



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA – PPGIBA



IDENTIFICAÇÃO DOS SUBTIPOS DE ALELOS DE *HLA-DRB1\*04* ASSOCIADOS À TUBERCULOSE PULMONAR

DHÊMERTON SOUZA DE LIMA

MANAUS-AM  
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA – PPGIBA



## IDENTIFICAÇÃO DOS SUBTIPOS DE ALELOS DE *HLA-DRB1\*04* ASSOCIADOS À TUBERCULOSE PULMONAR

DHÊMERTON SOUZA DE LIMA

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Professora Doutora Aya Sadahiro

Coorientador: Professor Doutor Rajendranath Ramasawmy

MANAUS-AM  
2015

## Ficha Catalográfica

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

L732i Lima, Dhêmerson  
Identificação dos subtipos de alelos de HLA-DRB1\*04 associados  
à Tuberculose pulmonar / Dhêmerson Lima. 2015  
86 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Aya Sadahiro  
Coorientadora: Rajendranath Ramasawmy  
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Tuberculose. 2. Mycobacterium tuberculosis. 3. HLA-DRB1\*04.  
4. Suscetibilidade. 5. Resistência. I. Sadahiro, Aya II. Universidade  
Federal do Amazonas III. Título

**A todos aqueles que, independentemente  
de alcançarem ou não os seus objetivos,  
nunca desistem, mas sim encontram  
forças e motivação para seguirem em  
frente e para darem sempre o seu  
melhor!**

## AGRADECIMENTOS

Quero manifestar minha gratidão às pessoas muito queridas que colaboraram para a concretização deste projeto, tornando-o agradável e possível.

Ao meu pai, Arnaldo; à minha mãe, Raimunda; aos meus irmãos; e à Anny, por todo o apoio, carinho e amor que me deram, estando sempre ao meu lado nos momentos felizes e tristes.

À Professora Doutora Aya Sadahiro; você foi mais que uma orientadora; foi uma mãe.

Ao Professor Doutor Mauricio Morishi Ogusku, pelos ensinamentos, orientação e infraestrutura.

Ao Professor Doutor Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes, pelas valiosas sugestões, ensinamentos e criatividade ilimitada.

À Professora Doutora Alessandra Pontillo, pela oportunidade e ensinamentos no Laboratório de Imunogenética da Universidade de São Paulo.

À Banca Examinadora do processo de Qualificação, composta pela Professora Doutora Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto, Professor Doutor Pritesh Jaychand Lalwani e Professor Doutor Sérgio Roberto Lopes Albuquerque, pelas valiosas sugestões e correções.

Ao Professor Doutor Rajendranath Ramasawmy, pela coorientação.

À Professora Doutora Irineide Assumpção Antunes, por permitir a coleta de amostras biológicas na Policlínica Cardoso Fontes.

À Maisa Porto dos Santos, pelo auxílio nas análises bacteriológicas e moleculares.

À Vanessa Alves de Almeida, pelo auxílio na coleta de amostras biológicas.

À Alita Moura de Lima, pelo entusiasmo contagiante, amizade e alegria de sempre levada ao ambiente.

Ao Júlio César Maciel Bonet, pelo auxílio na coleta de amostras biológicas.

À Claudia Maria de Melo Silva e Raphaela Honorato Barletta Naveca, pela convivência e ajuda.

À Linda Luciana Oliveira Santana e Isabella da Motta Passos, pela tipagem de *HLA*.

Ao Thiago Ibiapina Alves, pela ajuda e hospitalidade na cidade de São Paulo.

À equipe técnica da Policlínica Cardoso Fontes, pela convivência e auxílio na coleta de amostras biológicas; em especial, à Dulcilene, Elenilda Rodrigues, Arnaldo Atanásio e Delmiro Gibbs.

À equipe técnica do Laboratório de Micobacteriologia do INPA, Francisco Farias de Carvalho, Raimundo Bezerra do Nascimento, pela convivência, preparação de materiais e reagentes.

Ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular do INPA (LEEM), pela infraestrutura disponibilizada para as leituras no sequenciador; em especial, à Nayara Castro, uma amiga que foi essencial nessa etapa.

A todos os professores do Mestrado de Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA); em especial, àqueles que participaram diretamente da minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Mestrado.

## RESUMO

A tuberculose (TB) é um grave problema de saúde pública, considerada como prioridade pelo governo do Brasil desde 2003. A doença é endêmica nos países de baixa e média renda, acometendo principalmente a população que reside nas periferias urbanas (favelas e invasões), estando associada às más condições de moradia, à alimentação, ao saneamento básico e ao uso de drogas. O Brasil é um dos 22 países que contribuem com as maiores cargas de TB no mundo, ocupando a 16.<sup>a</sup> posição em número absoluto de casos. O Estado do Amazonas, em 2014, apresentou o maior coeficiente de incidência nacional de casos de TB (68,4 por 100 mil habitantes). Miséria, exclusão social, dificuldades operacionais de diagnósticos e tratamento da TB são preponderantes para manutenção da alta taxa de incidência. Além disso, os fatores imunogenéticos do hospedeiro são descritos e associados à suscetibilidade ou à resistência da doença. Dentre os genes mais fortemente associados à TB, estão os do Antígeno Leucocitário Humano (*HLA*). No presente estudo, foi investigada a frequência do alelo *HLA-DRB1\*04* em 622 indivíduos, 316 pacientes com TB pulmonar e 306 controles. O *HLA-DRB1\*04* foi frequente nos pacientes (187/316; 59,2%), quando comparado aos dados dos controles (101/306; 33,0%). Neste estudo, foram identificados nove subtipos de *HLA-DRB1\*04*; destes, o *HLA-DRB1\*04:11:01* foi associado à suscetibilidade ( $p = 0,0019$ ; OR = 2,23; IC 95% = 1,34 – 3,70) e à transmissão de TB pulmonar, enquanto o *HLA-DRB1\*04:07:01* foi associado à proteção ( $p < 0,0001$ ; OR = 0,02; IC 95% = 0,001 – 0,33), e o *HLA-DRB1\*04:92* foi associado à transmissão da doença ( $p = 0,0112$ ; OR = 8,62; IC 95% = 1,63 – 45,5). Esses resultados sugerem três subtipos do *HLA-DRB1\*04* como potenciais marcadores imunogenéticos na TB, os quais podem ajudar na compreensão dos mecanismos envolvidos na doença, bem como esclarecer os motivos das altas taxas de incidência de TB no Estado do Amazonas.

**Palavras-chave:** Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, *HLA-DRB1\*04*, Suscetibilidade, Resistência.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a serious public health problem, considered as a priority by the government of Brazil since 2003. This disease is endemic in low and middle-income countries, mainly affecting the population living in urban peripheries when associated with poor living conditions, malnutrition and drug abuse. Brazil is one of 22 countries contributing to the global high TB burden; it is on 16<sup>th</sup> position in number of TB cases. In 2014, Amazonas state had the highest national incidence rate of TB (68.4 *per* 100.000 inhabitants). Poverty, social exclusion, operational difficulties for diagnosis and treatment of TB are crucial to maintaining the high rate of incidence. In addition, the host immunogenic factors are associated with TB. Human Leukocyte Antigen (HLA) genes are associated with susceptibility or resistance to TB. This study verifies the frequency of *HLA-DRB1\*04* allele and subtypes in 622 subjects (316 patients with pulmonary TB and 306 controls). *HLA-DRB1\*04* was more frequent in TB patients (187/316; 59,2%) than control group (101/306; 33,0%). In this study, nine subtypes of *HLA-DRB1\*04* were identified. The subtype *HLA-DRB1\*04:11:01* was associated with susceptibility to pulmonary TB ( $p = 0.0019$ ; OR = 2.23; 95% CI = 1.34 to 3.70), while *HLA-DRB1\*04:07:01* was associated with protection ( $p < 0.0001$ ; OR = 0.02; 95% CI = 0.001 to 0.33) and *HLA-DRB1\*04:92* was associated with transmission to pulmonary TB disease ( $p = 0.0112$ ; OR = 8.62; 95% CI = 1.63 to 45.5). These results suggest three subtypes of *HLA-DRB1\*04* as potential immunogenetic markers in TB and can help in better understanding of mechanisms involved in disease, as well as the reasons for high rates of TB incidence in Amazonas state.

**Key-words:** Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, *HLA-DRB1\*04*, Susceptibility, Resistance.



## ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |   |
|---------------|---|
| AR            | Rheumatoid arthritis (Artrite reumatoide)   |
| CD4           | Cluster of differentiation (Grupamento de diferenciação 4)  |
| CD8           | Cluster of differentiation (Grupamento de diferenciação 8)  |
| CLRs          | C-type lectin receptors (Receptores de lectina do tipo C)   |
| CMTB          | Complex <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )                                   |
| CTAB          | Cetyltrimethylammonium bromide (Brometo de cetil trimetil amônio)   |
| DC-SIGN       | Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin  |
| DNA           | Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)   |
| DTAB          | Dodecyltrimethylammonium bromide (Brometo dodecil trimetil amônio)  |
| EDTA          | Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilendiamino tetra-acético)  |
| FIOCRUZ       | Fundação Oswaldo Cruz   |
| FMT/HVD       | Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado  |
| HLA           | Human leukocyte antigen (Antígeno Leucocitário Humano)  |
| IFN- $\gamma$ | Interferon gama   |
| IL-1          | Interleukin 1 (Interleucina 1)  |
| IL-10         | Interleukin 1 (Interleucina 10)   |
| IL-12         | Interleukin 1 (Interleucina 12)   |
| IL-18         | Interleukin 1 (Interleucina 18)   |
| INPA          | Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia   |
| Ng            | Nanograma   |
| MHC           | Major histocompatibility complex (Complexo Principal de Histocompatibilidade)   |
| NLRs          | NOD-like receptors (Receptores semelhantes a NOD)   |
| NRAMP1        | Natural resistance-associated macrophage protein gene 1 (Gene da proteína 1 associada à resistência natural do macrófago) |
| PAMPs         | Pathogen-associated molecular patterns (Padrões moleculares associados a patógenos)                                       |
| PCR           | Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)  |
| PDCD1         | Programmed cell death 1 (Gene da morte celular programada)  |
| PPD           | Purified protein derivative (Derivado proteico purificado)  |
| PRRs          | Pattern recognition receptors (Receptores de reconhecimento de padrões)   |
| SSP           | Sequence Specific Primer (Iniciador de sequência específica)  |
| TB            | Tuberculosis (Tuberculose)  |
| TCD4          | T helper lymphocyte (Linfócito T auxiliar)  |
| TCD8          | Cytotoxic T lymphocyte (Linfócito T citotóxico)   |
| TCR           | T cell receptor (Receptor de célula T)  |
| Th1           | T helper 1 Lymphocyte (Linfócito T auxiliar 1)  |
| TLRs          | Toll-like receptors (Receptores semelhantes a <i>Toll</i> )   |
| TNF           | Tumor necrosis factor (Fator de necrose tumoral)  |
| UFAM          | Universidade Federal do Amazonas  |
| $\mu$ L       | Microlitre (Microlitro)   |

## LISTA DE FIGURAS

| Ordem | Título da Figura  | Página |
|-------|---|--------|
| 1     | Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR)   | 21     |
| 2     | Representação esquemática dos receptores envolvidos na interação do sistema imune inato e adaptativo  | 26     |
| 3     | Localização e organização do Sistema HLA no cromossomo 6  | 32     |
| 4     | Estrutura de uma molécula do HLA de classe II   | 33     |
| 5     | Fluxograma de atividades  | 41     |
| 6     | Gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, revelado no transiluminador de luz azul  | 48     |
| 7     | Leitura da sequência de DNA do <i>HLA-DRB1*04</i>   | 49     |
| 8     | Curva ROC para modelo de regressão logística <i>stepwise</i> com as variáveis independentes (consumo de álcool, tabagismo e gênero masculino) associadas à TB pulmonar          | 51     |
| 9     | Curva ROC para modelo de regressão logística <i>stepwise</i> com as variáveis independentes e interação com gene <i>HLA-DRB1*04</i> associadas à TB pulmonar                    | 54     |
| 10    | Curva ROC para modelo de regressão logística <i>stepwise</i> com variáveis consumo de álcool e alelo <i>HLA-DRB1*04:11:01</i> associadas à TB pulmonar                          | 55     |
| 11    | Curva ROC para modelo de regressão logística <i>stepwise</i> com variáveis consumo de álcool, alelos <i>HLA-DRB1*04:11:01</i> e <i>DRB1*04:92</i> associadas à carga bacteriana | 56     |
| 12    | Distribuição das frequências de <i>HLA-DRB1*04</i> no mundo   | 58     |

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

| Ordem | Título do Quadro/Tabela   | Página |
|-------|---|--------|
| 1     | Alelos de HLA classe II associados às doenças   | 34     |
| 2     | Padronização da PCR   | 44     |
| 3     | Características gerais dos pacientes com TB pulmonar e controles  | 47     |
| 4     | Resultados das análises das sequências de nucleotídeos obtidas e alinhadas com as sequências do IMGT/HLA e a origem étnica conhecida  | 50     |
| 5     | Distribuição e análise de associação dos subtipos de <i>HLA-DRB1*04</i> em pacientes com TB pulmonar e grupo controle   | 51     |
| 6     | Resultado da análise de regressão logística <i>stepwise</i> com as variáveis associadas à TB pulmonar   | 52     |
| 7     | Resultados da análise de regressão logística <i>stepwise</i> com as variáveis consumo de álcool, gênero masculino e tabagismo, incluindo o alelo <i>HLA-DRB1*04</i>                   | 53     |
| 8     | Resultado da análise de regressão logística <i>stepwise</i> com as variáveis consumo de álcool e alelo <i>HLA-DRB1*04:11:01</i> associadas à TB                                       | 55     |
| 9     | Resultado da análise de regressão logística <i>stepwise</i> com as variáveis consumo de álcool e os alelos <i>HLA-DRB1*04:11:01</i> e <i>DRB1*04:92</i> associadas à carga bacteriana | 56     |
| 10    | Predição de ligação dos epítomos de ESAT-6 com as moléculas de HLA, codificadas pelos alelos <i>HLA-DRB1*04:11:01</i> e <i>DRB1*04:07:01</i>  | 57     |

## SUMÁRIO

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | INTRODUÇÃO.....   | 14 |
| 2.     | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 18 |
| 2.1.   | BREVE HISTÓRICO DA TUBERCULOSE .....  | 19 |
| 2.2.   | ASPECTOS GERAIS DA TUBERCULOSE PULMONAR .....   | 20 |
| 2.3.   | DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA TUBERCULOSE .....   | 23 |
| 2.4.   | RESPOSTA IMUNE À TUBERCULOSE.....   | 25 |
| 2.5.   | ASPECTOS IMUNOGENÉTICOS DA TUBERCULOSE.....   | 28 |
| 2.6.   | O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) HUMANO.....  | 29 |
| 2.7.   | MHC E RESPOSTA IMUNE .....  | 30 |
| 2.8.   | GENES DO HLA .....  | 31 |
| 2.9.   | HLA DE CLASSE II E DOENÇAS .....  | 34 |
| 2.10.  | HLA DE CLASSE II E TUBERCULOSE .....  | 35 |
| 3.     | OBJETIVOS.....  | 36 |
| 3.1.   | GERAL .....   | 37 |
| 3.2.   | ESPECÍFICOS .....   | 37 |
| 4.     | MATERIAL E MÉTODOS.....   | 38 |
| 4.1.   | TIPO DE ESTUDO .....  | 39 |
| 4.2.   | POPULAÇÃO DE ESTUDO .....   | 39 |
| 4.3.   | CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....   | 39 |
| 4.4.   | CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....  | 40 |
| 4.5.   | INFORMAÇÕES ÉTICAS E DE FINANCIAMENTO.....  | 40 |
| 4.6.   | ATIVIDADES REALIZADAS .....   | 40 |
| 4.7.   | CÁLCULO AMOSTRAL.....   | 42 |
| 4.8.   | AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....   | 42 |
| 4.9.   | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....   | 43 |
| 4.10.  | SEQUENCIAMENTO DO <i>HLA-DRB1*04</i> .....  | 44 |
| 4.11.  | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 45 |
| 5.     | RESULTADOS .....  | 46 |
| 5.1.   | CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA .....  | 47 |
| 5.2.   | IDENTIFICAÇÃO DO ALELO <i>HLA-DRB1*04</i> NOS PACIENTES E<br>CONTROLES POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....                | 48 |
| 5.3.   | RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS DE<br><i>HLA-DRB1*04</i> DE PACIENTES COM TB PULMONAR E CONTROLES.....                    | 49 |
| 5.4.   | DISTRIBUIÇÃO E ANÁLISE DOS SUBTIPOS DE ALELOS <i>HLA-DRB1*04</i><br>EM PACIENTES COM TB PULMONAR E CONTROLES. ....                  | 50 |
| 5.5.   | ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA DAS CARACTERÍSTICAS GERAIS<br>(VARIÁVEIS) DOS PACIENTES DE TB PULMONAR E CONTROLES. ....             | 51 |
| 5.6.   | ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES<br>E INTERAÇÃO COM GENES DE <i>HLA-DRB1*04</i> .....                     | 52 |
| 5.6.1. | ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES<br>E O GENE <i>HLA-DRB1*04</i> (GENÉRICO) <i>VERSUS</i> TB PULMONAR..... | 53 |

|  |    |
|--|----|
| 5.6.2. ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES E INTERAÇÃO COM OS SUBTIPOS <i>HLA-DRB1*04:11:01</i> E <i>HLA-DRB1*04:92</i> VERSUS TB PULMONAR .....                                | 54 |
| 5.6.3. ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA DA VARIÁVEL CONSUMO DE ÁLCOOL E INTERAÇÃO COM OS SUBTIPOS <i>HLA-DRB1*04:11:01</i> E <i>HLA-DRB1*04:92</i> VERSUS TRANSMISSÃO DA TB PULMONAR .....               | 55 |
| 5.7. ANÁLISE DE LIGAÇÃO COMPUTACIONAL ( <i>IN SILICO</i> ) DE MOLÉCULAS CODIFICADAS PELOS ALELOS <i>HLA-DRB1*04:11:01</i> E <i>DRB1*04:07:01</i> COM ESAT-6 DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> ..... | 57 |
| 5.8. DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE <i>HLA-DRB1*04</i> NO MUNDO .....   | 58 |
| <br>   |    |
| 6. DISCUSSÃO .....   | 59 |
| <br>   |    |
| 7. CONCLUSÕES .....  | 65 |
| <br>   |    |
| 8. EQUIPE DE PESQUISA .....  | 68 |
| <br>   |    |
| 9. REFERÊNCIAS .....   | 70 |
| <br>   |    |
| 10. ANEXOS .....   | 82 |

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é um grave problema de saúde pública no mundo. A doença é causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo *M. tuberculosis* a espécie mais comum (BRASIL, 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que, aproximadamente, um terço da população mundial está infectada pelo bacilo da TB, sendo 2 bilhões de pessoas com infecção latente e com risco de desenvolvimento da doença. Dos casos notificados de TB, mais de 90% ocorrem em países de baixa e média renda (WHO, 2012). O risco da ativação da doença é estimado em 5% nos 18 meses após a infecção inicial, e cerca de 5% permanecem latentes ao longo da vida (ANDREWS et al., 2012).

O agravo da doença é fortemente influenciado pela determinação social e demonstra relação direta com a pobreza e a exclusão social, acometendo principalmente as pessoas do sexo masculino na fase produtiva da vida, com aproximadamente 66% dos casos notificados, sendo os casos novos da doença mais frequentes na faixa etária entre 25 e 34 anos; e a maior taxa de incidência ocorre entre 45 e 54 anos de idade (BRASIL, 2012;2013).

Apesar de existir tratamento contra a TB, ainda há milhões de casos de doença ativa e mortes. Em 2013, foram notificados 9 milhões de casos novos da TB no mundo, com 1,5 milhão de mortes; destes 1,1 milhão eram pessoas sem o vírus da imunodeficiência humana (HIV); e 400 mil pessoas, HIV-positivos (WHO, 2014). Nesse mesmo ano, China, Índia, África do Sul, Paquistão e Indonésia foram os países que apresentaram as maiores taxas de incidência, de forma que os dois primeiros países apresentaram 24% e 11% dos casos de TB no mundo, respectivamente (WHO, 2014).

No Brasil, o controle e o combate da TB são considerados como prioridades pelo governo desde 2003. E, mesmo com diversas estratégias para combater a doença na última década, o Brasil, infelizmente, está entre os 22 países priorizados pela OMS que concentram 80% da carga mundial de TB, ocupando a 16.<sup>a</sup> posição em relação ao número de casos e a 101.<sup>a</sup> colocação em relação ao coeficiente de incidência (WHO, 2014). Em 2014, foram

notificados no Brasil 67.966 casos de TB, com coeficiente de incidência de 33,5 casos de TB/100.000 habitantes (BRASIL, 2015).

