



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA GASDERMINA
D E DE RECEPTORES P2X7 EM PACIENTES COM TUBERCULOSE

LAIANNE LOPES ROCHA

MANAUS

2021



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

AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA GASDERMINA D E DE RECEPTORES P2X7 EM PACIENTES COM TUBERCULOSE

LAIANNE LOPES ROCHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Prof^a Dr^a Aya Sadahiro

Coorientador: Dr. Mauricio Morishi Ogusku

Manaus
2021

Ficha Catalográfica

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

R672a Rocha, Lianne Lopes
Avaliação dos polimorfismos genéticos da Gasdermina D e de receptores P2X7 em pacientes com tuberculose / Lianne Lopes Rocha . 2021
96 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Gasdermina D. 2. Polimorfismos. 3. Receptor P2X7. 4. Resposta imune. 5. Tuberculose. I. Sadahiro, Aya. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

Dedicada a todos que acreditam em mim 🙏

AGRADECIMENTOS

A Deus, com qual eu finalmente me entendi. Gratidão pela vida, por me aceitar e retribuir com mais do que eu mereço.

Aos meus pais, José Rocha e Ednair, meus maiores incentivadores em tudo, se cheguei tão longe com certeza foi por causa deles. Muito obrigada por me oferecerem a oportunidade de só estudar, por todo carinho e todas as carona durante esses anos.

Ao meu irmão Jonathas e ao meu marido Luan Pedro, são as pessoas que mais acreditam em mim e me apoiam em tudo. Obrigada por sempre ouvirem minhas prévias.

À minha orientadora professora Dra. Aya Sadahiro que é uma mãe científica e uma grande amiga. Obrigada por todo acolhimento sempre, por tanto apoio, por tanto ensinamento e por cada conversa. Obrigada por tirar o melhor de mim como pesquisadora e por ter feito eu me apaixonar pela imunologia.

Ao meu coorientador professor Dr. Maurício Ogusku por disponibilizar um ambiente tão acolhedor para o trabalho e ser sempre tão solícito. Obrigada por todo o suporte, todas as sugestões e ensinamentos sempre.

À professora Dra. Alessandra Pontillo por toda ajuda e atualizações sobre imunogenética e inflamassoma. Obrigada também pela acolhida pelos laboratórios de São Paulo, juntamente com a Dra. Thelma Oshiro.

Aos meus colegas de laboratório que auxiliaram na realização desse projeto. Muito obrigada pela ajuda e apoio na coleta e processamento de cada amostra. Meu muito obrigada especialmente a Mariana, que é nosso braço direito. Obrigada por repassar os ensinamentos e me sanar tantas dúvidas.

Aos técnicos do Laboratório de Micobacteriologia do INPA, Maisa, Tânia, Ray por todo auxílio laboratorial.

Aos professores Dra. Luciana Fujimoto, Dra. Adriana Malheiros e Dr. Rajendranath Ramasawmy pelas sugestões e correções no exame de qualificação. E aos professores doutores da banca examinadora do processo de defesa.

A todos os professores do PPGIBA e da graduação em Ciências Biológicas, por todo o conhecimento que me foi passado e por tanta inspiração.

Aos pacientes e funcionários da Policlínica Cardoso Fontes, pelo auxílio na coleta de amostras biológicas.

Ao LIM, INPA e UFAM que durante muito tempo foram minha segunda casa.

Ao PPGIBA, coordenação e secretaria, professor Dr. Antônio Boechat, professora Dra. Jerusa Quintão, Edson e Ana Paula, por todo suporte necessário.

Aos meus amigos de infância: Victor, Ana e Ingrid. Aos meus amigos da graduação: David, Thyago, Leidyane e Glenda. Aos meus amigos do mestrado: Ivanildo, Patrícia e Gabrielly. Obrigada por enfrentarem cada desafio comigo e sempre oferecerem palavras de apoio.

Às minhas tias, pelas palavras de incentivo, suporte e por todo o carinho sempre.

À minha cadelinha Lana, por todo o companheirismo durante 15 anos maravilhosos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

A todos os demais que contribuíram para a realização desse projeto. Muito obrigada!

