vez, permitem o crescimento bacteriano com mais velocidade (entre 5 e 12 dias), sendo empregados com metodologias automatizadas (COSTA et al., 2018; BRASIL, 2019a).

A realização da cultura para pesquisa do bacilo é muito importante, pois permite a realização de testes de sensibilidade fundamentais para o emprego dos antimicrobianos adequados no tratamento, uma vez que o uso de uma farmacoterapia baseada apenas na presunção de resistência aos antimicrobianos, pode levar a efeitos tóxicos indesejáveis ao paciente, além de custos desnecessários, caso o paciente esteja infectado com uma cepa sensível. Já o emprego de uma farmacoterapia inespecífica para casos em que há resistência, geralmente leva a falhas no tratamento, aumentando o risco de disseminação do bacilo, podendo levar posteriormente à morte. As drogas comumente testadas são estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol (JAMIL et al., 2017; BRASIL, 2019a).

Em se tratando de TB latente, a prova da tuberculina, ou teste PPD (*purified protein derivate*), constitui em uma metodologia útil na identificação de pacientes que foram expostos ao bacilo. Esse método se baseia na injeção intradérmica de PPD para averiguar a resposta imune dos indivíduos, especialmente respostas mediadas por células T. O exame é considerado positivo quando há um endurecimento do local da injeção entre 48 e 72 horas após a aplicação. O resultado positivo não significa que o indivíduo esteja apresentando a forma latente da TB,

essa distinção é feita com base nos sinais e sintomas do paciente. Esse exame, porém, apresenta possibilidades de falso-negativos em pacientes com imunocomprometimento, e falso-positivos em casos de pacientes vacinados com BCG ou infectados por outras micobactérias não-tuberculosas (BRASIL, 2014; ACHARYA et al., 2020).

Outros métodos que contribuem para a identificação de tuberculose latente são ensaios de liberação do interferon-gama (Interferon-Gamma Release Assays – IGRA), que se fundamentam na proposição de que células anteriormente sensibilizadas com antígenos de *M. tuberculosis*, ao serem novamente estimuladas com antígenos do bacilo, secretam quantidades maiores de IFN- γ . Atualmente 2 métodos baseados nesse fundamento foram validados para uso diagnóstico, o teste QuantiFERON®-TB *Gold in tube*, aprovado pelo FDA em 2004, que consiste em um ensaio imunoenzimático que detecta a produção de IFN- γ liberadas por células T no sangue total após estímulo com antígenos de *M. tuberculosis*, e o ELISpot, que se baseia na detecção de células T secretoras de IFN- γ em face do estímulo com antígenos do bacilo (JUN-CHI, et al., 2017; BRASIL, 2019a).

A problemática da TB, para ser controlada de fato, precisa inicialmente de metodologias diagnósticas capazes de fornecer resultados fidedignos e com mais velocidade, desse modo, os métodos moleculares despontam como importantes ferramentas. O teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB) é uma dessas ferramentas, e está indicado para o diagnóstico de TB pulmonar e laríngea em adultos e adolescentes, e para triagem dos casos com resistência à rifampicina, sendo o único método molecular disponível na rede pública em alguns municípios brasileiros (BRASIL, 2019a).

O TRM-TB permite a emissão de resultados em 2 horas e se baseia na reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, permitindo a detecção do DNA de *M. tuberculosis*. A sensibilidade desse método é de 90% para amostras de escarro de adultos, e permite também a detecção da resistência à rifampicina com sensibilidade de até 95% (BOEHME et al., 2010; BRASIL, 2019a).

2.5 Tratamento

O tratamento para TB é longo, no mínimo seis meses, dependendo da forma clínica e outras condições do paciente. O esquema terapêutico básico para adultos e adolescentes nos dois primeiros meses é a administração diária e combinada de quatro medicamentos: rifampicina, pirazinamida, etambutol e isoniazida (fase de tratamento intensiva), e mais quatro meses de manutenção, com uso diário da rifampicina e isoniazida. Já em crianças com idade igual ou inferior a 10 anos, o tratamento na fase intensiva é composto por rifampicina,

pirazinamida e isoniazida, e na fase de manutenção por rifampicina e isoniazida. Em casos de pacientes com meningite, envolvimento ósseo e articular ou infecções por microrganismos resistentes, o tratamento pode ser prolongado e o esquema terapêutico adaptado (RANG; DALE, 2011; BRASIL, 2019a).

A TB droga resistente se configura em um grande desafio, pois possui um tratamento mais difícil. Geralmente a resistência à rifampicina é a mais prevalente, no entanto, outras drogas também podem apresentar ineficiência contra o bacilo, desse modo, na ausência da rifampicina que é a droga mais ativa contra a TB, se faz necessário o uso de drogas de segunda linha, levando a tratamentos mais longos e com potencial de desenvolvimento de toxicidade (BRASIL, 2019a).

A TB pode apresentar diferentes níveis de resistência: a monorresistência, quando há resistência a somente 1 fármaco, sendo a rifampicina e a isoniazida os de maior vigilância e impacto terapêutico; a polirresistência, que se configura pela resistência de 2 ou mais fármacos anti-TB, exceto rifampicina e isoniazida juntas; a multirresistência, quando há, pelo menos, resistência à rifampicina e isoniazida que são os fármacos mais importantes no tratamento da TB; a resistência extensiva, que ocorre quando há resistência à rifampicina e isoniazida, associada à resistência às fluoroquinolonas e aos injetáveis de segunda linha (BRASIL, 2019a).

Em geral os fármacos utilizados atuam inibindo as vias metabólicas do bacilo (interferindo em vias enzimáticas ou em síntese de metabólitos necessários para a sobrevivência do microrganismo), propiciando que o sistema imunológico também possa ajudar eliminando os bacilos em latência. Cada fármaco envolvido no esquema terapêutico tem a função de atuar nos bacilos durante suas diferentes atividades metabólicas, por exemplo, nas lesões cavitárias onde há condições de oxigênio e pH adequados para a multiplicação bacilar, a rifampicina, a isoniazida e a estreptomicina são bastante eficientes, já nas populações de bacilos no interior dos fagócitos, onde o pH é ácido, os níveis de oxigênio baixos e os mecanismos de defesas imunes levam a uma baixa taxa de proliferação do bacilo, os fármacos com maior capacidade de atuação são aqueles que se difundem em meio intracelular e que podem atuar no pH ácido local, como a rifampicina, a pirazinamida e etambutol (BRASIL, 2019a).

Apesar do tratamento longo para TB, cujo objetivo é garantir a eliminação dos bacilos em latência que são os principais responsáveis pelas recidivas, a maioria das pessoas que desenvolvem a TB e recebem um diagnóstico em tempo hábil, pode ser curada. A TB, no entanto, é uma doença carregada de estigmas e preconceitos que são grandes barreiras para o acesso e fidelização dos pacientes ao tratamento. Há também dificuldade de acesso aos serviços

de saúde e educação formal por parte de grupos sociais vulneráveis, que contribui para a manutenção tanto do ciclo de transmissão quanto dos números de novos doentes que se mantêm estável nos últimos anos (WHO, 2019; BRASIL, 2019a; FURIN; COX; PAI, 2019).

2.6 O Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

A TB pode ser causada por qualquer uma das sete espécies que integram o Complexo *Mycobacterium tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae* (BRASIL, 2019a). A espécie de maior impacto na saúde pública é *M. tuberculosis*, também conhecida como bacilo de Koch. É um bacilo álcool-ácido resistente, aeróbio, com a parede celular constituída por rica concentração de ácidos graxos, em especial por ácido micólico, mas também por glicolipídios como lipoarabinomanana e lipomanana (GAGNEUX, 2018; GHAZAEI, 2018).

Ao longo de sua evolução, *M. tuberculosis* conservou muitas características metabólicas encontradas em micobactérias não patogênicas, no entanto, adquiriu novas funções, adaptando suas vias metabólicas para o sucesso na infecção do hospedeiro humano, e conseqüentemente, para sua propagação. Diferentemente de muitos outros microrganismos patogênicos, *M. tuberculosis* possui um aparato genético que possibilita a síntese de muitas biomoléculas fundamentais para sua sobrevivência, como todos os aminoácidos essenciais, vitaminas e cofatores, além da síntese de enzimas envolvidas na lipogênese e lipólise, e na glicólise, enquanto outros patógenos obrigatórios tendem a utilizar da maquinaria celular dos hospedeiros para a síntese desses componentes (COLE et al., 1998; MASHABELA; DE WET; WANER, 2019).

O metabolismo de *M. tuberculosis* está altamente relacionado com sua patogenicidade, principalmente por se tratar de um patógeno obrigatório. Sua coevolução ao longo de milênios com o hospedeiro humano, fez com que o metabolismo do bacilo pudesse se adaptar a uma variedade de pressões que atuam para a sua eliminação, como a imunidade do hospedeiro, a farmacoterapia, e a escassez de nutrientes e de oxigênio em ambiente intracelular. Desse modo, o sucesso no estabelecimento da infecção passa pela capacidade do bacilo de entrar em um período metabólico e replicativo quiescente, e sair desse status quando for favorável para o restabelecimento do ciclo celular e propagação da infecção (EHRT; SCHNAPPINGER; DIRK, 2018; MASHABELA; DE WET; WANER, 2019).

Dentre os mecanismos regulatórios do metabolismo bacteriano que auxiliam na adaptação do bacilo ao metabolismo intracelular do hospedeiro, podemos citar o cocatabolismo de substratos de carbono, que envolve o consumo de múltiplas fontes de carbono

simultaneamente com o objetivo de otimizar o crescimento bacteriano, diferente de outras bactérias que usualmente utilizam as fontes de carbono de maneira seletiva e sequencial de acordo com a eficiência no crescimento; a regulação do uso de colesterol pelo *M. tuberculosis* por meio do AMP cíclico, com o objetivo de controlar o uso do nutriente, uma vez que o bacilo prefere o colesterol como fonte de energia do que outras macromoléculas como glicose e ácidos graxos; e a reciclagem metabólica, a fim de otimizar o uso de nutrientes, pela conversão das cabeças polares dos glicerofosfolipídeos, em fosfato inorgânico e glicerol, que servem como substratos enzimáticos no metabolismo do bacilo (DE CARVALHO et al., 2010; LARROUY-MAUMUS et al., 2013; VANDERVEN et al., 2015; EHRT; SCHNAPPINGER; DIRK, 2018).

A composição da parede celular de *M. tuberculosis* também desempenha um importante fator na interface patógeno-hospedeiro, sendo o primeiro sítio para essa interação. A parede celular é composta por uma camada exterior à membrana plasmática composta majoritariamente por peptidoglicano, que se liga covalentemente a uma segunda camada composta de arabinogalactano (essa camada possui lipídeos e lipoglicanos ligados não covalentemente, entremeando-se), e essa, por sua vez, se liga a uma terceira camada composta de ácidos micólicos, a qual é envolta por uma camada frouxamente aderida, composta de proteínas e polissacarídeos (GAGNEUX, 2018; GHAZAEI, 2018; EHRT et al., 2018; MASHABELA et al., 2019).

Os componentes da parede celular são fundamentais para a patogenicidade do bacilo; cadeias de ácido micólico, por exemplo, foram identificadas como determinantes antigênicos para receptores de células T, de modo que modificações nas cadeias de ácido micólico causam alterações nas atividades desses receptores (CHANCELLOR et al., 2017). Os componentes lipídicos consistem em cerca de 60% do peso seco da parede de *M. tuberculosis*, e modulam a resposta imune do hospedeiro. Mudanças no metabolismo lipídico do bacilo, por exemplo, levam a alterações na composição da parede celular, influenciando a resposta imunológica do paciente, no que diz respeito à produção de citocinas e a ativação de fagócitos (GAGNEUX, 2018; GHAZAEI, 2018; EHRT et al., 2018; MASHABELA et al., 2019).

2.7 Imunidade Inata no contexto de TB

A espécie *M. tuberculosis* é um patógeno muito antigo, que ao longo de sua evolução desenvolveu mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro e estratégias para o desenvolvimento de infecções persistentes. Estima-se que cerca de um quarto da população global esteja infectada com o bacilo, desse grupo, a maioria permanece em estado latente, e apenas uma parcela de 3 a 10% desses indivíduos desenvolve a doença ativa ao longo de suas

vidas em decorrência de falhas no sistema imune em manter a infecção controlada. Geralmente é esse o desfecho da infecção primária em um indivíduo saudável: a latência do *M. tuberculosis* no interior de macrófagos ou granulomas. Ainda assim, uma parte dos indivíduos desenvolve doença ativa a partir da infecção primária, em decorrência de diversos fatores sobre os quais ainda são necessários esclarecimentos, como os aspectos imunológicos e genéticos dos pacientes (SCHOREY; SCHLESINGER, 2016; COPPOLA; OTTENHOFF, 2018).

Os bacilos após serem inalados, atingem o tecido pulmonar e são internalizados preferencialmente pelos macrófagos alveolares através da fagocitose mediada por receptores, destacando-se duas vias importantes de internalização, a primeira mediada por receptores do complemento (CR), que envolve a ativação de proteínas do complemento presentes no espaço alveolar pelos antígenos micobacterianos, e consequente opsonização do bacilo, propiciando a sua internalização após reconhecimento das opsoninas recobrando o patógeno pelos receptores de complemento do fagócito (FENTON; RILEY; SCHLESINGER, 2005), e a segunda que é mediada por receptores de manose (MR), capazes de reconhecer resíduos de manose micobacterianos (GUPTA et al., 2012).

Além dos macrófagos alveolares, a interação inicial de *M. tuberculosis* se dá também com outras células como as células dendríticas (DC), células Natural Killer (NK), neutrófilos, e também células epiteliais. Essa diversidade celular lança mão de diversos receptores de reconhecimento de padrão (PRR), tais como receptores do tipo Toll (TLRs), do tipo NOD (NLRs) e receptores de lecitina tipo C (CLR), que atuam individualmente ou em associação, para reconhecer os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) do bacilo, e dar início a cascatas bioquímicas e ativação de fatores de transcrição, que atuam no núcleo celular para, então, haver a produção de moléculas da resposta imune, como citocinas pró-inflamatórias, e quimiocinas como a CCL2, responsável pelo recrutamento de macrófagos intersticiais e amplificação da resposta imune (GUPTA et al., 2012; LIU; LIU; GE, 2017; HUANG; NAZAROVA; RUSSELL, 2019).

Nos macrófagos, no interior dos fagossomos, o bacilo entra em contato com um meio ácido e rico em enzimas lisossomais, com capacidade de destruir o microrganismo e de manter as baixas taxas de replicação. No entanto, *M. tuberculosis* evoluiu de modo a possuir a capacidade de inibir a maturação do fagolisossoma, que passa a apresentar uma concentração das enzimas antimicrobianas reduzida, o pH passa para níveis menos ácidos (~6,4) e, portanto, conseguem garantir um meio adequado para a sobrevivência do patógeno e a persistência da infecção (LIU; LIU; GE, 2017; HUANG; NAZAROVA; RUSSELL, 2019).

No pulmão são encontradas diferentes populações de macrófagos, especialmente macrófagos alveolares, que são células residentes, oriundas do saco vitelino e do fígado fetal durante a embriogênese, e com capacidade de autorrenovação. Outra população é a de macrófagos intersticiais, oriundos dos monócitos circulantes. Apesar de compartilharem o mesmo ambiente, essas células, em razão de suas diferentes ontogêneses, apresentam respostas divergentes em face de estímulos semelhantes, consequentemente essas duas populações de macrófagos fornecem diferentes meios intracelulares para *M. tuberculosis*, afetando a sobrevivência, o metabolismo e a multiplicação dos bacilos de diferentes formas (HUANG; NAZAROVA; RUSSELL, 2019).

Os macrófagos alveolares quando infectados pelo bacilo, apresentam aumento dos transcritos associados ao metabolismo de ácidos graxos e balanço do colesterol, o que é essencial para a sobrevivência do patógeno, dada a preferência de *M. tuberculosis* pelos lipídios como fonte de carbono. Já os macrófagos intersticiais apresentam aumento nos transcritos relacionados a sinalização via IFN- γ , atividades inflamatórias, glicólise e hipóxia, mostrando-se células mais hostis contra os bacilos e mais aptas ao controle da infecção. De fato, os macrófagos são células muito importantes para a contenção da proliferação dos bacilos, inclusive são as células que iniciam a formação do granuloma, a maior característica histopatológica da TB (GHAZAEI, 2018; HUANG; NAZAROVA; RUSSELL, 2019).

Os granulomas são agregados celulares compactos formados principalmente por macrófagos maduros, os quais, a depender dos estímulos e dos diferentes processos patológicos envolvidos, podem sofrer alterações diversas, por exemplo, tornarem-se células epitelioides, cujas membranas celulares das células adjacentes se conectam umas às outras por meio de interdigitações em arranjos semelhantes a zíper; podem fundir suas membranas inteiramente formando células gigantes multinucleadas; e também podem se diferenciar em macrófagos espumosos, que apresentam elevada concentração de lipídios oxidados, em consequência de estímulos inflamatórios repetidos. Inclusive, no centro caseoso do granuloma, que são os locais necróticos formados pelas células mortas que participam da sua composição, há elevada concentração de colesterol esterificado, o qual é proveniente dos macrófagos espumosos que cercam o centro caseoso (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018; HUANG; NAZAROVA; RUSSELL, 2019).

A formação do granuloma ocorre essencialmente pela incapacidade de fagócitos mononucleares em eliminar o patógeno, desse modo, o recrutamento de macrófagos e outros tipos celulares, e a formação de tecido fibrótico, agem para confinar o bacilo em seu interior a fim de manter a infecção sob controle e prevenir o desenvolvimento de doença ativa, porém,

essa estratégia do organismo também representa riscos de danos, pois de forma paradoxal, conforme o granuloma se desenvolve, e não ocorrendo o *clearance* do patógeno, a produção de citocinas pelas células do granuloma como TGF- β 1 ou IL-4/IL-13, pode levar ao excesso de tecido fibroso causando até mesmo falência do órgão (RAMAKRISHNAN, 2012; PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018; GHAZAEI, 2018; HUANG; NAZAROVA; RUSSELL, 2019).

Assim como a fibrose, outra característica patológica do granuloma é a necrose, cujos danos teciduais causados nos órgãos acometidos estão associados à morbidade do paciente e à maior transmissibilidade do bacilo, pois *M. tuberculosis* apresenta grande capacidade de multiplicação nos detritos necróticos, possivelmente pela elevada concentração de lipídios presentes no meio, os quais podem ser usados pela micobactéria como substrato. Ainda assim, há evidência de que a conservação da resposta granulomatosa, desde os invertebrados até os humanos, indica que essa estratégia imune desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro, inclusive, a presença de granulomas estéreis (calcificados ou fibróticos) em diversos indivíduos, demonstram que a resposta granulomatosa atuou pela eliminação do patógeno em favor do hospedeiro (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018).

2.7.1 Receptores do tipo Toll (TLR – Toll Like Receptor)

O reconhecimento inicial dos patógenos se dá através da ligação entre os PAMPs pelos PRRs presentes nas células da imunidade inata, por exemplo os TLRs, um grupo de proteínas transmembranares que está presente em células com funções imunes. Esses receptores recrutam moléculas adaptadoras que retransmitem os sinais para as moléculas seguintes da cascata bioquímica, levando a ativação de diferentes vias de sinalização e então a produção de citocinas pró-inflamatórias. Os diferentes TLRs, dependendo da sua localização, podem reconhecer diferentes estruturas do patógeno, como os TLRs localizados na membrana celular (TLR 1, 2, 4, 5 e 6) que reconhecem lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias gram-negativas e o ácido lipoteicoico de bactérias gram-positivas, enquanto os TLRs 3, 7, 8 e 9, que são endossomais, reconhecem principalmente ácidos nucleicos antigênicos. No caso da TB, componentes lipídicos de *M. tuberculosis* interagem com TLR e com o domínio TIR da molécula adaptadora MyD88, ativando as moléculas seguintes da cascata, IRAK-1, TRAF e TIRAK, que direcionam a ativação do TLR ao núcleo, onde o NF- κ B induz a transcrição de genes que codificam proteínas inflamatórias, como TNF- α e IL-1, que geram resposta contra *M. tuberculosis* (BIYIKLI et al., 2016; LIU; LIU; GE, 2017).

Os TLRs são expressos de forma relevante nos tecidos e órgãos com funções imunes, como o baço, e os leucócitos do sangue periférico, possuindo perfis de distribuição distintos,

além de exercerem uma importante função nos órgãos que possuem interface com o ambiente, como no trato respiratório e gastrointestinal. Diversos componentes micobacterianos já foram reconhecidos como agonistas de TLR2/TLR6, TLR1/TLR2, TLR4 e TLR6, levando a uma cascata de ativação que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , quimiocinas e óxido nítrico, que são fundamentais na imunopatogenia da TB (BASU; SHIN; JO, 2012; SARAAS; SINGH; SHARMA, 2014).