O Estado do Amazonas, em 2014, apresentou o coeficiente de incidência de 68,4 casos de TB/100.000 habitantes, muito acima da média nacional (33,5 casos de TB/100.000 habitantes), ocupando o primeiro lugar em relação aos outros estados, ultrapassando o Estado do Rio de Janeiro, que obteve 60,9 casos de TB/100.000 habitantes (BRASIL, 2015). Na cidade de Manaus, capital do Estado do Amazonas, em 2014, foram notificados 1.770 casos novos de TB, o que equivale ao coeficiente de incidência de 93,8 casos de TB/100.000 habitantes (BRASIL, 2015). Essa alta taxa de incidência facilita a infecção de novos indivíduos.

Em relação à infecção, os fatores genéticos do hospedeiro são fortemente associados ao desenvolvimento da TB, e a conclusão do Projeto Genoma Humano, em 2003, foi um marco inicial para entender a base molecular das doenças humanas, incluindo as moléstias infecciosas, como a TB (QU; FISHER-HOCH; MCCORMICK, 2011).

Estima-se que apenas 5% a 10% dos indivíduos infectados pelo bacilo desenvolvem a TB, indicando que há fatores genéticos no hospedeiro regulando o desenvolvimento da doença (BELLAMY, 1998; SELVARAJ et al., 2008). Dessa maneira, estudar genes que fazem parte da resposta imunológica do hospedeiro é fundamental para a melhor compreensão dos mecanismos moleculares. Com isso, o perfil imunogenético do hospedeiro é um importante fator a ser determinado; e, dentre os genes fortemente associados à TB, há relatos de genes de HLA (antígeno leucocitário humano) do receptor semelhantes a *toll 2*, *9* (*TRL2*, *TRL9*), interferon-gama (*IFN- $\gamma$* ), *NRAMP1* (natural resistance-associated macrophage protein gene 1), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ), interleucina-10 (*IL-10*) (DUBANIEWICZ; MOSZKOWSKA; SZCZERKOWSKA, 2005; VEJBAESYA et al., 2007; AXELSSON-ROBERTSON et al., 2015; CARMONA et al., 2015; MABUNDA et al., 2015).

Quanto à resposta imune do hospedeiro, esse estímulo protetor é mediado pelas células T CD4<sup>+</sup>, com perfil Th1. E as moléculas do HLA são



essenciais para o desenvolvimento da resposta imunológica, pois são proteínas expressas na superfície celular, especializadas em apresentar antígenos associados às células do hospedeiro para o reconhecimento por receptores de células T (TCR). Diversos estudos têm associado os genes do HLA classe II à suscetibilidade ou à resistência à TB pulmonar (GOLDFELD, E., 2004; DUBANIEWICZ; MOSZKOWSKA; SZCZERKOWSKA, 2005; LOMBARD et al., 2006; THUONG et al., 2008; WANG et al., 2010; YULIWULANDARI et al., 2010; QU et al., 2011; SHI et al., 2011; MAGIRA et al., 2012; EL BAGHDADI et al., 2013; MISHRA, G. et al., 2014). Essas pesquisas básicas são fundamentais para a compreensão da base molecular da TB e sua relação com a expressão das moléculas de HLA classe II. Nesse contexto, já foram descritos os seguintes alelos de HLA classe II associados à suscetibilidade à TB pulmonar: *HLA-DRB1\*0803* e *DQB1\*0601* (KIM et al., 2005), *HLA-DQB1\*0503* (DELGADO et al., 2006), *HLA-DRB1\*15* (SHI et al., 2011), *HLA-DRB1\*14* (DUARTE et al., 2011), *HLA-DRB1\*04*, *HLA-DRB1\*09*, *HLA-DRB1\*10*, *HLA-DRB1\*15* e *HLA-DRB1\*16* (TONG et al., 2015). Essa diversidade dos resultados certamente está relacionada ao polimorfismo do sistema HLA, em virtude dos diferentes perfis genéticos de HLA observados nas populações estudadas.

Em estudo preliminar realizado pela nossa equipe de pesquisa, dado não publicado, o *HLA-DRB1\*04* foi mais frequente nos pacientes com TB pulmonar, porém a tipagem utilizada foi de baixa resolução (PCR-SSP) e não identificou os subtipos do *HLA-DRB1\*04* que poderiam estar associados à TB.

Dessa maneira, este trabalho visou investigar os subtipos de *HLA-DRB1\*04* em pacientes com TB pulmonar e em grupo controle, no qual permitiu identificar os subtipos associados à doença.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. BREVE HISTÓRICO DA TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é um problema antigo na sociedade; e acredita-se que a doença tenha matado mais pessoas do que qualquer outro patógeno microbiano. Os primeiros indícios da TB no homem foram descritos em achados arqueológicos, que evidenciaram a ocorrência da enfermidade em ossos humanos pré-históricos encontrados na Alemanha, datados de aproximadamente 8.000 antes de Cristo (a.C.). Também há evidências de TB na coluna vertebral das múmias egípcias, de 2.500 a.C., denominada de *doença de Pott*. À medida que as tribos deixaram de ser nômades e começaram a fixar-se nas aldeias, a doença passou a ser mais citada, pois, quanto maior o número de pessoas em área fechada, maior o risco de contaminação. Na América pré-colombiana, na região andina, foi encontrada uma múmia de criança inca, datada de 700 a.C., evidenciando a ocorrência da enfermidade antes da chegada dos primeiros exploradores europeus (HERZOG, 1998).

Na Grécia antiga, a TB era chamada de *tísica*. Hipócrates (460-370 a.C.) foi o primeiro que observou tubérculos nos tecidos de animais bovinos, ovinos e suínos, todavia não há resultados análogos encontrados no homem, pois no mundo grego não eram realizadas necropsias em seres humanos nesse período. No entanto suas observações permitiram fazer uma apresentação clínica da doença na qual, segundo o filósofo, a tísica acometia as pessoas com a idade de 18-35 anos, reconhecendo que jovens e adultos eram mais suscetíveis à moléstia (DANIEL, 2006). Nesse período, Hipócrates e seus alunos consideravam a doença hereditária em vez de infecciosa, pois não conheciam os agentes etiológicos da enfermidade. Por outro lado, Aristóteles (384-322 a.C.) acreditava que a tísica era uma doença infecciosa, mas sua hipótese foi descartada (HERZOG, 1998).

Em 24 de março de 1882, um médico alemão chamado Hermann Heinrich Robert Koch (1843-1910) fez sua famosa apresentação, intitulada *A etiologia da tuberculose (Die aetiologie der tuberculose)* para a Sociedade Fisiológica de Berlim (Berlin Physiological Society). Em sua explanação, Koch descreveu o

bacilo da TB e também disponibilizou à comunidade científica os seus postulados. Em 1905, ele ganhou o prêmio Nobel em Fisiologia/Medicina pela elucidação do agente etiológico da TB (GRADMANN, 2006).

## 2.2. ASPECTOS GERAIS DA TUBERCULOSE PULMONAR

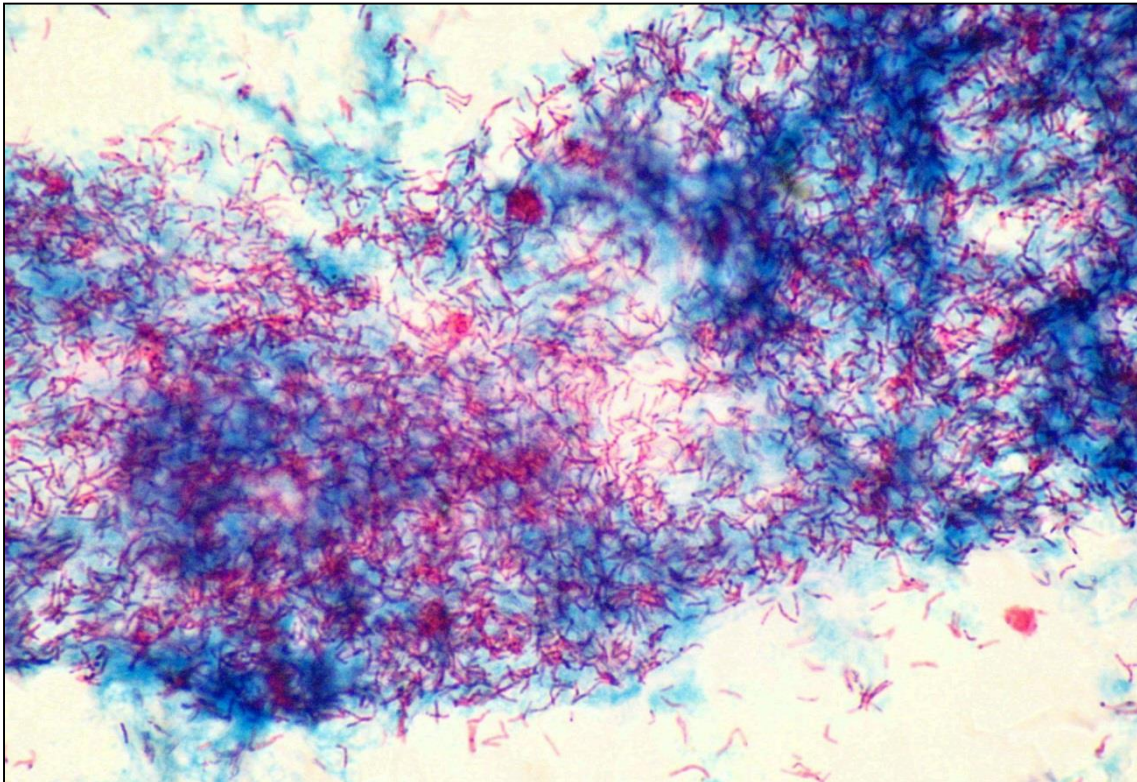
A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa, causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). O CMTB é formado pelas seguintes espécies: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. caprae*, sendo a primeira o agente etiológico mais frequente (FORRELLAD et al., 2013; BRASIL, 2014). A denominação do gênero originou-se do latim *fungus bacterium*, em virtude de o bacilo apresentar algumas características semelhantes aos fungos quando cultivado em meio líquido (COLLINS et al., 1997). Oficialmente são descritas 170 espécies e 13 subespécies do gênero *Mycobacterium* (EUZÉBY, 2015).

*M. tuberculosis* é um bacilo patogênico intracelular obrigatório, aeróbico; não possui motilidade, não tem cápsula e não consegue formar esporos. O bacilo pode infectar diversas espécies de animais, sendo o homem o principal hospedeiro. Esse microrganismo cresce com mais facilidade em locais em que existe uma grande quantidade de oxigênio, por isso a forma pulmonar da doença é mais frequente (LAWN; ZUMLA, 2011).

Os bacilos variam de tamanho conforme a espécie de micobactéria (0,2 a 0,7 por 1 a 10 micrômetros) e possuem uma morfologia bacilar devido à parede celular, que é quimicamente constituída por diversos lipídeos, tais como os ácidos micólicos. Quando os lipídeos se ligam ao corante fucsina, formam complexos que conferem as características tintoriais de resistência à descoloração por soluções álcool-ácidas; e por isso são denominados de *Bacilos Álcool-Ácido Resistentes* (BAAR), conforme a Figura 1. Essa característica é rotineiramente utilizada para a identificação microscópica de micobactérias. No entanto, para a identificação da espécie, é preciso isolar os bacilos em meio de cultura, que é considerado o padrão ouro para diagnóstico da TB.

Posteriormente, é realizada a identificação fenotípica; e, quando necessário, são feitos testes moleculares (BRASIL, 2008).

O indivíduo com TB pulmonar e positivo, no exame de baciloscopia, ao tossir, falar ou espirrar, libera para a atmosfera milhares de partículas infectantes. Para o estabelecimento da infecção, os bacilos devem atingir os alvéolos pulmonares, onde serão englobados por macrófagos, ativando o sistema imune inato. A infecção inicial poderá ser controlada; ou então o bacilo poderá evadir-se a uma resposta imune natural por meio da inibição da fusão do fagossomo com o lisossomo, o que lhe permite replicar-se dentro do macrófago, estabelecendo um quadro de latência ou de ativação da doença (STEWART; ROBERTSON; YOUNG, 2003).



Fonte: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto (UFAM/INPA)

**Figura 1.** Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR). Baciloscopia direta (coloração de Kinyoun, aumento de 10x100). Amostra de escarro de paciente com TB pulmonar

Os indivíduos com TB pulmonar – a forma mais comum da doença – apresentam geralmente o seguinte quadro clínico: tosse crônica, produção

exacerbada de muco, falta de apetite, perda de peso, febre, suor noturno e hemoptise (LAWN; ZUMLA, 2011). Além dos pulmões, os bacilos também podem acometer outros órgãos, resultando na TB extrapulmonar. Caws et al (2008) demonstraram que essa forma clínica ocorre aproximadamente em 10 a 40% dos pacientes e depende de diversos fatores, tais como origem étnica, idade, estado imunológico do hospedeiro, além do genótipo da cepa de *M. tuberculosis*, o qual pode influenciar no fenótipo da doença. Quanto ao tempo de replicação do *M. tuberculosis*, estima-se que seja de aproximadamente 15 a 20 horas. Comparado com o *Escherichia coli*, que se replica a cada 20 minutos, observa-se que *M. tuberculosis* possui tempo de divisão extremamente lento. Fatores como replicação e capacidade de persistir em latência podem resultar em longos períodos de tratamento (seis meses), com uso de diferentes fármacos (CAWS et al., 2008).

Na primoinfecção, o bacilo se multiplica lentamente, principalmente nos alvéolos terminais dos pulmões (foco de Gohn) e em linfonodos correspondentes à drenagem da área, formando o complexo primário. Em um ou dois meses, com a ação de linfócitos e de macrófagos, o bacilo é contido e encapsulado com uma zona de necrose parenquimatosa (necrose caseosa), momento em que a imunidade específica contra o bacilo aparece, e a reação da prova tuberculínica (teste intradérmico – PPD) torna-se positiva. Esse estágio normalmente é assintomático; e em 90% dos casos a lesão se estabiliza, e o processo de cura inicia-se. Nos 10% restantes, a multiplicação permanece, e pode haver complicações pulmonares e pleurais (VARAINE; RICH; GROUZARD, 2014).

Diversos fatores podem influenciar o risco de o indivíduo desenvolver a TB em uma população (LAN et al., 2011). Por exemplo, a convivência em ambientes com aglomeração de pessoas, as más condições sanitárias e o estado de desnutrição são fatores importantes e podem facilitar a transmissão do bacilo de um indivíduo para outro. A variação da idade e o gênero também influenciam na suscetibilidade à doença. Além disso, os aspectos imunogenéticos do hospedeiro têm sido constantemente discutidos nos artigos científicos; dentre eles, destacam-se os genes de HLA (antígeno leucocitário humano), *NRAMP1* (natural resistance-associated macrophage protein gene 1)

e *TNF-alfa* (fator de necrose tumoral alfa), associados à predisposição ou à resistência à doença (DUBANIEWICZ, A. et al., 2000; VEJBAESYA et al., 2007; ZHANG, Z. et al., 2012; WU et al., 2013).

### **2.3. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Inicialmente, o diagnóstico preventivo da TB é feito por meio dos dados clínicos e da radiografia, sendo a confirmação da doença obtida mediante exames laboratoriais, entre os quais os principais que são empregados para a identificação das micobactérias são a baciloscopia de escarro, podendo ser direta ou concentrada, e o cultivo em meio específico, que é considerado o padrão ouro no diagnóstico (BRASIL, 2008; 2013).

A baciloscopia é o exame mais utilizado para diagnósticos e controle da TB, sendo amplamente empregada nos países em que a doença é endêmica (ONYEBUJOH; ROOK, 2004), sobretudo naqueles em desenvolvimento, como o Brasil. Esse exame identifica os Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR), sendo rápido e de baixo custo; e, quando executado de maneira eficiente, possibilita a detecção de 60 a 80% dos casos, com a obtenção dos resultados em um período de 24 horas (BRASIL, 2012).

Nos 22 países com alta carga de TB no mundo, a baciloscopia detecta mais de 60% dos casos, no entanto a detecção é feita tardiamente, após o indivíduo com TB ter transmitido o bacilo causador da doença para outras pessoas (ONYEBUJOH; ROOK, 2004).

No Brasil, em 2012, dos 59.972 casos de TB pulmonar registrados, estima-se que aproximadamente 85,8% realizaram baciloscopia, sendo 73,7% com resultados positivos, o que equivale a 37.907 casos. Esses dados mostram que dois terços dos pacientes ativamente fazem parte da cadeia de transmissão da doença (BRASIL, 2013).

O cultivo é o exame mais sensível na identificação do bacilo, no entanto requer no mínimo quatro semanas para detectar o desenvolvimento da bactéria.

O cultivo, quando associado a teste de identificação de sensibilidade aos fármacos, possibilita o diagnóstico de bacilos resistentes aos medicamentos utilizados no tratamento da doença (BRASIL, 2013). No entanto a diagnose baseada em cultivo não é amplamente utilizada, principalmente nos países com alta carga de TB, pois muitos laboratórios dos centros de atendimento não possuem a infraestrutura adequada para realização desse exame (AMIRZARGAR et al., 2004).

A infecção latente pode ser investigada por meio do teste intradérmico, utilizando proteínas purificadas de *M. tuberculosis* (PPD), de modo que esse exame é de baixo custo e é muito utilizado em regiões de baixa renda. No entanto a presença de micobactérias ambientais e a alta carga vacinal do Bacilo Calmette-Guérin (BCG) – a vacina profilática contra a TB – podem influenciar na interpretação dos resultados, obtendo falsos positivos (BASTA; CAMACHO, 2006; FARHAT et al., 2006).

Dessa maneira, diversos estudos demonstram que a resposta imunológica celular do hospedeiro pode ser utilizada para auxiliar o diagnóstico da TB, pois a produção da citocina IFN- $\gamma$  por células T específicas aos antígenos de *M. tuberculosis* pode sugerir indivíduos com a doença ativa ou latente (DOHERTY; WALLIS; ZUMLA, 2009; PAI et al., 2009; DENKINGER; DHEDA; PAI, 2011; MCNERNEY et al., 2012).

Além disso, existem testes moleculares que se baseiam no princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Esses ensaios representam um grande avanço tecnológico; e atualmente o principal teste molecular empregado para o diagnóstico da TB é o GeneXpert, que é uma plataforma automatizada a qual realiza PCR em tempo real, produzindo resultado em um período de duas horas (BOEHME et al., 2010). Além de detectar o material genético de *M. tuberculosis*, o equipamento também é capaz de identificar se a cepa é resistente à rifampicina (LAWN et al., 2013).

Quanto ao tratamento, o indivíduo com primoinfecção tem a probabilidade de 100% de cura, desde que sejam rigorosamente seguidos os princípios da terapia. O tratamento começa em regime ambulatorial, com supervisões



constantes para garantir que a medicação seja tomada de forma adequada, e todo o serviço é realizado na unidade básica de saúde adjacente da residência do paciente; e, uma vez iniciado esse procedimento, ele não deve ser interrompido. O tempo de tratamento com administração dos antibióticos contra a TB pulmonar tem duração de seis meses, sendo utilizada uma combinação dos seguintes fármacos: rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (BRASIL, 2011).

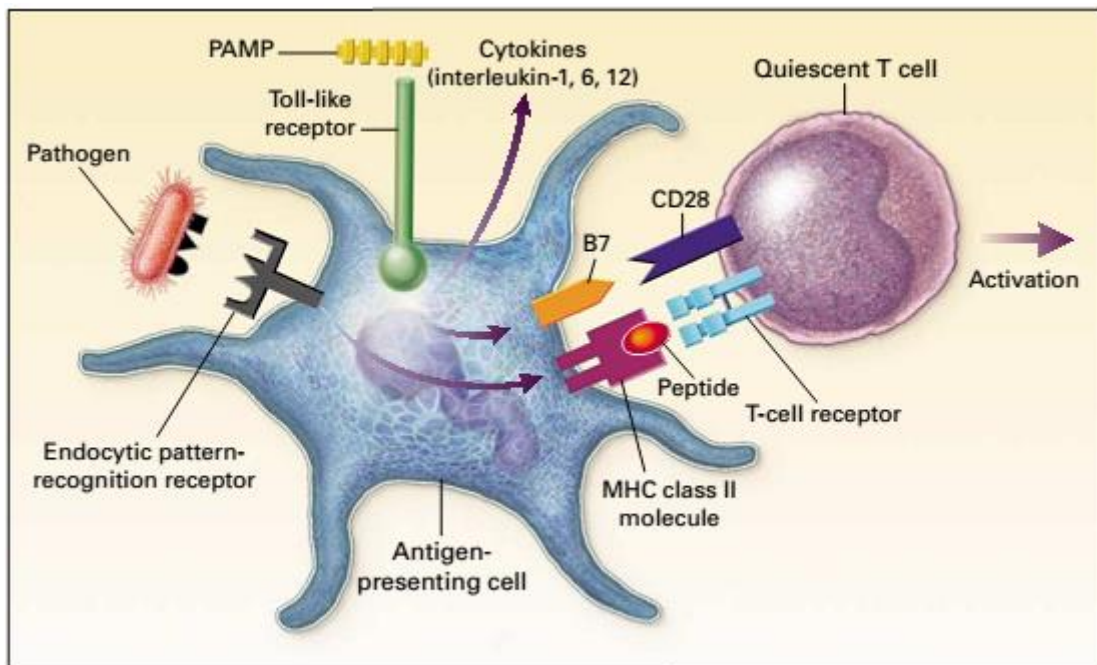
#### **2.4. RESPOSTA IMUNE À TUBERCULOSE**

O sistema imunológico é didaticamente dividido em imunidade inata e adaptativa (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). A imunidade inata representa a primeira linha de defesa contra o bacilo, sendo fundamental para as respostas imunológicas adaptativas, pois a primeira estimula as segundas e pode influenciar a natureza das respostas específicas, tornando-as mais eficazes (ABBAS et al., 2012).