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, e ainda se configura como um grave problema de saúde pública global. O estado do Amazonas registrou em 2020 o maior coeficiente de incidência de casos de TB no Brasil e estes dados preocupantes estimulam a investigação sobre os fatores genéticos associados à doença em nossa região. A primeira linha de defesa contra esses micro-organismos é a resposta imune inata, na qual há atuação dos macrófagos. Essas células expressam receptores em sua superfície, como o P2X7, com funções de reconhecimento de antígenos, regulação da resposta inflamatória e efetivação da resposta imune. Essa resposta ativa os inflamassomas responsáveis por induzir uma rede de sinalização para produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e para a clivagem da proteína Gasdermina D. A porção N-terminal da Gasdermina irá formar poros na membrana plasmática da célula infectada, auxiliando no processo de eliminação do patógeno por meio da piroptose e liberação de citocinas secretadas. Esse estudo visa avaliar os polimorfismos de base única dos genes que codificam para Gasdermina D e receptores P2X7: *GSDMD* (rs7834318, rs2290414) e *P2RX7* (rs2230911, rs3751143, rs208290) e analisar se existe associação com a TB, para risco ou proteção à doença. Foram recrutados pacientes na Policlínica Cardoso Fontes (Manaus – AM), foi feita a coleta de sangue total, extração de DNA por precipitação de sais e realizada a genotipagem, utilizando a técnica de qPCR, de 504 amostras de sangue, sendo 245 pacientes com tuberculose pulmonar e 259 contatos saudáveis. A determinação das concentrações de IL-1 β foi realizada por ELISA em amostras de pacientes TB (n=44) e em controles (n=39). Dos polimorfismos analisados, o rs208290 (genótipo G/A) do gene *P2RX7* foi associado a proteção contra a TB ($p= 0.0031$; OR= 0.54; IC 95%= 0.36-0.82), a mesma associação foi feita para a combinação de haplótipos ACA do *P2RX7* ($p= 0,020$; OR= 0,51; IC 95%= 0,33-0,78). Estudos imunogenéticos revelam dados importantes sobre como podem afetar a regulação da resposta imunológica a patógenos, apesar desses estudos ainda serem escassos em pacientes com TB na região Norte do Brasil, eles podem contribuir para revelar os fatores associados à proteção e/ou risco para TB que justifiquem coeficientes tão elevados da doença no Amazonas.

Palavras-chave: Gasdermina D; polimorfismos; receptor P2X7; resposta imune; tuberculose.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease, caused by *Mycobacterium tuberculosis*, and is still a serious global public health problem. In 2020, the state of Amazonas recorded the highest incidence rate of TB cases in Brazil and these worrying data encourage research into genetic factors associated with the disease in our region. The first line of defense against these microorganisms is the innate immune response, in which macrophages act. These cells express receptors on their surface, such as P2X7, with functions of antigen recognition, regulation of the inflammatory response and effecting the immune response. This response activates the inflammasomes responsible for inducing a signaling network for the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β and for the cleavage of the Gasdermin D protein. The N-terminal portion of Gasdermin will form pores in the plasma membrane of the infected cell, helping to eliminate the pathogen through pyroptosis and release of secreted cytokines. This study aims to evaluate the single-base polymorphisms of genes that code for Gasdermin D and P2X7 receptors: GSDMD (rs7834318, rs2290414) and P2RX7 (rs2230911, rs3751143, rs208290) and analyze whether there is an association with TB, for risk or protection from the disease. Patients were recruited at the Cardoso Fontes Polyclinic (Manaus – AM), whole blood was collected, DNA extracted by salt precipitation and genotyping, using the qPCR technique, of 504 blood samples, of which 245 patients with tuberculosis pulmonary and 259 healthy contacts. The determination of IL-1 β concentrations was performed by ELISA in samples from TB patients (n=44) and in controls (n=39). Of the analyzed polymorphisms, the rs208290 (G/A genotype) of the P2RX7 gene was associated with protection against TB (p=0.0031; OR= 0.54; 95% CI= 0.36-0.82), the same association was made for the combination of haplotypes ACA of P2RX7 (p=0.020; OR= 0.51; 95% CI= 0.33-0.78). Immunogenetic studies reveal important data on how they can affect the regulation of the immune response to pathogens, although these studies are still scarce in patients with TB in Northern Brazil, they can contribute to reveal factors associated with protection and/or risk for TB that justify such high coefficients of the disease in Amazonas.