As lipoproteínas LprG or LpqH de *M. tuberculosis* foram identificadas como ligantes do heterodímero TLR1/TLR2, e capazes de coestimular células T CD4+ de memória, indicando um papel na indução de respostas secundárias e na manutenção da memória imunológica (LANCIONI et al., 2011). A lipoarabinomanana de *M. tuberculosis* também foi identificada como agonista do heterodímero TLR1/TLR2, ativando neutrófilos humanos e estimulando a produção das citocinas como IL-6 e IL-8 (HOOK et al., 2019).

TLR2 também atua no reconhecimento de *M. tuberculosis*, ligando-se às proteínas da família PE_PGRS (*proline-glutamic acid polymorphic guanine-cytosine-rich sequence*), PE_PGRS 17 (Rv0978c) e PE_PGRS 11 (Rv0754), que são associadas à parede celular do bacilo. Ao serem reconhecidas pelo TLR2, induzem a maturação e posteriormente a ativação de células dendríticas humanas, e aumentam a capacidade dessas células de estimular células T CD4+ (BANSAL et al., 2010); outro antígeno, a pirofosfatase Rv3628, essencial para a viabilidade da célula bacteriana e que já foi identificada na parede celular de *M. tuberculosis*, mostrou-se ativadora de células dendríticas e estimuladora da síntese de TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-12p70, via MyD88, através da ligação à TLR2 (KIM et al., 2016).

A ativação de TLR4 pela proteína Rv0652, que é abundante em filtrados de *M. tuberculosis* K (pertencente à família Beijing), mostrou-se estimuladora da produção de TNF e da quimiocina CCL2 em macrófagos, dependente de MyD88. Além de aumentar a produção de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e MHCII, preponderantes para ativação de células T (KIM et al., 2012); e a proteína da família Rpf (*Resuscitation Promoting Factor*), RpfB, que foi demonstrada como um ligante de TLR4, ativa células dendríticas e estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como a expressão de moléculas co-estimuladoras, como CD80, CD86, e os MHC de classe I e II (KIM et al., 2013).

Os ácidos nucleicos de *M. tuberculosis* também são elementos antigênicos reconhecidos por receptores da imunidade inata. Verificou-se que DNA purificado de *M. tuberculosis* estimulou a produção de IL12p40 por células dendríticas de baço de camundongos, bem como a produção de IL-12p40, TNF e IFN- α por células dendríticas derivadas de medula óssea, e de

TNF e IL-6 por macrófagos derivados da medula óssea de maneira dependente de TLR9 (BAFICA et al., 2005). A replicação intracelular de cepa atenuada de *M. tuberculosis* (H37Ra) foi maior em macrófagos isolados de camundongos deficientes em TLR9 em comparação a macrófagos de camundongos do tipo selvagem, enquanto a cepa virulenta H37Rv mostrou sobrevivência igual em células de camundongos *selvagens* ou mutantes (KIEMER et al., 2008).

Por ser endossomal, o TLR9 apresenta-se como um importante alvo de estudo visto que sua localização no citoplasma permite uma interação importante com *M. tuberculosis*, alguns estudos sinalizam nesse sentido ao identificar que variantes gênicas de TLR9 apresentam associação com o desenvolvimento de TB (BHARTI et al., 2014; SCHURZ et al., 2015; WANG et al., 2018). Nesse sentido, não apenas TLR9, mas variantes dos diferentes receptores do tipo Toll podem impactar nas doenças infecciosas, de modo que estudos científicos têm identificado variantes de *TLR1*, *TLR2*, *TLR4* e *TLR6* relacionadas à tuberculose em diferentes populações do mundo (ZHANG et al., 2013; ZHAO et al., 2015; CHEN et al., 2015; HU et al., 2019).

2.7.2 SNV rs5743618 de TLR1

A variante rs5743618 é não-sinônima, onde o alelo de maior frequência T corresponde ao códon ATC (isoleucina), e o alelo G corresponde ao códon AGC (serina). Essa variação de aminoácidos ocorre na posição 602 da proteína gerando modificações no primeiro aminoácido do domínio intracelular de TLR1 (MA et al., 2007). Alguns autores reportam que essa variação de aminoácidos, especialmente a decorrente do alelo G (AGC, serina) acarreta em uma expressão deficiente de TLR1 na superfície celular, resultando no prejuízo das respostas imunes (JOHNSON et al., 2007; UCIECHOWSKI et al., 2011).

Ainda que JOHNSON et al., 2007 tenha detectado prejuízo funcional em decorrência do alelo G da variante rs5743618, os autores também encontraram um papel protetivo do alelo G frente a hanseníase (uma doença micobacteriana) ($p=0.004$; $OR=0.48$; $CI95\%=0.29-0.80$), pode-se atribuir esses achados contrastantes ao fato de que outros alelos podem atuar conjuntamente com rs5743618 para acarretar em prejuízos na expressão de TLR1, de modo que, uma análise envolvendo outras variantes em desequilíbrio de ligação com rs5743618, como rs4833095, pode permitir uma análise mais fidedigna a respeito do possível efeito deletério do alelo G sobre a expressão da proteína TLR1.

UCIECHOWSKI et al., 2011, por exemplo, verificou que o genótipo G/G de rs5743618 em conjunto com o genótipo A/A de rs4833095 acarreta em uma expressão praticamente nula de TLR1 na superfície de leucócitos polimorfonucleares de doadores, porém, também o genótipo T/T de rs5743618 em conjunto com A/G de rs4833095, e T/G da variante rs5743618

junto com A/A de rs4833095, acarretam expressão reduzida ou praticamente nula de TLR1 na superfície celular de leucócitos, permitindo aos autores concluir que o alelo A de rs4833095 está associada a redução da expressão de TLR1 mais que o alelo G de rs5743618. Os autores também pontuam que outros estudos que avaliaram o efeito do alelo G na redução da expressão de TLR1 em monócitos (JOHNSON et al., 2007; WURFEL et al., 2008) não analisaram outras variantes em desequilíbrio de ligação com rs5743618, o que também pode levar a conclusões menos precisas a respeito da funcionalidade dessa variante.

Os estudos caso-controle publicados na literatura com a variante rs5743618 em pacientes com TBP ou TB extrapulmonar foram sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Resumo dos estudos publicados na literatura com a variante rs5743618 de *TLR1* e sua associação com tuberculose.

Alelos e Genótipos	Valores Estatísticos	População	Resultados	Referências
Genótipo T/T	$p < 0.001$; OR: 2.29	Hispânicos (TB e TBEP)	Foi verificada associação do genótipo T/T com risco para TB.	MA et al., 2007
	$p < 0.001$; OR: 2.50	Afro-americanos (TB e TBEP)		
	$p = 0.080$; OR: 0.49	Caucasianos (TB e TBEP)	Não foi encontrada associação	
Alelos G e T	$p = 0.814$	Pacientes com TBP de mais de 16 anos de Hebei, China.	Não houve associação com TBP.	MA et al., 2010
Genótipos T/T, T/G, G/G	$p = 0.970$			
Genótipos T/T, T/G	$p = 0.15$; OR: 0.56; 95%CI: 0.24-1.30	Pacientes com TBP do sul da Índia	Não houve associação com TBP.	SELVARAJ et al., 2010
Alelo G	$p = 0.0059$; OR: 2.74; 95%CI: 1.26-6.05	Indivíduos com TB nascidos na Alemanha	Foi encontrada associação entre o alelo G e o genótipo G/G com TB.	UCIECHOWSKI et al., 2011
Genótipo G/G	$p = 0.0025$; OR: 4.17; 95%CI: 1.52-11.67			
Alelo G	$p = 0.02$; OR: 1.43; 95%CI: 1.07-1.90	Pacientes caucasianos com TBP de Cantabria, Norte da Espanha.	Foi encontrada associação entre o alelo G e o genótipo G/G com TBP.	OCEJO-VINYALS et al., 2013
Genótipo G/G	$p = 0.005$; OR: 2.04; 95%CI: 1.26-3.31			
Genótipos T/T, T/G, G/G	$p = 0.186$	Pacientes entre 12 e 70 anos com TBP de Uttar Pradesh, Índia.	Não houve associação com desenvolvimento de TBP.	SINHA et al., 2014
Alelo G	$p = 0.115$; OR: 0.606; 95%CI: 0.323-1.137	Pacientes com TBP de Xangai, China.	Não foi encontrada associação entre alelos e genótipos e TBP.	WU et al., 2015
Alelo T	$p = 0.115$; OR: 1.650; 95%CI: 0.880-3.095			
Genótipo T/T	$p = 0.074$; OR: 1.833; 95%CI: 0.935-3.592			
Genótipo T/G	$p = 0.054$; OR: 0.508; 95%CI: 0.252-1.022			
Genótipo G/G	$p = 0.499$; OR: 1.944; 95%CI: 0.175-21.64			
Alelo G	$p = 0.0009$; OR: 2.40; 95%CI: 1.41-4.07	Pacientes pediátricos de Han, Norte da China.	Foi encontrada associação entre o alelo G e o genótipo T/G com TBP e TBEP.	QI et al., 2015
Genótipo T/G	$p = 0.001$; OR: 2.53; 95%CI: 1.47-4.34			

Alelo G	$p=0.0001$; OR: 3.00; 95%CI: 1.69-5.31	Pacientes com TBP do sudeste iraniano.	Foi encontrada associação entre o alelo G e o genótipo T/G com TBP.	NADERI et al., 2016
Genótipo T/G	$p<0.0001$; OR: 3.29; 95%CI: 1.82-5.97			
Alelo G	$p=0.48$; OR: 0.89; 95%CI: 0.66-1.37	Pacientes adultos com TBP e TB pleural do Amazonas.	Não foi encontrada associação entre alelos e genótipos e TB.	BARLETTA-NAVECA et al., 2018
Alelo T	$p=0.48$; OR:0.83; 95%CI: 0.83-1.5			
Genótipo T/T	$p=0.77$; OR: 1.11; 95%CI: 0.7-1.61			
Genótipo T/G	$p=0.77$; OR: 0.64; 95%CI: 0.64-1.37			
Genótipo G/G	$p=0.77$; OR:0.81; 95%CI: 0.42-1.56			

Dos estudos relacionados na Tabela 1, alguns não encontraram associação do SNV rs5743618 com TB em populações da China, Índia e Brasil (MA et al., 2010; SELVARAJ et al., 2010; SINHA et al., 2014; WU et al., 2015; BARLETTA-NAVECA et al., 2018). Já o alelo G e o genótipo G/G apresentaram associação com risco de TBP na população de caucasianos estudada na Europa (UCIECHOWSKI et al., 2011 e OCEJO-VINYALS et al., 2013). O genótipo T/G também já apresentou associação com risco à TBP na China e Irã (QI et al., 2015; NADERI et al., 2016). Enquanto MA et al., 2007, que analisou essa variante em diferentes grupos étnicos nos Estados Unidos da América identificou o genótipo T/T com risco à TB tanto em indivíduos hispânicos quanto em afro-americanos.

Os resultados divergentes identificados nos estudos de associação da variante rs5743618 de *TLR1* com TB, pode ser justificado pelas diferentes populações estudadas em cada trabalho, com diferentes idades, diferentes etnias e diferentes formas clínicas da doença, evidenciando a necessidade de se estudar o SNV nas populações de cada região, delimitando-se as formas clínicas e faixas etárias a serem incluídas, a fim de se ter resultados mais reais do papel dessa variante em cada grupo específico.

2.7.3 SNV rs187084 de *TLR9*

O SNV rs187084 é uma variante localizada na região promotora de *TLR9* (POTLICHET; QUINTANA-MURCI, 2013), cujo alelo de menor frequência é C (G na fita molde) e o de maior frequência é T (A na fita molde). Devido a sua localização na região promotora, essa variante tem sido relacionada à regulação da expressão de *TLR9* e consequente impacto na susceptibilidade a diversas doenças, como periodontite crônica (SAHINGUR et al., 2010), malária (MOCKENHAUPT et al., 2006; SAWIAN et al., 2013) e sepse (CHEN et al., 2011). Os estudos de associação entre a variante rs187084 e a tuberculose publicados na literatura, foram sumarizados na tabela 2.

Tabela 2. Resumo dos estudos publicados na literatura com a variante rs187084 de *TLR9* e sua associação com tuberculose.

Alelos e Genótipos	Valores Estatísticos	População	Resultados	Referências
Alelos T e C Genótipos T/T; T/C; C/C	$p=0.07$ $p=0.41$	Pacientes com TBP da Guiné-Bissau	Não foi encontrada associação com TBP.	OLESEN et al., 2007
Genótipo T/C Genótipo C/C	$p=0.81$; OR: 1.11; 95%CI: 0.73-1.71 $p=0.81$; OR: 0.94; 95%CI: 0.51-1.72	Pacientes com TBP do sul da Índia	Não foi encontrada associação com TBP.	SELVARAJ et al., 2010
Alelo T Alelo C Genótipo T/C Genótipo C/C	$p=0.2$; OR: 1.2; 95%CI: 0.8-1.8 $p=0.4$; OR: 1.1; 95%CI: 0.7-1.9 $p=0.2$; OR: 1.6; 95%CI: 0.6-4.4	Pacientes com TBP do Irã	Não foi encontrada associação com TBP.	JAHANTIGH et al., 2013
Alelo T Alelo C Genótipo T/T Genótipo T/C Genótipo C/C	$p=0.21$; OR: 0.79; 95%CI: 0.59-1.07 $p=0.21$; OR: 1.25; 95%CI: 0.93-1.68 $p=0.13$; OR: 0.65; 95%CI: 0.43-0.98 $p=0.13$; OR: 1.33; 95%CI: 0.89-2 $p=0.13$; OR: 1.17; 95%CI: 0.61-2.21	Pacientes adultos com TBP e TB pleural do Amazonas	Não foi encontrada associação com TB.	BARLETTA-NAVECA et al., 2018
Alelo C Genótipo T/C Genótipo C/C	$p=0.6$; OR: 1.05; 95%CI: 0.88-1.24 $p=0.64$; OR: 1.06; 95%CI: 0.83-1.36 $p=0.70$; OR: 1.07; 95%CI: 0.74-1.55	Pacientes maiores de 15 anos com TB da China	Não foi encontrada associação com TB.	WANG et al., 2018
Alelo C Genótipo T/C Genótipo C/C	$p=0.01$; OR: 1.48; 95%CI: 1.10-2.00 $p=0.03$; OR: 1.68; 95%CI: 1.07-2.65 $p=0.06$; OR: 1.80; 95%CI: 0.99-3.27	Pacientes com TBP e TB latente com mais de 18 anos da China.	Alelo C e genótipo T/C associado ao desenvolvimento de TB a partir de TB latente.	

Com exceção do trabalho de WANG et al., 2018, o qual identificou a variante rs187084 com a predisposição ao desenvolvimento de TBP a partir de uma infecção latente em indivíduos chineses, o restante dos trabalhos não associou o SNV em questão com a TB, ainda que outros estudos tenham sido realizados e identificado esta variante com outras doenças infecciosas.

2.7.4 Interleucina-6

A IL-6 tem um papel importante na imunopatogênese de doenças infecciosas. É uma citocina inflamatória, produzida por fagócitos mononucleares e células endoteliais vasculares em resposta a PAMPs e às citocinas IL-1 e TNF- α . Atua estimulando a produção de leucócitos, em especial neutrófilos pela medula óssea, o crescimento e a diferenciação de células B e T, a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, além de atuar no sistema nervoso para a produção de febre. Essa citocina também age, em conjunto com TGF- β , na polarização de células T CD4+ naíve em células efetoras Th17, que são grupos celulares importantes no

combate de infecções, pois produzem a citocina IL-17, a qual estimula a produção de substâncias antimicrobianas, como as defensinas, e induz o recrutamento de neutrófilos para os sítios de inflamação contribuindo também para a formação de granulomas maduros (YOSHIDA et al., 2010; MURPHY, 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Os TLRs ao reconhecerem ligantes microbianos dimerizam e induzem a aproximação das caudas citoplasmáticas, permitindo a interação do domínio TIR citoplasmático dos receptores com as moléculas adaptadoras citoplasmáticas que iniciam a sinalização intracelular, todos os outros TLRs são capazes de sinalizar via MyD88, com exceção de TLR3 que sinaliza apenas via TRIF. A partir daí ocorre a ativação de diferentes fatores de transcrição, como NF- κ B, AP-1 e os fatores 3 e 7 de resposta do interferon - IRF3 e IRF7. Os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 estimulam a expressão gênica de citocinas inflamatórias como a IL-6, além de IL-1 e TNF, enquanto os IRFs induzem a expressão de genes dos interferons tipo 1 (MURPHY, 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A relação da IL-6 com a TB tem sido demonstrada ao longo de várias investigações. Um estudo realizado com lavados broncoalveolares de pacientes com TB pulmonar, encontrou um aumento significativo na liberação espontânea de IL-1 β , TNF- α , e IL-6, além do aumento na expressão gênica dessas proteínas se comparado aos controles negativos (LAW et al., 1996). Em outros estudos que acompanharam os componentes imuno-endócrinos da TB, mostrou-se a elevada concentração plasmática de IL-6 e IFN- γ , correlacionando-se esses aumentos com os efeitos endócrinos encontrados nesses pacientes, como o aumento das concentrações de cortisol e de hormônios tireoidianos, pelo efeito dessas citocinas no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (BOTTASSO et al., 2007).

A relação da IL-6 com a imunopatogênese da TB já foi demonstrado em alguns estudos. Ratos infectados com *M. tuberculosis* e posteriormente tratados com anticorpos neutralizantes anti-IL-6, tiveram prejuízos na aquisição de atividade tuberculostática a longo prazo (APPELBERG, 1994), já a deficiência da Interleucina-6 em camundongos (IL-6 $^{-/-}$), levou-os a maior suscetibilidade à TB, bem como à alta taxa de mortalidade dos animais (LADEL et al., 1997).

Embora os mecanismos imunogênicos envolvidos na ação da IL-6 para a proteção contra TB sejam diversos, o efeito dessa citocina na produção de neutrófilos, bem como seu papel na diferenciação de células T naíve em efectoras Th17, pode indicar um dos caminhos para seu papel protetivo, através de citocinas relacionadas ao padrão de resposta Th17 que acabam induzindo respostas inflamatórias ricas em polimorfonucleares, que, por sua vez,

desempenham um papel fundamental na regulação inicial e formação dos granulomas (SEILER et al., 2003; TORRADO; COOPER, 2010).

Polimorfismos nos genes que codificam a IL-6 também evidenciam o papel dessa citocina no controle da infecção pelo *M. tuberculosis*, por exemplo, a variante rs1800795 de IL-6 está relacionado com o decréscimo no risco de desenvolvimento da TB em geral, e, em uma estratificação por populações, essa redução no risco esteve mais associada à população asiática (MAO et al., 2015). Outro polimorfismo de IL-6, rs1800796, mostrou-se associada a redução do risco de TB em asiáticos e latinos (WANG et al., 2017).

O efeito imune protetivo contra a TB é composto de vários mecanismos celulares e moleculares, e tem uma característica paradoxal, pois, ao mesmo tempo que protege contra a progressão da doença, também pode apresentar efeitos deletérios pela hiper-reatividade imune, gerando danos teciduais e sistêmicos. A concentração elevada de IL-6 em pacientes de TB, com extensa lesão do tecido pulmonar, por exemplo, se mostrou um importante parâmetro associado a exacerbação aguda (OH et al., 2018). A elevação da concentração plasmática de IL-6, e da proteína C reativa (um dos produtos da ação da IL-6), também se mostraram um importante biomarcador para a progressão da síndrome inflamatória da reconstituição imune associada à TB em pacientes coinfectados pelo HIV (NARENDRAN et al., 2013).

2.8 Imunidade adaptativa na TB

Após a infecção primária pelo bacilo e as respostas iniciais dos macrófagos, as células dendríticas que internalizaram os bacilos no pulmão migram para os linfonodos de drenagem, para a apresentação dos antígenos às células T e, conseqüentemente, realizam a ligação entre a imunidade inata à adaptativa, tal função é essencial para a ativação de células T CD4+ e CD8+ naïve.

A resposta adaptativa começa a ser produzida após 3 a 8 semanas após a infecção primária e é fundamental para conter a multiplicação do bacilo e manutenção do estado de latência, pois os linfócitos também fazem parte dos granulomas que isolam os bacilos, se encontrando na camada mais externa. Ainda que após o estabelecimento da imunidade adaptativa o bacilo não seja eliminado, o controle da infecção por parte dos linfócitos ativados é extremamente importante, pois a ação coordenada entre linfócitos T CD4+ que produzem respostas Th1, com liberação da citocina IFN- γ , e os macrófagos, que têm a sua atividade fagocítica potencializada por essa citocina, atuam de modo a garantir a baixa proliferação dos bacilos e a prevenção do surgimento da doença ativa, de modo que deficiência na produção do

IFN- γ , por exemplo, é um fator de risco para o desenvolvimento da TB (BARBER-MAYER; BARBER, 2015; JASENOSKY et al., 2015).