Quando os bacilos são inalados, as barreiras físicas (pelos das fossas nasais) e químicas (substância antimicrobiana e muco), que fazem parte do sistema imune inato, impedem a infecção. No entanto, dependendo da carga de bacilos, muitos conseguem vencer essas barreiras iniciais, atingindo posteriormente os alvéolos pulmonares e, conseqüentemente, iniciando a infecção (NORTH; JUNG, 2004).

A TB é uma infecção na qual a imunidade protetora e a hipersensibilidade patológica coexistem, e a resposta do hospedeiro contribui significativamente para os danos aos tecidos. Em uma infecção primária, os bacilos multiplicam-se lentamente nos pulmões, sendo os macrófagos alveolares as primeiras células ativadas via Fator Nuclear kappa B (NF-κB), com a síntese de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, fazendo que os macrófagos respondam à infecção por haver o início de uma cascata inflamatória, ocorrendo a migração de leucócitos para o foco de infecção. Esse mecanismo é fundamental, por inicialmente conter a infestação e posteriormente ativar a resposta imune adaptativa (NORTH; JUNG, 2004).

Os macrófagos e as células dendríticas reconhecem os bacilos por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), tais como os receptores semelhantes a *Toll* (TLRs), receptores de lectina do tipo C (CLRs), receptores semelhantes a NOD (NLRs), receptores de manose, lectina 1 e DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin) ou CD209. Esses receptores, codificados na linhagem germinal, reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), conforme a Figura 2, que são estruturas conservadas encontradas nos microrganismos (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; O'GARRA et al., 2013).



Fonte: MEDZHITOV; JANEWAY (2000).

**Figura 2.** Representação esquemática dos receptores envolvidos na interação do sistema imune inato e adaptativo. O reconhecimento do Padrão Molecular Associado ao Patógeno (PAMP) por receptores de reconhecimento de padrões, tais como os receptores semelhantes ao *toll*, gera sinais que ativam o sistema imunológico adaptativo. Receptores endocíticos de reconhecimento de padrões, tais como o receptor de manose em macrófagos, se ligam a componentes da parede celular microbiana e medeiam a fagocitose dos agentes patogênicos por células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas). Proteínas derivadas de microrganismos são processadas nos lisossomos para gerar peptídeos antigênicos, que são apresentados via MHC de classe II na superfície do macrófago. Esses peptídeos são reconhecidos por receptores de células T (TCR) com a participação de moléculas coestimuladoras e citocinas. Com isso, ativam linfócitos T virgens específicos. Portanto os receptores de reconhecimento de padrões têm um papel na geração de ambos, o complexo MHC-peptídeo e a coestimulação necessária para ativação de células T.

Após o reconhecimento do bacilo, estima-se que, de seis a oito semanas, os macrófagos chegam aos linfonodos drenantes, e as células T CD4<sup>+</sup> são ativadas, pois são as mediadoras primárias da resposta imune celular contra o bacilo da TB; e posteriormente ocorre a ativação das células T CD8<sup>+</sup>, as quais produzem IFN- $\gamma$ , que potencializa o poder fagocítico dos macrófagos, conseqüentemente aumentando sua capacidade de eliminar os bacilos internalizados. Além da produção de IFN- $\gamma$ , as células T e os macrófagos produzem TNF- $\alpha$ , citocina que também ativará os macrófagos (ABBAS et al., 2012).

Quanto ao desenvolvimento da resposta de células T efetoras, ela depende dos sinais gerados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC)-peptídeos, moléculas coestimulatórias e citocinas. E as células apresentadoras de antígenos (APCs) são fundamentais nesse processo, pois são elas que internalizam, processam e apresentam via moléculas de MHC classe II os antígenos de *M. tuberculosis* aos linfócitos T CD4 (Th0) virgens. Na presença de IFN- $\gamma$ , as células Th0 se diferenciam na subpopulação de células efetoras com o perfil Th1, que são responsáveis pela imunidade contra a TB, principalmente por produzirem IFN- $\gamma$ , potencializando o poder dos fagócitos (OH; GHOSH, 2013).

Além do IFN- $\gamma$ , as células Th1 produzem TNF- $\alpha$  e diversas quimiocinas, que participam do recrutamento de leucócitos e do aumento da inflamação (ABBAS et al., 2012). Outra citocina importante na resposta imunológica contra a TB é a IL10, que atua inibindo as células dendríticas e os macrófagos, suprimindo, portanto, a ativação de linfócitos Th1, em um processo denominado de “feedback” negativo, sendo importante para a estabilidade da resposta, garantindo a homeostasia (OTHIENO et al., 1999).

As células Th2 permitem um equilíbrio no sistema imunológico, pois o excesso de IFN- $\gamma$  poderá causar lesões teciduais. Com isso, essas células produzem IL4 e IL10, que modulam a inibição de IFN- $\gamma$ , garantindo o desenvolvimento de uma resposta imunológica balanceada com população de

células predominantes do tipo Th1, pois estas coordenam a resposta do indivíduo contra o bacilo da TB (MURPLY; TRAVERS; WALPORT, 2008).

Resultados de artigos científicos demonstram que os polimorfismos no gene da IL10 estão associados à predisposição do indivíduo em desenvolver a TB (AWOMOYI et al., 2002; ZHANG, J. et al., 2011).

Além da subpopulação Th1, as células efetoras com o perfil Th17 parecem ser importantes para a defesa do hospedeiro contra a TB, pois essas células secretam IL17, que protege o ser humano contra *M. tuberculosis* (DHEDA et al., 2008; CHEN et al., 2011). Jee et al (2009) relataram que a redução de células com o perfil Th17 em pacientes com TB foi associada à suscetibilidade à TB. No entanto há resultados controversos, mostrando antagonismo entre a resposta Th1 e Th17 na TB (TORRADO; ROBINSON; COOPER, 2011), de forma que o aumento de IL17 leva à diminuição de IFN- $\gamma$ , tornando o indivíduo suscetível a desenvolver TB (MARÍN et al., 2012).

Outro estudo relevante foi realizado por Peng et al (2013), que encontraram na população chinesa uma associação entre o polimorfismo do gene do receptor da IL17 e a suscetibilidade à TB pulmonar.

Os resultados imunogenéticos descritos são essenciais para elucidar os mecanismos da resposta imune contra *M. tuberculosis*, no entanto mais estudos são necessários, pois os polimorfismos (ou perfis genéticos) associados podem ser distintos, dependendo da população selecionada, assim como múltiplos genes podem estar envolvidos; e, certamente, outros polimorfismos ainda não descritos também devem estar associados à TB.

## **2.5. ASPECTOS IMUNOGENÉTICOS DA TUBERCULOSE**

Há várias evidências convincentes de que os fatores genéticos do hospedeiro são essenciais à determinação da suscetibilidade à TB pulmonar (BELLAMY, 1998; HILL, 2001; GOLDFELD, 2004; HILL, 2006; EL BAGHDADI et al., 2013).

Em 1890, um estudo clássico realizado na reserva indígena Qu'Appelle, na província Saskatchewan, localizada no Canadá, avaliou os indígenas quando eles entraram em contato com a TB pela primeira vez. Os dados dessa pesquisa mostraram que a taxa de mortalidade aumentava anualmente em 10%. Depois de 40 anos, mais da metade das famílias indígenas foi eliminada por causa da TB, e a taxa de mortalidade dessa moléstia havia caído apenas em 0,2%. Isso presume que havia forte pressão de seleção, eliminando os indígenas que possuíam genes que os tornavam mais suscetíveis à TB (MOTULSKY, 1989). Acredita-se que os indivíduos que passaram por exposição contínua ao bacilo da TB, sem o desenvolvimento da doença, adquiriram resistência, e tal característica está diretamente relacionada ao perfil genético do hospedeiro (O'BRIEN, 1991).

Entre os fatores genéticos do hospedeiro, os genes relacionados ao sistema imunológico, tais como *IFN- $\gamma$*  (interferon gama), *TNF- $\alpha$*  (fator de necrose tumoral alfa), *NRAMP1* (natural resistance-associated macrophage protein gene 1), *IL10* (interleucina-10), *IL1* (interleucina-1), HLA classe I e II foram associados à suscetibilidade à TB pulmonar (GOLDFELD, 2004; SALLAKCI et al., 2007; SELVARAJ et al., 2008; THUONG et al., 2008).

Dessa maneira, o perfil imunogenético do hospedeiro deve ser considerado um fator essencial a ser estudado nos indivíduos que desenvolveram a TB e também naqueles que foram expostos ao bacilo, mas não desenvolveram a doença, com o propósito de identificar marcadores moleculares associados à TB. Dentre os genes investigados, o do sistema MHC tem sido amplamente associado a diversas doenças infecciosas, incluindo a TB, pois esse sistema é crucial na resposta imunológica.

## **2.6. O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) HUMANO**

O MHC foi descoberto em estudos sobre transplante de tecidos em camundongos por Peter Gorer em 1937 (GORER, 1937). Em 1940, George Snell e seus colegas fizeram uma demonstração experimental do processo de rejeição

em camundongos endogâmicos. Em suas análises genéticas, os pesquisadores identificaram o locus gênico no cromossomo 17 que codificava um antígeno de grupo sanguíneo, o qual foi denominado de antígeno II. Essa região genética era que controlava a rejeição de enxertos e possuía uma grande diversidade de genes, sendo então denominada de Histocompatibilidade-2 (H-2) (ABBAS et al., 2012).

Jean Dausset acreditava que havia um sistema antigênico nos humanos semelhante ao observado em eritrócitos de camundongos; e, em 1952, a intensa busca de moléculas de superfície celular resultou na descoberta do MHC humano (DAUSSET, 1981). Em 1958, por meio de sorologia, o *HLA-A2* foi o primeiro antígeno identificado (DAUSSET, 1958). O trabalho realizado por Jon van Rood, Rose Payne e Walter Bodmer confirmou a existência do sistema HLA, com a identificação dos antígenos 4a, 4b (*Bw4* e *Bw6*) e *HLA-A2*, *HLA-A3*, respectivamente (PAYNE et al., 1964; BODMER, 1972).

A partir dos resultados desses pesquisadores, a busca por novos antígenos do sistema HLA se tornou um campo da ciência muito produtivo; e, graças a essas pesquisas e a um esforço internacional, em 1964, foram iniciados os *workshops* internacionais de histocompatibilidade. Isso facilitou a localização dos genes do HLA no cromossomo 6 e a identificação dos alelos *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* (VANDIEDONCK; KNIGHT, 2009). Na década de 1970, os alelos de HLA classe II foram caracterizados, e os avanços da biologia molecular permitiram a investigação do HLA em nível de genes.

## **2.7. MHC E RESPOSTA IMUNE**

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) tinha como única função a rejeição a enxertos. Isso aumentava a curiosidade da comunidade científica, pois transplante não é um evento natural do processo evolutivo; e todos se perguntavam por que existe um conjunto de genes somente para o processo de rejeição. Durante a década de 1960 e 1970, Baruj Benacerraf, Hugh McDevitt e colaboradores mostraram que os genes do MHC são importantes para as respostas imunes a antígenos proteicos, sendo denominados *genes da*

*resposta imune*; e foi constatado que eram mapeados no MHC (BENACERRAF, 1981; MCDEVITT; SELA, 1965). As moléculas de MHC recebem denominação para cada espécie animal; no camundongo; são conhecidas como histocompatibilidade-2; e, em humanos, como antígenos leucocitários humanos (HLA); o sistema MHC no homem é extremamente amplo.

Os genes de HLA classe I e II codificam moléculas de glicoproteínas que são expressas na superfície celular, cuja função é a apresentação dos peptídeos antigênicos às células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, respectivamente, formando o complexo peptídeo – MHC (ABBAS et al., 2012). Rolf Zinkernagel e Peter Doherty, em 1974, demonstraram que o MHC está envolvido no reconhecimento de antígenos pelas células T (ZINKERNAGEL; DOHERTY, 1974).

O HLA, por ser um sistema altamente polimórfico, confere uma ampla diversidade de moléculas de superfície para reconhecer antígenos proteicos de diversos patógenos. Com isso, induz uma resposta celular eficiente contra o patógeno, garantindo dessa forma uma vantagem seletiva (VANDIEDONCK; KNIGHT, 2009).

A afinidade de ligação do HLA com o epítopo antigênico foi elucidada com o reconhecimento da estrutura tridimensional da molécula de HLA, inicialmente com o *HLA-A2*, uma molécula de classe I (BJORKMAN et al., 1987); e, em 1993, foi relatada a estrutura tridimensional do *HLA-DR1*, molécula de classe II, a partir de membranas das células B, por meio de cristalografia de raio X, mostrando que a molécula de classe II possui estrutura semelhante à de classe I (BROWN et al., 1993).

## **2.8. GENES DO HLA**

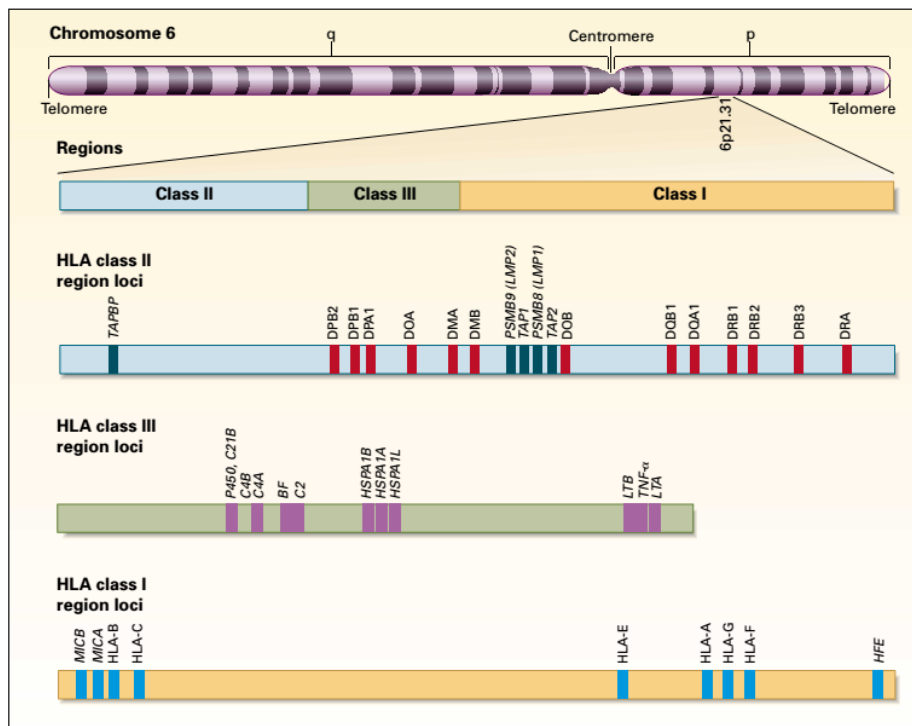
O HLA é constituído por um conjunto de *loci* gênicos com aproximadamente 4 megabases (Mb), contendo mais de 180 genes que codificam uma grande variedade de proteínas que participam da resposta imunológica (YUCESYOY et al., 2013). Todos esses genes estão localizados no

cromossomo 6, braço curto, banda 21, sub-banda 3 (6p21.3) (KLEIN; SATO, 2000).

A expressão dos genes de HLA ocorre de modo codominante em cada indivíduo, ou seja, para um determinado gene do HLA, o indivíduo expressa um alelo herdado do pai e outro alelo herdado da mãe. Essa codominância maximiza o número de moléculas de HLA disponíveis para ligação de peptídeos formando posteriormente o complexo HLA-peptídeo para a apresentação às células T (ABBAS et al., 2012).

Os genes de HLA são os mais polimórficos encontrados em todo o genoma humano, gerando uma diversidade de moléculas (DONADI, 2000), sendo benéficos para o indivíduo, pois essa variedade auxilia o reconhecimento de inúmeros antígenos proteicos pelo sistema imunológico (ORRU et al., 2013).

Tradicionalmente, o HLA é dividido em classe I, II e III (Figura 3). Os genes do sistema HLA codificam moléculas que participam da resposta imune por meio da apresentação de antígenos às células T CD4<sup>+</sup> por HLA classe II e às células T CD8<sup>+</sup> por HLA classe I (KLEIN; SATO, 2000).

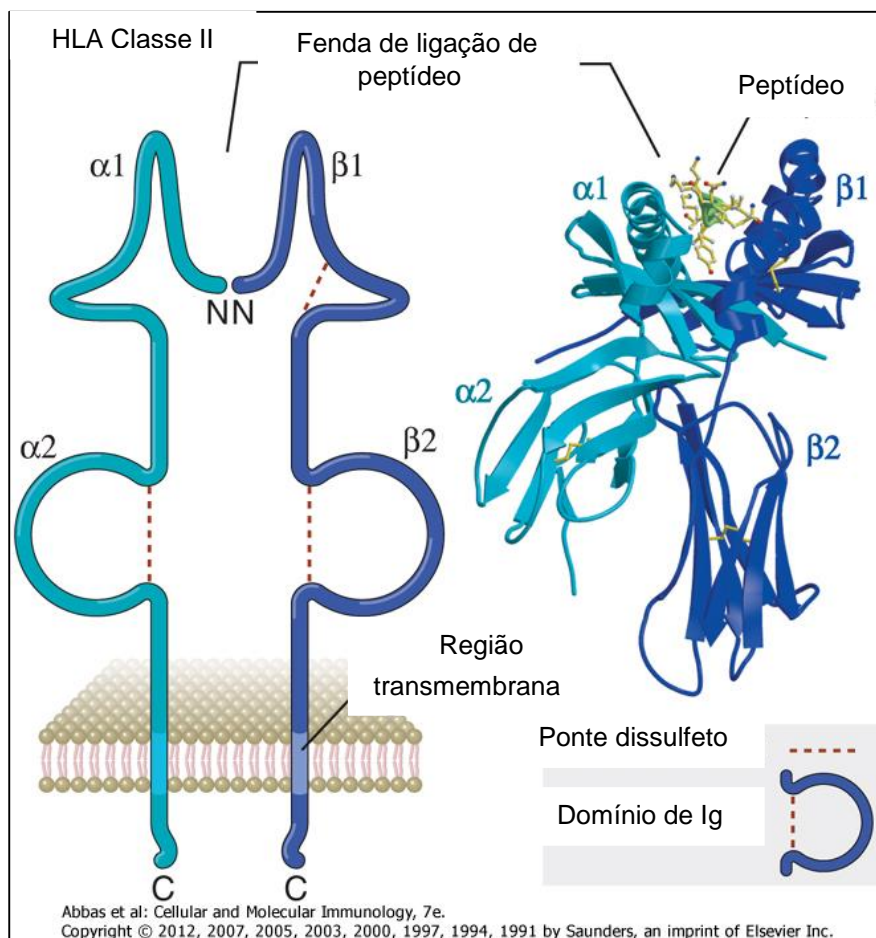


Fonte: KLEIN; SATO (2000).

**Figura 3.** Localização e organização do sistema HLA no cromossomo 6. O sistema é didaticamente dividido em três regiões. Cada região contém diversos genes; apenas alguns são mostrados.



As moléculas de HLA classe II são heterodímeros de glicoproteínas formadas por uma cadeia  $\alpha$  com aproximadamente 34 kDa e uma cadeia  $\beta$  com aproximadamente 28 kDa (POLUEKTOV; KIM; SADEGH-NASSERI, 2013). Essas moléculas estão ligadas de forma não covalente e são expressas constitutivamente nas células dendríticas, linfócitos B e macrófagos. Os segmentos aminoterminais das cadeias  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  interagem para formar a fenda de ligação de peptídeos, enquanto os segmentos  $\alpha 2$  e  $\beta 2$  possuem sítio de ligação para as moléculas coestimuladoras (ABBAS et al., 2012) (Figura 4).



Fonte: ABBAS et al, (2012).

**Figura 4.** Estrutura de uma molécula do HLA de classe II. O diagrama esquemático (à esquerda) ilustra as diferentes regiões da molécula do HLA. As cadeias  $\alpha$  polimórficas estão associadas às cadeias  $\beta$  polimórficas, e ambas são glicosiladas. O diagrama em forma de fita (à direita) mostra a estrutura da porção extracelular da molécula *HLA-DRB1*, com peptídeo ligado.