Keywords: Gasdermin D; immune response; polymorphisms; receptor P2X7; tuberculosis

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Países com maior número de casos estimados de TB nas Américas em 2018.....	23
Tabela 2:	Indicadores epidemiológicos e operacionais da TB, por Unidade da Federação e região, Brasil, 2021.....	25
Tabela 3:	Características gerais dos pacientes de TB e controles saudáveis...	48
Tabela 4:	Características gerais dos pacientes de TB pulmonar e controles saudáveis quanto as variáveis: tabagismo, alcoolismo e vacinação BCG.....	50
Tabela 5:	Distribuição das frequências dos genótipos e alelos dos polimorfismos <i>GSDMD</i> e <i>P2RX7</i> em controles saudáveis e pacientes com TB.....	57
Tabela 6:	Resultado da análise de associação do SNP rs208290 do gene <i>P2RX7</i> mostrando todos os modelos de herança genética.....	62
Tabela 7:	Resultado da análise de associação do SNP rs208290 no gene <i>P2RX7</i> nos grupos controle e pacientes com TB com o fator de correção sexo e idade.....	63
Tabela 8:	Frequências dos alelos menores (MAF) dos SNPs obtidas nos grupos estudados.....	64
Tabela 9:	Resultado de combinações de haplótipos dos polimorfismos nos genes <i>GSDMD</i>	65
Tabela 10:	Resultado de combinações de haplótipos dos polimorfismos no gene <i>P2RX7</i>	66

Lista de Quadros

Quadro 1:	Características das sondas utilizadas.....	44
Quadro 2:	Condições para a qPCR usadas para <i>GSDMD</i> e <i>P2RX7</i>	44
Quadro 3:	Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos SNPs nos genes <i>GSDMD</i> e <i>P2RX7</i> nos grupos controles e pacientes com TB.....	57

Lista de Figuras

Figura 1:	Bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em amostra de escarro de paciente com TB.....	20
Figura 2:	Esquema de transmissão da TB entre pacientes bacilíferos e contatos.....	26
Figura 3:	Atuação do receptor P2X7.....	31
Figura 4:	Via do receptor P2X7.....	32
Figura 5:	Mecanismos de ativação do inflamassoma.....	34
Figura 6:	O papel da Gasdermina D na piroptose causada por inflamassomas não-canônicos e canônicos.....	36
Figura 7:	Fluxograma do número total de amostras e depois dividido entre os grupos gênicos da Gasdermina D e os receptores P2X7.....	46
Figura 8:	Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs7834318 do gene <i>GSDMD</i>	51
Figura 9:	Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs2290414 do gene <i>GSDMD</i>	52
Figura 10:	Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs208290 do gene <i>P2RX7</i>	53
Figura 11:	Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs2230911 do gene <i>P2RX7</i>	54
Figura 12:	Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs3751143 do gene <i>P2RX7</i>	55
Figura 13:	Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo nos genes <i>GSDMD</i> e <i>P2RX7</i>	56
Figura 14:	Resultado da análise de LD para os SNPs dos genes <i>GSDMD</i> e <i>P2RX7</i>	66
Figura 15:	Concentração da citocina IL-1 β versus os genótipos do gene <i>GSDMD</i> e <i>P2RX7</i>	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS:	Acquired Immunodeficiency Syndrome – Síndrome Imunodeficiência Adquirida
AIM2:	Absent In Melanoma 2 – Ausente na Melanoma 2
APC:	Antigen-Presenting Cell – Células Apresentadoras de Antígeno
ASC:	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD – Proteína puntiforme associada a Apoptose contendo um domínio do tipo CARD
BAAR:	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
CARD:	Caspase Activation and Recruitment Domain – Domínio C terminal Recrutador e Ativador de Caspase
DNA:	Deoxyribonucleic acid – Ácido desoxirribonucleico
DO:	Densidade Ótica
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ESAT-6:	Early Secreted Antigenic Target – Antígeno Alvo de Secreção Primária
GSDMD-NT:	Fragmento N-terminal da Gasdermina D
IL-1 β :	Interleucina 1 β
IL-18:	Interleucina 18
INPA:	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LAM:	Lipoarabidomanana
LM:	Lipomanana
LPS:	Lipopolysaccharide - Lipopolissacarídeo
Man-LAM:	Manosil Lipoarabidomanana
MDR:	Multidrogas-Resistentes
MTBC:	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NLR:	NOD-Like Receptor – Receptores Semelhantes a NOD
NLRC4:	NLR family CARD-domain-containing protein 4 – Proteína 4 com domínio CARD da família NLR