A diferenciação de linfócitos auxiliares para o subgrupo de células Th1 ocorre a partir do reconhecimento dos PAMPs do bacilo pelos PRRs de macrófagos, células dendríticas e células NK. Essas células da imunidade inata produzem citocinas como IL-12 e IFN- γ , as quais atuam nos linfócitos T CD4+, ativando os fatores de transcrição T-bet, STAT1 e STAT4 que induzem a produção de IFN- γ por parte dos linfócitos, conduzindo a diferenciação das células imaturas ao fenótipo Th1. O IFN- γ produzido pelos linfócitos também atuam de forma autócrina, amplificando a resposta e promovendo uma expansão clonal do fenótipo Th1. O linfócito diferenciado também passa a expressar em sua superfície CD40L, que atua em sinergia com o IFN- γ na ativação de macrófagos, que começam a produzir de maneira mais acentuada espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e enzimas lisossomais. Ocorre então a fusão dos lisossomos com os fagossomos contendo as bactérias internalizadas, permitindo a destruição do patógeno. Essa interação entre as células Th1 e os macrófagos também induz o aumento da expressão de MHC classe II, moléculas B7 e CD40, potencializando o papel dessas células na apresentação de antígenos para os linfócitos (MURPHY, 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Essa retroativação de macrófagos contendo micobactérias internalizadas e linfócitos Th1, constitui-se em um dos principais mecanismos de contenção da progressão da infecção por *M. tuberculosis* através da formação dos granulomas (MURPHY, 2014). Ratos *knock out* para a citocina IFN- γ e para a enzima NOS2, por exemplo, tiveram um tempo de sobrevida significativamente menor em relação a ratos *wild type* durante a infecção por *M. tuberculosis* (MOGUES et al., 2001). Outros estudos envolvendo a IL-12, que é a citocina mais potente na indução do perfil celular Th1, mostraram a importância dessa citocina para a produção de respostas imunes eficientes no controle da TB (LYADOVA; PANTELEEV, 2015), por exemplo, ratos *knock out* para a subunidade p40 da IL-12, infectados com *M. tuberculosis*, mostraram-se menos hábeis na produção de IFN- γ bem como no controle do crescimento bacteriano (COOPER et al., 1997).

Estudos recentes, no entanto, têm apresentado resultados que se opõem a esse paradigma: no qual células Th1 produzem IFN- γ , levando à ativação de macrófagos e então à eliminação do bacilo. A falta de correlação entre o grau de proteção e os níveis de IFN- γ já foram verificados em alguns estudos. Camundongos BALB/C, embora tenham produzido uma resposta Th1 aumentada frente a imunização pela BCG, com maiores níveis de IFN- γ ,

apresentaram o mesmo nível de proteção imune que os camundongos C57BL/6, cuja produção da citocina IL-10 foi mais acentuada (GARCIA-PELAYO et al., 2015).

Uma outra investigação mostrou que células T deficientes em IFN- γ reduziram as cargas bacterianas, não havendo diferença significativa na capacidade das células *wild type* e das células com deficiência de IFN- γ no controle do crescimento de *M. tuberculosis*. Indicando que células T CD4⁺ têm vias efetivas de controle da infecção pelo bacilo da TB que são independentes de IFN- γ (GALLEGOS et al., 2011).

Além da resposta Th1, a resposta Th2 também exerce um papel importante na resposta imune contra TB. Inicialmente essa resposta parecia ser deletéria na contenção da TB, pois as citocinas Th2 induzem a ativação alternativa de macrófagos, que estão mais relacionados ao reparo tecidual que as atividades microbidas dos macrófagos classicamente ativados pela ação do IFN- γ . A IL-4 estimula a produção de IL-10 e TGF- β pelos macrófagos alternativamente ativados, que são citocinas inibidoras das atividades microbidas do perfil Th1, como a fagocitose, além da redução da apoptose mediada por TNF- α das células infectadas, atividade reduzida da iNOS, aumento da disponibilidade de ferro para *M. tuberculosis* no meio intracelular, e aumento da proliferação de células T reguladoras. A IL-4 também estimula a fibrose pulmonar, contribuindo para a imunopatogênese (ROOK, 2007).

Apesar dessa visão antagônica entre as respostas Th1 e Th2, uma visão mais abrangente dos mecanismos envolvidos nessas diferentes respostas permite notar que há também uma possível sinergia entre elas. As citocinas da resposta Th2, IL-4, a IL-5 e a IL-13, atuam nas células B, estimulando a produção de anticorpos como IgA, IgE e alguns isotipos de IgG, possuindo assim um perfil de resposta humoral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). A atuação sinérgica entre esse perfil humoral, e o perfil mediado por células gerado pela resposta Th1 pode ser notada no estudo de coorte envolvendo pacientes com TB, seus contatos próximos, e controles da comunidade (sem evidência clínica de TB e sem exposição a *M. tuberculosis*) de uma área endêmica. Foi encontrada uma alta prevalência tanto do anticorpo IgA (um importante anticorpo na defesa das mucosas, como o trato respiratório e o trato gastrointestinal), específico para o antígeno da superfície micobacteriana HBHA (*Heparin-binding hemagglutinin*), quanto de IFN- γ nos controles e nos contatos, e uma concentração menor desses elementos nos pacientes com TB, sugerindo-se que esse seria um mecanismo de ação conjunta entre Th1 e Th2 na resposta protetora contra a infecção pelo *M. tuberculosis* (BELAY et al., 2016; ABEBE, 2019).

As respostas geradas pelo perfil de células Th17 estão majoritariamente associadas à contenção de bactérias extracelulares, pois a citocina IL-17, que é a principal interleucina produzida nesse tipo de resposta, estimula o recrutamento de neutrófilos e a produção de defensinas. Apesar disso, investigações vêm sugerindo o papel das células Th17, da IL-17 e da IL-23 na contenção de infecções por patógenos intracelulares também. Em um estudo, o uso de uma vacina molecular para induzir células T CD4⁺ de longa duração, e epítipo-específica, gerou uma população de células T, produtoras de IL-17 e dependentes de IL-23, que se estabeleceram nos pulmões de camundongo, então, após exposição ao *M. tuberculosis*, foi produzida uma resposta mediada por IFN- γ , essencial para o controle da infecção (KHADER et al., 2007).

Camundongos deficientes em IL-17A, também apresentaram prejuízo no controle da infecção por *M. tuberculosis*, pois a formação de granulomas maduros tornou-se prejudicada (YOSHIDA et al., 2010). Um outro estudo também demonstrou o papel da IL-17 na resposta imune protetora inicial contra a cepa de *M. tuberculosis* HN878, pertencente ao grupo W-Beijing, ao propiciar a ativação de macrófagos e o controle do bacilo (GOPAL et al., 2014).

Embora sejam evidentes as funções dos macrófagos e dos neutrófilos (que são as células efetoras da imunidade inata do eixo de respostas Th1 e Th17, respectivamente) como sinérgicas e colaborativas na contenção de diversos patógenos (SILVA, 2010a; SILVA, 2010b), reconhecendo-se, inclusive, o papel dos neutrófilos no combate ao *M. tuberculosis*, auxiliando, por exemplo, na formação dos granulomas (PEDROSA et al., 2000; SEILER et al., 2003; YOSHIDA et al., 2010), deve-se levar em consideração também que as respostas das células Th17 já foram associadas a progressão da doença e a imunopatologia da TB, principalmente pela promoção de uma resposta inflamatória rica em neutrófilos. Uma possibilidade é que as células Th17 atuem em diferentes estágios da infecção pelo *M. tuberculosis*, propiciando uma resposta mais protetora nos estágios iniciais da doença, e mais patológica nos estágios mais avançados (LYADOVA; PANTELEEV, 2015).

A função das células T CD4⁺ tem sido extensivamente estudada no contexto de TB, e a importância do papel dessas células no controle da infecção pelo *M. tuberculosis* já estabelecida, no entanto, o conhecimento científico acerca do papel das células T CD8⁺ ainda está sendo construído. Em um modelo murino, foi verificado que o controle da TB latente é dependente de células T CD8⁺, e a depleção dessa população celular aumentou a carga bacteriana no pulmão dos animais (VAN PINXTEREN et al., 2000).

Em macacos Rhesus, a depleção de células T CD8+ levou a uma diminuição significativa da imunidade contra a TB induzida pela BCG em primatas vacinados, além da perda de imunidade anti-TB frente a reinfeção por *M. tuberculosis*, em macacos previamente infectados com o bacilo e curados por antibioticoterapia (CHEN et al., 2009). Esses e outros achados apontam para a necessidade de se focar também na indução de respostas citotóxicas por células T CD8+ no planejamento de futuras vacinas que produzam respostas eficientes na contenção da infecção por *M. tuberculosis* (LIN; FLYNN, 2015).

A coordenação entre a imunidade inata e a adaptativa envolve muitos aspectos, desde fatores genéticos e bioquímicos do hospedeiro, quanto do microrganismo. A necessidade do reconhecimento de um patógeno pela resposta imune inata existe, não apenas para que haja a contenção de um patógeno antes do desenvolvimento de uma imunidade adaptativa e especializada que demora mais tempo para ser produzida, mas também, a imunidade inata é fundamental para gerar os sinais que ativam a imunidade adaptativa, a qual permite o desenvolvimento de memória imunológica e leva ao combate dos agentes infecciosos.

Dada a complexidade dessa cascata, variações genéticas individuais, como variantes de base única (SNV) nos genes envolvidos nas sínteses de receptores e moléculas pró-inflamatórias, podem interferir no sentido de promover aumento da proteção ou da suscetibilidade contra a TB, ao conferir alterações estruturais na conformação das proteínas e conseqüentemente na interação ligante-receptor, ou ainda na regulação da expressão dessas proteínas. Em se tratando dos TLRs, muitos estudos têm mostrado resultados divergentes em populações distintas, de modo que as diferenças genéticas nas populações investigadas precisam ser consideradas ao se inferir se determinada variante gênica apresenta qualquer associação com efeito de suscetibilidade ou resistência à TB.

Desse modo, o presente estudo tem como objetivo avaliar a frequência de variantes de base única presentes em genes que codificam para TLR1 e TLR9 em pacientes com tuberculose pulmonar na cidade de Manaus, e também verificar se há associação das variantes gênicas com a resistência ou suscetibilidade à TB. Além disso, pretende-se avaliar se as variantes dos *TLR1* e *TLR9* podem estar relacionadas à concentração da citocina IL-6 nos pacientes de TB.

3. JUSTIFICATIVA

A TB é uma doença infectocontagiosa causada por micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, e continua sendo um grave problema de saúde pública no mundo, inclusive no Brasil, que figura entre os 30 países com as maiores cargas da doença segundo a Organização Mundial de Saúde (2020). No Amazonas os registros também são preocupantes, pois o estado é o líder em incidência de TB no país (BRASIL, 2021).

Apesar do números de doentes e de óbitos significativos e constantes, tornando a TB um necessário campo de estudo científico, muitos aspectos da doença ainda carecem de elucidação, como os fatores imunogenéticos individuais do hospedeiro, que podem contribuir nas respostas contra *M. tuberculosis*, que vão desde a eliminação da micobactéria pelos mecanismos efetores da imunidade inata, como a fagocitose realizada pelos macrófagos, até o estabelecimento de uma infecção primária pelo patógeno, que mesmo com os refinados mecanismos da imunidade adaptativa, consegue evadir e permanecer em latência, aguardando qualquer desequilíbrio na resposta imune do hospedeiro, para que possa multiplicar-se e estabelecer doença ativa.

A avaliação dessas variações moleculares individuais, e das suas consequentes alterações bioquímicas e funcionais, ajudam a entender melhor o papel dos ligantes e dos receptores envolvidos nas cascatas imunológicas que geram as mais diversas respostas contra os patógenos. Pesa-se nessa balança os aspectos populacionais, que são muito importantes e precisam ser considerados para que sejam feitas as devidas estratificações nas análises realizadas, visto que as variações imunogenéticas são herdadas e desse modo, estudos que auxiliam a entender os diferentes fatores moleculares envolvidos na patogênese das doenças, ajudam a entender as diferentes respostas que cada grupo populacional pode apresentar em face de determinados patógenos, como *M. tuberculosis*.

Neste passo, investigar as variantes dos genes dos receptores semelhantes a Toll, os TLRs, como os genes de *TLR1* e *TLR9*, podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na resposta inata inicial contra o bacilo da TB. Além disso, permite determinar as frequências dos SNVs de *TLR1* e *TLR9* e investigar se estas variantes imunogenéticas podem estar associadas a proteção ou risco a doença, bem como se estão relacionadas com as concentrações da IL-6, citocina importante na resposta inflamatória da TB.

A variante escolhida de *TLR1* para ser analisada foi rs5743618, uma variante missense, cuja relação com a TB tem sido estudada por diversos grupos. O genótipo heterozigoto dessa

variante já foi associada com a TB multibacilar em indivíduos recrutados na cidade de Manaus (BARLETTA-NAVECA et al., 2018). Outro estudo identificou o alelo G dessa variante associada ao risco de desenvolver TB em crianças chinesas (QI et al., 2015), ao passo que o alelo T foi associado ao risco aumentado de desenvolvimento de TB em indivíduos hispânicos e sul-africanos (MA et al., 2007).

Para *TLR9* foi selecionada a variante intrônica rs187084, cuja localização na região promotora do gene tem sido associada a uma série de doenças infecciosas e de ordem imunológica (POTHLICHET; QUINTANA-MURCI, 2013). O alelo C dessa variante apresentou associação com aumento da vulnerabilidade à TB em indivíduos recrutados na Índia (BHARTI et al., 2014). O alelo C também foi associado ao risco de desenvolvimento de TB ativa a partir de TB latente em indivíduos chineses (WANG et al., 2018).

Hipótese nula (H0): Não há associação entre as variantes gênicas estudadas de *TLR1* e *TLR9* com o desenvolvimento de tuberculose pulmonar.

Hipótese alternativa (H1): A presença de variantes gênicas rs5743618 em *TLR1* ou rs187084 em *TLR9* estão associadas ao risco ou proteção no desenvolvimento de tuberculose pulmonar.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a frequência dos polimorfismos dos genes de receptores semelhantes a Toll (TLR) em pacientes com tuberculose pulmonar.

4.2 Objetivos específicos

- a) Estimar a frequência das variantes de base única rs5743618 de *TLR1* e rs187084 de *TLR9* em pacientes com TB pulmonar e em controles saudáveis.
- b) Avaliar se existe associação dos SNV de *TLR1* e *TLR9* com a tuberculose pulmonar.
- c) Verificar se as variantes dos genes de *TLR1* e *TLR9* estão relacionados às concentrações de IL-6, no plasma de pacientes com TB e controles.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Tipo de Estudo

O presente estudo é caso/controle que visa avaliar se as variantes de base única (SNV), nos genes de *TLR1* e *TLR9* estão associados com TB pulmonar.

5.2 População de Estudo

Para a realização deste projeto foram selecionados indivíduos residentes em Manaus ou em outros municípios da região Norte, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 anos. Dentre estes indivíduos, foram incluídos pacientes com tuberculose pulmonar e contatos (controles) recrutados na Policlínica Cardoso Fontes. Os contatos são os acompanhantes dos pacientes de TB, indivíduos que convivem com esses pacientes e funcionários da Fundação Cardoso Fontes.

5.3 Critérios de Inclusão

a) Pacientes com Tuberculose pulmonar

Os pacientes com TB pulmonar são os sintomáticos respiratórios, com resultados positivos “*Mycobacterium tuberculosis* detectável” para o Teste Rápido Molecular (TRM, GeneXpert MTB/RIF), ou pacientes que tiverem uma ou duas baciloscopias de escarro positivas e/ou cultivo do escarro com isolamento de *M. tuberculosis*, ou pacientes com baciloscopia e cultivo do escarro com resultados negativos, mas que iniciaram o tratamento para TB por possuírem imagem pulmonar compatível (raios-x ou tomografia).

b) Contatos saudáveis (controles)

Os contatos são os indivíduos que convivem com os pacientes com TBP, ou que acompanham os mesmos por ocasião do diagnóstico laboratorial ou tratamento na referida policlínica, sem parentesco consanguíneo, bem como os profissionais de saúde que fazem o atendimento aos pacientes de TB pulmonar. Os contatos devem ser negativos para *M. tuberculosis* nos exames diagnósticos.

5.4 Critérios de exclusão

Os pacientes com TB que apresentaram outras comorbidades: câncer, Aids, hepatites e doenças autoimunes, bem como os indivíduos HIV positivos, gestantes, transplantados ou que estavam fazendo uso de algum imunorregulador não foram incluídos no projeto.

Pacientes que tiveram resultados de cultivo com identificação de micobactérias não causadoras de TB (NTM) também foram excluídos.

Pacientes diagnosticados com TB (por exames clínicos e de imagens), mas que no decorrer da execução do projeto não responderam aos medicamentos para o tratamento de TB.

Contatos que no decorrer do projeto apresentaram sintomas respiratórios e/ou resultados da baciloscopia e/ou cultivo positivo para *M. tuberculosis*.

5.5 Recrutamento dos pacientes

O recrutamento dos pacientes com tuberculose pulmonar e contatos foi realizado na Policlínica Cardoso Fontes, na cidade de Manaus, entretanto, em decorrência da suspensão das atividades na UFAM (Portaria nº 626 GR/UFAM de 13/03/2020 e Decisão *ad referendum* nº 01/2020/CONSUNI/UFAM de 26/03/2020) e dos serviços não-essenciais nas policlínicas do estado desde 23 de março de 2020 (NOTA TÉCNICA 001/2020 - SEAASC/SUSAM) em função da pandemia de COVID-19, foram usadas amostras do biorrepositório do projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo 1).

A abordagem dos pacientes e contatos incluídos foi realizada no setor de Aprazamento 1, local onde os pacientes recebem rotineiramente as orientações sobre o tratamento da TB e a autorização para retirada dos medicamentos. Os pacientes e contatos foram convidados a participar do projeto e aqueles cujo consentimento foi aceito, forneceu-se a explicação e esclarecimentos sobre a pesquisa e posterior coleta dos dados. As coletas das amostras foram realizadas em ambientes adequados para cada procedimento e sempre com a autorização dos participantes.

Os contatos na maioria dos casos são os acompanhantes dos pacientes e estes foram convidados a participar do projeto, antes ou após a entrevista com os pacientes de TBP no setor de Aprazamento 1 da Policlínica Cardoso Fontes.

5.6 Seleção dos pacientes e contatos

A inclusão dos pacientes e contatos foi pela técnica de amostragem aleatória sistemática, determinada por um intervalo de tempo. O setor de Aprazamento 1 da Policlínica Cardoso Fontes realiza normalmente atendimentos das 8:00 às 17:00 horas (de segunda a sexta-feira), O intervalo da entrevista foi de aproximadamente 30 minutos. Neste passo, o critério adotado foi entrevistar o primeiro paciente da fila, o qual é convidado a participar da pesquisa, e o próximo paciente é atendido após o intervalo de tempo.

5.7 Cálculo amostral

Para definição do tamanho da amostra da pesquisa, foi realizado um cálculo aproximado baseado nas frequências dos polimorfismos genéticos de aproximadamente 10%. O programa Gpower versão 3.1 foi utilizado e adotou-se o valor de $\alpha = 0,05$ (5%), $\beta = 0,1$ (10%), poder da amostra de 0,95. O resultado do número amostral foi de 404 indivíduos com TB e 404 controles (contatos).

5.8 Amostras biológicas

As amostras de escarro e sangue total (5mL) foram coletadas em local ou salas apropriadas da Policlínica Cardoso Fontes. Nesta policlínica, as amostras de escarro foram analisadas por exames rotineiros como a Baciloscopia direta e/ou TRM (GeneXpert MTB/Rif). Para esta pesquisa foi solicitada também ao paciente e seu contato amostras de escarro que são encaminhadas ao laboratório de Micobacteriologia do Instituto de Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) para cultura de micobactérias. As amostras de sangue coletadas na Policlínica Cardoso Fontes foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia Molecular (LIM), do Instituto de Ciências Biológicas/ICB da Universidade Federal do Amazonas.

5.9 Exames micobacteriológicos nas amostras de escarro

As amostras de escarro foram submetidas aos exames de microscopia e cultivo. Para a microscopia do escarro foi utilizada a técnica de baciloscopia direta (BRASIL, 2001; BRASIL, 2008) e baciloscopia pós-concentração (SALEM et al., 1990). O cultivo foi realizado, segundo a metodologia de Salem et al. (2007), pelo método PKO (Petroff, Kudoh e Ogawa). A identificação de *M. tuberculosis* foi feita por PCR utilizando primers específicos para o elemento de inserção IS6110 (HERMANS et al., 1990; VAN EMBDEN et al., 1993).