## 2.9. HLA DE CLASSE II E DOENÇAS

Há, atualmente, 9.437 alelos de HLA classe I e 3.105 alelos de HLA classe II (IMGT/HLA, 2015). Estudos realizados demonstram que os genes de HLA são altamente variáveis na mesma espécie (ROJAS-VILLARRAGA; BOTELLO-CORZO; ANAYA, 2010; GBANNAI; NONAKA, 2013; GUHA et al., 2013). Essa variabilidade possivelmente implicaria a suscetibilidade ou a resistência às doenças, como a TB (GUHA et al., 2013). Com isso, estudos têm associado os polimorfismos do HLA classe I e II a diversas enfermidades (GOLDHABER-FIEBERT et al., 2011; LUCKEY; BASTAKOTY; MANGALAM, 2011; ROSENMAN et al., 2011; ERLICH, 2012; MISHRA, G. et al., 2014; SOHRABI; CARMONA et al., 2015; SHEKARI KHANIANI; MANSOORI DERAKHSHAN, 2015). O quadro 1 mostra as associações entre HLA classe II e as doenças.

**Quadro 1.** Alelos de HLA classe II associados às doenças

| <b>Doenças</b>          | <b>Alelos HLA classe II</b>  | <b>Tipo de associação</b>   |
|-------------------------|--|---|
| Hanseníase              | <i>DRB1*02/DRB1*15/DRB1*16:01</i><br><i>DRB1*04/DRB1*09/DRB1*12</i>  | Suscetibilidade<br>Proteção   |
| Leishmaniose tegumentar | <i>DRB1*04:07/DRB1*13</i><br><i>DPB1*04:01</i>   | Suscetibilidade<br>Proteção   |
| Diabetes tipo I         | <i>DRB1*04:01/DRB1*04:05</i><br><i>DRB1*03:01/DQB1*02:01</i><br><i>DRB1*04:03/DQB1*06:02</i>   | Suscetibilidade<br>Suscetibilidade<br>Proteção  |
| Artrite Reumatoide      | <i>DRB1*01:01/DRB1*01:02</i><br><i>DRB1*01:03/DRB1*03</i><br><i>DRB1*04:01/DRB1*04:02</i><br><i>DRB1*04:03/DRB1*04:04</i><br><i>DRB1*04:05/DRB1*04:07/DRB1*04:08</i> | Suscetibilidade<br>Suscetibilidade<br>Suscetibilidade<br>Suscetibilidade<br>Suscetibilidade |
| Esclerose Múltipla      | <i>DRB5*01:01/HLA-DRB1*15:01</i><br><i>DQB1*06:02</i>  | Suscetibilidade<br>Suscetibilidade  |

Fonte: SOEBONO, H. et al (1997); OLIVO-DIAZ et al (2004); MONTCEL et al (2005); JONES et al (2006); DA SILVA et al (2009); ZHANG, F. et al (2009); RIBAS-SILVA, R. C. et al (2013).

## 2.10. HLA CLASSE II E TUBERCULOSE

A associação entre HLA classe II e a suscetibilidade à TB é particularmente relevante, pois suas moléculas se ligam aos peptídeos antigênicos dos compartimentos endossomais, local em que se encontra o *M. tuberculosis*, enquanto as moléculas do HLA classe I se ligam aos peptídeos antígenos encontrados no citoplasma (CHANG; LINDERMAN; KIRSCHNER, 2008); talvez por isso o HLA classe II seja fundamental à resposta imune contra *M. tuberculosis*.

Em relação à TB, dados contidos em artigos científicos demonstram a associação entre as moléculas de HLA classe II e a suscetibilidade à doença (HILL, 2006; THUONG et al., 2008; EL BAGHDADI et al., 2013;). O primeiro alelo de HLA classe II associado à TB pulmonar foi o *HLA-DQB1\*0503*. Tal resultado foi obtido em uma pesquisa realizada no Camboja. Esse alelo codifica uma substituição do aminoácido valina na posição 57 da molécula HLA-DQ por um ácido aspártico, resultando em uma perda de efetividade de ligação dos antígenos do bacilo, o que conseqüentemente torna o indivíduo suscetível à TB (GOLDFELD, A. E. et al., 1998).

Dentre os alelos de HLA classe II associados à TB foram descritos os seguintes: *HLA-DRB1\*16* (DUBANIEWICZ, ANNA et al., 2000), *HLA-DRB1\*15* (BORNMAN et al., 2004), *HLA-DRB1\*08:03*, *DQB1\*06:01*, *DRB1\*04*, *DQB1\*03*, *DRB1\*14*, *DQB1\*05*, associados à suscetibilidade à TB pulmonar (RUGGIERO et al., 2004; KIM et al., 2005; LOMBARD et al., 2006; SINGH et al., 2007). Em 2011, o estudo realizado em Portugal por Duarte et al (2011) identificou o alelo *HLA-DRB1\*14* como a forma mais frequente nos pacientes com TB. Um estudo de meta-análise envolvendo 31 artigos com 3.416 pacientes com TB e 4.515 controles, encontrou na população asiática os seguintes alelos associados à TB: *HLA-DRB1\*04*, *DRB1\*09*, *DRB1\*10*, *DRB1\*15* e *DRB1\*16* (TONG et al., 2015).

Há descrita uma diversidade de alelos HLA classe II associados à suscetibilidade à TB pulmonar, em que diferentes perfis genéticos são observados, variando de acordo com a população. Dessa maneira, estudos imunogenéticos em diferentes populações são fundamentais para identificar

marcadores moleculares associados à TB, permitindo, com isso, a melhor compreensão dos mecanismos do hospedeiro envolvidos na suscetibilidade e na resistência à doença.

### **3. OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. GERAL**

Identificar os subtipos do *HLA-DRB1\*04* nos pacientes com TB pulmonar e controles a fim de determinar um possível marcador imunogenético associado à doença.

#### **3.2. ESPECÍFICOS**

Determinar a distribuição dos subtipos de *HLA-DRB1\*04* em pacientes com TB pulmonar e grupo controle.

Investigar os subtipos de *HLA-DRB1\*04* associados à TB pulmonar para suscetibilidade ou para proteção no desenvolvimento da doença.

Avaliar as características gerais de pacientes e controles associados à TB pulmonar e sua interação com os genes de *HLA-DRB1\*04*.

Analisar a predição *in silico* das moléculas de HLA, codificadas pelos subtipos de *HLA-DRB1\*04*, possivelmente associadas à TB pulmonar, à proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis*.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. TIPO DE ESTUDO**

O estudo é do tipo caso controle, em que foram determinados os subtipos de *HLA-DRB1\*04* em pacientes com TB pulmonar e nos controles (indivíduos saudáveis).

### **4.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO**

Os pacientes foram selecionados na Policlínica de Referência em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes, Manaus-AM. Foram coletados sangue e escarro dos pacientes diagnosticados com TB pulmonar.

### **4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Foram admitidos para o estudo pacientes com TB pulmonar e controles, ambos nascidos na Amazônia brasileira, não indígenas, cujos pais e avós nasceram e viveram na mesma região, não relacionados entre si (consanguinidade), de ambos os gêneros, com idade entre 18 e 60 anos.

Foram selecionados pacientes com TB pulmonar, na fase inicial da doença, com resultados positivos para baciloscopia ou cultivo.

Os pacientes foram classificados assim: a) Multibacilar – indivíduos que tiveram o escarro positivo para baciloscopia direta ou concentrada; e b) Paucibacilar – indivíduos com resultados negativos para baciloscopia, mas com resultados positivos para o cultivo.

Os controles foram representados por pessoas que estiveram expostas ao *M. tuberculosis*, no entanto não desenvolveram a doença e são saudáveis. Esse grupo foi constituído pelos contatos dos pacientes com TB, sem consanguinidade com os pacientes e entre si. Os contatos são considerados

indivíduos que convivem ou conviveram com os pacientes de TB, mas não desenvolveram a enfermidade.

#### **4.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Pacientes com outras enfermidades além da TB pulmonar, tais como doenças autoimunes, neoplasias, diabetes, HIV positivos ou ainda indivíduos que estavam fazendo uso de algum imunorregulador e gestantes foram excluídos da amostra. Também foram desconsiderados os pacientes de TB com recidivas e TB extrapulmonar.

#### **4.5. INFORMAÇÕES ÉTICAS E DE FINANCIAMENTO**

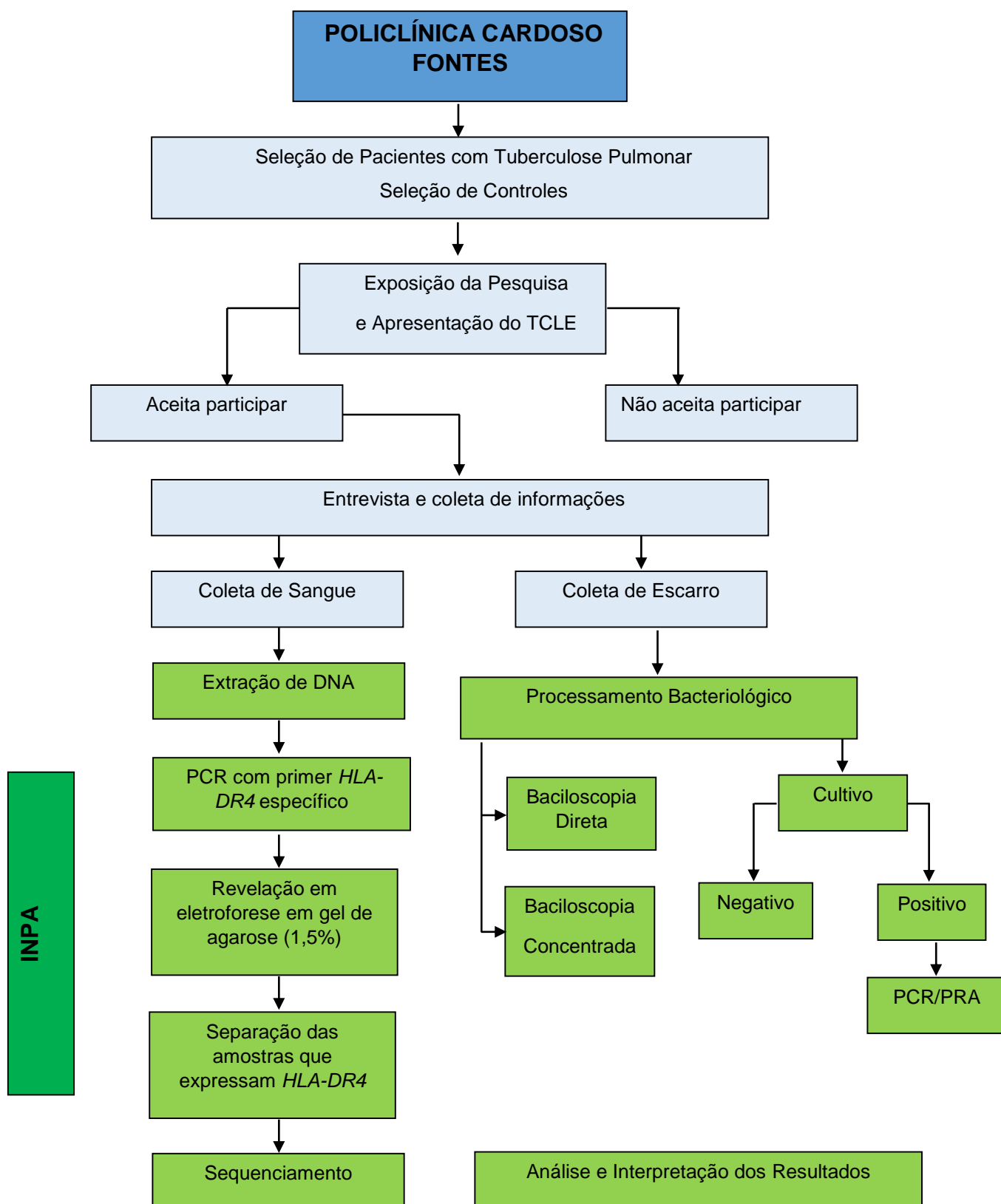
Este projeto está vinculado ao projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal do Amazonas sob n.º CAAE: 0017.0.115.000-08.

A pesquisa recebeu apoio financeiro de projetos aprovados no PIPT/2007 (recurso recebido em 2008) e no PPSUS/2009 (recurso recebido em 2011), coordenados pela orientadora, Professora Doutora Aya Sadahiro.

#### **4.6. ATIVIDADES REALIZADAS**

Na figura 5, está descrito o fluxograma de atividades que foram desenvolvidas no presente estudo.





**Figura 5.** Fluxograma de atividades. \*Controles – Indivíduos saudáveis. O convite para o exame bacteriológico foi oferecido, mas nem todos o realizaram.

#### **4.7. CÁLCULO AMOSTRAL**

O número de amostras biológicas coletadas foi estimado com a utilização do programa Gpower versão 3.1. Foram considerados os dados notificados de tuberculose (TB) pulmonar no ano de 2012, divulgados pela Secretaria Municipal de Saúde de Manaus (SEMSA): 1.770 casos de TB pulmonar registrados na cidade de Manaus. Para realização do cálculo, utilizou-se o valor de  $\alpha = 0,05$  (5%),  $\beta = 0,1$  (10%) obtendo poder estatístico de 0,9 (90%), resultando em um número presumido de 160 pacientes. O número estimado de amostras dos controles foi igual ao número estimado de pacientes. O número total presumido de amostras foi de 320 casos. No entanto o número total de amostras coletadas no presente estudo foi de 622 casos, ou seja, superior ao estimado. Destes, 316 foram amostras de pacientes com TB pulmonar; e 306 representaram amostras de controles.

#### **4.8. AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

Foram coletados 5mL de sangue periférico em tubo com anticoagulante ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) para a extração do DNA de acordo com a técnica rápida com sais de brometo de tetrametilamônio (DTAB/CTAB), proposta por Gustincich et al. (1991).

Após a extração, as amostras de DNA foram diluídas (1:10), quantificadas por espectrofotometria e ajustadas às concentrações de uso. As amostras foram armazenadas em *freezer* a - 20°C.

Os ensaios bacteriológicos foram realizados no Laboratório de Micobacteriologia, localizado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As amostras de escarro de pacientes foram processadas para realização da baciloscopia direta, concentrada e cultivo, conforme descrito por (SALEM et al., 1990; 2007).

#### 4.9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A técnica de PCR foi utilizada para fazer a identificação de amostras de pacientes e controles que expressam o alelo *HLA-DRB1\*04*. Foram utilizados *primers* específicos, 5' GTTTCTTGGAGCAGGTAAAC 3' (AMP4 Forward) e 5' CCTAACCTTCACCCCAACCAC 3' (DR4 Reverse), que foram desenvolvidos com a utilização do *software* SeqBuilder versão 11.

A PCR foi padronizada utilizando amostras de DNA de pacientes e controles confirmados para *HLA-DRB1\*04*. Esse resultado foi obtido de estudos prévios realizados pela nossa equipe de pesquisa com a tipagem de HLA pela técnica de PCR-SSP (Sequence Specific Primer), executada de acordo a orientação do fornecedor. Foi utilizado o *kit* "Micro SSP™ Generic HLA Class II DNA Typing Tray" (One Lambda, 21001 Kittridge Street Canoga Park, CA 91303, EUA).

O protocolo da PCR foi realizado de acordo com os dados descritos no quadro 2. A análise do produto de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR Green e revelado no transiluminador de luz azul.

O tamanho do produto de PCR estimado foi de aproximadamente 700 pares de bases, com cobertura do exon 2 (270 pares de bases) e das regiões intrônicas.

## Quadro 2. Padronização da PCR

| Reagentes                       | [ ]<br>Estoque | [ ]<br>Reação | 1 Reação<br>Vol (µL) | Termociclador<br>Veriti Applied |         |        |
|---------------------------------|----------------|---------------|----------------------|---------------------------------|---------|--------|
| H <sub>2</sub> O                | -              | -             | 13,5                 | Programa: AMP4                  |         |        |
| Buffer PCR                      | 10 X           | 1 X           | 2,5                  |                                 |         |        |
| dNTPs                           | 2 mM           | 0,2 mM        | 2,5                  | Temp.                           | Tempo   | Ciclos |
| MgCl <sub>2</sub>               | 50 mM          | 2 mM          | 1,25                 | 96°C                            | '5:00"  | 1      |
| Primer AMP4 F                   | 10 µM          | 0,2 µM        | 0,5                  | 96°C                            | '1:00"  | 35     |
| Primer DR4 R                    | 10 µM          | 0,2 µM        | 0,5                  | 64,5°C                          | '1:00"  |        |
| Taq DNA Pol                     | 5 U/µL         | 1,25 U        | 0,25                 | 72°C                            | '1:00"  |        |
| DNA                             | 50 ng/µL       | 50 ng/µL      | 4                    | 72°C                            | '10:00" | 1      |
| Volume final                    |                |               | 25                   | 4°C                             | ∞       |        |
| Volume do <i>mix</i> por reação |                |               | 21                   |                                 |         |        |

### 4.10. SEQUENCIAMENTO DO *HLA-DRB1\*04*

A reação de sequenciamento foi realizada pelo método de dideoxynucleotídeos, descrito por Sanger; Nicklen; Coulson (1977). A remoção de *primers* e nucleotídeos não incorporados na PCR, que poderiam interferir na reação de sequenciamento, foi realizada com a utilização de polietilenoglicol (PEG) a 20%. Foi utilizado o *kit* BigDye Terminator versão 3.1 para sequenciar os fragmentos em ambas as direções (*forward* e *reverse*). A leitura foi realizada em eletroforese capilar no sequenciador automatizado ABI 3130xl Genetic Analyzer da Applied Biosystems.

A construção das sequências consensos foi realizada com o *software* Geneious versão R8 e foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados IMGT/HLA.

#### 4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi utilizada para caracterizar o perfil dos pacientes com TB pulmonar e controles que participaram deste projeto; e posteriormente foi aplicado o teste de Qui Quadrado ou Exato de Fisher, dependendo da natureza dos dados, para avaliar as diferenças entre os grupos. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ , e o intervalo de confiança foi de 95%.

Foi realizada regressão logística *stepwise*, com  $p < 0,05$  e intervalo de confiança de 95% (IC), para avaliar nas características gerais de pacientes com TB pulmonar e grupo controle quais variáveis estavam associadas à doença. As variáveis analisadas foram paciente e controle (variáveis dependentes), vacina BCG, tabagismo, consumo de álcool, ocorrência de TB na família, idade, gênero e naturalidade (variáveis independentes).

A interação do gene *HLA-DRB1\*04* com as características gerais foi analisada pela regressão logística *stepwise*. As variáveis independentes que foram associadas com TB pulmonar foram utilizadas em outra análise de regressão logística para avaliar a influência dos subtipos de alelos *HLA-DRB1\*04* associados à TB pulmonar (variável dependente 1) e carga bacilar (variável dependente 2). Foram elaboradas as curvas ROC (Receiver Operating Characteristics) para averiguar a precisão de cada modelo de regressão logística. As análises foram realizadas nos *softwares* GraphPad Prism versão 6 e MedCalc versão 15.

## **5. RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Neste estudo houve a coleta de 622 amostras biológicas; destas, 316 foram de pacientes com tuberculose (TB) pulmonar e 306 de indivíduos saudáveis (grupo controle). As características gerais dos pacientes e controles estão dispostas na Tabela 1. A maioria dos indivíduos foi da cidade de Manaus. Foram observadas diferenças significativas para as pessoas que consomem bebidas alcoólicas ( $p < 0,0001$ ; OR = 7,28; IC 95% = 4,28 – 12,4), tabagismo ( $p < 0,0001$ ; OR = 11,7; IC 95% = 5,66 – 24,1) e gênero ( $p = 0,0002$ ; OR = 1,84; IC 95% = 1,33 – 2,53). Das amostras testadas, 75% foram de pacientes com TB pulmonar multibacilar; e 25%, de paucibacilar.