NLRP3:	NLR Pyrin-domain-containing protein 3 – Proteína 3 com domínio Pirina da família NLR
NF-kB:	Factor Nuclear kappa B – Fator de transcrição nuclear kappa B
OMS / WHO:	Organização Mundial de Saúde – World Health Organization
PAMP:	Pathogen-Associated Molecular Pattern – Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR:	Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia de Polimerase
PILAM:	Fosfatidilinositol Lipoarabidomanana
PKO:	Petroff, Kudoh e Ogawa
PNG:	Peptidoglicano
PRR:	Pattern recognition receptors – Receptores de Reconhecimento de Padrão
<i>P2RX7</i> :	Gene purinoceptor P2X7
qPCR:	PCR quantitativa em tempo real
SNP:	Single-Nucleotide Polymorphism – Polimorfismo de Base Única
SUS:	Sistema Único de Saúde
TB:	Tuberculose
TCLE:	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Aspectos gerais da tuberculose	19
2.2 Aspectos epidemiológicos da tuberculose	22
2.3 Aspectos imunopatogênicos da tuberculose (TB)	26
2.4 Polimorfismos	29
2.5 Receptores P2X7	30
2.6 Inflamassomas e a Gasdermina D	33
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Tipo de estudo	40
4.2 Aspectos éticos.....	40
4.3 População de estudo	40
4.4 Local de coleta de amostra biológica	40
4.5 Cálculo da amostra	40
4.6 Critério de inclusão e exclusão	41
4.6.1. Critérios de Inclusão:	41
4.6.2. Critérios de Exclusão:	41
4.7 Exames micobacteriológicos.....	42
4.8 Extração de DNA	42
4.9 Genotipagem por PCR em tempo real	42
4.10 Quantificação de Citocina	45
4.11 Análise dos dados	45

4.12 Orçamento e Fonte de Financiamento	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Descrição da população recrutada.....	46
5.2 Características gerais da população estudada	47
5.3 Análise dos polimorfismos nos genes <i>GSDMD</i> e <i>P2RX7</i>	50
5.4 Análise de associação para os polimorfismos.....	57
5.4.1 Análise de associação para o gene <i>GSDMD</i>	59
5.4.2 Análise de associação para o gene <i>P2RX7</i>	60
5.5 Frequência do alelo menor	63
5.6 Análise de haplótipos.....	65
5.7 Análise da quantificação de IL-1 β	67
6. CONCLUSÃO	69
7. EQUIPE DO PROJETO	70
8. REFERÊNCIAS	71
9. APÊNDICE	89
10. ANEXO	95

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa de elevada magnitude e é reconhecida como um grave problema de saúde pública mundial, sendo seu controle (redução do número de casos) um grande desafio para a comunidade científica e para os programas de controle da doença em diversos países. Estima-se que 25% da população mundial esteja infectada pelas micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) (BRASIL, 2018; WHO, 2020).

A carga estimada de tuberculose (TB) em 2019, pela Organização Mundial de Saúde, foi cerca de 10 milhões de casos novos de TB ativa no mundo. Deste número houve 1,4 milhão de óbitos, sendo a TB a principal causa de morte entre pessoas que convivem com HIV (WHO, 2020). No Brasil, no ano de 2020, foram notificados 66.819 casos novos da doença, resultando em um coeficiente de incidência de 31,6 casos/100 mil habitantes e em 2019 foram registrados 2,2 óbitos por TB/100 mil habitantes no país (BRASIL, 2021).

A alta prevalência de TB no cenário mundial está intimamente relacionada à pobreza de grande parcela da população, e suas consequências, como péssimas condições de moradia, falta de saneamento básico, além da dificuldade no acesso a informação, no diagnóstico e tratamento da TB, sobretudo nos países em desenvolvimento, como o Brasil (CADENA et al., 2017). Além destes, fatores intrínsecos ao patógeno, como carga bacilar, infecção policlonal, genótipo de *Mycobacterium tuberculosis* e surgimento de resistência aos tuberculostáticos, e fatores intrínsecos ao hospedeiro como sua constituição genética e comorbidades como a co-infecção HIV/TB e diabetes, contribuem para quadros de maior suscetibilidade à TB, sendo determinantes para imunopatogênese e o quadro clínico resultante (CAWS et al., 2008; ABBADI et al., 2009; CASANOVA et al., 2011; VANNBERG et al., 2011; COHEN et al., 2012; SHALER et al., 2012; FORD et al., 2013).