5.10 Processamento das amostras de sangue

Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA (anticoagulante). Estas amostras foram imediatamente registradas e codificadas no LIM, em seguida centrifugadas para separação e armazenamento a -20°C do plasma. A camada de leucócitos foi coletada para extração de DNA.

5.11 Critérios de seleção dos SNVs

Foram selecionados SNVs rs5743618 e rs187084 pois apresentam frequência superior a 10% na população das américas segundo a plataforma Ensembl (<https://www.ensembl.org/>). Além disso, optou-se por utilizar essas variantes já que apresentam estudos disponíveis na literatura

quanto a sua funcionalidade tanto na TB quanto em outras doenças, para fins de comparação e discussão de resultados. Por fim, foram selecionados estes SNVs pois também apresentaram resultados promissores em outros estudos realizados por este grupo de pesquisa.

5.12 Extração de DNA a partir da amostra de sangue

Após centrifugação da amostra de sangue, foi coletada a camada de leucócitos para extração de DNA que foi feita pela metodologia descrita por Gustincich et al. (1991) com modificações, baseada na precipitação do DNA por sais de brometo de tetrametilamônio (DTAB/CTAB). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro de luz UV e armazenadas a -20 °C no LIM/ICB/UFAM em tubos de polipropileno, devidamente codificados e datados até o momento do uso.

5.12 Ensaios de Genotipagem de *TLR1* e *TLR9* por PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) – Ensaio TaqMan e/ou sequenciamento

O ensaio de genotipagem dos polimorfismos foi realizada pela técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) em equipamento QuantStudio 3 Real-Time PCR da Applied System. Neste estudo foram utilizadas sondas fluorescentes de hidrólise TaqMan com seqüências alelo-específicas, as quais permitem a genotipagem de indivíduos para um SNP específico.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, incluindo-se para maior segurança nos resultados um controle negativo constituído do mix da reação e água Milli-Q®, além de dois controles homozigotos para cada alelo e um heterozigoto. As condições de preparo do mix das reações de qPCR se encontram no **quadro 1**, e as características das sondas utilizadas se encontram no **quadro 2**.

Quadro 1. Condições do mix utilizado nas reações de qPCR para genotipagem de *TLR1* e *TLR9*

Reagentes	Concentração	Volume para 1 reação (µl)
TaqMan Genotyping Master Mix 2x	0,6x	3
Sonda TaqMan® SNP Genotyping 20x	1x	0,5
H ₂ O ultrapura	-	6,5
VOLUME FINAL DO MIX	-	10
DNA adicionado	50ng/µL	2

Quadro 2. Característica das sondas utilizadas no experimento

Gene	Posição no cromossomo	SNV	Tipo de SNV	Sequência da sonda 5''-[VIC/FAM]-3''
<i>TLR1</i>	4:38797027	rs5743618	Mutação missense	GAGATACCAGGGCAGATCCAAGTAG[C/A] TGCAGAGGGAGGTCACAGTCACAGC
<i>TLR9</i>	3:52227015	rs187084	íntron	TCCCCTGCTGGAATGTCAGCTTCTT[A/G] AGGGCAGTGATCTTTTATCTGCATC

Para *TLR1* (VIC-alelo C / FAM-alelo A), a sonda marcada com fluoróforo FAM indica o alelo alternativo A e a sonda marcada com o fluoróforo VIC indica o alelo referência C. Para *TLR9* (VIC-alelo A / FAM-alelo G), a sonda marcada com fluoróforo FAM indica o alelo alternativo G e a sonda marcada com o fluoróforo VIC indica o alelo referência A.

5.13 Quantificação de IL-6 por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

A quantificação da IL-6 foi realizada por ELISA, utilizando-se 100 uL da amostra de plasmas sanguíneos dos pacientes e controles. Para o ensaio de ELISA foi utilizado o kit comercial da R&D e foi realizado conforme as instruções do fabricante. A leitura foi realizada no espectrofotômetro de placas da BioRad com filtro de 450 nm. Os resultados foram expressos em densidade ótica e, posteriormente, convertidos em pg/mL.

5.14 Análise Estatística

Os resultados obtidos das frequências dos polimorfismos, na população investigada, foram testados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) avaliada através do programa Haploview. As análises de associação de genótipos e doença foram realizadas por regressão logística, e para estes testes foram empregados o software estatístico R, versão 3.4.3, (www.r-project.org) junto o pacote "SNPassoc", versão 1.9-2. A análise de associação dos alelos com a doença foi realizada por teste de qui-quadrado (χ^2) utilizando-se o GrahPadPrism® (versão 7.0).

Para as análises das concentrações de citocinas e genótipos foram aplicadas o teste de Análise de Variância não paramétrico, empregando o programa GrahPadPrism® (versão 7.0). O nível de significância foi de $p < 0,05$, com o intervalo de confiança de 95%.

5.15 Aspectos Éticos

Este projeto de mestrado está vinculado ao projeto: "Avaliação de Polimorfismos genéticos relacionados à resposta imunológica na tuberculose", aprovado no Comitê de ética para pesquisa (CEP) envolvendo seres humanos da UFAM, aprovado em 25 de agosto de 2019. CAAE: 19021519.9.0000.5020; nº. Número do Parecer: 3.530.854 (anexo 1).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Características gerais da população estudada

Nesta pesquisa foram inseridos 723 participantes divididos em dois grupos: o grupo de pacientes com tuberculose pulmonar contendo 320 indivíduos e o grupo controle com 403 indivíduos. Em decorrência da pandemia da COVID-19 e da consequente suspensão das coletas na Fundação Cardoso Fontes, foi preciso utilizar amostras do biorrepositório do Laboratório de Imunologia Molecular do ICB-UFAM, dentre as quais haviam algumas sem todos os dados disponíveis (Tabela 3).

Tabela 3. Características gerais dos grupos estudados e resultados de associação dos caracteres avaliados com o desenvolvimento de TBP.

Características	Controles (n=393)	Pacientes TBP (n=315)	OR	95% CI	p-valor
Idade (anos) (média±DP)	32.5±12.8	39.8±14.7	-	-	< 0.0001
Sexo					
Masculino	212 (53.94%)	188 (59.68)	1.26	0.93-1.70	0.1459
Feminino	181 (46.06%)	127 (40.32)			
Tabagismo	n=211	n=214			
Sim	21 (9.95%)	50 (23.36%)	2.76	1.59-4.89	0.0003
Não	190 (90.05%)	164 (76.64%)			
Etilismo	n=187	n=176			
Sim	42 (22.46%)	60 (34.09%)	1.79	1.12-2.83	0.0189
Não	145 (77.54%)	116 (65.91%)			
Vacina BCG	n=239	n=263			
Sim	230 (96.23%)	225 (85.55%)	0.23	0.11-0.48	< 0.0001
Não	9 (3.77%)	38 (14.45%)			

o teste t de Student foi usado para comparação das médias de idade. Para associação de TBP com sexo, tabagismo, etilismo e vacina BCG foi aplicado o teste chi-quadrado com correção de Yates utilizando-se o GrahPadPrism® (versão 7.0).

A média de idade para o grupo de pacientes foi de 39.8 anos enquanto para o grupo controle foi de 32.5 anos. Tanto no grupo controle quanto no grupo de pacientes com TBP, a maioria dos indivíduos é do sexo masculino (53.94% e 59.68% respectivamente), porém não foi encontrada associação entre o sexo dos participantes e o desenvolvimento de TBP no presente estudo. A tuberculose pulmonar pode acometer indivíduos de quaisquer sexo e idade, no entanto a maioria dos casos acontece em indivíduos adultos e do sexo masculino, onde 56%

dos casos diagnosticados em 2019 foram registrados em homens adultos, ao passo que 32% foram em mulheres, e apenas 12% em crianças (OMS, 2020).

Pesquisas científicas têm demonstrado a maior prevalência da doença entre os homens, alguns fatores podem explicar esse dado, como a maior ocorrência de práticas de risco à TBP em homens, como tabagismo e alcoolismo (MARÇÔA et al., 2018), algumas questões comportamentais como uma maior tendência de pessoas do sexo masculino em negligenciar aspectos de cuidado à própria saúde (JOHANSSON et al., 2000), e também fatores genéticos que influenciam na modulação da resposta imune frente ao MTB, muitos dos quais ainda carecem de elucidação (SCHURZ et al., 2019). Tudo isso pode contribuir para a proporção de 1.6 homens diagnosticados com TB para cada caso diagnosticado em mulheres no mundo ao longo de 2019 (OMS, 2020).

Embora os dados obtidos no presente estudo não tenham indicado associação entre o sexo dos participantes e TBP, não se pode a partir disso aferir que essa associação de fato não ocorra, dado que evidências científicas têm sido acumuladas no sentido de apontar as variáveis ligadas ao sexo, não somente as biológicas, mas também aquelas socioculturais que estão atreladas aos papéis de gênero prevalentes na nossa sociedade, com o maior risco de desenvolver a doença, já que a maioria dos diagnosticados e das vítimas fatais da TBP são homens adultos (DIWAN; THORSON, 1999; BEN JMAA et al., 2020; OMS, 2020), logo, a ausência de associação vista neste trabalho, pode ter ocorrido em função do recrutamento pareado dos participantes do estudo.

Quanto ao tabagismo, a maioria dos indivíduos que declararam fazer uso de cigarros de nicotina é do grupo de pacientes (23,36% dos pacientes com TBP ante 9,95% dos indivíduos controle) sendo observada uma possível associação do tabagismo com o risco de desenvolvimento de TBP. Em relação ao etilismo, 22.46% dos indivíduos controle declararam consumir bebida alcoólica, enquanto 34.09% dos pacientes declararam o uso, permitindo encontrar possível efeito de risco do consumo de álcool para o desenvolvimento de TBP.

Fatores comportamentais como o consumo de álcool e o uso de cigarros estão amplamente associados à tuberculose na literatura. Um estudo realizado na Índia envolvendo 413 pacientes com tuberculose, identificou 322 (78%) indivíduos que afirmaram ser fumantes, e 319 (77%) que afirmaram consumir bebida alcoólica (NAVYA et al., 2019). No Amazonas, um estudo identificou uma forte associação entre o fumo ($p < 0.0001$; OR= 6.55; 95%CI= 3.2–13.6) e desordens no consumo de álcool ($p < 0.0001$; OR= 7.14; 95%CI= 3.7–13.9;) com o desenvolvimento de TBP (BARLETTA-NAVECA et al., 2016). Outro estudo brasileiro

encontrou não somente associação do consumo de elevadas doses de álcool ($p= 0.000002$; OR= 6.11; 95%CI= 2.82-13.26), e do tabagismo excessivo (10 ou mais cigarros por dia) ($p= 0.001$; OR= 3.73; 95%CI= 1.38-10.03) com TB, como também encontrou a associação com risco de desenvolver a doença entre indivíduos que sofrem com o abuso de drogas ilícitas como o crack (SILVA et al., 2017). Desse modo, sugere-se que as campanhas de prevenção e tratamento da tuberculose, possam incluir também a prevenção ao abuso de álcool, cigarro e outras drogas, a fim de que comportamentos mais saudáveis na população possam impactar positivamente os índices de ocorrência da TB (SILVA et al., 2017; NAVYA et al., 2019).

Embora o mecanismo pelo qual o tabagismo cause predisposição à TBP ainda não esteja completamente elucidado, algumas evidências apontam que o consumo de cigarro pode levar ao aumento do recrutamento de macrófagos, ao aumento da inflamação no tecido epitelial do pulmão, aumentando a produção de muco, e prejudicando o *clearance* mucociliar, o que pode contribuir para ocorrência de infecções (STRZELAK et al., 2018), embora ocorra aumento da presença de macrófagos em indivíduos expostos ao fumo, tais células podem ter seus efeitos antimicrobianos prejudicados, uma vez que o tabagismo pode prejudicar a fusão do fagossomo e do lisossomo, além de macrófagos de indivíduos fumantes apresentarem polarização para o perfil M2, que tem menor capacidade de eliminar patógenos (SHAYKHIEV et al., 2009; CHAN et al., 2014).

Quanto ao consumo de álcool, existem evidências demonstrando efeito modulador negativo dessa prática na resposta imune inata e adaptativa, interferindo na sobrevivência e na funcionalidade de células imunes, além de produzir efeitos pró-inflamatórios que acarretam em danos teciduais em órgãos. No entanto, tais efeitos moduladores da resposta imune tendem a ser subclínicos, havendo, portanto, significância clínica em face de problemas secundários, como a infecção por *M. tuberculosis* (SZABO; SAHA, 2015). É de extrema importância mencionar que os efeitos, tanto do uso de álcool quanto de cigarros na resposta imune, tendem a ser dose-dependentes, desse modo, dados referentes a quantidade de cigarros e de bebida alcoólica consumida pelos participantes do presente estudo permitiria uma avaliação mais precisa acerca dessas variáveis.

Nesta pesquisa, a maioria dos indivíduos que não foram vacinados com a BCG é do grupo de pacientes com TBP (14.45%), enquanto 3.77% dos indivíduos controle declararam não ter tomado a vacina, encontrando-se um possível efeito protetor dessa vacinação contra o desenvolvimento de TBP. Segundo a Sociedade Brasileira de Imunização (2021), a vacina BCG pode ser aplicada a partir do nascimento até os 5 anos de idade, sua principal indicação é a prevenção de formas graves de tuberculose, como a meningite tuberculosa e TB miliar, cujo

efeito protetor em estudos caso-controles realizados é de mais de 50%, entretanto, para formas gerais de TB, não há um consenso do efeito dessa vacina, onde estudos clínicos encontram dados bastante variáveis, de 0% até 80%, desse modo, é difícil atribuir de maneira assertiva qualquer efeito protetor dessa vacina contra formas leves e moderadas de TB pulmonar (BARRETO et al., 2006).

Entretanto, considerando-se que a TBP é uma doença multifatorial e que diversos fatores sociais, biológicos, e ambientais podem se somar para definir a maior ou menor susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, a vacina BCG pode, em conjunto com esses fatores, contribuir parcialmente para que indivíduos imunizados possam ter uma proteção maior contra o desenvolvimento de TBP.

6.2 Análise das variantes gênicas de *TLR1* e *TLR9*

Foram genotipadas a variante missense rs5743618 de *TLR1* e a variante intrônica rs187084 de *TLR9* de 320 amostras de DNA de pacientes com tuberculose pulmonar e 403 amostras de DNA de indivíduos controle. Na genotipagem da variante rs5743618 (*TLR1*), oito amostras de pacientes com TBP (2.5%) e 23 amostras de controles (5.7%) não amplificaram, obtendo-se 692 genótipos dessa variante (95.7% das amostras). Na genotipagem da variante rs187084 (*TLR9*), 12 amostras de pacientes (3,8%) e 29 amostras de controles (7,2%) não amplificaram, obtendo-se 682 genótipos (94.3% das amostras). Os genótipos de cada amostra de DNA foram definidos segundo as curvas de amplificação geradas (**figuras 1 e 2**), e na **figura 3** podem-se visualizar os gráficos de distribuição alélica obtidos para ambas as variantes gênicas.

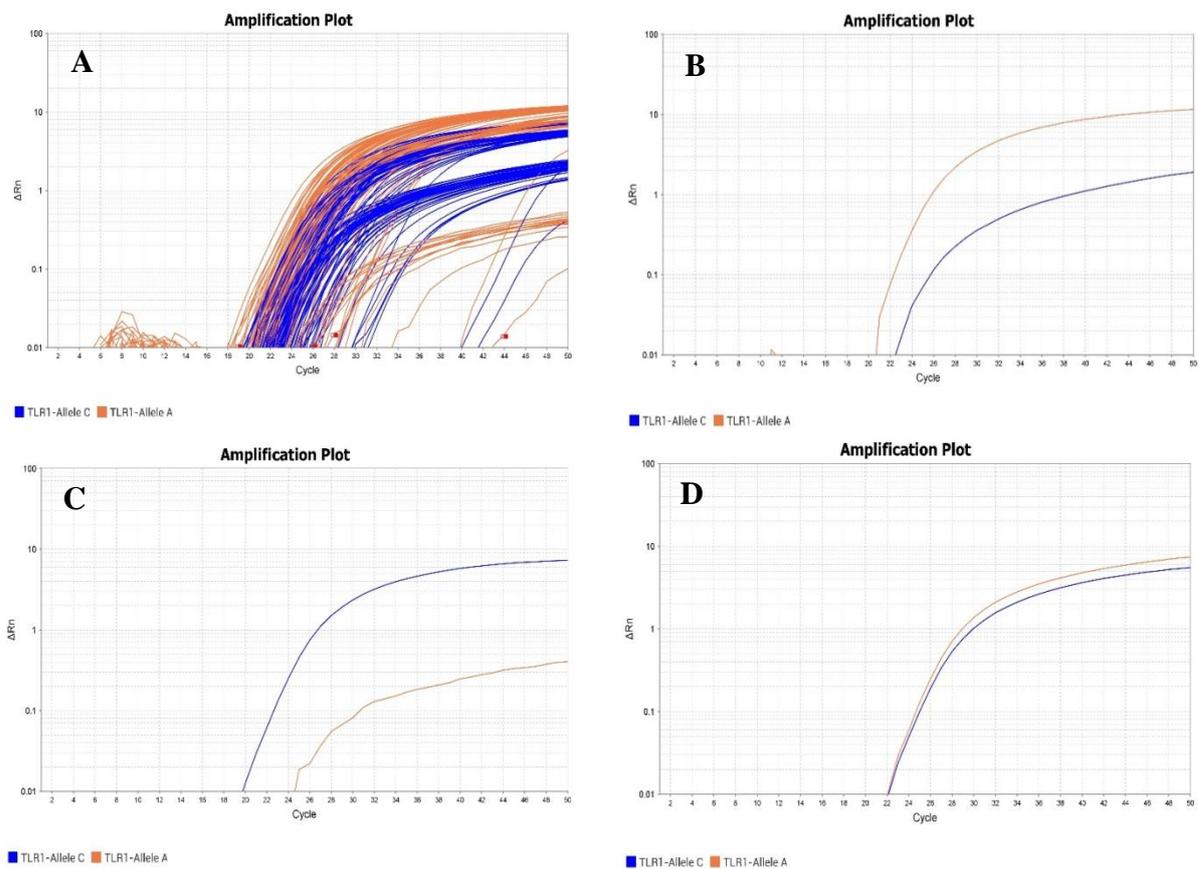


Figura 1. Curvas de amplificação geradas para a variante rs5743618 de TLR1: **A**-Curvas de amplificação de 94 amostras; **B**-Homozigoto para alelo alternativo (T/T); **C**-Homozigoto para alelo referência (G/G); **D**-Heterozigoto (T/C).

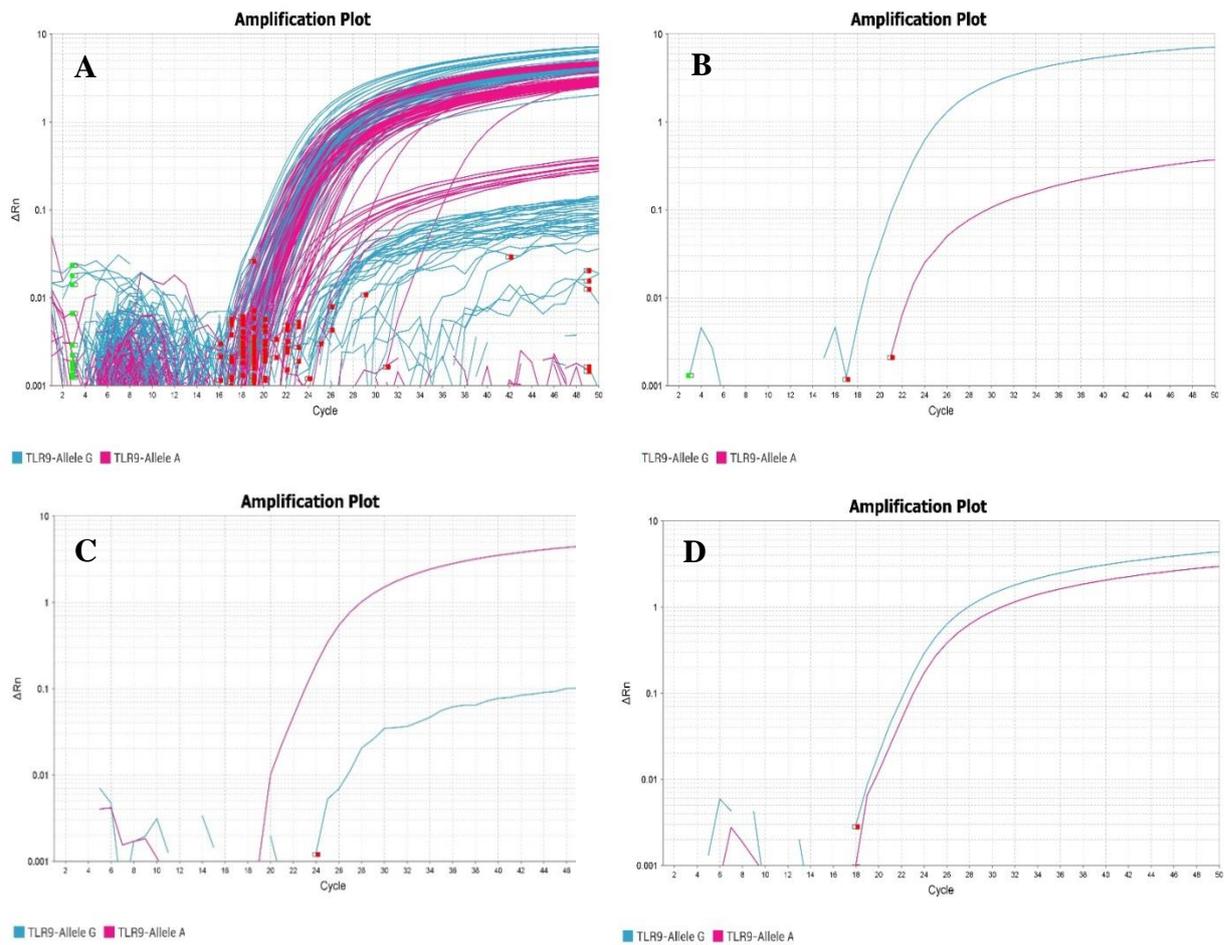


Figura 2. Curvas de amplificação gerada para a variante rs187084 do gene TLR9: **A**-Curvas de amplificação de 94 amostras; **B**-Homozigoto para alelo alternativo (C/C); **C**-Homozigoto para alelo referência (T/T); **D**-Heterozigoto (T/C).