**Tabela 1.** Características gerais dos pacientes com TB pulmonar e controles

| Características                                   | Pacientes n = 316 (%) | Controles n = 306 (%) |
|---|-----------------------|-----------------------|
| <b>Gênero</b>                                     |                       |                       |
| Masculino, n (%)                                  | 194 (61,4%)           | 142 (46,4%)           |
| Feminino, n (%)                                   | 122 (38,6%)           | 164 (53,6%)           |
| Idade (anos), (M <sup>a</sup> e SD <sup>b</sup> ) | 36±12,6               | 35±10,7               |
| <b>Vacina BCG</b>                                 |                       |                       |
| Sim, n (%)  | 212 (67,0%)           | 180 (58,8%)           |
| Não, n (%)  | 25 (8,00%)            | 36 (11,8%)            |
| Não sabe, n (%)                                   | 79 (25,0%)            | 90 (29,4%)            |
| <b>Consumo de álcool<sup>c</sup></b>              |                       |                       |
| Sim, n (%)  | 87 (27,5%)            | 20 (6,5%)             |
| Não, n (%)  | 135 (42,7%)           | 226 (73,9%)           |
| Sem dados, n (%)                                  | 94 (29,8%)            | 60 (19,6%)            |
| <b>Tabagismo<sup>d</sup></b>                      |                       |                       |
| Sim, n (%)  | 69 (21,8%)            | 9 (3,0%)              |
| Não, n (%)  | 153 (48,4%)           | 233 (76,0%)           |
| Sem dados, n (%)                                  | 94 (29,8%)            | 64 (21,0%)            |
| <b>Naturalidade</b>                               |                       |                       |
| Manaus, n (%)                                     | 133 (42,1%)           | 191 (62,4%)           |
| Outros municípios do Amazonas                     | 80 (25,3%)            | 80 (26,2%)            |
| Outros estados da Amazônia brasileira             | 103 (32,6%)           | 35 (11,4%)            |

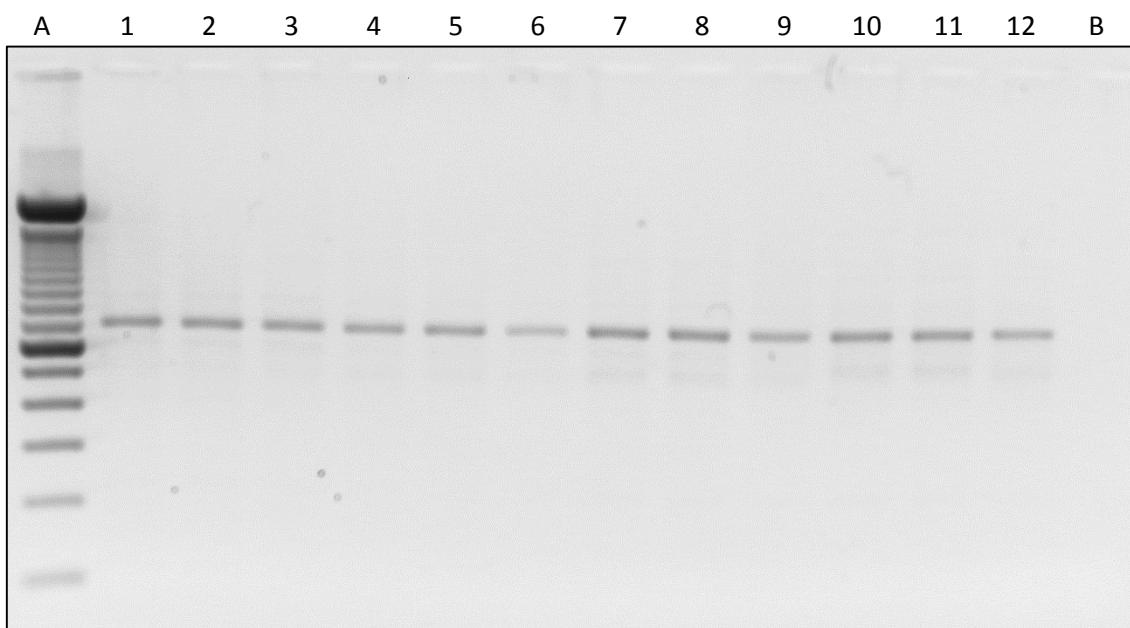
<sup>a</sup> Média; <sup>b</sup> Desvio padrão

<sup>c</sup> Consumo de álcool: indivíduos que consumiam  $\geq 4$  doses para mulheres e  $\geq 5$  doses para homens, em uma mesma ocasião, dentro dos últimos 30 dias (BRASIL, 2014). 1 dose = 30 mL de destilado (ou 12g de álcool puro).

<sup>d</sup> Tabagismo: foram definidos como tabagistas os que fizeram uso de cigarro diariamente, durante um período de um ano ou mais (DEN BOON et al., 2005).

## 5.2. IDENTIFICAÇÃO DO ALELO *HLA-DRB1\*04* NOS PACIENTES E CONTROLES POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Das 622 amostras submetidas ao processo de PCR, 288 foram positivas para o alelo *HLA-DRB1\*04*, sendo 59,2% de pacientes com TB pulmonar (187/316) e 33,0% de controles (101/306). Na Figura 6, é possível observar o resultado da PCR de 12 amostras de pacientes com TB pulmonar.



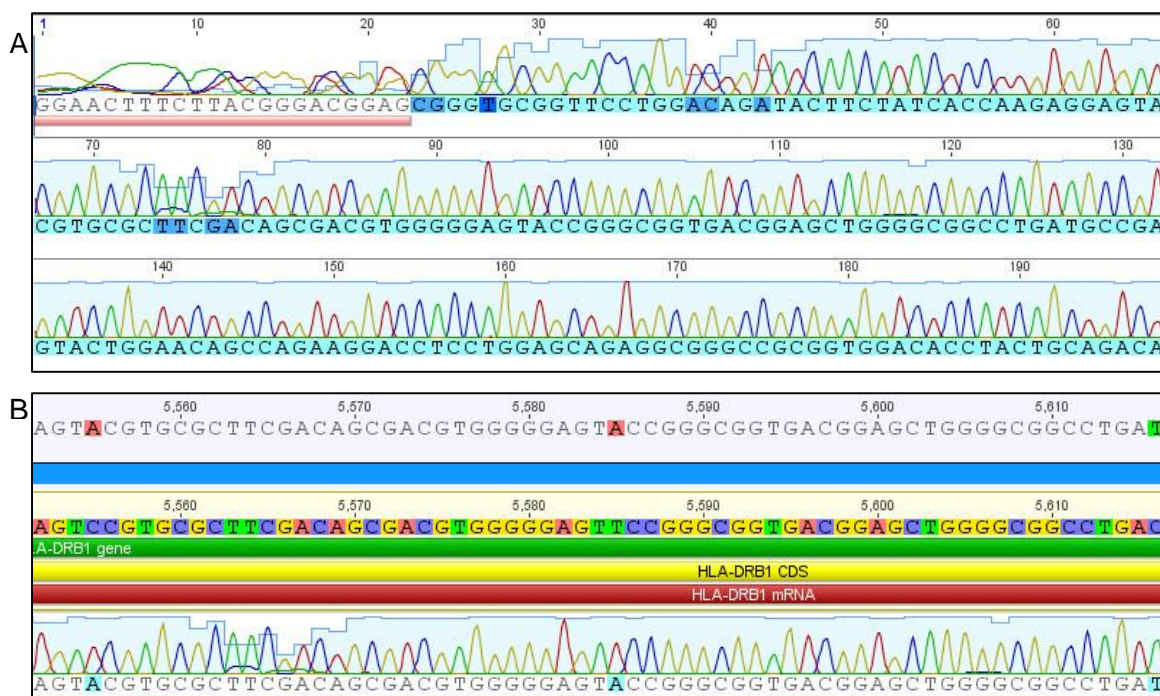
**Figura 6.** Gel de agarose 1,5%, corado com SYBR Green, revelado no transiluminador de luz azul. Detecção de *HLA-DRB1\*04* após corrida com os seguintes parâmetros: Voltagem 130, Ampere 110, tempo 60 minutos. *Ladder* de 100 pares de bases (A), amostras de pacientes com TB pulmonar (1 – 12), controle negativo (B). Foram utilizados 4 $\mu$ L de produto de PCR.

Após análise estatística dos dados, pelo teste Qui Quadrado com correção de Yates, observou-se forte associação do alelo *HLA-DRB1\*04* para suscetibilidade à TB pulmonar ( $p < 0,0001$ ; OR = 2,94; IC 95% = 2,12 - 4,08).



### 5.3. RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS DE *HLA-DRB1\*04* DE PACIENTES COM TB PULMONAR E CONTROLES

As 288 amostras positivas para *HLA-DRB1\*04*, sendo 187 pacientes e 101 controles, foram submetidas ao sequenciamento para subtipagem. Na Figura 7, consta um dos resultados do sequenciamento de DNA do alelo *HLA-DRB1\*04*.



**Figura 7.** Leitura da sequência de DNA do *HLA-DRB1\*04*. Cada uma das quatro cores (azul, verde, amarelo e vermelho) representa uma base nitrogenada diferente (A). Para as construções das sequências consenso, foi utilizado o gene *HLA-DRB1* como sequência de referência, gene ID:3123. É possível identificar na sequência consenso polimorfismo de base única, com destaque em vermelho e verde (B).

As amostras foram sequenciadas com sucesso, tendo sido identificados nove subtipos de *HLA-DRB1\*04*, conforme listados na Tabela 2.

Os resultados de sequenciamento foram alinhados com as sequências depositadas no Banco de Dados do IMGT/HLA (BLASTn). Além disso, foram indicadas as origens étnicas conhecidas para cada subtipo do *HLA-DRB1\*04*, de acordo com os dados fornecidos pelo IMGT/HLA (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados das análises das sequências de nucleotídeos obtidas e alinhadas com as sequências do IMGT/HLA e a origem étnica conhecida

| Alelos<br>HLA-DRB1*04 | Score | Comprimento<br>Obtido (IMGT) | %<br>Identidade | %<br>Positividade | Origem Étnica  |
|-----------------------|-------|------------------------------|-----------------|-------------------|--|
| <i>DRB1*04:01:01</i>  | 1085  | 561 (801 bp)                 | 100             | 100               | Caucasoide, Oriental   |
| <i>DRB1*04:02:01</i>  | 1085  | 561 (801 bp)                 | 100             | 100               | Caucasoide   |
| <i>DRB1*04:03:01</i>  | 1085  | 561 (801 bp)                 | 100             | 100               | Caucasoide   |
| <i>DRB1*04:04:01</i>  | 1085  | 561 (801 bp)                 | 100             | 100               | Caucasoide   |
| <i>DRB1*04:05:01</i>  | 1085  | 561 (801 bp)                 | 100             | 100               | Caucasoide, Oriental   |
| <i>DRB1*04:06:01</i>  | 1085  | 560 (801 bp)                 | 100             | 100               | Caucasoide, Oriental   |
| <i>DRB1*04:07:01</i>  | 1076  | 561 (801 bp)                 | 99              | 99                | Caucasoide,<br>Hispânico <sup>a</sup>  |
| <i>DRB1*04:11:01</i>  | 1085  | 561 (801 bp)                 | 100             | 100               | Aborígenes<br>australianos,<br>Hispânico <sup>a</sup> , Mestiço <sup>b</sup> |
| <i>DRB1*04:92</i>     | 1076  | 561 (663 bp)                 | 99              | 99                | Desconhecido <sup>c</sup>  |

<sup>a</sup> Hispânicos: indivíduos miscigenados de caucasoides do Mediterrâneo e ameríndios; <sup>b</sup> Mestiços: mistura de várias raças; <sup>c</sup> Desconhecido: sem associação a nenhum grupo étnico.

#### 5.4. DISTRIBUIÇÃO E ANÁLISE DOS SUBTIPOS DE ALELOS *HLA-DRB1\*04* EM PACIENTES COM TB PULMONAR E CONTROLES

As frequências dos nove subtipos de *HLA-DRB1\*04* identificados nas 288 amostras de pacientes de TB pulmonar (n=187) e controles (n=101) estão descritas na Tabela 3.

Os subtipos mais frequentes na população investigada foram os seguintes: *HLA-DRB1\*04:04:01* (22,5%) e *HLA-DRB1\*04:11:01* (50,8%). Este último subtipo, juntamente com o *HLA-DRB1\*04:92*, foi fortemente associado à suscetibilidade para TB pulmonar (Tabela 3), enquanto o *HLA-DRB1\*04:07:01* foi associado à proteção à doença e não foi encontrado nos pacientes com TB pulmonar (Tabela 3).

**Tabela 3.** Distribuição e análise de associação dos subtipos de *HLA-DRB1\*04* em pacientes com TB pulmonar e grupo controle

| Alelos<br><i>HLA-DRB1*04</i> | Pacientes<br>n = 187 (%) | Controles<br>n = 101 (%) | p<br>valor <sup>a</sup> | OR    | IC 95%       |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------|--------------|
| <i>DRB1*04:01:01</i>         | 6 (3,2)                  | 6 (5,9)                  | 0,3544                  | 0,525 | 0,165 – 1,67 |
| <i>DRB1*04:02:01</i>         | 9 (4,8)                  | 9 (8,9)                  | 0,2039                  | 0,517 | 0,198 – 1,35 |
| <i>DRB1*04:03:01</i>         | 9 (4,8)                  | 9 (8,9)                  | 0,2039                  | 0,517 | 0,198 – 1,35 |
| <i>DRB1*04:04:01</i>         | 42 (22,5)                | 28 (27,7)                | 0,3185                  | 0,755 | 0,434 – 1,32 |
| <i>DRB1*04:05:01</i>         | 2 (1,1)                  | 3 (3,0)                  | 0,3479                  | 0,353 | 0,058 – 2,15 |
| <i>DRB1*04:06:01</i>         | 3 (1,6)                  | 2 (2,0)                  | 1,0000                  | 0,807 | 0,133 – 4,91 |
| <i>DRB1*04:07:01</i>         | 0 (0,0)                  | 12 (11,9)                | 0,0001                  | 0,019 | 0,001 – 0,33 |
| <i>DRB1*04:11:01</i>         | 95 (50,8)                | 32 (31,7)                | 0,0019                  | 2,23  | 1,34 – 3,70  |
| <i>DRB1*04:92</i>            | 21 (11,2)                | 0 (0,0)                  | 0,0002                  | 26,21 | 1,57 – 438   |

<sup>a</sup> Obtido pelo Teste Exato de Fisher; nível de significância  $p < 0,05$

### 5.5. ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA DAS CARACTERÍSTICAS GERAIS (VARIÁVEIS) DOS PACIENTES DE TB PULMONAR E CONTROLES

Os dados das características gerais descritas na Tabela 1, de 316 pacientes com TB pulmonar e 306 controles, foram utilizados para a análise de regressão logística *stepwise*.

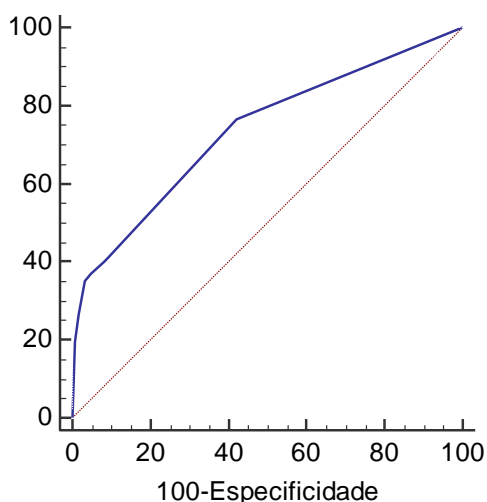
Da análise realizada, somente as variáveis consumo de álcool, gênero (masculino) e tabagismo foram associadas à TB pulmonar, conforme resultados descritos na Tabela 4.

A curva ROC (Figura 7) obtida neste estudo serviu para validar o modelo utilizado da regressão logística *stepwise*, que apresentou a área sob curva de 0,734, sendo esse valor considerado aceitável e confiável para validação do teste utilizado.

**Tabela 4.** Resultado da análise de regressão logística *stepwise* com as variáveis associadas à TB pulmonar

| Variáveis          | <i>p</i> valor | OR   | IC 95%      |
|--------------------|----------------|------|-------------|
| Consumo de álcool  | 0,0016         | 4,32 | 1,74 – 10,7 |
| Gênero (Masculino) | 0,0001         | 2,69 | 1,64 – 4,40 |
| Tabagismo          | 0,0442         | 3,16 | 1,03 – 9,69 |

Nível de significância  $p < 0,05$



**Figura 8.** Curva ROC para o modelo de regressão logística *stepwise* com as variáveis independentes (consumo de álcool, tabagismo e gênero masculino) associadas à TB pulmonar (AUC = 0,734; IC 95% = 0,68 – 0,78;  $p < 0,0001$ ).

## 5.6. ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES E INTERAÇÃO COM GENES DE *HLA-DRB1\*04*

Outra análise importante realizada neste trabalho foi verificar se a interação das variáveis independentes com os genes de *HLA-DRB1\*04* influenciaria aumentando ou não o risco de suscetibilidade à TB pulmonar. Somente os dados dos 187 pacientes de TB pulmonar e dos 101 controles, positivos para *HLA-DRB1\*04*, foram utilizados para essa análise de regressão logística *stepwise*.

### 5.6.1. ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES E O GENE *HLA-DRB1\*04* (GENÉRICO) VERSUS TB PULMONAR

Na análise de regressão logística, o consumo de álcool com a interação do gene *HLA-DRB1\*04* apresentou forte associação à TB pulmonar e aumentou, de forma significativa, o risco de suscetibilidade à doença (Tabela 5), quando comparado ao resultado na ausência do gene (Tabela 4).

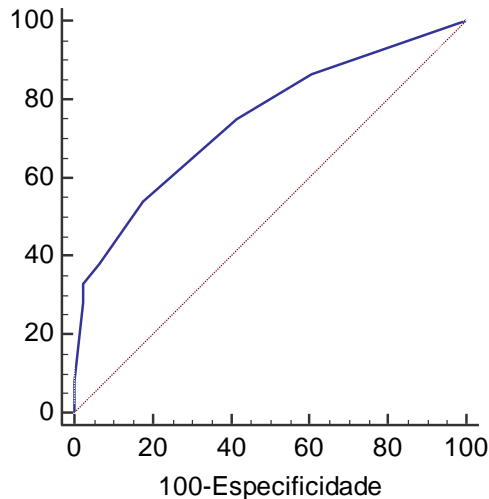
Quanto às variáveis gênero (masculino) e tabagismo, a interação com o gene *HLA-DRB1\*04* não alterou o risco de suscetibilidade à TB pulmonar. Além disso, para a variável tabagismo, a interação com o gene não foi estatisticamente significativa (Tabela 5). As demais variáveis testadas – vacinados ou não para BCG, idade e naturalidade – não apresentaram resultados significativos (dados não apresentados).

A curva ROC também foi gerada para essa análise de regressão logística *stepwise*, das variáveis independentes e do gene *HLA-DRB1\*04*, com o valor da área sob a curva de 0,745, demonstrando, assim, a precisão e a confiabilidade do modelo de regressão utilizado (Figura 8).

**Tabela 5.** Resultado da análise de regressão logística *stepwise*, com as variáveis consumo de álcool, gênero e tabagismo, incluindo o alelo *HLA-DRB1\*04*

| Variáveis          | <i>p</i> valor | OR   | IC 95%      |
|--------------------|----------------|------|-------------|
| Consumo de álcool  | < 0,0001       | 8,43 | 3,85 – 18,5 |
| Gênero (Masculino) | 0,0001         | 2,71 | 1,66 – 4,43 |
| Tabagismo          | 0,0564         | 2,99 | 0,97 – 9,26 |
| <i>HLA-DRB1*04</i> | 0,0143         | 1,92 | 1,14 – 3,23 |

Nível de significância  $p < 0,05$



**Figura 9.** Curva ROC para o modelo de regressão logística *stepwise* com as variáveis independentes e a interação com o gene *HLA-DRB1\*04*, associadas à TB pulmonar (AUC = 0,745; IC 95% = 0,70 – 0,79;  $p < 0,0001$ ).

#### **5.6.2. ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES E INTERAÇÃO COM OS SUBTIPOS *HLA-DRB1\*04:11:01* E *HLA-DRB1\*04:92* VERSUS TB PULMONAR**

Para a análise da regressão logística com as variáveis independentes e interação com os subtipos de HLA, somente a variável consumo de álcool e o alelo *HLA-DRB1\*04:11:01* apresentaram dados estatisticamente significativos, com risco extremamente elevado de suscetibilidade à TB pulmonar (Tabela 6), quando comparado aos resultados anteriores para consumo de álcool sem a interação com esse alelo (Tabela 4 e 5).

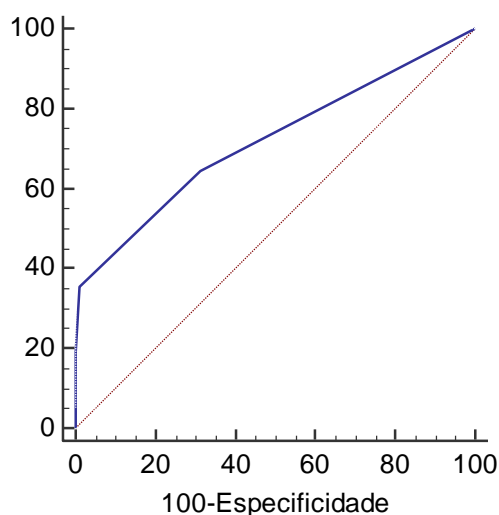
Embora o subtipo *HLA-DRB1\*04:92* tenha sido associado à TB pulmonar com elevado risco de desenvolver a doença (Tabela 3), nesta análise de interação, com as variáveis independentes, não foi observada nenhuma associação.