No organismo, a principal linha de defesa são os macrófagos, os quais expressam receptores em sua superfície que contribuem para a resposta contra o patógeno da TB. Durante a resposta imune inata por uma condição de estresse ou por um processo infeccioso pode ocorrer a liberação de ATP, o qual ativará um receptor chamado: P2X7 (SAVIO et al., 2018). Esse receptor exercerá o sinal para

ativação dos inflamassomas (sensores intracelulares) e na sequência permite a ativação da caspase-1 e clivagem da pró-IL-1 β , com secreção da IL-1 β bioativa, uma citocina que irá promover uma resposta contra o patógeno e sua eliminação (QU et al., 2007; BRIKEN et al., 2013).

O receptor purinérgico P2X7 ativado por ATP possui propriedades pró-inflamatórias, que contribuem para a ativação de macrófagos. O tratamento com ATP causou a ativação da caspase-1, bem como a produção de formas ativas de citocinas via receptor P2X7 (*P2RX7*) (SAVIO, 2020). Mishra et al. (2010) realizaram um estudo utilizando macrófagos e identificaram que o fator de virulência ESAT-6, secretado por *M. tuberculosis*, ativa o inflamassoma NLRP3 e estimula a caspase-1, promovendo a secreção de IL-1 β .

Além da indução direta da secreção de citocinas pró-inflamatórias, a caspase-1 ativada desencadeia a morte piroptótica das células infectadas. A proteína citosólica Gasdermina D (*GSDMD*) é um mediador chave deste processo. A clivagem da *GSDMD* por caspase-1 ativada, resulta na liberação de seu fragmento N-terminal (*GSDMD-NT*), que forma poros na membrana plasmática da célula infectada, levando à eliminação do patógeno (LIU; LIEBERMAN, 2017; SBORGI et al. 2016). Os poros interrompem a integridade da membrana celular, permitindo o influxo de água, a intumescência das células e a lise osmótica, juntamente com um efluxo de moléculas pequenas, incluindo citocinas pró-inflamatórias (GAIDT; HORNING, 2016).

Neste contexto, é possível observar a importância dos receptores de P2X7 e da Gasdermina D na resposta inflamatória, fato que estimulou a investigar o papel dos genes *P2RX7* e *GSDMD* na tuberculose (TB). Como os aspectos genéticos do hospedeiro podem influenciar na complexidade da doença, há estudos relatando que os polimorfismos podem modificar a função fisiológica do inflamassoma, por exemplo, e contribuir para a suscetibilidade a doença (SOUZA DE LIMA et al., 2016).

Um fato intrigante na patogenia da TB é que menos de 10% dos indivíduos infectados apresentarão a forma clínica da doença ao longo da vida. Entretanto, o Brasil é um dos países que apresentam mais casos da doença e o estado do Amazonas, juntamente com sua capital Manaus, apresentaram o maior coeficiente de incidência da TB do país, 64,8 casos/100 mil habitantes e 90,1 casos/100 mil

habitantes respectivamente. Diante desses números preocupantes, o Amazonas ainda precisa de mais ações de combate à doença, por isso é importante investigar os motivos de índices tão elevados na região. Estudos que abordem características imunogenéticas e sócio demográficas na predisposição a doenças infecciosas, em especial a TB, ainda são escassos na região Norte. Os polimorfismos genéticos foram relatados com a possibilidade de estarem de fato envolvidos para proteção ou suscetibilidade, ou ainda para gravidade da doença.

Pretende-se investigar genes/proteínas que participam diretamente ou indiretamente na ativação dos inflamassomas, cruciais durante a resposta imune inata nas infecções por micro-organismos como as micobactérias causadoras da tuberculose.