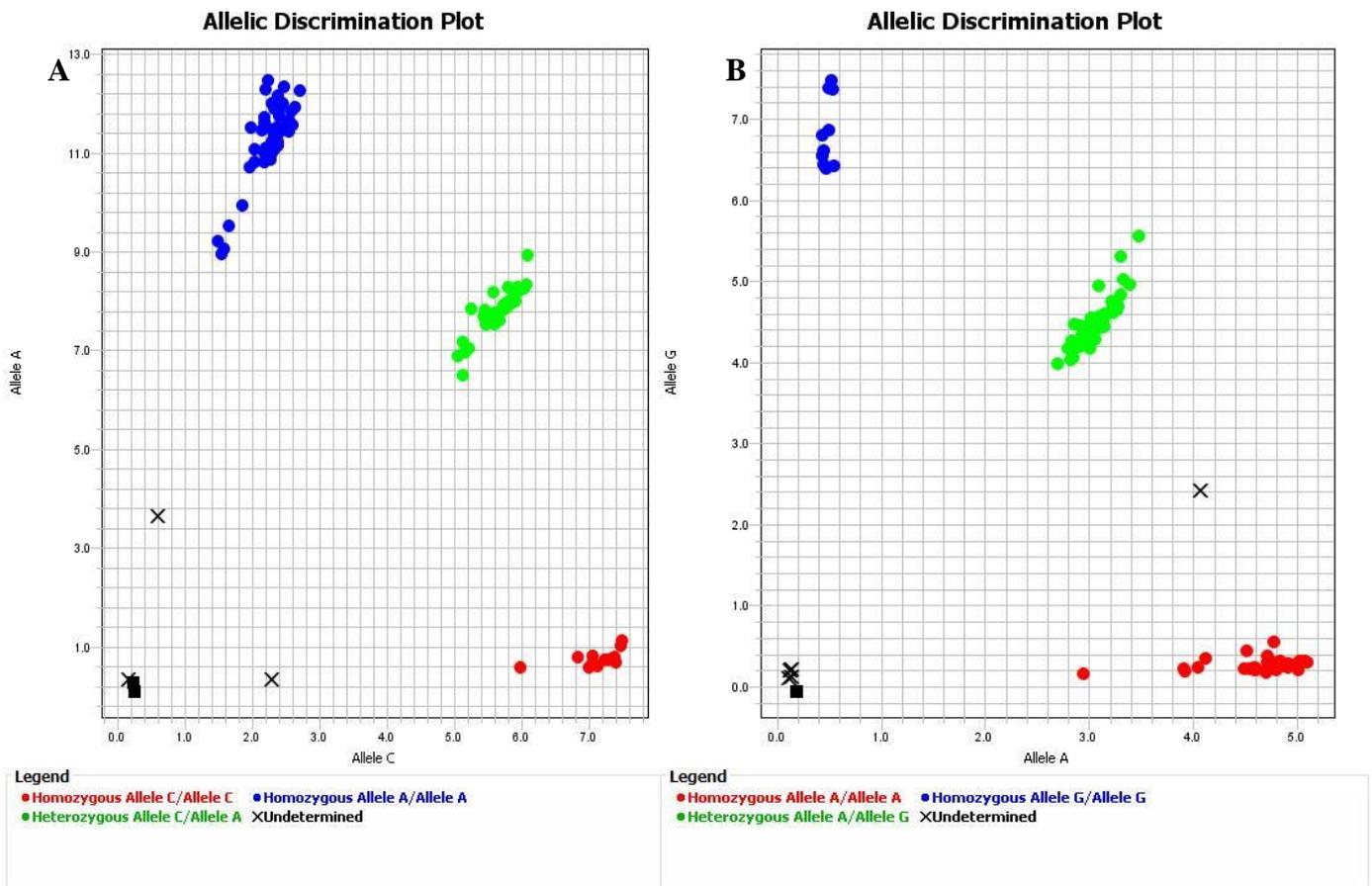


Figura 3. Gráfico da discriminação alélica dos polimorfismos estudados nos genes de *TLR1* (A) e *TLR9* (B). O 'X' representa amostra indeterminada, e o quadrado o controle negativo da reação.

A partir dos resultados das genotipagens foi possível realizar as análises de associação com base nos modelos genéticos e as análises de associação dos alelos e genótipos de *TLR1* e *TLR9*. Os grupos controle e de pacientes de ambas as variantes estudadas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (quadro 3).

Quadro 3. Avaliações do Equilíbrio de Hardy Weinberg (p -EHW) dos grupos de controles e de pacientes para as variantes estudadas..

Variante	Controles (p -EHW)	Pacientes (p -EHW)
rs5743618	0.0533	0.6183
rs187084	0.9097	0.9035

Ao se considerar os genótipos obtidos, sem utilizar as variáveis de ajuste sexo e idade, observou-se um possível efeito protetor do genótipo G/G da variante rs5743618 contra TBP

nos modelos genéticos codominante ($p= 0.042$; OR= 0.48; 95%CI= 0.26-0.89), recessivo ($p= 0.028$; OR= 0.52; 95%CI= 0.28-0.95) e log-aditivo ($p=0.017$; OR= 0.75; 95%CI= 0.59-0.95) (tabela 2). Ao passo que para a variante de *TLR9* rs187084 não houve diferenças significativas nas distribuições genótípicas entre os grupos controle e de pacientes, não sendo identificada associação dessa variante com o desenvolvimento da TBP no presente estudo (tabela 3).

Tabela 4. Resultados das análises de associação do SNV rs5743618 de *TLR1*, com base nos modelos genéticos, em pacientes com tuberculose pulmonar e controles saudáveis, sem considerar variáveis de ajuste.

<i>TLR1</i> Modelo genético	CS n (%)	TBP n (%)	<i>p</i> -valor	OR (95% CI)	AIC
<i>Codominante</i>					
T/T	208 (54.7)	193 (61.9)	0.04214	1.00	952.3
T/G	136 (35.8)	103 (33.0)		0.82 (0.59-1.13)	
G/G	36 (9.5)	16 (5.1)		0.48 (0.26-0.89)	
<i>Dominante</i>					
T/T	208 (54.7)	193 (61.9)	0.05864	1.00	953.0
T/G-G/G	172 (45.3)	119 (38.1)		0.75 (0.55-1.01)	
<i>Recessivo</i>					
T/T-T/G	344 (90.5)	296 (94.9)	0.02838	1.00	951.8
G/G	36 (9.5)	16 (5.1)		0.52 (0.28-0.95)	
<i>Overdominante</i>					
T/T-G/G	244 (64.2)	209 (67.0)	0.44432	1.00	956.0
T/G	136 (35.8)	103 (33.0)		0.88 (0.64-1.21)	
<i>Log-Aditivo</i>					
0,1,2	380 (54.9)	312 (45.1)	0.01715	0.75 (0.59- 0.95)	950.9

TB: tuberculose pulmonar; CS: controles saudáveis; OR: odds ratio; AIC: Akaike information criterion value.

Tabela 5. Resultados das análises de associação do SNV rs187084 de *TLR9*, com base nos modelos genéticos, em pacientes com tuberculose pulmonar e controles saudáveis, sem considerar variáveis de ajuste.

<i>TLR9</i> Modelo genético	CS n (%)	TBP n (%)	<i>p</i> -valor	OR (95% CI)	AIC
<i>Codominante</i>					
T/T	158 (42.2)	118 (38.3)	0.5680	1.00	943.9
T/C	169 (45.2)	147 (47.7)		1.16 (0.84-1.61)	
C/C	47 (12.6)	43 (14.0)		1.23 (0.76-1.97)	
<i>Dominante</i>					
T/T	158 (42.2)	118 (38.3)	0.2972	1.00	942.0
T/C-C/C	216 (57.8)	190 (61.7)		1.18 (0.87-1.60)	
<i>Recessivo</i>					
T/T-T/C	327 (87.4)	265 (86.0)	0.5929	1.00	942.8
C/C	47 (12.6)	43 (14.0)		1.13 (0.72- 1.76)	
<i>Overdominante</i>					
T/T-C/C	205 (54.8)	161 (52.3)	0.5080	1.00	942.6
T/C	169 (45.2)	147 (47.7)		1.11 (0.82-1.50)	
<i>Log-Aditivo</i>					
0,1,2	374 (54.8)	308 (45.2)	0.3085	1.12 (0.90-1.40)	942.0

TBP: tuberculose pulmonar; CS: controles saudáveis; OR: odds ratio; AIC: Akaike information criterion value.

Ao se utilizarem as variáveis de ajuste ‘sexo’ e ‘idade’, a variante rs5743618 de *TLR1* manteve a associação do genótipo G/G com proteção contra a TBP nos modelos genéticos codominante ($p= 0.025$; OR= 0.43; 95%CI= 0.22-0.87), dominante ($p= 0.020$; OR= 0.66; 95%CI= 0.46-0.94), recessivo ($p= 0.035$; OR= 0.49; 95%CI= 0.25-0.97) e log-aditivo ($p= 0.007$; OR= 0.68; 95%CI= 0.52-0.91) (tabela 4). Para a variante rs187084 permaneceu a ausência de associação entre esse SNV e o desenvolvimento da TBP no estudo (tabela 5).

Tabela 6. Resultados das análises de associação do SNV rs5743618 de *TLR1*, com base nos modelos genéticos, em pacientes com tuberculose pulmonar e controles saudáveis, considerando-se as variáveis de ajuste ‘sexo’ e ‘idade’.

<i>TLR1</i> Modelo genético	CS n (%)	TBP n (%)	<i>p</i> -valor	OR (95% CI)	AIC
<i>Codominante</i>					
T/T	132 (51.2)	171 (61.5)	0.025059	1.00	708.9
T/G	96 (37.2)	93 (33.5)		0.72 (0.49-1.05)	
G/G	30 (11.6)	14 (5.0)		0.43 (0.22-0.87)	
<i>Dominante</i>					
T/T	132 (51.2)	171 (61.5)	0.020192	1.00	708.9
T/G-G/G	126 (48.8)	107 (38.5)		0.66 (0.46-0.94)	
<i>Recessivo</i>					
T/T-T/G	228 (88.4)	264 (95.0)	0.034732	1.00	709.8
G/G	30 (11.6)	14 (5.0)		0.49 (0.25-0.97)	
<i>Overdominante</i>					
T/T-G/G	162 (62.8)	185 (66.5)	0.227456	1.00	712.8
G/T	96 (37.2)	93 (33.5)		0.80 0.55 1.15	
<i>Log-Aditivo</i>					
0,1,2	258 (48.1)	278 (51.9)	0.007175	0.68 (0.52-0.91)	707.1

TBP: tuberculose pulmonar; CS: controles saudáveis; OR: odds ratio; AIC: Akaike information criterion value.

Tabela 7. Resultados das análises de associação do SNV rs187084 de *TLR9*, com base nos modelos genéticos, em pacientes com tuberculose pulmonar e controles saudáveis, considerando-se as variáveis de ajuste ‘sexo’ e ‘idade’.

<i>TLR9</i> Modelo genético	CS n (%)	TB n (%)	<i>p</i> -valor	OR (95% CI)	AIC
<i>Codominante</i>					
T/T	107 (42.5)	106 (38.7)	0.7810	1.00	704.1
T/C	113 (44.8)	132 (48.2)		1.15 (0.78-1.68)	
C/C	32 (12.7)	36 (13.1)		1.10 (0.62-1.94)	
<i>Dominante</i>					
T/T	107 (42.5)	106 (38.7)	0.4907	1.00	702.1
T/C-C/C	145 (57.5)	168 (61.3)		1.14 (0.79-1.63)	
<i>Recessivo</i>					
T/T-T/C	220 (87.3)	238 (86.9)	0.9298	1.00	702.6
C/C	32 (12.7)	36 (13.1)		1.02 0.60 1.74	
<i>Overdominante</i>					
T/T-C/C	139 55.2	142 51.8	0.5345	1.00	702.2
T/C	113 44.8	132 48.2		1.12 0.78 1.60	
<i>Log-Aditivo</i>					
0,1,2	252 (47.9)	274 (52.1)	0.5863	1.08 (0.83-1.40)	702.3

TBP: tuberculose pulmonar; CS: controles saudáveis; OR: odds ratio; AIC: Akaike information criterion value.

Ao estratificar por sexo, percebeu-se que a variante rs5743618 não se mostrou associada à proteção contra TBP em indivíduos do sexo masculino, porém, manteve-se a associação do genótipo G/G com proteção contra TBP em indivíduos do sexo feminino nos modelos codominante, dominante e log-aditivo (tabela 6). A variante de *TLR9* rs187084 não se mostrou associada com o desenvolvimento de TBP a despeito da estratificação por sexo dos participantes do presente estudo (tabela 7).

Tabela 8. Resultados das análises de associação do SNV rs5743618 de *TLR1*, com base nos modelos genéticos, em pacientes com tuberculose pulmonar e controles saudáveis, considerando-se as variáveis de ajuste ‘idade’ e estratificado por sexo ‘masculino’ ou ‘feminino’.

Sexo: masculino				
Modelo genético	p-valor	OR	95% CI	AIC
Codominante	0.42	0.57	0.24-1.34	403.6
Dominante	0.37	0.80	0.50-1.29	402.5
Recessivo	0.22	0.60	0.26-1.38	401.9
Overdominante	0.83	0.95	0.58 -1.55	403.3
Log-aditivo	0.22	0.80	0.56 1.15	401.9
Sexo: feminino				
Codominante	0.024	0.28	0.09-0.93	305.2
Dominante	0.013	0.50	0.29-0.87	304.4
Recessivo	0.061	0.35	0.11-1.13	307.1
Overdominante	0.11	0.63	0.36-1.12	308.1
Log-aditivo	0.006	0.54	0.35-0.85	303.2

OR: odds ratio; AIC: Akaike information criterion value; 95% CI: intervalo de confiança 95%

Tabela 9. Resultados das análises de associação do SNV rs187084 de *TLR9*, com base nos modelos genéticos, em pacientes com tuberculose pulmonar e controles saudáveis, considerando-se as variáveis de ajuste ‘idade’ e estratificado por sexo ‘masculino’ ou ‘feminino’.

Sexo: masculino				
Modelo genético	p-valor	OR	95% CI	AIC
Codominante	0.74	1.21	0.72-2.03	394.7
Dominante	0.44	1.21	0.75-1.97	392.7
Recessivo	0.79	1.09	0.57-2.11	393.3
Overdominante	0.57	1.15	0.71-1.86	393.0
Log-aditivo	0.50	1.12	0.80-1.57	392.9
Sexo: feminino				
Codominante	0.95	1.07	0.61-1.87	310.7
Dominante	0.88	1.04	0.61-1.80	308.8
Recessivo	0.83	0.90	0.36 2.27	308.8
Overdominante	0.78	1.08	0.63-1.84	308.7
Log-aditivo	0.98	1.00	0.66 1.53	308.8

OR: odds ratio; AIC: Akaike information criterion value; 95% CI: intervalo de confiança 95%

Avaliando-se a associação dos alelos das variantes estudadas com o desenvolvimento de TBP, verificou-se que o alelo G de rs5743618 apresentou-se associado à protetor contra o desenvolvimento da doença, ao passo que o alelo T apresentou associação com o risco para o desenvolvimento de TBP. Os alelos da variante de rs187084 não apresentaram associação com TBP segundo os dados obtidos no presente estudo (tabela 8).

Tabela 10. Resultados das frequências dos alelos de *TLR1* (rs5743618) e *TLR9* (rs187084) e das análises de associação entre pacientes TBP e controles.

Gene SNV ID	Alelo/genótipo	Tuberculose pulmonar	Controles	Valor <i>p</i>	OR	IC95%
		n=312 (%)	n=380 (%)			
<i>TLR1</i> rs5743618	T (A)	489 (78.4)	552 (72.6)	0.017	1.37	1.07-1.74
	G (C)	135 (21.6)	208 (27.4)	0.017	0.73	0.57-0.94
		n=308 (%)	n=374 (%)			
<i>TLR9</i> rs187084	T (A)	485 (64.8)	383 (62.2)	0.336	1.12	0.9-1.4
	C (G)	263 (35.2)	233 (37.8)	0.336	0.89	0.71-1.11

SNV ID – número de identificação do polimorfismo; OR – Odds Ratio; IC – Intervalo de Confiança. A análise dos alelos foi realizada por X^2 com correção de Yate. *Observação:* A frequência dos alelos foi contabilizada pelo número de vezes que aparecem nos genótipos.

O presente estudo identificou um possível efeito protetor do alelo G (alelo C da fita molde) para TBP, bem como um efeito de risco do alelo T (alelo A da fita molde) para TBP. Encontrou-se também um possível efeito protetor do genótipo G/G (ou C/C) contra a TBP. Alguns estudos não encontraram qualquer efeito associativo do SNV rs5743618 com TB como os de MA et al., 2010, SELVARAJ et al., 2010, SINHA et al., 2014; WU et al., 2015 e BARLETTA-NAVECA et al., 2018.

Essa divergência entre os resultados encontrados no presente estudo e os acima mencionados pode ser em decorrência de fatores como a população estudada, onde a maioria, com exceção do trabalho de BARLETTA-NAVECA et al., 2018, foi realizado no continente asiático onde o alelo G é de frequência muito baixa (0.01 no leste asiático e 0.07 no sul asiático), por exemplo, no estudo de MA et al., 2010 só foram encontrados um paciente e um controle com o genótipo G/G; SELVARAJ et al., 2010 em seu estudo contou apenas um paciente com o genótipo G/G enquanto nenhum indivíduo do grupo controle apresentou esse genótipo; SINHA et al., 2014 por sua vez encontrou apenas um indivíduo do grupo controle com o

genótipo G/G enquanto nenhum indivíduo com TBP o possuía; e WU et al., 2015 encontrou apenas duas pessoas do grupo controle e um paciente com TBP possuindo o genótipo G/G, desse modo, a baixa frequência desse genótipo nos estudos apontados pode dificultar a comparação com o nosso estudo, e ao mesmo tempo, impossibilitar que esses autores consigam comparar o efeito desse genótipo especificamente sobre o desenvolvimento da TBP.

Já o estudo de BARLETA et al., 2018, que também não encontrou associação de rs5743618 com TB, foi realizado no estado do Amazonas e obteve a frequência do genótipo G/G relativamente maior que nos estudos previamente mencionados (20 indivíduos do grupo controle (9.5%) e 20 pacientes (7.9%)), permitindo uma comparação melhor desse genótipo com a TB, porém, a autora em questão utilizou pacientes com tuberculose pulmonar e com tuberculose pleural em suas análises, o que pôde contribuir para os achados diferentes encontrados em seu estudo em relação a este trabalho, onde foram utilizados apenas dados de pacientes com TBP.