A Curva ROC do modelo de regressão logística *stepwise* com variáveis consumo de álcool e alelo *HLA-DRB1\*04:11:01* atingiu o valor da área sob a curva de 0,719, indicando que os resultados desse modelo foram válidos (Figura 9).

**Tabela 6.** Resultado da análise de regressão logística *stepwise* com as variáveis consumo de álcool e alelo *HLA-DRB1\*04:11:01* associadas à TB pulmonar

| Variáveis                | p valor | OR   | IC 95%      |
|--------------------------|---------|------|-------------|
| Consumo de álcool        | 0,0001  | 51,3 | 6,81 – 386  |
| <i>HLA-DRB1*04:11:01</i> | 0,0265  | 2,13 | 1,09 – 4,14 |

Nível de significância  $p < 0,05$



**Figura 10.** Curva ROC para o modelo de regressão logística *stepwise* com as variáveis consumo de álcool e alelo *HLA-DRB1\*04:11:01* associadas à TB pulmonar (AUC = 0,719; IC 95% = 0,65 – 0,78;  $p < 0,0001$ ).

### 5.6.3. ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA DA VARIÁVEL CONSUMO DE ÁLCOOL E INTERAÇÃO COM OS SUBTIPOS *HLA-DRB1\*04:11:01* E *HLA-DRB1\*04:92* VERSUS TRANSMISSÃO DA TB PULMONAR

Após ter identificado que a variável consumo de álcool e genes de *HLA-DRB1\*04* (genérico) e *HLA-DRB1\*04:11:01* (subtipo) estão fortemente associados à suscetibilidade para TB pulmonar (Tabelas 5 e 6), outra análise de regressão logística foi incluída no estudo, que foi verificar se esses fatores (consumo de álcool e genes) poderiam também estar vinculados à carga bacilar, ou seja, se existiria associação com pacientes de TB pulmonar das formas multibacilar e paucibacilar.

Para essa análise de regressão logística, foram avaliadas as variáveis consumo de álcool e os genes de *HLA-DRB1\*04* nos pacientes de TB pulmonar multibacilar e paucibacilar.

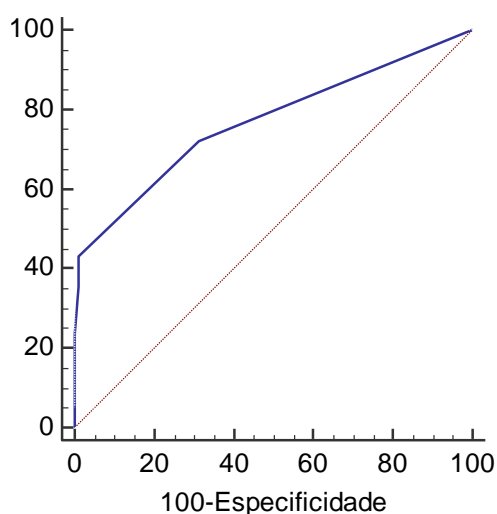
O consumo de álcool, os subtipos *HLA-DRB1\*04:11:01* e *HLA-DRB1\*04:92* foram associados à TB pulmonar da forma multibacilar, conforme resultados descritos na Tabela 7.

Para validar o modelo de regressão logística *stepwise*, com as variáveis consumo de álcool e os alelos *HLA-DRB1\*04:11:01* e *DRB1\*04:92* associados à transmissão da TB, foi elaborada a curva ROC (figura 10), com valor da área sob curva de 0,743 considerado preciso e confiável.

**Tabela 7.** Resultado da análise de regressão logística *stepwise* com as variáveis consumo de álcool e os alelos *HLA-DRB1\*04:11:01* e *DRB1\*04:92* associadas à carga bacteriana

| Variáveis                | p valor | OR   | IC 95%      |
|--------------------------|---------|------|-------------|
| Consumo de álcool        | 0,0026  | 11,1 | 3,99 – 30,9 |
| <i>HLA-DRB1*04:92</i>    | 0,0112  | 8,62 | 1,63 – 45,5 |
| <i>HLA-DRB1*04:11:01</i> | 0,0442  | 2,01 | 1,03 – 3,93 |

Nível de significância  $p < 0,05$



**Figura 11.** Curva ROC para o modelo de regressão logística *stepwise* com variáveis consumo de álcool e os alelos *HLA-DRB1\*04:11:01* e *DRB1\*04:92* associadas à carga bacteriana (AUC = 0,743; IC 95% = 0,68 – 0,80;  $p < 0,0001$ ).



## 5.7. ANÁLISE DE LIGAÇÃO COMPUTACIONAL (*IN SILICO*) DE MOLÉCULAS CODIFICADAS PELOS ALELOS *HLA-DRB1\*04:11:01* E *DRB1\*04:07:01* COM ESAT-6 DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Foram realizadas as predições dos epítomos imunodominantes do antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv e sua ligação com as moléculas codificadas pelos alelos *HLA-DRB1\*04:11:01* e *DRB1\*04:07:01*. Foi utilizado o antígeno 6 kDa alvo antigênico precocemente secretado ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target of 6 kDa), número de acesso Rv3875.

As predições dos epítomos imunodominantes de ESAT-6 e suas ligações com as moléculas codificadas pelos alelos *HLA-DRB1\*04:11:01* e *DRB1\*04:07:01* foram realizadas com análise de algoritmos (*in silico mapping*) pelo método NetMHCIIpan (NIELSEN, M. et al., 2010) no Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB).

As ligações entre epítomos de ESAT-6 com as moléculas de HLA, codificadas pelos alelos *HLA-DRB1\*04:11:01* e *DRB1\*04:07:01*, estão categorizadas em percentil, conforme os resultados descritos na Tabela 8. Os baixos valores de percentil mostram os fragmentos com as melhores afinidades de ligações. É importante destacar que as regiões centrais devem representar os fragmentos dos antígenos que interagem com as moléculas de HLA, determinando a afinidade de ligação e a especificidade. A análise de predição para o *HLA-DRB1\*04:92* não foi realizada, pois esse HLA não está ainda no banco de dados do IEDB.

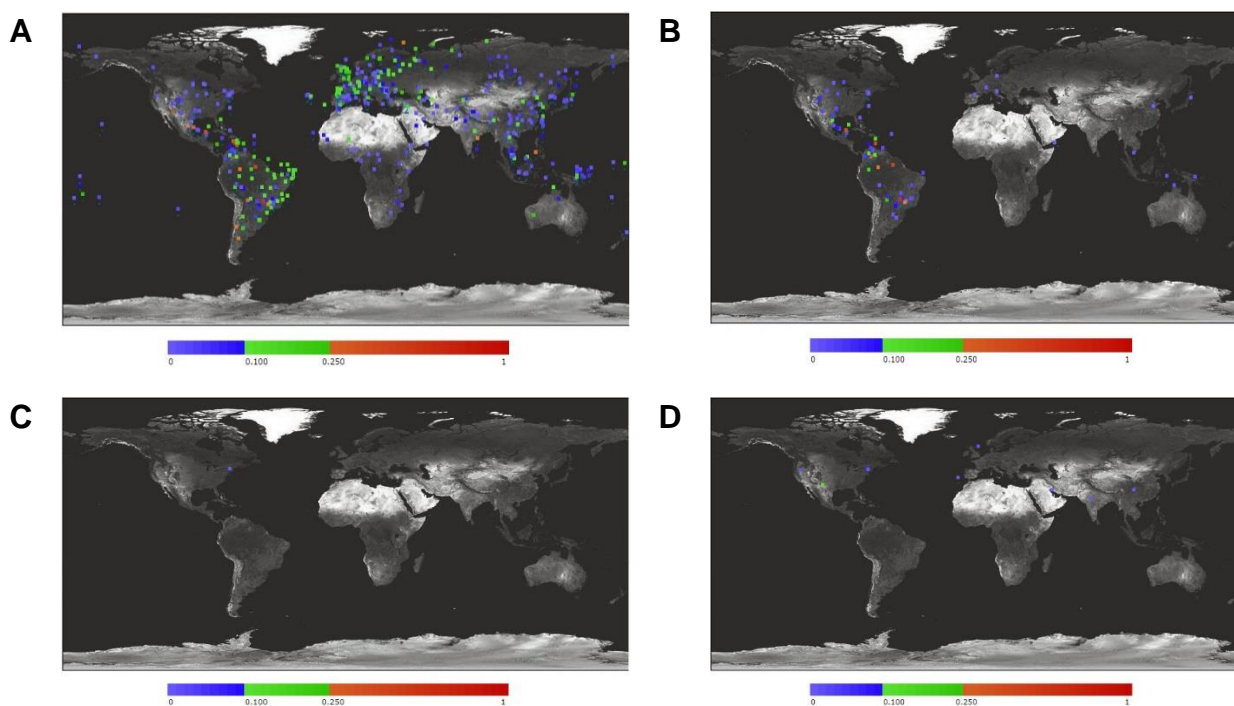
**Tabela 8.** Predição de ligação dos epítomos de ESAT-6 com as moléculas de HLA, codificadas pelos alelos *HLA-DRB1\*04:11:01* e *DRB1\*04:07:01*

| Alelos<br><i>HLA-DRB1*04</i> | Antígenos início-fim    | Sequências       | Regiões centrais | Percentil rank |
|------------------------------|-------------------------|------------------|------------------|----------------|
| <i>DRB1*04:07:01</i>         | ESAT-6 <sub>5-19</sub>  | QWNFAGIEAAASAIQ  | FAGIEAAAS        | 1,58           |
| <i>DRB1*04:07:01</i>         | ESAT-6 <sub>4-18</sub>  | QQWNFAGIEAAASAI  | FAGIEAAAS        | 1,96           |
| <i>DRB1*04:07:01</i>         | ESAT-6 <sub>6-20</sub>  | WNFAGIEAAASAIQG  | FAGIEAAAS        | 3,78           |
| <i>DRB1*04:07:01</i>         | ESAT-6 <sub>3-17</sub>  | EQQWNFAGIEAAASA  | FAGIEAAAS        | 4,55           |
| <i>DRB1*04:07:01</i>         | ESAT-6 <sub>7-21</sub>  | NFAGIEAAASAIQGN  | FAGIEAAAS        | 8,31           |
| <i>DRB1*04:07:01</i>         | ESAT-6 <sub>2-16</sub>  | TEQQWNFAGIEAAAS  | FAGIEAAAS        | 9,92           |
| <i>DRB1*04:11:01</i>         | ESAT-6 <sub>19-33</sub> | QGNVTSIHSLLDDEGK | VTSIHSLLD        | 13,3           |
| <i>DRB1*04:11:01</i>         | ESAT-6 <sub>18-32</sub> | IQGNVTSIHSLLDDEG | VTSIHSLLD        | 13,5           |
| <i>DRB1*04:11:01</i>         | ESAT-6 <sub>17-31</sub> | AIQGNVTSIHSLLDE  | VTSIHSLLD        | 16,1           |
| <i>DRB1*04:11:01</i>         | ESAT-6 <sub>62-76</sub> | ATELNNALQNLARTI  | LNNALQNLA        | 16,2           |
| <i>DRB1*04:11:01</i>         | ESAT-6 <sub>5-19</sub>  | QWNFAGIEAAASAIQ  | FAGIEAAAS        | 16,6           |
| <i>DRB1*04:11:01</i>         | ESAT-6 <sub>16-30</sub> | SAIQGNVTSIHSLLD  | VTSIHSLLD        | 16,7           |

Percentil rank ≤ 10,0 – melhor ligante

## 5.8. DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE *HLA-DRB1\*04* NO MUNDO

As informações da distribuição do *HLA-DRB1\*04* foram obtidas no banco de dados “The Allele Frequency Net Database” (AFND). O alelo genérico apresenta a maior frequência nas populações do continente americano (América do Sul e Central), conforme Figura 11A. E o subtipo *HLA-DRB1\*04:11:01* também tem maior frequência nas populações do continente americano (América do Sul e Central), consoante Figura 11B, embora a origem étnica desse alelo inclua os aborígenes australianos, além dos hispânicos e dos mestiços (Tabela 2). Os subtipos *HLA-DRB1\*04:92* e *HLA-DRB1\*04:07:01* são, respectivamente, mais frequentes nos Estados Unidos (Figura 11C) e no México (Figura 11D). De acordo com os dados informados, os subtipos envolvidos na TB pulmonar (Tabela 3) são frequentes nas Américas.



**Figura 12.** Distribuição das frequências de *HLA-DRB1\*04* no mundo. Alelo genérico *HLA-DRB1\*04* (A) e subtipo *HLA-DRB1\*04:11:01* (B) são mais frequentes nas populações do continente americano (América do Sul e Central). O subtipo *HLA-DRB1\*04:92* (C) é mais frequente nos Estados Unidos, e o subtipo *HLA-DRB1\*04:07:01* (D) é mais frequente no México. Abaixo do mapa, encontra-se a escala decimal de frequência alélica; as cores azul, verde e vermelho representam baixa, intermediária e alta frequência, respectivamente. Fonte: GONZÁLEZ-GALARZA et al (2014), citação recomendada pelo banco de dados AFND.

## **6. DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que foi considerada como prioridade pela OMS em 1993. Isso colaborou com grandes progressos, visando à detecção, ao tratamento e à cura dessa enfermidade. Apesar dos avanços, a TB ainda continua sendo um dos principais problemas na saúde pública, acometendo milhões de pessoas a cada ano; e é responsável por milhões de óbitos (WHO, 2014).

Há diversos fatores de risco associados à suscetibilidade à TB, tais como pessoas infectadas com o vírus HIV (BEKKER; WOOD, 2010; GETAHUN et al., 2010), *diabetes mellitus* (GOLDHABER-FIEBERT et al., 2011; DOBLER; FLACK; MARKS, 2012), tabagismo (JEE et al., 2009; GAMBHIR et al., 2010), consumo de álcool (LONNROTH et al., 2008; COIS; EHRLICH, 2013), condição nutricional (CEGIELSKI; ARAB; CORNONI-HUNTLEY, 2012; BHARGAVA et al., 2013), genes do hospedeiro relacionados ao sistema imunológico (AMIRZARGAR et al., 2004; SAHIRATMADJA et al., 2007; MA et al., 2010; ZHANG, Z. et al., 2012; LÜ et al., 2014).

Entre os fatores imunogenéticos do hospedeiro, os genes de HLA têm sido frequentemente associados à TB pulmonar (DUARTE et al., 2011; MAGIRA, E. et al., 2012; MISHRA, G. et al., 2014; SU; LI; SUN, 2014). Isso se deve ao fato de o sistema HLA exercer um papel fundamental durante o processo de apresentação de antígenos aos linfócitos T helper (Th).

Dos genes de HLA, os resultados mais consistentes associados à TB pulmonar têm sido com alelos de HLA classe II, quando comparados aos de HLA classe I (LINDENAU et al., 2014).

No presente estudo, o alelo *HLA-DRB1\*04* foi fortemente associado à suscetibilidade à TB pulmonar, sendo estatisticamente significativo ( $p < 0,0001$ ; OR = 2,94; IC 95% = 2,12- 4,08). Esse resultado corrobora com o observado por Lucena-Silva et al (2010), na população de Recife ( $p = 0,0324$ ; OR = 2,44), que também identificaram o alelo *HLA-DRB1\*04*, associado à TB, assim como a meta-análise realizada por Tong et al (2015), que demonstraram a mesma associação na população asiática ( $p < 0,001$ ; OR = 1,39; IC 95% = 1,21 – 160).

Esses resultados mostram a importância do sistema de HLA classe II, pois as moléculas produzidas, normalmente, estão envolvidas na apresentação de antígenos proteicos de patógenos fagocitados.

Os complexos formados de HLA classe II e os peptídeos são apresentados aos linfócitos Th; e, se o local estiver favorável a IL-12 e IFN-gama, há predomínio da resposta celular Th1, considerada protetora contra o bacilo da TB (O'GARRA, A. et al., 2013).

Embora vários trabalhos confirmem a associação entre *HLA-DRB1\*04* e a suscetibilidade à TB, há um estudo realizado na população mexicana que encontrou risco reduzido para TB nos indivíduos com *HLA-DRB1\*04*, estando associado à proteção (OR = 0,24; IC 95% = 0,07 – 0,84) (TERÁN-ESCANDÓN et al., 1999). Nesse caso, vale ressaltar que a maioria dos estudos de HLA apresentava como limitação o uso de técnicas de tipagens por baixa resolução. Com isso, não era possível identificar quais subtipos de *HLA-DRB1\*04* estariam de fato associados à TB pulmonar, indicando provavelmente que o subtipo desse HLA, ligado à proteção na população mexicana, deve ser diferente dos subtipos que foram associados à suscetibilidade à TB.

Além disso, não eram realizadas as análises da interação do fator genético com outras variáveis sabidamente envolvidas na TB, tais como consumo de álcool, tabagismo e gênero.

Nos resultados observados neste trabalho, os indivíduos apresentaram fortes associações à suscetibilidade à TB pulmonar, como consumo de álcool ( $p = 0,0016$ ; OR = 4,32; IC 95% = 1,74 – 10,7), tabagismo ( $p = 0,0442$ ; OR = 3,16; IC 95% = 1,03 – 9,69) e gênero, sendo os homens os mais afetados ( $p = 0,0001$ ; OR = 2,69; IC 95% = 1,64 – 4,40). Esses resultados coincidem com os de outros trabalhos realizados por Gambhir et al (2010), Cois, Ehrlich (2013) e Reed et al (2013).

Quando o alelo genérico de *HLA-DRB1\*04* foi analisado junto com consumo de álcool, tabagismo e gênero, a interação do alelo *HLA-DRB1\*04* ( $p = 0,0143$ ; OR = 1,92; IC 95% = 1,14 – 3,23) com as variáveis consumo de álcool e gênero (homens mais afetados) aumentou o risco para TB pulmonar ( $p <$

0,0001; OR = 8,43; IC 95% = 3,85 – 18,5;  $p = 0,0001$ ; OR = 2, 71; IC95% = 1,66 – 4,43), respectivamente, mostrando uma forte interação. O fator tabagismo não influenciou de forma expressiva o risco de desenvolver a doença, na presença do gene *HLA-DRB1\*04*. Esse fato, provavelmente, está relacionado com o número reduzido de casos de tabagismo no Brasil, de forma que a população da Região Norte apresenta o menor índice do País, com 13,4% de fumantes (BRASIL, 2014).

Na análise dos subtipos, o *HLA-DRB1\*04:11:01* foi associado à suscetibilidade à TB pulmonar ( $p = 0,0265$ ; OR = 2,13; IC 95% = 1,09 – 4,14). Essa associação pode ser, em parte, explicada pelo fato de a molécula de *HLA-DRB1\*04:11:01* interagir de forma não eficiente (afinidade intermediária e baixa) com os epítomos da ESAT-6 – proteína importante liberada pelo bacilo da TB. É importante destacar que as regiões centrais dos epítomos (ESAT-6) interagem com *HLA-DRB1\*04:11:01* determinando a afinidade de ligação e a especificidade (JONES et al., 2006), de modo que a afinidade de ligação varia de acordo com os resíduos de peptídeos que flanqueiam as regiões centrais (GODKIN et al., 2001). Esses dados foram evidenciados nos estudos *in silico* (computacionais) de interação entre a molécula de HLA codificada pelo alelo *HLA-DRB1\*04:11:01* com os determinantes antigênicos (epítomos) de ESAT-6. Apesar de determinados fragmentos de ESAT-6 se ligarem com *HLA-DRB1\*04:11:01*, a afinidade de ligação foi intermediária e principalmente baixa. Por sua vez, a molécula codificada pelo alelo *HLA-DRB1\*04:07:01* apresentou afinidade com seis fragmentos de ESAT-6, atingindo resultados que determinaram as melhores ligações (IEDB, 2015). Os resultados observados na predição *in silico* confirmaram aqueles observados nos modelos imunogenéticos de suscetibilidade e de proteção para TB pulmonar. Além disso, é sabido que a boa resposta para células Th CD4 efetora necessita, inicialmente, da sinalização mediada por HLA classe II/peptídeo, coestimulação e citocinas, de modo que precisa de uma boa ligação entre HLA/peptídeo (JOFFRE et al., 2009).

Nesse aspecto, as pessoas que expressam o *HLA-DRB1\*04:11:01* não desenvolvem uma resposta imunológica efetora; conseqüentemente o bacilo da TB não é neutralizado nem destruído, levando ao desenvolvimento da doença.

Outra análise incluída, neste estudo, foi elaborar um modelo de associação (regressão logística *stepwise*) para investigar se os subtipos de *HLA-DRB1\*04* estariam associados às formas multibacilar e paucibacilar na TB e, conseqüentemente, ligados à transmissão da doença.