De maneira contrastante com nossos resultados, onde o alelo G e o genótipo G/G aparentemente possuem efeito protetor contra TBP na população estudada, UCIECHOWSKI et al., 2011 e OCEJO-VINYALS et al., 2013 encontraram associação com risco à TBP desses mesmos alelo e genótipo, já QI et al., 2015 e NADERI et al., 2016 identificaram associação do alelo G e genótipo T/G com o risco de TB. As variáveis relacionadas à população também podem justificar essa discrepância, por exemplo, UCIECHOWSKI et al., 2011 e OCEJO-VINYALS et al., 2013 realizaram um estudo com populações caucasianas na Europa (Alemanha e Espanha, respectivamente), ao passo que o presente estudo foi realizado em uma população altamente miscigenada no estado do Amazonas; outro fator importante é o baixo número de participantes no trabalho de UCIECHOWSKI et al., 2011, onde o grupo controle contava com 49 participantes e o grupo de pacientes com 45 indivíduos. É importante salientar a diferença de resultados inclusive entre populações da mesma etnia, por exemplo, o estudo de MA et al., 2007, realizado com caucasianos nos Estados Unidos da América não encontrou associação entre a variante rs5743618 e TB, diferentemente dos estudos de UCIECHOWSKI et al., 2011 e OCEJO-VINYALS et al., 2013, o que pode ocorrer em função do papel conjunto de outros alelos relacionados não apenas a TLR1 mas também a outros genes da resposta imune distribuídos diferentemente em diversas populações do mundo.

Em relação aos trabalhos de QI et al., 2015 e NADERI et al., 2016, que apresentaram diferenças em relação aos resultados encontrados no presente estudo, a discrepância pode ter ocorrido em função, tanto da ausência do genótipo G/G entre pacientes e indivíduos do grupo controle em ambos os trabalhos, quanto ao fato de que o trabalho de QI et al., 2015 envolveu

além de pacientes com TBP, pacientes com TB extrapulmonar, além de contar apenas com pacientes pediátricos.

Ainda que haja trabalhos que identificaram uma associação do alelo G de rs5743618 com TB. O trabalho de MA et al., 2007, que analisou essa variante em diferentes grupos étnicos nos Estados Unidos da América, foi na contramão desses estudos e identificou o genótipo T/T com risco à TB tanto em indivíduos hispânicos quanto em afro-americanos. No presente estudo, embora tenha sido verificada a associação do alelo T com risco à TBP, não foi possível encontrar diferença estatística na ocorrência do genótipo T/T entre grupos controle e de pacientes com TBP (T/T vs. G/T+G/G: $p=0.07$; OR: 1.34; 95%CI: 0.99-1.82), porém, isso não significa que a associação desse genótipo deva ser descartada, mas sim que estudos sejam realizados com mais participantes, bem como, que outras regiões do gene de TLR1 e outras variantes de TLR que eventualmente possam atuar em conjunto com a variantes rs5743618 sejam também investigadas.

Quanto a variante rs187084, assim como o presente estudo, a maioria dos autores mencionados na tabela 2 não encontraram associação entre rs187084 e TB, com exceção de WANG et al., 2018 que identificou um possível efeito do alelo C com o risco de desenvolvimento de TBP a partir de uma infecção latente por MTB. Em conformidade com esse achado, BHARTI et al., 2014 identificou um papel do alelo C de rs187084 na diminuição da expressão de IFN γ e de TNF α em células mononucleares do sangue periférico mesmo após a estimulação com H37Rv, o que estaria relacionado com a predisposição ao desenvolvimento de TB.

WANG et al 2018 identificou ainda que o alelo C está presente em frequência menor entre os Baiga, uma tribo resistente à TBP da Índia Central, em relação a outras tribos da mesma região (Korku e Gond), correlacionando essa menor frequência do alelo C na tribo Baiga com a maior resistência a TBP apresentada por essa população. Contudo, os estudos realizados até o momento envolvendo essa variante não permitiram encontrar associação de rs187084 com TB, de modo que meta-análises realizadas até o presente momento envolvendo o papel dessa variante concluíram que esse SNV, individualmente, não interfere na susceptibilidade à TB nas populações estudadas (SUN et al., 2015; ZHAO et al., 2015; SCHURZ et al., 2015; ZHOU; ZHANG, 2020).

Ainda que não tenha sido identificada associação de rs187084 com TBP no presente estudo, em conformidade com outras pesquisas, essa variante tem sido amplamente discutida na literatura quanto a seu impacto na susceptibilidade a diversas doenças infecciosas e de ordem

imunológica (POTHLICHET; QUINTANA-MURCI, 2013), portanto, outras investigações devem ser realizadas levando-se em consideração também outras variantes de TLR que possam atuar em conjunto com esse SNV na susceptibilidade a TB, como aqueles em desequilíbrio de ligação com rs187084 identificados na população estudada por CHEN et al., 2011, rs352162, rs352139 e rs352140 também de TLR9, a fim de se obter uma análise mais precisa sobre o impacto dessa variante da região promotora de TLR9 na TB.

6.3 Frequência alélica

A frequência dos alelos dos SNVs rs5743618 (*TLR1*) e rs187084 (*TLR9*) foram obtidas e comparadas com as frequências disponíveis na plataforma Ensembl.org de diversas populações do mundo (tabela 11). As menores frequências alélicas encontradas no presente estudo é o alelo G da variante rs5743618 e o alelo C da variante rs187084.

Tabela 11. Frequência dos alelos dos SNVs de genes de *TLR1* e *TLR9* na população estudada e de outras populações do mundo.

SNV ID	Alelo	População estudada		Outras populações				
		Controle	Global	África	Américas	Leste asiático	Europa	Sul asiático
rs5743618	G (C)	0,27	0,20	0,04	0,28	0,01	0,67	0,07
	T (A)	0,73	0,80	0,96	0,72	0,99	0,33	0,93
rs187084	C (G)	0,38	0,38	0,29	0,44	0,40	0,43	0,37
	T (A)	0,62	0,62	0,71	0,56	0,60	0,57	0,63

SNV ID: número de identificação da variante gênica

Em relação ao rs5743618, a frequência do alelo G obtida na população controle foi de 0.27, superior à média global (0.20), e equivalente a frequência de 0.28 encontrada nas Américas, porém bastante abaixo da frequência encontrada na Europa (0.67). Curiosamente, a Europa foi a região do globo que apresentou o menor número de casos de TB do ano de 2019, representando apenas 2,5% do total de casos confirmados. Enquanto o leste asiático, o sul asiático e a África, apresentaram as menores frequências do alelo G (0.01, 0.07 e 0.04, respectivamente) e estiveram entre as regiões com a maior incidência de TB. A China, por exemplo, localizada no leste asiático, representou sozinha 8.4% do total de casos de TB no mundo em 2019; Índia, Paquistão e Bangladesh, localizados no Sul da Ásia, tiveram 26%, 5.7% e 3.6% do total de casos de TB do mundo em 2019, respectivamente; e o continente africano, nesse mesmo ano, teve 25% do total de casos da doença (WHO,2020).

Em contraste com essas observações, os estudos que foram realizados com caucasianos no continente europeu envolvendo a variante rs5743618 identificaram associação do alelo G com risco ao desenvolvimento de TB (UCIECHOWSKI et al., 2011; OCEJO-VINYALS et al., 2013), entretanto, MA et al., 2007 não encontrou essa mesma associação entre caucasianos dos Estados Unidos da América.

Pode-se justificar essa divergência pelo efeito de outros alelos que possam estar atuando em conjunto com rs5743618 para aumentar a susceptibilidade a TB na população dos estudos anteriormente mencionados, de modo que o alelo G, o qual se encontra em elevada frequência na Europa, não se constitua, individualmente, como um risco à TB conforme os referidos estudos apontaram, de outra forma, ter-se-ia nessa região, a qual é a área do globo com a maior frequência desse alelo, números mais elevados de casos de TB. O próprio estudo de UCIECHOWSKI et al., 2011 refere ao alelo A de rs4833095 um maior impacto sobre a redução da expressão de *TLR1* que o alelo G de rs5743618.

Embora tenha-se encontrado associação do genótipo G/G do rs5743618 de *TLR1* para proteção contra TB, este resultado deve ser analisado com extrema cautela, pois, ainda que também seja notável a baixa frequência do alelo G da variante rs5743618 de *TLR1* em regiões com grande incidência TB, o desenvolvimento de uma doença é multifatorial, dependendo não somente de um único receptor, mas de uma grande variedade de genes. Além disso, questões socioculturais e econômicas são preponderantes para o desenvolvimento de TB, contribuindo significativamente para que regiões mais pobres do globo sejam responsáveis pela maior carga da doença no mundo.

Em relação a variante rs187084 de *TLR9*, encontrou-se no presente estudo a frequência do alelo C semelhante à média da frequência global, e um pouco acima da frequência encontrada nas Américas (0.44). Nota-se que a frequência dos alelos dessa variante é bastante semelhante entre as regiões do globo, e, apesar de não ser identificada associação individual entre essa variante com TB, o papel dessa variante da região promotora de *TLR9* tem sido amplamente discutido quanto ao impacto na susceptibilidade de outras doenças.

6.4 Quantificação de interleucina-6

A citocina IL-6 foi quantificada por ELISA na amostra de plasma de 61 pacientes com TBP e 75 indivíduos controle. Obteve-se a concentração média de 30.871 pg/mL (DP: 50.01) de IL-6 entre pacientes, e 16.717 pg/mL (DP: 20.09) entre indivíduos controle ($p=0.047$) (figura 4).

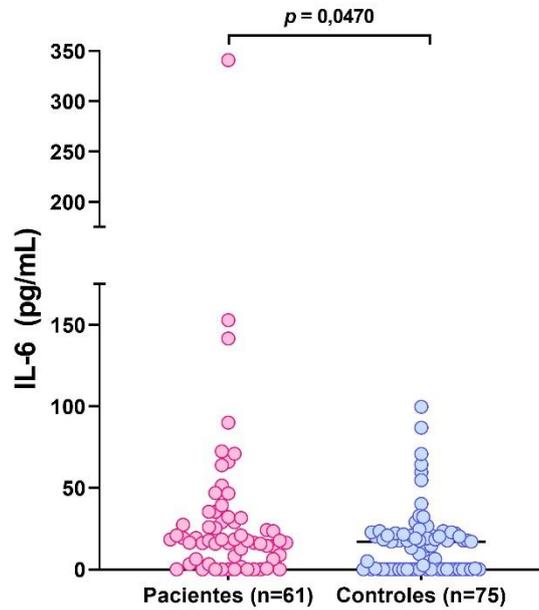


Figura 4. Concentração de IL-6 em amostra de plasma de pacientes (n=61) e controles (n=75). Para análise estatística foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney no programa GrahPadPrism® (versão 7.0).

O papel da IL-6 na tuberculose tem sido discutido ao longo dos anos, ZHANG et al., 1994 averiguaram que lipoarabinomanana, um componente da parede celular de MTB, estimulava a expressão de mRNA de IL-6, bem como a liberação da citocina por monócitos do sangue periférico de doadores, sugerindo o fator de transcrição NF- κ B como mediador da expressão gênica da IL-6. LADEL et al., 1997 verificou que ratos knockout para IL-6 não conseguiam controlar a infecção gerada através da inoculação intravenosa de MTB, possuindo um impacto letal nos animais. Já os ratos que expressavam normalmente a citocina conseguiram controlar a infecção. Além disso, os animais knockout para IL-6 também apresentavam aumento na produção de IL-4 e diminuição na produção de IFN- γ , a qual é essencial para a potencialização da atividade fagocítica de macrófagos.

Por sua vez, SAUNDERS et al., 2000, verificou que animais knockout para IL-6, e que foram infectados através da via respiratória com aerossol contendo baixas doses de MTB,

apresentaram produção mais retardada de IFN- γ , assim como proliferação bacteriana mais veloz, entretanto, esses animais conseguiram controlar a infecção de forma a produzir uma resposta imune de memória em face de uma infecção secundária, e diferentemente do experimento de LADEL et al., 1997, o impacto da ausência de IL-6 em face da infecção por MTB não foi letal.

Em humanos, o estudo de NOLAN et al., 2013 que contou com 75 participantes com TBP, identificou um papel protetor de IL-6 contra lesão pulmonar cavitária, ao identificar que 22 pacientes que possuíam lesões cavitárias apresentaram níveis de IL-6 no lavado broncoalveolar inferiores aos níveis de IL-6 identificados nos 53 indivíduos que não possuíam esse tipo de lesão (14.19 pg/ml vs. 30.68 pg/ml $p=0.002$). O que estaria em conformidade com os achados em modelos animais de LADEL et al., 1997 e SAUNDERS et al., 2000, os quais atribuem à IL-6 um papel na redução inicial da carga micobacteriana, e consequente controle da infecção.

Em contraste com NOLAN et al., 2013, outro estudo identificou uma associação entre lesão do parênquima pulmonar em pacientes de TBP com baciloscopias negativas, e níveis mais elevados de IL-6 no lavado broncoalveolar (LOSADA et al., 2020). Pacientes com lesão destrutiva do parênquima pulmonar também apresentaram níveis elevados de IL-6 quantificados no soro em comparação com pacientes sem exacerbação dos danos pulmonares (OH et al., 2018).

Pode-se notar uma divergência entre os achados na literatura a respeito do papel dessa citocina quanto a seu efeito protetor na lesão pulmonar, o que pode ser em decorrência de diferentes populações envolvidas nos estudos, bem como da análise de diferentes matérias biológicas, tais como lavado broncoalveolar e soro, além dos diferentes aspectos clínicos entre os pacientes estudados, por exemplo, enquanto o estudo de NOLAN et al., 2013 envolveu maioria de pacientes com baciloscopia positiva, o estudo de LOSADA et al., 2013 contou apenas com pacientes com baciloscopia negativa.

Observa-se, então, que IL-6 tem seus níveis aumentados em indivíduos com TB em comparação com indivíduos saudáveis, possuindo um papel na imunopatogênese da TB onde atua na modulação inicial da resposta imune frente a MTB, sendo essencial no controle da infecção diante de elevadas cargas microbianas (DOMINGO-GONZALEZ et al., 2017), permitindo que alguns autores tenham apresentado métodos para utilização dessa citocina como biomarcador diagnóstico da tuberculose (SINGH; GOYAL, 2013; ADANKWAH et al., 2021).

Desse modo, o presente estudo encontra-se em conformidade com a maioria dos

trabalhos que investigam essa citocina na tuberculose, ao identifica-la em maior quantidade no plasma de indivíduos com PTB em relação aos indivíduos saudáveis.

Em relação ao efeito das variantes na concentração de IL-6, não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre genótipos de rs5743618 e de rs187084 na quantidade de IL-6 detectada no plasma dos indivíduos estudados (figuras 5 e 6).

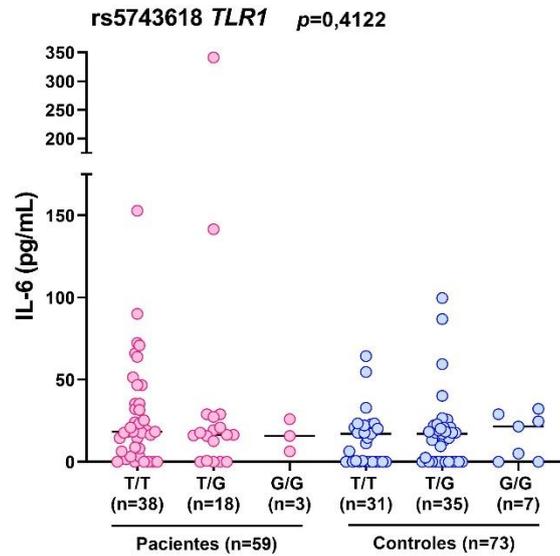


Figura 5. Concentração de IL-6 em amostra de plasma de pacientes e controles com base nos diferentes genótipos da variante rs5743618 de TLR1. Para análise estatística foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

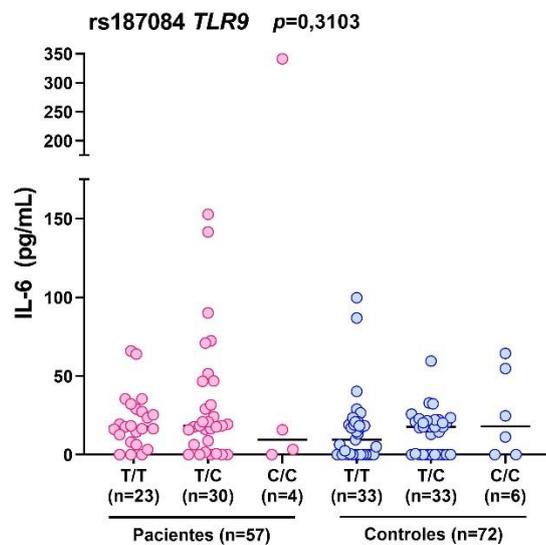


Figura 6. Concentração de IL-6 em amostra de plasma de pacientes e controles com base nos diferentes genótipos da variante rs187084 de TLR9. Para análise estatística foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Assim como o presente estudo, o trabalho de QI et al., 2015, realizado com pacientes pediátricos com TB, não encontrou associação dos genótipos da variante rs5743618 com a concentração de IL-6 em ensaio envolvendo a estimulação de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com lisado de H37Rv inativado, assim como não houve associação dos genótipos com a concentração de IL-8, entretanto, no experimento dos autores, houve aumento na concentração de IL-10, e redução na concentração de TNF- α , CXCL10 associado ao genótipo TG, em comparação ao genótipo TT.

Em outro estudo, realizado com pacientes pediátricos precisando de tratamento intensivo, identificou-se que monócitos de pacientes com o genótipo G/G da variante rs5743618 apresentava secreção reduzida de IL-6, IL-8 e TNF- α em comparação com o genótipo T/G (WHITMORE et al., 2016). Semelhantemente, o estudo de HAWN et al., 2007 realizado com vietnamitas e americanos saudáveis, averiguou em um ensaio de citocinas de sangue total, que os indivíduos com genótipos T/T e T/G produziram substancialmente mais IL-6 em resposta à estimulação PAM3 em comparação com indivíduos com genótipo G/G.

Ao se avaliarem células polimorfonucleares obtidas de adultos saudáveis, as quais foram estimuladas com diferentes agonistas, dentre os quais a lipoarabinomanana de MTB, verificou-se que o alelo T induzia produção mais elevada de IL-6, IL-8 e IL-1Ra em comparação com o alelo G (HOOK et al., 2020).

Ainda que no presente estudo não tenha sido observadas diferenças significativas na concentração de IL-6 entre os genótipos T/T (14.48 pg/mL) e T/G (18.36 pg/mL) e o genótipo G/G (16.07 pg/mL) de rs5743618 de TLR1 no grupo controle, foi visto uma produção de IL-6 maior entre os pacientes contendo o genótipo T/G (39.10 pg/mL) e T/T (28.31 pg/mL) em relação ao genótipo G/G (16.03 pg/mL) de rs5743618, porém a análise estatística realizada não permitiu encontrar associação entre esses genótipos e concentração de IL-6 ($p > 0.05$) como os estudos de HAWN et al., 2007, WHITMORE et al., 2016 e HOOK et al., 2020.

Já em relação a rs187084 de TLR9, poucos estudos na literatura buscam analisar o papel dos genótipos dessa variante com a produção de IL-6. Um estudo realizado por PIÑERO et al., 2017, o qual analisou amostra de soro de pacientes com cirrose, identificou que aqueles portadores do genótipo C/C apresentavam níveis reduzidos de IL-6 e de TNF- α em relação aos portadores do genótipo T/T ou T/C, assim como BHARTI et al., 2014 que identificou um papel do alelo C de rs187084 na diminuição da expressão de IFN- γ e de TNF- α em células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis de tribos da Índia.

Diferentemente desses achados de BHARTI et al., 2014 e PIÑERO et al., 2017, CHEN et al., 2011 ao estudar pacientes chineses com trauma sem perfuração, identificou que o genótipo C/C estaria associado com a maior produção de TNF- α em relação ao genótipo T/C e T/T após estimulação com oligonucleotídeos CpG, enquanto que sem a estimulação, não observou nenhuma diferença estatisticamente significativa na produção da citocina.

Neste estudo, a quantificação de Il-6 foi maior no plasma de indivíduos com genótipo C/C de rs187084 entre os pacientes (90.02 pg/mL) e controles (25.83 pg/mL) em relação aos genótipos T/C e TT de pacientes (31.88 pg/mL e 21.17 pg/mL, respectivamente) e de controles (15.11 pg/mL e 15.91 pg/mL, respectivamente), entretanto, as análises estatísticas igualmente não indicaram diferenças significativas entre as concentrações de IL-6 com base nos diferentes genótipos ($p > 0.05$).

A diferença de resultados encontrada neste trabalho em relação aos demais estudos realizados pode ter ocorrido em função de diferenças metodológicas nas análises, como a estimulação de células imunes em alguns estudos por agonistas e TLR1 e TLR9, ou antígenos micobacterianos. Além disso, populações distintas foram estudadas, o que pode impactar significativamente os resultados, como pacientes pediátricos estudados por WHITMORE et al., 2016 e pacientes asiáticos e norte-americanos estudados por HAWN et al., 2007.

Uma avaliação mais fidedigna a respeito do papel dessas variantes pode ser obtida ao se analisarem um número mais elevado de indivíduos, em especial, um número maior de pacientes e controles com o genótipo G/G de rs5743618. Além disso, uma readequação metodológica, envolvendo a estimulação com antígenos micobacterianos entre os participantes do grupo controle, poderia render uma comparação mais precisa com os trabalhos disponíveis na literatura a respeito de ambas as variantes estudadas e a citocina IL-6.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho forneceu dados importantes quanto a distribuição dos genótipos da variante rs5743618 de *TLR1* e da variante rs187084 de *TLR9* em pacientes com tuberculose pulmonar e em controles saudáveis recrutados na cidade de Manaus-AM, que podem ser úteis para a compreensão do papel dos fatores genéticos individuais na tuberculose e também em outras doenças de ordem infecciosa e imunológica que acometem a população do Amazonas. A frequência do alelo referência T de rs187084 foi estimada em 0.62 entre indivíduos controle e em 0.65 entre pacientes, enquanto o alelo referência G de rs5743618 foi estimado em 0.27 entre controles e 0.22 entre pacientes com TBP nos indivíduos recrutados na cidade de Manaus. Também ressalta os aspectos multifatoriais da tuberculose, que envolvem fatores comportamentais, bem como fatores genéticos, dentre os quais muitos ainda carecem de maiores elucidações. Diante disso, destaca-se o genótipo G/G da variante rs5743618 de *TLR1*, o qual apresentou na população investigada associação com proteção frente a TBP, especialmente entre indivíduos do sexo feminino, contribuindo para a melhor compreensão das variações genéticas que acarretam em diferentes desfechos a partir da exposição de um indivíduo saudável frente ao *Mtb*, e das diferenças genéticas envolvidas na maior proporção de homens doentes de TB em relação a mulheres. Além disso, embora este estudo não tenha identificado um papel da variante rs187084 de *TLR9* na TBP, muitos outros estudos indicam a funcionalidade dessa variante em outras doenças, além de salientar a atuação dessa variante de maneira conjunta com outros alelos de *TLR9*, indicando que ainda há muito para ser explorado quanto ao papel dessa variante na imunopatogênese da TB e de outras doenças. Este estudo também não identificou associação dos diferentes genótipos das variantes rs5743618 e rs187084 com as concentrações de IL-6 no plasma dos pacientes com TBP e controles estudados, embora tenha sido detectada concentração mais elevada da citocina no plasma do grupo de pacientes em relação ao grupo de controles, evidenciando o papel da IL-6 na imunopatogenia da TBP.

EQUIPE DO PROJETO

NOME	INSTITUIÇÃO	FUNÇÃO
Marcos Henrique Gurgel Rodrigues (Farmacêutico e pós-graduando de mestrado do PPGIBA)	PPGIBA-ICB/UFAM	Execução do projeto e demais atividades vinculadas ao programa de mestrado do PPGIBA
Aya Sadahiro (Farmacêutica e docente)	PPGIBA-ICB/UFAM	Orientadora
Mauricio Morishi Ogusku (Farmacêutico e pesquisador)	INPA	Coorientador, prestou assessoria nos exames para o diagnóstico laboratorial da TB e genotipagem por qPCR.
Mariana Brasil Figueira de Andrade (Farmacêutica e pós-graduanda de doutorado do PPGIBA)	PPGIBA-ICB/UFAM	Prestou colaboração nas atividades de genotipagem de <i>TLR1</i> e <i>TLR9</i> por qPCR e na detecção de citocinas por ELISA
Joycenea da Silva Matsuda (Pesquisadora e Médica Pneumologista)	ILMD-Fiocruz/AM e SUSAM	Prestou assessoria na seleção dos pacientes de TB

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*; tradução de Tatiana Ferreira Robaina et al. – 8ª ed. – Rio de Janeiro : Elsevier, 2015.

ABEBE, F. Synergy between Th1 and Th2 responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection: A review of current understanding. *International Reviews of Immunology*, 38(4), pp. 172-179, 2019.

ACHARYA, B. et al. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Biology Reports*, 47, pp. 4065–4075, 2020.

ADANKWAH, E., NAUSCH, N., MINADZI, D., ABASS, M. K., FRANKEN, K. L. M. C., OTTENHOFF, T. H. M., MAYATEPEK, E., PHILLIPS, R. O., JACOBSEN, M. Interleukin-6 and *Mycobacterium tuberculosis* dormancy antigens improve diagnosis of tuberculosis. *The Journal of Infection*, 82(2), pp. 245-252, 2021.

APPELBERG, R. Protective Role of Interferon Gamma, Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-6 in *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* Infections. *Immunobiology*, 191(4-5), pp. 520-525, 1994.

BAFICA A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Experimental Medicine*, 202(12), pp.1715-1724, 2005.

BANSAL, K. et al. PE_PGRS Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* Induce Maturation and Activation of Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 184(7), pp. 3495-3504, 2010.

BARBER-MAYER, K. D., BARBER, D. L. Innate and adaptive cellular immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(12), pp. 1–19, 2015.

BARLETTA-NAVECA, R. H. et al. Toll-like receptor-1 single-nucleotide polymorphism 1805T/G is associated with predisposition to multibacillary tuberculosis'. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), pp. 1–7, 2018.

BARRETO, M. L., PEREIRA, S. M., FERREIRA, A. A. Vacina BCG: eficácia e indicações da vacinação e da revacinação. *Jornal de Pediatria [online]*, 82(3)suppl, pp. s45-s54, 2006.

- BARRETT JC, FRY B, MALLER J, DALY MJ Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21: 263-265, 2005.
- BARRY, C. E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies, 7(12), pp. 845-855, 2009.
- BASU, J., SHIN, D. M., JO, E. K. Mycobacterial signaling through toll-like receptors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2(145), 2012.
- BATES, M.N. Risk of Tuberculosis From Exposure to Tobacco Smoke, 167(4), PP. 335-342, 2007.
- BELAY, M. et al. IFN- γ and IgA against non-methylated heparin-binding hemagglutinin as markers of protective immunity and latent tuberculosis: Results of a longitudinal study from an endemic setting. *Journal of Infection*, 72(2), pp. 189-200, 2016.
- BEN JMAA, M., BEN AYED, H., KOUBAA, M., HAMMAMI, F., DAMAK, J., BEN JEMAA, M. Is there gender inequality in the epidemiological profile of tuberculosis? *La Tunisie Médicale*, Mar;98(3), pp. 232-240, 2020.
- BHARTI, D. et al. The role of TLR9 polymorphism in susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Immunogenetics*, 66(12), pp. 675–681, 2014.
- BIYIKLI, O. O. et al. Role of toll-like receptors in tuberculosis infection. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(10), pp. e20224, 2016.
- BOEHME C. C. et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *New England Journal of Medicine*, 363(11):1005-15, 2010.
- BOTTASSO, O. et al., The Immuno-endocrine Component in the Pathogenesis of Tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66(2-3), pp. 166-175, 2007.
- BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Vigilância das Doenças transmissíveis. Manual de Recomendações para o Controle da tuberculose no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em saúde, departamento de Vigilância das doenças transmissíveis. – Brasília: Ministério da saúde, 2019a. 364 p.: il. ISBN978-85-334-2696-2.
- BRASIL. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, número especial, março 2021. ISSN 9352-7864.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, Vol 50, n. 9, 2019b. ISSN 9352-7864.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Tuberculose. Diagnóstico Laboratorial Baciloscopia. Ministério da Saúde, v. 1, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Ministério da Saúde, v. 1, p. 434, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Técnicas de aplicação e leitura da prova tuberculínica/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 56 p.: il. ISBN 978-85-334-2133-2

CHANCELLOR, A. et al. CD1b-restricted GEM T cell responses are modulated by *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid meromycolate chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(51), pp. E10956-E10964, 2017.

CHEN. C. Y. et al. A critical role for CD8 T cells in a nonhuman primate model of tuberculosis. *PLoS Pathogens*, 5(4), pp. 1-9, 2009.

CHEN, K. H., ZENG, L., G. U. W., ZHOU, J., DU, D. Y., JIANG, J.X. Polymorphisms in the toll-like receptor 9 gene associated with sepsis and multiple organ dysfunction after major blunt trauma. *The British Journal of Surgery*, 98(9), pp. 1252-9, 2011.

CHEN, Z. et al. Association between toll-like receptors 9 (TLR9) gene polymorphism and risk of pulmonary tuberculosis: meta-analysis. *BMC Pulmonary Medicine*, 15(1), pp. 1-10, 2015.

CHURCHYARD, G. et al. What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview. *Journal of Infectious Diseases*, 216(Suppl 6), pp. S629–S635, 2017.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393(November), pp. 537-544, 1998.

COOPER, A. M. et al. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Experimental Medicine*, 186(1), pp. 39-45, 1997.

- COPPOLA, M., OTTENHOFF, T. H. M. Genome wide approaches discover novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens as correlates of infection, disease, immunity and targets for vaccination. *Seminars in Immunology*, 39(Julho), pp. 88–101, 2018.
- COSTA, R. R. S. et al. Comparison between Ogawa-Kudoh and modified Petroff techniques for mycobacteria cultivation in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 16(2), pp. eAO4214, 2018.
- CHAN, E. D., KINNEY, W. H., HONDA, J. R., BISHWAKARMA, R., GANGAVELLI, A., MYA, J., BAI, X., ORDWAY, D. J. Tobacco exposure and susceptibility to tuberculosis: is there a smoking gun? *Tuberculosis (Edinb)*, Dec;94(6), pp. 544-50, 2014.
- DE CARVALHO, L. P. S. et al. Metabolomics of mycobacterium tuberculosis reveals compartmentalized co-catabolism of carbon substrates. *Chemistry and Biology*, 17(10), pp. 1122-1131, 2010.
- DHEDA, K., BARRY, C. E., MAARTENS, G. Tuberculosis. *The Lancet*, 387(10024), pp. 1211–1226, 2016.
- DIWAN, V. K., THORSON, A. Sex, gender, and tuberculosis. *Lancet*, 353(9157), pp. 1000-1, 1999.
- DOMINGO-GONZALEZ, R., PRINCE, O., COOPER, A., KHADER, S. A. Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Microbiology Spectrum*, 4(5):10.1128/microbiolspec.TBTB2-0018-2016, 2016.
- DOWDY D. W. et al. Transforming the fight against tuberculosis: targeting catalysts of transmission. *Clinical Infectious Diseases*, 59(8), pp. 1123-1129, 2014.
- EHRT, S., SCHNAPPINGER D., DIRK, K. Y. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), PP. 496-507, 2018.
- FENTON, M.J., RILEY, L.W., SCHLESINGER, L.S., 2005. Receptor-Mediated Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* by Host Cells. American Society for Microbiology, Washington, DC 20036-2904, USA.
- FURIN, J., COX, H. AND PAI, M. Tuberculosis. *The Lancet*, pp. 1642–1656, 2019.
- GAGNEUX, S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, 16(4), pp. 202–213, 2018.

GALLEGOS, A. M. et al. A gamma interferon independent mechanism of CD4 T cell mediated control of *M. tuberculosis* infection in vivo. *PLoS Pathogens*, 7(5), pp. e1002052, 2011.

GARCIA-PELAYO, M. C. BALB/c mice display more enhanced BCG vaccine induced Th1 and Th17 response than C57BL/6 mice but have equivalent protection. *Tuberculosis*, 95(1), pp. 48-53, 2015.

GHAZAEI, C. Mycobacterium tuberculosis and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *Journal of Research in Medical Sciences*, 23(63), 2018.

GOLDEN, M. P. AND VIKRAM, H. R. Extrapulmonary tuberculosis: An overview. *American Family Physician*, 72(9), pp. 1761–1768, 2005.

GOPAL, R. et al. Unexpected Role for IL-17 in Protective Immunity against Hypervirulent Mycobacterium tuberculosis HN878 Infection. *PLoS Pathogens*, 10(5), pp. e1004099, 2014.

GUPTA, A. et al. Mycobacterium tuberculosis: Immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*, 217(3), pp.363-374, 2012.

GUSTINCICH, S. et al. Fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1993.

HAWN, T. R., MISCH, E. A., DUNSTAN, S. J., THWAITES, G. E., LAN, N. T., QUY, H. T., CHAU, T. T., RODRIGUES, S., NACHMAN, A., JANER, M., HIEN, T. T., FARRAR, J. J., ADEREM. A. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *European Journal of Immunology*, 37(8), pp. 2280-9, 2007.

HERMANS, P. W. et al. Insertion element IS986 from Mycobacterium tuberculosis: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 28(9), pp. 2051–2058, 1990.

HU, L. et al. TLR2 Arg753Gln gene polymorphism associated with tuberculosis susceptibility: An updated meta-analysis. *BioMed Research International*, 2019, 2019.

HOOK, J. S., CAO, M., WENG, K., KINNARE, N., MORELAND, J. G. *Mycobacterium tuberculosis* Lipoarabinomannan Activates Human Neutrophils via a TLR2/1 Mechanism Distinct from Pam 3 CSK 4. *The Journal of Immunology*, 204(3), pp. 671-681, 2019.

HUANG, L., NAZAROVA, E. V. AND RUSSELL, D. G. Mycobacterium tuberculosis: Bacterial Fitness within the Host Macrophage. *Microbiology Spectrum*, 7(2), pp. 1–18, 2019.

- IMTIAZ, S. et al. Alcohol consumption as a risk factor for tuberculosis: Meta-analyses and burden of disease. *European Respiratory Journal*, 50(1), 2017.
- JAHANTIGH, D., SALIMI, S., ALAVI-NAINI, R., EMAMDADI, A., OWAYSEE OSQUEE, H., FARAJIAN MASHHADI, F. Association between TLR4 and TLR9 gene polymorphisms with development of pulmonary tuberculosis in Zahedan, southeastern Iran. *Scientific World Journal*, v. 2013:534053, 2013.
- JAMIL, S. A. et al. Diagnosis of tuberculosis in adults and children. *Annals of the American Thoracic Society*, 14(2), PP. 275-278, 2017.
- JASENOSKY, L. D. et al. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunological Reviews*, 264(1), pp. 74–87, 2015.
- JOHANSSON, E., LONG, N. H., DIWAN, V. K., WINKVIST, A. Gender and tuberculosis control: perspectives on health seeking behaviour among men and women in Vietnam. *Health Policy*. May;52(1), pp. 33-51, 2000.
- JOHNSON, C. M., LYLE, E. A., OMUETI, K. O., STEPENSKY, V. A., YEGIN, O., ALPSOY, E., HAMANN, L., SCHUMANN, R. R., TAPPING, R. I. Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *The Journal of Immunology*, 178(12), pp. 7520-4, 2007.
- JUN-CHI, X. et al. More significance of TB-IGRA except for the diagnose of tuberculosis. *Journal of Clinical Laboratory analysis*, 32(1), pp. e22183, 2017.
- KHADER, S. A. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature Immunology*, 8(4), pp. 369-377, 2007.
- KHAN, F. Y. Review of literature on disseminated tuberculosis with emphasis on the focused diagnostic workup. *Journal of Family and Community Medicine*, 26(2), pp. 83-91, 2019.
- KIEMER, A.K. et al. Attenuated activation of macrophage TLR9 by DNA from virulent mycobacteria. *Journal of Innate Immunity*, 1(1), pp.29-45, 2008.
- KIM J. S. et al. *Mycobacterium tuberculosis* RpfB drives Th1-type T cell immunity via a TLR4-dependent activation of dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(4), pp. 733-749, 2013.

KIM, K. et al. Mycobacterium tuberculosis Rv 0652 stimulates production of tumour necrosis factor and monocytes chemoattractant protein- 1 in macrophages through the Toll-like receptor 4 pathway. *Immunology*, 135(2), pp. 231-240, 2012.

KIM, W. S. Mycobacterium tuberculosis Rv3628 drives th1-type T cell immunity via TLR2-mediated activation of dendritic cells and displays vaccine potential against the hyper-virulent beijing K strain. *Oncotarget*, 7(18), pp. 24962-24982, 2016.

KRISHNAN, N., ROBERTSON, B. D., THWAITES, G. The mechanisms and consequences of the extra-pulmonary dissemination of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 90(6), pp. 361-366, 2010.

LADEL, C. H. et al. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infection and Immunity*, 65(11), pp. 4843–4849, 1997.

LANCIONI, C.L. et al. Mycobacterium tuberculosis lipoproteins directly regulate human memory CD4+ T cell activation via toll-like receptors 1 and 2. *Infection and Immunity*, 79(2), pp. 663-673, 2011.

LARROUY-MAUMUS, G. et al. Discovery of a glycerol 3-phosphate phosphatase reveals glycerophospholipid polar head recycling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(28), pp. 11320-11325, 2013.

LAW K. et al. Increased Release of interleukin-1 Beta, interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor-Alpha by Bronchoalveolar Cells Lavaged From Involved Sites in Pulmonary Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 153(2), 1996.

LIN, P. L., FLYNN, J. L. CD8 T cells and Mycobacterium tuberculosis infection. *Seminars in Immunopathology*, 37(3), pp. 239-249, 2015.

LIU, C. H., LIU, H., GE, B. Innate immunity in tuberculosis: Host defense vs pathogen evasion. *Cellular and Molecular Immunology*, 14(12), pp. 963–975, 2017.

LÖNNROTH, K. et al. Drivers of tuberculosis epidemics: The role of risk factors and social determinants. *Social Science and Medicine*, 68(12), pp. 2240-2246, 2009.

LOSADA, P. X., PERDOMO-CELIS, F., CASTRO, M., SALCEDO, C., SALCEDO, A., DELAURA, I., LASTRA, G., NARVÁEZ, C. F. Locally-secreted interleukin-6 is related with radiological severity in smear-negative pulmonary tuberculosis. *Cytokine*, v.127:154950, 2020.

- LYADOVA, I. V., PANTELEEV, A. V. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators of Inflammation*, 2015, pp. 1-13, 2015.
- LYON, S. M., ROSSMAN, M. D. Pulmonary Tuberculosis. *Microbiology Spectrum*, 5(1), pp. 321–333, 2017.
- MA, M. J., XIE, L. P., WU, S. C., TANG, F., LI, H., ZHANG, Z.S., YANG, H., CHEN, S.L., LIU, N., LIU, W., CAO, W. C. Toll-like receptors, tumor necrosis factor- α , and interleukin-10 gene polymorphisms in risk of pulmonary tuberculosis and disease severity. *Human Immunology*, 71(10), pp. 1005-10, 2010.
- MA, X., LIU, Y., GOWEN, B. B., GRAVISS, E. A., CLARK, A. G., MUSSER, J. M. Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS One*, 2(12):e1318, 2007.
- MAO, X. et al. IL-1 β +3953C/T, -511T/C and IL-6 -174C/G polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Gene*, 573(1), pp. 75-83, 2015.
- MARÇÔA, R., RIBEIRO, A. I., ZÃO, I., DUARTE, R. Tuberculosis and gender - Factors influencing the risk of tuberculosis among men and women by age group. *Pulmonology*, Maio-Jun;24(3), pp. 199-202, 2018.
- MASHABELA, G. T., DE WET, T. J., WARNER, D. F. Mycobacterium tuberculosis Metabolism. *Microbiology Spectrum*, 7(4), pp. 1-26, 2019.
- MOCKENHAUPT, F. P., HAMANN, L., VON GAERTNER, C., BEDU-ADDO, G., VON KLEINSORGEN, C., SCHUMANN, R. R., BIENZLE, U. Common polymorphisms of toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(2), pp. 184-8, 2006.
- MOGUES, T. et al. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 193(3), pp. 271-280, 2001.
- MUKHERJEE, S., HUDA, S., SINHA BABU, S. P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scandinavian Journal of Immunology*, 90(1), pp. 1–18, 2019.
- MURPHY, Kenneth. *Imunobiologia de Janeway / Kenneth Murphy*; tradução Denise C. Mahado, Gaby Renard, Lucien Peroni Gualdi; revisão técnica: Denise C. Machado. – 8ª ed. Porto Alegre : Artmed, 2014.

NADERI, M., HASHEMI, M., MIRSHEKARI, H., BAHARI, G., TAHERI, M. Toll-like Receptor 1 Polymorphisms Increased the Risk of Pulmonary Tuberculosis in an Iranian Population Sample. *Biomedical and Environmental Sciences*, 29(11), pp. 825-828, 2016.

NARENDRAN, G. et al. Paradoxical Tuberculosis Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (TB-IRIS) in HIV Patients with Culture Confirmed Pulmonary Tuberculosis in India and the Potential Role of IL-6 in Prediction. *PLoS ONE*, 8(5), pp. e63541, 2013.

NATHAVITHARANA, R. R. et al. Accuracy of line probe assays for the diagnosis of pulmonary and multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal*, 49(1), pp. 1601075, 2017.