Os alelos *HLA-DRB1\*04:11:01* e *DRB1\*04:92* foram associados à forma multibacilar da TB pulmonar ( $p = 0,0404$ ; OR = 2,01; IC 95% = 1,03 – 3,93;  $p = 0,0112$ ; OR = 8,62; IC 95% = 1,63 – 45,5), respectivamente; e também houve uma forte interação desses alelos com o consumo de álcool ( $p < 0,0001$ ; OR = 11,1; IC 95% = 3,99 – 30,9). A ingestão de álcool na população brasileira é de 24%, de forma que as regiões Sul e Centro-Oeste apresentam as maiores taxas de prevalências, com 28,4% e 25,4%, respectivamente. Contudo, nas populações das regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte, as taxas de consumo abusivo de álcool são elevadas, com 16,2%, 15,6 e 14,2%, respectivamente (BRASIL, 2014). O consumo de álcool contribui para o desenvolvimento de TB pulmonar, favorecendo o aumento da carga bacilar nos pulmões, além de ocasionar a diminuição do número de células T CD4<sup>+</sup> e, conseqüentemente, a menor liberação de IFN- $\gamma$  (MASON, C. M. et al., 2004).

Nossos resultados sugerem que os pacientes com TB pulmonar, que expressam um desses dois subtipos de HLA, podem ser potenciais responsáveis por manter a cadeia de transmissão da doença. Esses dados nos ajudam a explicar que, além dos fatores conhecidos e relacionados à TB (socioeconômicos, desnutrição, uso de drogas etc.), o perfil genético do paciente também pode colaborar para a manutenção das taxas tão elevadas da doença na nossa região. Ademais, pode haver o aumento do risco de transmissão da doença quando o perfil genético e o consumo de álcool estão juntos.

Outro resultado que merece uma investigação mais detalhada foi em relação ao subtipo *HLA-DRB1\*04:07:01*, o qual foi encontrado somente no grupo controle, em 12 indivíduos (Tabela 3) e apresentou valores estatisticamente significativos para proteção à TB. Isso sugere que indivíduos detentores desse alelo são mais resistentes à infecção pelo bacilo da TB. Curiosamente, o *HLA-DRB1\*04:07:01* contribui para o desenvolvimento de artrite reumatoide (AR) (ZANELLI, E.; BREEDVELD, F. C.; DE VRIES, R. R., 2000).

Pessoas com *HLA-DRB1\*04:07:01* têm fator de risco reduzido e talvez fiquem protegidas da TB, mas ficam suscetíveis a desenvolver AR. Esse alelo expressa no domínio transmembrana da molécula de HLA classe II o aminoácido metionina (M). Uma mudança de nucleotídeo no códon 207 (G/A) resulta em uma diminuição na produção do aminoácido metionina (M), com aumento de produção do aminoácido valina (M < V), quando comparado com o subtipo de alelo *HLA-DRB1\*04:92* (BALAS; GARCIA-SANCHEZ; VICARIO, 2011).

Ainda no contexto do HLA de classe II, não há dúvidas sobre a influência da diversidade do sistema HLA nos resultados dos estudos populacionais. Por esse fato, considerou-se importante destacar o panorama da distribuição do HLA.

Na América do Sul, o *HLA-DRB1\*04* (genérico) é mais frequente nas populações da Argentina e do Brasil, com média de 39,6% e 22,0%, respectivamente (GONZÁLEZ-GALARZA et al., 2014). O subtipo *HLA-DRB1\*04:11:01* também é comum nas populações do Brasil e da Argentina, com média 14,0% e 20,2%, respectivamente (TSUNETO, L.T. et al., 2003; GONZÁLEZ-GALARZA et al., 2014). O *HLA-DRB1\*04:92* é pouco encontrado no mundo, sendo associado com a população afro-americana do sul dos Estados Unidos com uma frequência gênica de 0,0027 (GRAGERT et al., 2013; GONZÁLEZ-GALARZA et al., 2014). O *HLA-DRB1\*04:07:01* possui uma média de frequência de 34,5% na população mexicana (VARGAS-ALARCON, G. et al., 2000; GARCIA-ORTIZ, J. E. et al., 2006; GONZÁLEZ-GALARZA et al., 2014); possivelmente esse seja o alelo presente no estudo realizado por Terán-Escandón et al (1999).

Diante desses resultados de associação do HLA com a TB pulmonar, assim como dos resultados das análises de regressão logística da interação dos genes de *HLA-DRB1\*04* com outros fatores de risco ao desenvolvimento da TB, é possível ter certeza de que estamos apenas no início de uma longa investigação, que direciona vários desdobramentos da complexa rede de respostas à TB. Nesse processo, sem dúvida o HLA e outros genes relacionados à resposta imune devem ser valorizados para ajudar, de alguma forma (direta ou indireta), na difícil missão do “controle da tuberculose”.



## **7. CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

O *HLA-DRB1\*04* foi mais frequente nos pacientes com TB pulmonar, quando comparado ao grupo controle, demonstrando uma forte associação desse gene para suscetibilidade à TB pulmonar.

No presente trabalho, nove subtipos de *HLA-DRB1\*04* foram identificados. Desses, três subtipos foram associados à TB pulmonar, sendo dois para suscetibilidade à doença: *HLA-DRB1\*04:11:01* e *HLA-DRB1\*04:92*; e um para proteção: *HLA-DRB1\*04:07:01*.

As variáveis consumo de álcool, tabagismo e gênero masculino foram associadas à suscetibilidade à TB pulmonar, confirmando os resultados já descritos em artigos científicos.

O subtipo *HLA-DRB1\*04:11:01* mostrou ser o principal responsável pela suscetibilidade à TB pulmonar. Esse alelo apresentou forte interação com o consumo de álcool, independentemente do gênero.

Os subtipos *HLA-DRB1\*04:11:01* e *DRB1\*04:92* foram mais frequentes nos pacientes multibacilares, indicando que esses genes estão envolvidos na transmissão da TB pulmonar e possivelmente estão relacionados à gravidade da doença, pois pacientes com carga bacilar positiva não desenvolvem uma resposta imunológica efetora e não conseguem neutralizar e eliminar os bacilos. Ambos os subtipos possuem forte interação com consumo de álcool, independentemente do gênero.

O subtipo *HLA-DRB1\*04:07:01* foi encontrado somente no grupo dos controles (indivíduos saudáveis) e foi associado à proteção contra a TB pulmonar.

Na análise de predição *in silico* das moléculas de HLA, codificadas por *HLA-DRB1\*04:11:01* e *HLA-DRB1\*04:07:01*, com a proteína ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv), elas apresentaram ligações de baixa e alta afinidades, respectivamente, com peptídeos da ESAT-6, confirmando os resultados observados nas análises imunogenéticas de associação com a TB pulmonar.

### **Considerações finais:**

Neste estudo, foi possível determinar associações dos alelos de HLA classe II com a TB pulmonar, contribuindo para ampliar o conhecimento a respeito dos fatores imunogenéticos do hospedeiro envolvidos nessa enfermidade, além de informar a distribuição dos subtipos de *HLA-DRB1\*04* na população oriunda da Região Amazônica. Trata-se de dados que serão úteis para estudar a frequência do HLA em análises populacionais de migração e de evolução humana, como também para ajudar a esclarecer as taxas elevadas da TB e de outras doenças infecciosas existentes na Região.

É importante enfatizar que é fundamental dar continuidade a essa linha de pesquisa, ampliando o número de casos a serem avaliados, com possibilidade de reunir dados de outras populações do Brasil e de outros países. Ademais, isso possibilitará a inclusão de outros genes ligados à resposta imune, além do HLA.

## **EQUIPE DE PESQUISA**

## 8. EQUIPE DE PESQUISA

| Nome |                                    | Instituição                 | Função               | Responsabilidade no projeto   |
|------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------|---|
| 01   | Dhêmerson Souza de Lima            | UFAM <sup>1</sup>           | Mestrando            | Coordenador. Executor das PCRs, Sequenciamento dos <i>loci</i> específicos      |
| 02   | Aya Sadahiro                       | UFAM <sup>1</sup>           | Docente              | Orientadora   |
| 03   | Rajendranath Ramasawmy             | FMT/HVD <sup>4</sup>        | Pesquisador          | Coorientador  |
| 04   | Mauricio Morishi Ogusku            | INPA <sup>2</sup>           | Pesquisador          | Consultor nos ensaios de biologia molecular e no diagnóstico laboratorial da TB |
| 05   | Irineide Assumpção Antunes         | Cardoso Fontes <sup>3</sup> | Médica Pneumologista | Consultora na seleção dos pacientes e dos controles                             |
| 07   | Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes | UFAM <sup>1</sup>           | Docente              | Consultor nas análises dos dados  |
| 08   | Maisa Porto dos Santos             | INPA <sup>2</sup>           | Mestre               | Auxílio no cultivo e na realização de PCR/PRA                                   |
| 09   | Vanessa Alves de Almeida           | UFAM <sup>1</sup>           | Mestranda            | Auxílio na coleta de amostras de sangue de pacientes e de controles             |
| 10   | Júlio Cesar Maciel Bonet           | UFAM <sup>1</sup>           | Graduando            | Auxílio na coleta de amostras de sangue de pacientes e de controles             |

## **9. REFERÊNCIAS**

## 9. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHITMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*, 7.<sup>a</sup> Edição. **Editora Elsevier**, p. 351-372, 2012.

AMIRZARGAR, A. A. et al. The association of *HLA-DRB*, *DQA1*, *DQB1* alleles and haplotype frequency in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 8, n. 8, p. 1017-21, 2004.

ANDREWS, J. R. et al. Risk of progression to active tuberculosis following reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 784-91, 2012.

AWOMOYI, A. A. et al. Interleukin-10, polymorphism in *SLC11A1* (formerly *NRAMP1*) and susceptibility to tuberculosis. **J Infect Dis**, v. 186, n. 12, p. 1808-14, 2002.

AXELSSON-ROBERTSON, R. et al. *Mycobacterium tuberculosis*-specific and MHC class I-restricted CD8<sup>+</sup> T-cells exhibit a stem cell precursor-like phenotype in patients with active pulmonary tuberculosis. **Int J Infect Dis**, v. 32, p. 13-22, 2015.

BALAS, A.; GARCIA-SANCHEZ, F.; VICARIO, J. L. Characterization of three novel *HLA-DRB1* alleles, *DRB1\*03:55*, *\*11:46:02* and *\*04:92*, by exon 2, 3 and 4 sequencing-based typing. **Int J Immunogenet**, v. 38, n. 5, p. 435-6, 2011.

BASTA, P. C.; CAMACHO, L. A. Tuberculin skin test to estimate the prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* infection in indigenous populations in the Americas: a literature review. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 2, p. 245-54, 2006.

BEKKER, L.-G.; WOOD, R. The Changing Natural History of Tuberculosis and HIV Coinfection in an Urban Area of Hyperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. Supplement 3, p. S208-S214, 2010.

BELLAMY, R. Genetics and pulmonary medicine bullet 3: Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations. **Thorax**, v. 53, n. 7, p. 588-593, 1998.

BENACERRAF, B. Role of MHC gene products in immune regulation. **Science**, v. 212, n. 4500, p. 1229-1238, 1981.

BHARGAVA, A. et al. Nutritional Status of Adult Patients with Pulmonary Tuberculosis in Rural Central India and Its Association with Mortality. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77979, 2013.

BJORKMAN, P. J. et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, *HLA-A2*. **Nature**, v. 329, n. 6139, p. 506-12, 1987.

BODMER, W. F. Evolutionary Significance of the HL-A System. **Nature**, v. 237, n. 5351, p. 139-183, 1972.

BOEHME, C. C. et al. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 11, p. 1005-1015, 2010.

BORNMAN, L. et al. Vitamin D Receptor Polymorphisms and Susceptibility to Tuberculosis in West Africa: A Case-Control and Family Study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 9, p. 1631-1641, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias. **Brasília: Ministério da Saúde**, v. 1, p. 434, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Especial Tuberculose. **Ministério da Saúde**, v. 43, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Boletim Epidemiológico. **Ministério da Saúde**, v. 44, n.º 2, 2013.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. **IBGE**, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal Saúde, 2014. Disponível em: [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br), acesso em 08.04.2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Detectar, tratar e curar: desafios e estratégias brasileiras frente à tuberculose. **Ministério da Saúde**, v. 46, n.º 9, 2015.

BROWN, J. H. et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. **Nature**, v. 364, n. 6432, p. 33-9, 1993.

CARMONA, F. D. et al. A Large-Scale Genetic Analysis Reveals a Strong Contribution of the HLA Class II Region to Giant Cell Arteritis Susceptibility. **Am J Hum Genet**, v. 96, n. 4, p. 565-580, 2015.

CAWS, M. et al. The Influence of Host and Bacterial Genotype on the Development of Disseminated Disease with *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 3, p. e1000034, 2008.



CEGIELSKI, J. P.; ARAB, L.; CORNONI-HUNTLEY, J. Nutritional Risk Factors for Tuberculosis Among Adults in the United States, 1971–1992. **American Journal of Epidemiology**, 2012.

CHANG, S. T.; LINDERMAN, J. J.; KIRSCHNER, D. E. Effect of Multiple Genetic Polymorphisms on Antigen Presentation and Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3221-3232, 2008.

CHEN, Y. C. et al. Prognostic values of serum IP-10 and IL-17 in patients with pulmonary tuberculosis. **Dis Markers**, v. 31, n. 2, p. 101-10, 2011.

COIS, A.; EHRLICH, R. Problem drinking as a risk factor for tuberculosis: a propensity score matched analysis of a national survey. **BMC Public Health**, v. 13, n. 1, p. 871, 2013.

DA SILVA, S. A. et al. *HLA-DR* and *HLA-DQ* alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance. **BMC Infect Dis**, v. 9, p. 134, 2009.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respir Med**, v. 100, n. 11, p. 1862-70, 2006.

DAUSSET, J. Iso-Leuko-Antibodies\*. **Vox Sanguinis**, v. 3, n. 1, p. 40-41, 1958.

DAUSSET, J. The major histocompatibility complex in man. **Science**, v. 213, n. 4515, p. 1469-1474, 1981.

DELGADO, J. C. et al. Aspartic Acid Homozygosity a Codon 57 of *HLA-DQ*  $\beta$  is associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 2, p. 1090-1097, 2006.

DEN BOON, S. et al. Association between smoking and tuberculosis infection: a population survey in a high tuberculosis incidence area. **Thorax**, v. 60, n. 7, p. 555-557, 2005.

DENKINGER, C. M.; DHEDA, K.; PAI, M. Guidelines on interferon-gamma release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion? **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 6, p. 806-14, 2011.

DHEDA, K. et al. Gene expression of IL17 and IL23 in the lungs of patients with active tuberculosis. **Thorax**, v. 63, n. 6, p. 566-8, 2008.

DOBLER, C. C.; FLACK, J. R.; MARKS, G. B. Risk of tuberculosis among people with *Diabetes mellitus*: an Australian nationwide cohort study. **BMJ Open**, v. 2, n. 1, 2012.

DOHERTY, T. M.; WALLIS, R. S.; ZUMLA, A. Biomarkers of disease activity, cure, and relapse in tuberculosis. **Clin Chest Med**, v. 30, n. 4, p. 783-96, 2009.

DONADI, E. A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina de Ribeirão Preto**, v. 33, p. 7-18, 2000.

DUARTE, R. et al. HLA class II alleles as markers of tuberculosis susceptibility and resistance. **Rev Port Pneumol**, v. 17, n. 1, p. 15-9, 2011.

DUBANIEWICZ, A. et al. Molecular subtypes of the HLA-DR antigens in pulmonary tuberculosis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 129-133, 2000.

DUBANIEWICZ, A. et al. Molecular subtypes of the HLA-DR antigens in pulmonary tuberculosis. **Int J Infect Dis**, v. 4, n. 3, p. 129-33, 2000.

DUBANIEWICZ, A.; MOSZKOWSKA, G.; SZCZERKOWSKA, Z. Frequency of DRB1-DQB1 two-locus haplotypes in tuberculosis: preliminary report. **Tuberculosis**, v. 85, n. 4, p. 259-67, 2005.

EL BAGHDADI, J. et al. Human genetics of tuberculosis. **Pathol Biol (Paris)**, v. 61, n. 1, p. 11-6, 2013.

ERLICH, H. HLA DNA typing: past, present and future. **Tissue Antigens**, v. 80, n. 1, p. 1-11, 2012.

EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature, **LPSN bacterio.net**, 2015. Disponível em: [www.bacterio.net/mycobacterium.html](http://www.bacterio.net/mycobacterium.html), acessado em 20.02.2015.

FARHAT, M. et al. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 10, n. 11, p. 1192-204, 2006.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3-66, 2013.

GAMBHIR, H. S. et al. Tobacco smoking-associated risk for tuberculosis: a case-control study. **International Health**, v. 2, n. 3, p. 216-222, 2010.

GARCIA-ORTIZ, J. E. et al. High-resolution molecular characterization of the HLA class I and class II in the Tarahumara Amerindian population. **Tissue Antigens**, v. 68, n. 2, p. 135-46, 2006.

GBANNAI, H. P.; NONAKA, M. Comprehensive analysis of medaka major histocompatibility complex (MHC) class II genes: Implications for evolution in teleosts. **Immunogenetics**, 2013.

GETAHUN, H. et al. HIV Infection – Associated Tuberculosis: The Epidemiology and the Response. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. Supplement 3, p. S201-S207, 2010.

GODKIN, A. J. et al. Naturally Processed HLA Class II Peptides Reveal Highly Conserved Immunogenic Flanking Region Sequence Preferences That Reflect Antigen Processing Rather Than Peptide-MHC Interactions. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 11, p. 6720-6727, 2001.

GOLDFELD, A. E. et al. Association of an *HLA-DQ* allele with clinical tuberculosis. **JAMA**, v. 279, n. 3, p. 226-8, 1998.

GOLDFELD, A. E. Genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. **Tuberculosis**, v. 84, n. 1-2, p. 76-81, 2004.

GOLDHABER-FIEBERT, J. D. et al. *Diabetes mellitus* and tuberculosis in countries with high tuberculosis burdens: individual risks and social determinants. **International Journal of Epidemiology**, v. 40, n. 2, p. 417-428, 2011.

GONZÁLEZ-GALARZA, FAVIEL F. et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. **Nucleic Acids Research**, 2014.

GORER, P. A. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 44, n. 3, p. 691-697, 1937.

GRADMANN, C. Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. **Microbes Infect**, v. 8, n. 1, p. 294-301, 2006.

GRAGERT, L. et al. Six-locus high resolution HLA haplotype frequencies derived from mixed-resolution DNA typing for the entire US donor registry. **Hum Immunol**, v. 74, n. 10, p. 1313-20, 2013.

GUHA, P. et al. Human migration, diversity and disease association: a convergent role of established and emerging DNA markers. **Front Genet**, v. 4, p. 155, 2013.

GUSTINCICH, S. et al. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. **Biotechniques**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 302, 1991.

HERZOG, B. H. History of Tuberculosis. **Respiration**, v. 65, n. 1, p. 5-15, 1998.

HILL, A. V. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 2, p. 373-400, 2001.

HILL, A. V. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. **Annu Rev Genet**, v. 40, p. 469-86, 2006.

IEDB. Immune Epitope Database and Analysis Resource, 2015. Disponível em: [www.iedb.org](http://www.iedb.org), acesso em 15.04.2015.

IMGT/HLA. Database provides a specialist database for sequences of the human major histocompatibility complex (MHC), 2015. Disponível em: [www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla), acesso em 15.02.2015.

JEE, S. H. et al. Smoking and Risk of Tuberculosis Incidence, Mortality and Recurrence in South Korean Men and Women. **American Journal of Epidemiology**, v. 170, n. 12, p. 1478-1485, 2009.

JOFFRE, O. et al. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. **Immunol Rev**, v. 227, n. 1, p. 234-47, 2009.

JONES, E. Y. et al. MHC class II proteins and disease: a structural perspective. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 4, p. 271-82, 2006.

KIM, H. S. et al. Association of *HLA-DR* and *HLA-DQ* genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Koreans: preliminary evidence of associations with drug resistance, disease severity and disease recurrence. **Hum Immunol**, v. 66, n. 10, p. 1074-81, 2005.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA System. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 10, p. 702-709, 2000.

LAN, R. et al. *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria isolates from HIV-infected patients in Guangxi, China. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 15, n. 12, p. 1669-75, 2011.

LAWN, S. D. et al. Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 349-361, 2013.

LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 57-72, 2011.

LINDENAU, J. D. et al. Association between HLA-DR4 haplotypes and tuberculin skin test response in the Aché population. **Tissue Antigens**, v. 84, n. 5, p. 479-83, 2014.

LOMBARD, Z. et al. Association of *HLA-DR*, *-DQ* and vitamin D receptor alleles and haplotypes with tuberculosis in the Venda of South Africa. **Hum Immunol**, v. 67, n. 8, p. 643-54, 2006.

LONNROTH, K. et al. Alcohol use as a risk factor for tuberculosis – a systematic review. **BMC Public Health**, v. 8, n. 1, p. 289, 2008.