NAVYA, N., JEYASHREE, K., MADHUKESHWAR, A. K., ANAND, T., NIRGUDE, A. S., NAYARMOOLE, B. M., ISAAKIDIS, P. Are they there yet? Linkage of patients with tuberculosis to services for tobacco cessation and alcohol abuse - a mixed methods study from Karnataka, India. *BMC Health Services Research*, 19(1):90, 2019.

OCEJO-VINYALS, J. G., PUENTE DE MATEO, E., AUSÍN, F., AGÜERO, R., ARROYO, J. L., GUTIÉRREZ-CUADRA, M., FARIÑAS, M. C. Human toll-like receptor 1 T1805G polymorphism and susceptibility to pulmonary tuberculosis in northern Spain. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 17(5), pp. 652-4, 2013.

OH, J. Y. et al. Elevated interleukin-6 and bronchiectasis as risk factors for acute exacerbation in patients with tuberculosis-destroyed lung with airflow limitation. *Journal of Thoracic Disease*, 10(9), pp. 5246–5253, 2018.

OLESEN, R., WEJSE, C., VELEZ, D. R., BISSEYE, C., SODEMANN, M., AABY, P., RABNA, P., WORWUI, A., CHAPMAN, H., DIATTA, M., ADEGBOLA, R. A., HILL, P. C., ØSTERGAARD, L., WILLIAMS, S. M., SIRUGO, G. DC-SIGN (CD209), pentraxin 3 and vitamin D receptor gene variants associate with pulmonary tuberculosis risk in West Africans. *Genes and Immunity*. 8(6), pp. 456-67, 2007.

PAGÁN, A.J.; RAMAKRISHNAN, L. The Formation and Function of Granulomas. *Annual Review of Immunology*, 36(janeiro), pp. 639-665, 2018.

PIÑERO, P., JUANOLA, O., CAPARRÓS, E., ZAPATER, P., GIMÉNEZ, P., GONZÁLEZ-NAVAJAS, J. M., SUCH, J., FRANCÉS, R. Toll-like receptor polymorphisms compromise the inflammatory response against bacterial antigen translocation in cirrhosis. *Scientific Reports*, v. 7:46425, 2017.

PEDROSA, J. et al. Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infection and Immunity*, 68(2), pp. 577-583, 2000.

POTHLICHET, J., QUINTANA-MURCI, L. The genetics of innate immunity sensors and human disease. *International Reviews of Immunology*, 32(2), pp. 157-208, 2013.

QI, H. et al. Toll-like receptor 1 (TLR1) Gene SNP rs5743618 is associated with increased risk for tuberculosis in Han Chinese children. *Tuberculosis*, 95(2), pp. 197-203, 2015.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(5), pp. 352–366, 2012.

RANG & DALE: farmacologia/ H. P. Rang et al.; tradução de Tatiana Ferreira Robaina et al. – 7ª ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2011.

ROOK, G. A. W. et al. IL-4 in tuberculosis: Implications for vaccine design. *Trends in Immunology*, 25(9), pp. 483-488, 2004.

ROOK, G. A. W. et al. Th2 Cytokines in Susceptibility to Tuberculosis. *Current Molecular Medicine*, 7(3), pp. 327-337, 2007.

SAHINGUR, S. E., XIA, X. J., GUNSOLLEY, J., SCHENKEIN, H. A., GENCO, R. J., De NARDIN, E. Single nucleotide polymorphisms of pattern recognition receptors and chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 46(2), pp. 184-92, 2011.

SALEM, J. I. et al. Valor relativo do exame direto, após concentração e por cultivo de escarro no diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar no Amazonas. *Jornal de Pneumologia*, v. 16, pp. 133-136, 1990.

SALEM, J. I. et al. PKO – Alternative method for isolating mycobacteria from sputum. *Acta Amazonica*, 37(3), pp. 419 – 424, 2007.

SALIE, M. et al. Association of toll-like receptors with susceptibility to tuberculosis suggests sex-specific effects of TLR8 polymorphisms. *Infection, Genetics and Evolution*, 34, pp. 221-229, 2015.

SALO, W. L. et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6), pp. 2091-2094, 1994.

- SARAAV I., SINGH, S., SHARMA, S. Outcome of *Mycobacterium tuberculosis* and Toll-like receptor interaction: Immune response or immune evasion?. *Immunology and Cell Biology*, 92(9), pp. 741-746, 2014.
- SAUNDERS, B. M., FRANK, A. A., ORME, I. M., COOPER, A. M. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and Immunity*, 68(6), pp. 3322-6, 2000.
- SAWIAN, C. E., LOUREMBAM, S. D., BANERJEE, A., BARUAH, S. Polymorphisms and expression of TLR4 and 9 in malaria in two ethnic groups of Assam, northeast India. *Innate Immunity*, 19(2), pp. 174-83, 2013.
- SELVARAJ, P., HARISHANKAR, M., SINGH, B., JAWAHAR, M. S., BANUREKHA, V. V. Toll-like receptor and TIRAP gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of South India. *Tuberculosis (Edinb)*, 90(5), pp. 306-10, 2010.
- SHAYKHIEV, R., KRAUSE, A., SALIT, J., STRULOVICI-BAREL, Y., HARVEY, B. G., O'CONNOR, T. P., CRYSTAL, R. G.. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Immunology*, Aug 15;183(4), pp. 2867-83, 2009.
- QI, H., SUN, L., WU, X., JIN, Y., XIAO, J., WANG, S., SHEN, C., CHU, P., QI, Z., XU, F., GUO, Y., JIAO, W., TIAN, J., SHEN, A. Toll-like receptor 1(TLR1) Gene SNP rs5743618 is associated with increased risk for tuberculosis in Han Chinese children. *Tuberculosis (Edinb)*, 95(2), pp. 197-203, 2015.
- SINGH, P. P., GOYAL, A. Interleukin-6: a potent biomarker of mycobacterial infection. *Springerplus*, 2(1):686, 2013.
- SINHA, E., BISWAS, S. K., MITTAL, M., BAJAJ, B., SINGH, V., ARELA, N., KATOCH, V. M., MOHANTY, K. K. Toll-like Receptor 1 743 A>G, 1805 T>G & Toll-like Receptor 6 745 C>T gene polymorphism and tuberculosis: a case control study of north Indian population from Agra (India). *Human Immunology*, 75(8), pp. 880-6, 2014.
- STRZELAK, A., RATAJCZAK, A., ADAMIEC, A., FELESZKO, W. Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: a Mechanistic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, May 21;15(5):1033, 2018.

- SCHOREY, J. S., SCHLESINGER, L. S. Innate Immune Responses to Tuberculosis. *Microbiology spectrum*, 4(6), pp. 1–27, 2016.
- SCHURZ, H. et al. TLR1, 2, 4, 6 and 9 variants associated with tuberculosis susceptibility: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 10(10), 2015.
- SCHURZ, H. et al. A sex-stratified genome-wide association study of tuberculosis using a multi-ethnic genotyping array. *Frontiers in Genetics*, 10(janeiro), pp.1-13, 2019.
- SEILER, P. et al. Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *European Journal of Immunology*, 33(10), pp. 2676-2686, 2003.
- SILVA, M., PEREIRA, J., COSTA, R., DIAS, J., GUIMARÃES, M., & LEITE, I. Drug addiction and alcoholism as predictors for tuberculosis treatment default in Brazil: A prospective cohort study. *Epidemiology and Infection*, 145(16), pp. 3516-3524, 2017.
- SILVA, M. T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(1), pp. 93-106, 2010a.
- SILVA, M. T. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(maio), pp. 805-813, 2010b.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÃO, Vacina BCG. SBIm, 2021. Disponível em: <<https://familia.sbim.org.br/vacinas/vacinas-disponiveis/vacina-bcg>>. Acesso em: junho, 2021.
- SOH, A.Z. et al. Alcohol drinking and cigarette smoking in relation to risk of active tuberculosis: prospective cohort study. *BMJ Open Respiratory Research*, 4:e000247, 2017.
- SUN, Q., ZHANG, Q., XIAO, H. P., BAI, C. Toll-like receptor polymorphisms and tuberculosis susceptibility: A comprehensive meta-analysis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 35(2), pp. 157-168, 2015.
- SZABO, G., SAHA, B. Alcohol's Effect on Host Defense. *Alcohol Research: Current Reviews*, 37(2), pp. 159-170, 2015.
- TORRADO, E., COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(6), pp. 455-462, 2010.

UCIECHOWSKI, P., IMHOFF, H., LANGE, C., MEYER, C. G., BROWNE, E. N., KIRSTEN, D. K., SCHRÖDER, A. K., SCHAAF, B., AL-LAHHAM, A., REINERT, R. R., REILING, N., HAASE, H., HATZMANN, A., FLEISCHER, D., HEUSSEN, N., KLEINES, M., RINK, L. Susceptibility to tuberculosis is associated with TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(2), pp. 377-88, 2011.

VAN EMBDEN, J. D. A. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(2), pp. 406–409, 1993.

VAN PINXTEREN, L. A. H. et al. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells, 30(12), pp. 3689-3698, 2000.

VANDERVEN, B. C. et al. Novel Inhibitors of Cholesterol Degradation in *Mycobacterium tuberculosis* Reveal How the Bacterium's Metabolism Is Constrained by the Intracellular Environment. *PLoS Pathogens*, 11(2), pp. 1-20, 2015.

WANG, H. et al. Association between the IL-6 gene polymorphism and tuberculosis risk: A meta-analysis. *Infection and Drug Resistance*, 10, pp. 445–454, 2017.

WANG, M. G. et al. Association of TLR8 and TLR9 polymorphisms with tuberculosis in a Chinese Han population: a case-control study *BMC infectious diseases*. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), pp. 561, 2018.

WEN, C.P. The reduction of tuberculosis risks by smoking cessation. *BMC Infectious Diseases*, 10(156), 2010.

WHITMORE, L. C., HOOK, J. S., PHILIP, A. R., HILKIN, B. M., BING, X., AHN, C., WONG, H. R., FERGUSON, P. J., MORELAND, J. G. A Common Genetic Variant in TLR1 Enhances Human Neutrophil Priming and Impacts Length of Intensive Care Stay in Pediatric Sepsis. *Journal of Immunology*, 196(3), pp. 1376-86, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISBN 978-92-4-156571-4.

WU, L., HU, Y., LI, D., JIANG, W., XU, B. Screening toll-like receptor markers to predict latent tuberculosis infection and subsequent tuberculosis disease in a Chinese population. *BMC Medical Genetics*, 16(1):19, 2015.

WURFEL, M. M., Gordon, A. C., Holden, T. D., et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms affect innate immune responses and outcomes in sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178(7), pp. 710-720, 2008.

YOSHIDA, Y. O. et al. Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung. *The Journal of Immunology*, 184(4), pp. 4414-4422, 2010.

ZHANG, Y., BROSER, M., ROM, W. N. Activation of the interleukin 6 gene by Mycobacterium tuberculosis or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF-IL6 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(6), pp. 2225-9, 1994.

ZHANG, Y. et al. Toll-Like Receptor -1, -2, and -6 Polymorphisms and Pulmonary Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 8 (5), pp. 1-12, 2013.

ZHOU, Y., ZHANG, M. Associations between genetic polymorphisms of TLRs and susceptibility to tuberculosis: A meta-analysis. *Innate Immunity*, 26(2), pp.75-83, 2020.

ZHAO, L. et al. Association of polymorphisms in toll-like receptors 4 and 9 with risk of pulmonary Tuberculosis: a meta-analysis. *Medical Science Monitor*, 21, pp. 1097-1106, 2015.

ANEXOS**Anexo 1 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS RELACIONADOS À RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA TUBERCULOSE

Pesquisador: Aya Sadahiro

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 19021519.9.0000.5020

Instituição Proponente: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.530.854

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo caso-controle, prospectivo para avaliar os polimorfismos genéticos e a expressão de genes e citocinas relacionados à resposta imune em pacientes com tuberculose (TB) e controles saudáveis. População de estudo: A população de estudo será constituída por indivíduos residentes e/ou oriundos dos estados da região norte, de ambos os sexos e idade entre 18 e 60 anos.

Grupos de estudo: Pacientes e Controles Grupo 1 – Pacientes com tuberculose: a) TB pulmonar com diagnóstico clínico e/ou laboratorial; b) TB extrapulmonar com diagnóstico na maioria das vezes por exames clínicos e de imagens. Grupo 2 – Controles saudáveis: Indivíduos deverão ser negativos para exames bacteriológicos: a) Contatos indivíduos que convivem com pacientes de TB; b) Não Contatos indivíduos que relatam não terem tido contato com pacientes de TB.

Os pacientes de TB e contatos serão recrutados na Policlínica Cardoso Fontes, no setor aprazamento 1, onde os pacientes recebem orientações de tratamento.

Para este estudo, foi estimado investigar no período de quatro anos o total de 808 amostras, sendo 404 de pacientes com TB e 404 controles (contatos e não contatos saudáveis).

Endereço: Rua Teresina, 495

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.530.854

Os pacientes com TB e contatos serão recrutados na Policlínica Cardoso Fontes, na cidade de Manaus. Os não contatos serão recrutados no ICB/UFAM.

A genotipagem das amostras e a expressão gênica serão realizadas pela técnica de Biologia Molecular (PCR em tempo real). Para alguns genes, será utilizada também a técnica de sequenciamento genético, caso seja necessário. Além disso, será realizada a quantificação das citocinas, pela técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ou citometria de fluxo, a partir do plasma sanguíneo ou do sobrenadante de cultura celular.

Os resultados deste estudo serão analisados e serão aplicados os testes estatísticos de acordo com a natureza dos dados. Espera-se identificar polimorfismos genéticos que possam estar associados a risco ou proteção ao desenvolvimento da TB. E que estes polimorfismos estejam associados a maior ou menor expressão gênica, inclusive possam estar envolvidos direta ou indiretamente com a produção de citocinas. A contribuição deste estudo será principalmente para a melhor compreensão dos aspectos imunogenéticos envolvidos na proteção ou risco para TB.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os polimorfismos genéticos, relacionados à resposta imune, em pacientes com tuberculose (TB).

Objetivo Secundário:

1. Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos, nos genes relacionados aos sistemas imunes inato e adaptativo, em pacientes com TB (pulmonar e TB extrapulmonar), comparadas com as frequências do grupo controle (contatos e não contatos).
2. Avaliar a possível associação dos polimorfismos genéticos quanto ao risco ou proteção para o desenvolvimento da TB.
3. Avaliar a possível associação dos polimorfismos genéticos com o sexo, idade, tabagismo e alcoolismo no desenvolvimento da TB.
4. Avaliar se a combinação de haplótipos dos genes pode estar associada ao desenvolvimento da TB.
5. Analisar se há interação entre os genes estudados e se esta interação pode estar associada ao desenvolvimento da TB.

Endereço: Rua Teresina, 495

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.530.854

6. Avaliar a expressão dos genes nos grupos de pacientes com TB (pulmonar e/ou extrapulmonar) comparados com a expressão nos controles.

7. Verificar se os polimorfismos genéticos estão associados com a concentração de citocinas e anticorpos em pacientes com TB (pulmonar e/ou extrapulmonar) e controles.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Para a realização desta pesquisa existirá risco durante a coleta de sangue visto que há possibilidade de ocasionar dor e desconforto no local da inserção da agulha por ser um procedimento invasivo. Além disso, após algumas horas da coleta de sangue, poderá ocorrer o aparecimento de mancha roxa transitória, bem como uma contaminação por agentes infecciosos. Para evitar esses riscos e não prejudicar a saúde do participante, medidas e cuidados serão realizados, como: a) A coleta de sangue será realizada por um profissional treinado e habilitado conforme as diretrizes estabelecidas para coleta sanguínea; b) Para reduzir o risco de contaminação na coleta, serão utilizados materiais limpos, estéreis e descartáveis, tais como: seringa, agulha, tubos e a utilização de luvas e outros EPI (Equipamentos de proteção individual) necessários e a bancada e os braços da cadeira realizada para apoiar durante a coleta serão limpos com álcool 70%, reduzindo a possibilidade de riscos de contaminação durante o procedimento de coleta de sangue. Outro risco possível será a perda do sigilo dos dados dos participantes da pesquisa, mas para evitar isso, as amostras coletadas receberão códigos numéricos e, desta forma, o sigilo da identidade dos participantes será preservado.

Benefícios:

Este projeto não oferecerá benefício financeiro aos participantes, mas eles receberão outros benefícios, tais como: os resultados obtidos nos exames bacteriológicos (baciloscopia e cultivo) e de biologia molecular (PCR) e também da análise imunogenética (presença de SNP). Os resultados serão entregues aos pacientes ou anexados aos prontuários (conforme solicitação do paciente), se os resultados forem anexados aos prontuários do paciente, estarão disponíveis aos médicos, que poderão utilizar estes resultados para compreender melhor o perfil imunogenético dos pacientes. No caso dos resultados dos exames bacteriológicos e moleculares será possível confirmar que a infecção foi ocasionada por micobactérias e com base nesses achados será possível direcionar a assistência médica ao melhor tratamento. Os benefícios para a sociedade serão a identificação de um possível marcador imunogenético de risco ou proteção ou gravidade para TB pulmonar e extrapulmonar, conhecimentos e aprimoramento sobre polimorfismos de genes relacionados a resposta imune a TB, dados escassos, principalmente em humanos.

Endereço: Rua Teresina, 495

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

CEP: 69.057-070

Telefone: (92)3305-1181

E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.530.854

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A Organização Mundial da Saúde relatou que a tuberculose (TB), causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, enquadra-se como a primeira e principal causa de morte causada por único agente infeccioso. Em 2017, cerca de 1,3 milhões de óbitos e 10 milhões de casos novos ocorreram no mundo devido a TB. Este cenário retrata que a TB continua sendo um problema de saúde pública, resultando em milhões de mortes. Além disso, neste mesmo ano, o estado do Amazonas e sua capital Manaus tiveram os maiores coeficientes de incidências da TB no país. O risco de adoecimento por TB tem sido associado a fatores sociais, ambientais, imunológicos e genéticos. Em conjunto, esses fatores podem aumentar o risco para o desenvolvimento da doença. Assim, polimorfismos em genes envolvidos na resposta imune podem resultar em diferentes respostas frente à infecção pelo bacilo da TB. Diante do exposto, pretende-se investigar os polimorfismos genéticos, a expressão gênica e as citocinas relacionadas à resposta imune inata e adaptativa na TB, visto que esses dois sistemas imunes são essenciais na resposta contra *M. tuberculosis*.

Para este estudo, foi estimado investigar no período de 4 (quatro) anos o total de 808 amostras, sendo 404 de pacientes com TB e 404 do grupo controle (indivíduos saudáveis), formado por contatos e não contatos de pacientes de TB. Os pacientes e contatos serão recrutados na Policlínica Cardoso Fontes, os não contatos serão recrutados no Instituto de Ciências Biológicas-ICB/UFAM. A genotipagem das amostras e a expressão gênica será realizada pela técnica de qPCR (PCR Quantitativa em Tempo Real). Para alguns genes, será utilizada também a técnica de sequenciamento genético, quando necessário. A quantificação das citocinas e anticorpos será feita por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ou citometria de fluxo, a partir do plasma sanguíneo ou do sobrenadante de cultura celular. Os resultados deste estudo contribuirão para a melhor compreensão dos fatores imunogenéticos associados à proteção ou risco para TB.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória devidamente apensados. Todos ADEQUADOS

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em razão do exposto, somos de parecer favorável que o projeto seja APROVADO, pois o pesquisador cumpriu as determinações da Res. 466/2012.

É o parecer

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Teresina, 495

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.530.854

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1381438.pdf	01/07/2019 20:08:01		Aceito
Outros	Aviso_Recrutamento_Controles.pdf	01/07/2019 20:04:35	Aya Sadahiro	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_Coleta_Amostra.pdf	01/07/2019 20:00:52	Aya Sadahiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Ficha_Controles.pdf	01/07/2019 19:59:06	Aya Sadahiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Ficha_Pacientes.pdf	01/07/2019 19:58:56	Aya Sadahiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Controles_2019.pdf	01/07/2019 19:51:00	Aya Sadahiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pacientes_2019.pdf	01/07/2019 19:50:00	Aya Sadahiro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_Policlinica.pdf	01/07/2019 19:49:13	Aya Sadahiro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_INPA.pdf	01/07/2019 19:46:56	Aya Sadahiro	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_Biorrepositorio.pdf	01/07/2019 19:44:50	Aya Sadahiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.pdf	01/07/2019 19:37:25	Aya Sadahiro	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	01/07/2019 19:36:55	Aya Sadahiro	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Teresina, 495

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

E-mail: cep.ufam@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - UFAM



Continuação do Parecer: 3.530.854

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 25 de Agosto de 2019

Assinado por:
Eliana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Teresina, 495

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

CEP: 69.057-070

Telefone: (92)3305-1181

E-mail: cep.ufam@gmail.com