LÜ, J. et al. Genetic polymorphisms of IFNG and IFNGR1 in association with the risk of pulmonary tuberculosis. **Gene**, v. 543, n. 1, p. 140-144, 2014.

LUCENA SILVA, N. et al. Relatedness and *HLA-DRB1* typing may discriminate the magnitude of the genetic susceptibility to tuberculosis using a household contact model. **J Epidemiol Community Health**, v. 64, n. 6, p. 513-7, 2010.

LUCKEY, D.; BASTAKOTY, D.; MANGALAM, A. K. Role of HLA class II genes in susceptibility and resistance to multiple sclerosis: studies using HLA transgenic mice. **J Autoimmun**, v. 37, n. 2, p. 122-8, 2011.

MA, M. J. et al. Toll-like receptors, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 gene polymorphisms in risk of pulmonary tuberculosis and disease severity. **Human Immunology**, v. 71, n. 10, p. 1005-1010, 2010.

MABUNDA, N. et al. Gene polymorphisms in patients with pulmonary tuberculosis from Mozambique. **Mol Biol Rep**, v. 42, n. 1, p. 71-6, 2015.

MAGIRA, E. E. et al. *HLA-A* and *HLA-DRB1* amino acid polymorphisms are associated with susceptibility and protection to pulmonary tuberculosis in a greek population. **Human Immunology**, v. 73, n. 6, p. 641-646, 2012.

MARÍN, N. D. et al. Reduced Frequency of Memory T Cells and Increased Th17 Responses in Patients with Active Tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 10, p. 1667-1676, 2012.

MASON, C. M. et al. Alcohol Exacerbates Murine Pulmonary Tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2556-2563, 2004.

MCDEVITT, H. O.; SELA, M. Genetic control of the antibody response: I. Demonstration of determinant-specific differences in response to synthetic polypeptide antigens in two strains of inbred mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 122, n. 3, p. 517-531, 1965.

MCNERNEY, R. et al. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances and opportunities. **J Infect Dis**, v. 205 Suppl 2, p. S147-58, 2012.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate Immunity. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

MISHRA, G. et al. Distribution of *HLA-A*, *B* and *DRB1* alleles in Sahariya tribe of North Central India: An association with pulmonary tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 22, n.0, p. 175-182, 2014.

MOTULSKY, A. G. Metabolic polymorphisms and the role of infectious diseases in human evolution. 1960. **Hum Biol**, v. 61, n. 5-6, p. 835-69; discussion 870-7, 1989.

MURPLY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Janeway's immunobiology, 7<sup>th</sup> Edition. **Garland Science**, 2008.

- NIELSEN, M. et al. MHC Class II epitope predictive algorithms. **Immunology**, Oxford, UK, v. 130, n. 3, p. 319-328, 2010.
- NORTH, R. J.; JUNG, Y. J. Immunity to tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 599-623, 2004.
- O'BRIEN, S. J. Ghetto legacy. **Curr Biol**, v. 1, n. 4, p. 209-11, 1991.
- O'GARRA, A. et al. The immune response in tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 475-527, 2013.
- OH, H.; GHOSH, S. NF- $\kappa$ B: roles and regulation in different CD4+ T-cell subsets. **Immunological Reviews**, v. 252, n. 1, p. 41-51, 2013.
- OLIVO-DIAZ, A. et al. Role of HLA class II alleles in susceptibility to and protection from localized cutaneous leishmaniasis. **Hum Immunol**, v. 65, n. 3, p. 255-61, Mar 2004.
- ONYEBUJOH, P.; ROOK, G. A. W. Focus: Tuberculosis. **Nat Rev Micro**, v. 2, n. 12, p. 930-932, 2004.
- ORRU, V. et al. Genetic variants regulating immune cell levels in health and disease. **Cell**, v. 155, n. 1, p. 242-56, 2013.
- OTHIENO, C. et al. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis*-induced transforming growth factor beta1 and interleukin-10. **Infect Immun**, v. 67, n. 11, p. 5730-5, 1999.
- PAI, M. et al. Novel and improved technologies for tuberculosis diagnosis: progress and challenges. **Clin Chest Med**, v. 30, n. 4, p. 701-16, 2009.
- PAYNE, R. et al. A new leukocyte isoantigen system in man. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 29, p. 285-95, 1964.
- PENG, R. et al. The IL-17F sequence variant is associated with susceptibility to tuberculosis. **Gene**, v. 515, n. 1, p. 229-32, 2013.
- POLUEKTOV, Y. O.; KIM, A.; SADEGH-NASSERI, S. HLA-DO and Its Role in MHC Class II Antigen Presentation. **Front Immunol**, v. 4, p. 260, 2013.
- QU, H. Q.; FISHER-HOCH, S. P.; MCCORMICK, J. B. Knowledge gaining by human genetic studies on tuberculosis susceptibility. **J Hum Genet**, v. 56, n. 3, p. 177-82, 2011.
- REED, G. W. et al. Impact of Diabetes and Smoking on Mortality in Tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e58044, 2013.

RIBAS-SILVA, R. C. et al. Association between HLA genes and american cutaneous leishmaniasis in endemic regions of Southern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 198-198, 2013.

ROJAS-VILLARRAGA, A.; BOTELLO-CORZO, D.; ANAYA, J. M. HLA-Class II in latin american patients with type 1 diabetes. **Autoimmun Rev**, v. 9, n. 10, p. 666-73, 2010.

ROSENMANN, K. D. et al. HLA class II *DPB1* and *DRB1* polymorphisms associated with genetic susceptibility to beryllium toxicity. **Occup Environ Med**, v. 68, n. 7, p. 487-93, 2011.

RUGGIERO, G. et al. Allelic distribution of human leucocyte antigen in historical and recently diagnosed tuberculosis patients in Southern Italy. **Immunology**, v. 111, n. 3, p. 318-322, 2004.

SAHIRATMADJA, E. et al. Association of polymorphisms in IL-12/IFN- $\gamma$  pathway genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Indonesia. **Tuberculosis**, v. 87, n. 4, p. 303-311, 2007.

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. **J. Pneumol**, v. 16: 133-136, 1990.

SALEM, J. I. et al. PKO alternative method for isolating mycobacteria from sputum. **Acta Amazonica**, v. 37 (3): 419-424, 2007.

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, 1977.

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

SHI, G. L. et al. Association of *HLA-DRB* alleles and pulmonary tuberculosis in North chinese patients. **Genet Mol Res**, v. 10, n. 3, p. 1331-6, 2011.

SINGH, M. et al. Immunogenetics of mycobacterial infections in the North indian population. **Tissue Antigens**, v. 69 Suppl 1, p. 228-30, 2007.

SOEBONO, H. et al. Associations between *HLA-DRB1* alleles and leprosy in an indonesian population. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 65, n. 2, p. 190-6, 1997.

SOHRABI, N.; SHEKARI KHANIANI, M.; MANSOORI DERAKHSHAN, S. Evaluation of Association Between HLA Class II DR4-DQ8 Haplotype and Type I

*Diabetes mellitus* in Children of East Azerbaijan State of Iran. **Adv Pharm Bull**, v. 5, n. 1, p. 137-40, 2015.

STEWART, G. R.; ROBERTSON, B. D.; YOUNG, D. B. Tuberculosis: a problem with persistence. **Nat Rev Microbiol**, v. 1, n. 2, p. 97-105, 2003.

SU, Y.; LI, Y.; SUN, G. Meta-analysis on the relevance of *HLA-DRB1* gene polymorphisms in a chinese population with pulmonary tuberculosis. **Family Medicine and Community Health**, v. 2, n. 2, p. 30-36, 2014.

TERÁN-ESCANDÓN, D. et al. Human Leukocyte Antigen-Associated susceptibility to pulmonary tuberculosis: Molecular Analysis of Class II Alleles by DNA Amplification and Oligonucleotide Hybridization in Mexican Patients **CHEST**, v. 115, p. 428 – 433, 1999.

THUONG, N. T. et al. Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 12, p. e1000229, 2008.

TONG, X. et al. Polymorphisms in *HLA-DRB1* Gene and the Risk of Tuberculosis: A Meta-analysis of 31 Studies. **Lung**, v. 193, n. 2, p. 309-18, 2015.

TORRADO, E.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 2, p. 66-72, 2011.

TSUNETO, L. T. et al. HLA class II diversity in seven amerindian populations. Clues about the origins of the Aché. **Tissue Antigens**, v. 62, n. 6, p. 512-26, 2003.

VANDIEDONCK, C.; KNIGHT, J. C. The Human Major Histocompatibility Complex as a Paradigm in Genomics Research. **Brief Funct Genomic Proteomic**, v. 8, n. 5, p. 379-94, 2009.

VARAINE, F.; RICH, M. L.; GROUZARD, V. Tuberculosis: Pratical guide for clinicans, nurses, laboratory technicians and medical auxiliares. **Médecins Sans Frontieres and Partners in Health**, 2014.

VARGAS-ALARCON, G. et al. *HLA-DR4* allele frequencies on indian and mestizo population from Mexico. **Hum Immunol**, v. 61, n. 3, p. 341-4, 2000.

VEJBAESYA, S. et al. NRAMP1 and TNF-alpha polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Thais. **Respirology**, v. 12, n. 2, p. 202-6, 2007.

WANG, L. X. et al. Identification of *HLA-DR4*-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination. **Vaccine**, v. 28, n. 8, p. 2026-31, 2010.



- WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Report, 2012.
- WHO. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic. Enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship, 2013.
- WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Report, 2014.
- WU, F. et al. NRAMP1, VDR, *HLA-DRB1* and *HLA-DQB1* gene polymorphisms in susceptibility to tuberculosis among the Chinese Kazakh population: a case-control study. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 484535, 2013.
- YUCESOY, B. et al. Genetic variants within the MHC region are associated with immune responsiveness to childhood vaccinations. **Vaccine**, 2013.
- YULIWULANDARI, R. et al. Association of *HLA-A*, *-B*, and *-DRB1* with pulmonary tuberculosis in Western Javanese Indonesia. **Hum Immunol**, v. 71, n. 7, p. 697-701, 2010.
- ZANELLI, E.; BREEDVELD, F. C.; DE VRIES, R. R. HLA class II association with rheumatoid arthritis: facts and interpretations. **Hum Immunol**, v. 61, n. 12, p. 1254-61, 2000.
- ZHANG, F. et al. Evidence for an association of *HLA-DRB1\*15* and *DRB1\*09* with leprosy and the impact of *DRB1\*09* on disease onset in a Chinese Han population. **BMC Medical Genetics**, v. 10, p. 133-133, 2009.
- ZHANG, J. et al. Interleukin-10 polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 15, n. 5, p. 594-601, 2011.
- ZHANG, Z. et al. Association between tumor necrosis factor alpha-238G/A polymorphism and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 328, 2012.
- ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, P. C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. **Nature**, v. 248, n. 450, p. 701-2, 1974.

## **10. ANEXOS**

## 10. ANEXOS

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFAM

---



UFAM


UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM

---

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0017.0.115.000-08, intitulado: **“Polimorfismo dos genes de HLA classe II, TNF-alfa e PDCD-1 em pacientes com Tuberculose pulmonar nascido no estado do Amazonas”**, tendo como Pesquisadora Responsável Aya Sadahiro.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 05 de março de 2008.

  
Prof.<sup>a</sup> Dra Maria de Meneses Pereira  
Coordenadora, em exercício

## FICHA DE CADASTRO



### LABORATÓRIO DE MICOBACTERIOLOGIA

#### CADASTRO DE PACIENTES/CONTROLES

n.º REGISTRO: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Data: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Já esteve em nosso Laboratório?       Não                       Sim                      Quando? \_\_\_\_\_

Natureza da Amostra:

- |                                       |   |                                       |   |                                |
|---------------------------------------|---|---------------------------------------|---|--------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Escarro      | <input type="checkbox"/> Líq. Ascítico  | <input type="checkbox"/> Genital      | <input type="checkbox"/> Osteoarticular | <input type="checkbox"/> Fezes |
| <input type="checkbox"/> Líquor       | <input type="checkbox"/> Lav. Gástrica  | <input type="checkbox"/> Pele         | <input type="checkbox"/> Ganglionar     | <input type="checkbox"/> Urina |
| <input type="checkbox"/> Líq. Pleural | <input type="checkbox"/> Lav. Brônquica | <input type="checkbox"/> Outro: _____ |   |                                |

Identificação do Paciente:

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo:  M     F

Endereço: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Procedência: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_

Naturalidade (País): \_\_\_\_\_ Naturalidade (Avós): \_\_\_\_\_

Informações Clínicas:

- |  |  |  |
|--|--|--|
| BCG: <input type="checkbox"/> Não          | PPD: <input type="checkbox"/> Não                                | RX Tórax <input type="checkbox"/> Não                        |
| <input type="checkbox"/> Sim Data: _____   | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não reator | <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Normal |
| <input type="checkbox"/> Não sabe informar | <input type="checkbox"/> Reator _____ mm                         | <input type="checkbox"/> Alterado                            |

Antecedente de Tuberculose:

Pessoal:  Não     Sim    Quando pela 1.ª vez: \_\_\_\_\_

- |  |                                  |                                   |   |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|---|
| Familiar: <input type="checkbox"/> Pai | <input type="checkbox"/> Tios    | <input type="checkbox"/> Sogros   | <input type="checkbox"/> Colega de trabalho |
| <input type="checkbox"/> Mãe           | <input type="checkbox"/> Primos  | <input type="checkbox"/> Cônjuge  | <input type="checkbox"/> Agregados          |
| <input type="checkbox"/> Irmãos        | <input type="checkbox"/> Filho   | <input type="checkbox"/> Namorado | <input type="checkbox"/> Outros             |
| <input type="checkbox"/> Avós          | <input type="checkbox"/> Cunhado | <input type="checkbox"/> Vizinho  | <input type="checkbox"/> Não sabe informar  |

Atualmente realizou pesquisa de BAAR em outros laboratórios?

Não     Sim. Onde? \_\_\_\_\_

Quantos? \_\_\_\_\_ Com resultados: \_\_\_\_\_

Apresenta outras doenças?

- |                                      |                                    |  |   |
|--------------------------------------|------------------------------------|--|---|
| <input type="checkbox"/> Hanseníase  | <input type="checkbox"/> Câncer    | <input type="checkbox"/> Alergias cutâneas | <input type="checkbox"/> Doenças reumáticas |
| <input type="checkbox"/> Cardiopatia | <input type="checkbox"/> Bronquite | <input type="checkbox"/> Diabetes          | <input type="checkbox"/> Alcoolismo         |
| <input type="checkbox"/> Tabagismo   | <input type="checkbox"/> Malária   | <input type="checkbox"/> Dengue            | <input type="checkbox"/> Qual? _____        |

Quadro clínico atual:

- |                                       |   |  |                                   |
|---------------------------------------|---|--|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Tosse        | <input type="checkbox"/> Expectoração         | <input type="checkbox"/> Hemoptise     | <input type="checkbox"/> Dispneia |
| <input type="checkbox"/> Dor torácica | <input type="checkbox"/> Dor de cabeça        | <input type="checkbox"/> Emagrecimento | <input type="checkbox"/> Cansaço  |
| <input type="checkbox"/> Febre        | <input type="checkbox"/> Outros. Quais? _____ |  |                                   |

Duração da doença: \_\_\_\_\_

O paciente:

Não recebeu nenhum tratamento antes da coleta da amostra clínica atual

Está recebendo tratamento desde: \_\_\_\_\_ Medicação: \_\_\_\_\_

Foi tratado dos últimos acometimentos em: \_\_\_\_\_

Resultados: Baciloscopia Direta: \_\_\_\_\_ Baciloscopia Concentrada: \_\_\_\_\_ Cultivo: \_\_\_\_\_

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



### UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS (INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS) TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar do Projeto de Pesquisa “Polimorfismo dos genes de HLA Classe II, TNF-alfa e PDCD-1 em pacientes com tuberculose pulmonar nascidos no Estado do Amazonas”, que será realizado na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e pretende saber em que forma se encontra um componente existente no sangue de pessoas com e sem a tuberculose pulmonar. A pesquisadora responsável pelo projeto é a professora **Aya Sadahiro** e pede sua autorização para coletar (tirar) um pouquinho do seu sangue (cinco mililitros) para poder fazer este estudo. O(a) Sr.(a) foi um dos selecionados para sabermos se o componente do sangue está ou não diferente em quem tem a doença e em quem não tem a doença. O sangue que não for usado não será guardado, sendo descartado com todo o cuidado. A coleta do sangue será feita em uma veia de seu braço, podendo causar uma leve dor na hora e uma pequena mancha roxa, que desaparecerá de três a quatro dias após a coleta, mas esperamos que nada disso aconteça. Se, depois de autorizar a coleta, o(a) Sr.(a) não quiser que seu sangue seja usado, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes, seja depois da coleta do sangue, independentemente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo. O(a) Sr.(a) não terá nenhuma despesa e também não ganhará nada. A sua participação é importante para o melhor conhecimento dessa doença e de como pode ser mais bem diagnosticada.

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em segredo para sempre. Para qualquer outra informação, o(a) Sr.(a) poderá entrar em contato com o(a) pesquisador(a) pelo telefone (92) 3643-3057 ou pelo *e-mail*: [asadahiro@ufam.edu.br](mailto:asadahiro@ufam.edu.br)

#### Consentimento Pós-Informação

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e por que precisa da minha colaboração e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair dele quando quiser. Estou recebendo uma cópia assinada deste documento, que vou guardar.

|                            |    |  |                           |
|----------------------------|----|--|---------------------------|
| _____                      | ou | <div style="border: 1px solid black; width: 150px; height: 80px; margin: 0 auto;"></div> | _____/_____/_____<br>Data |
| Assinatura do Participante |    | Impressão do dedo<br>polegar   |                           |
| _____                      |    | _____  | _____/_____/_____<br>Data |
| Assinatura do Pesquisador  |    |  |                           |

## Alleles of HLA-DRB1\*04 associated with pulmonary tuberculosis in Amazon Brazilian Population.

--Manuscript Draft--

|  |  |
|--|--|
| Manuscript Number:                     | PONE-D-15-33949  |
| Article Type:                          | Research Article   |
| Full Title:                            | Alleles of HLA-DRB1*04 associated with pulmonary tuberculosis in Amazon Brazilian Population.  |
| Short Title:                           | DR4 associated with pulmonary tuberculosis   |
| Corresponding Author:                  | Dhêmerson Souza de Lima<br>Universidade Federal do Amazonas<br>BRAZIL  |
| Keywords:                              | Immunogenetic host factors; HLA-DRB1*04 alleles; susceptibility; protection; tuberculosis  |
| Abstract:                              | <p>Immunogenetic host factors are associated with susceptibility or protection to tuberculosis (TB). Strong associations of HLA class II genes with TB are reported. We analyzed the HLA-DRB1*04 alleles to identify subtypes associated with pulmonary TB and their interaction with risk factors such as alcohol, smoking, and gender in 316 pulmonary TB patients and 306 healthy individuals of the Brazilian Amazon. The HLA-DRB1*04 was prevalent in patients with pulmonary TB (<math>p &lt; 0.0001</math>; OR = 2.94; 95% CI = 2.12 to 4.08). Direct nucleotide sequencing of DRB1 exon 2 identified nine subtypes of HLA-DRB1*04. The subtype HLA-DRB1*04:11:01 (<math>p = 0.0019</math>; OR = 2.23; 95% CI 1.34 - 3.70) was associated with susceptibility to pulmonary TB while DRB1*04:07:01 (<math>p &lt; 0.0001</math>; OR = 0.02; 95% CI 0.001 to 0.33) to protection. Notably, the interaction between alcohol and HLA-DRB1*04:11:01 increased the risk for developing pulmonary TB (<math>p = 0.0001</math>; OR = 51.3; 95% CI = 6.81 to 386). Multibacillary pulmonary TB, the clinical presentation of disease transmission, was strongly associated with interaction to alcohol (<math>p = 0.0026</math>; OR = 11.1; 95% CI 3.99 to 30.9), HLA-DRB1*04:11:01 (<math>p = 0.0442</math>; OR = 2.01; 95% CI 1.03 to 3.93) and DRB1*04:92 (<math>p = 0.0112</math>; OR = 8.62; 95% CI 1.63 to 45.5). These results show that HLA-DRB1*04 are associated with pulmonary TB. Interestingly, three subtypes, DRB1*04:07:01, DRB1*04:11:01 and DRB1*04:92 of the HLA-DRB1*04 could be potential immunogenetic markers that may help to explain</p> |
| Order of Authors:                      | Dhêmerson Souza de Lima<br>Mauricio Morishi Ogusku<br>Maisa Porto dos Santos<br>Claudia Maria de Melo e Silva<br>Vanessa Alves de Almeida<br>Irineide Assumpção Antunes<br>Antonio Luiz Boechat<br>Rajendranath Ramasawmy<br>Aya Sadahiro  |
| Opposed Reviewers:                     |  |
| Additional Information:                |  |
| Question                               | Response   |
| Financial Disclosure                   |  |
| Please describe all sources of funding |  |