De acordo com o apresentado, este projeto tem como proposta principal avaliar os polimorfismos de base única (SNP) em genes de Gasdermina D e de receptores P2X7 e verificar se existe uma possível associação com TB. A compreensão do papel da *GSDMD* e do *P2RX7*, durante a infecção pelo bacilo, permitirá a compreensão de aspectos importantes relacionados à doença e respostas do hospedeiro. Estudos imunogenéticos podem colaborar para uma melhor compreensão da patogênese, auxiliando nas perspectivas de estratégias imunoterapêuticas no futuro, além de ajudar na descoberta dos fatores de riscos relacionados a TB.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da tuberculose

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) (GALAGAN, 2014) associada a fatores sociais, ambientais e genéticos (MEYER; THYE, 2014). O MTBC 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 espécie *M. tuberculosis* é um bacilo reto ou ligeiramente curvo de crescimento lento, imóvel, não esporulado e não encapsulado, aeróbico restrito, medindo cerca de 1 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura. Pode infectar diversas espécies de animais, sendo o homem o principal hospedeiro. (BRASIL et al., 2002).

A parede celular das micobactérias é constituída mais externamente por uma camada de lipídeos frouxamente distribuídos, seguida de uma camada espessa de ácido micólico (CHATTERJEE; KHOO, 1998). A presença desta camada lipídica confere resistência a antibióticos e as enzimas lisossomais dos macrófagos do hospedeiro. Associados a esta camada lipídica existem biomoléculas contendo manose, incluindo lipoarabidomanana (LAM), constituída por lipomanana (LM) e arabinogalactana (KALSCHEUER, 2019). O domínio arabinan pode estar associado à manosil (Man-LAM) ou fosfatidilinositol (PILAM), dependendo do tipo de micobactéria. Além disso, mais internamente foi observada uma camada de peptidoglicano (PGN) e a membrana celular bacteriana (ABDALLA, 2012).

O bacilo possui uma espessa parede, constituída principalmente por ácidos micólicos, formando uma barreira hidrofóbica que confere resistência à dessecação e à descoloração. Os lipídeos se ligam à corantes, como a fucsina, e conseguem reter a coloração mesmo após lavagens com soluções de álcool-ácido, sendo denominados bacilos álcool ácido resistentes (BAAR). Essa propriedade é utilizada na baciloscopia direta pelos métodos de coloração denominados Ziehl-Neelsen ou Kinyoun (BRASIL, 2002) (**Figura 1**).

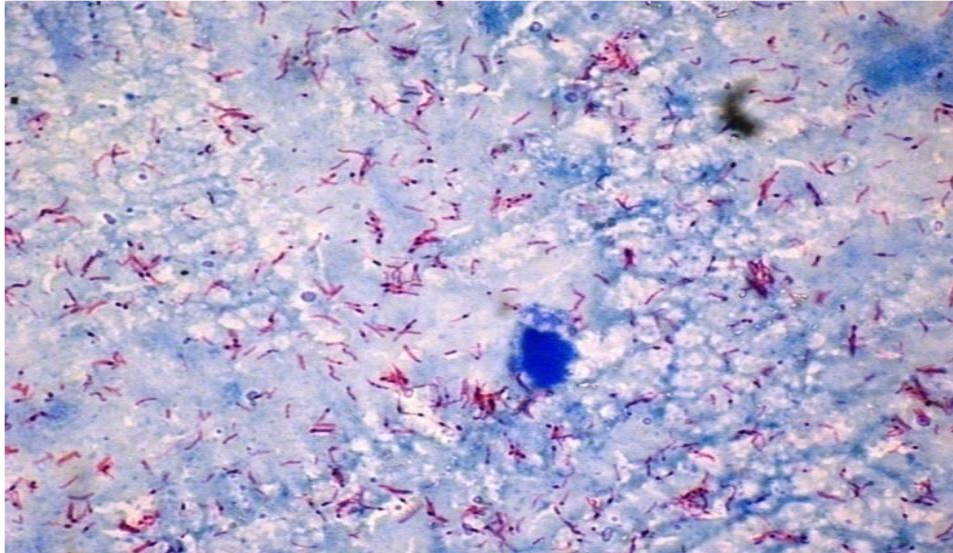


Figura 1: Bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em amostra de escarro de paciente com TB. Coloração feita pela técnica de Kinyoun.

Fonte: Prof^ª Dr^ª Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto (UFAM/INPA)

As espécies de MTBC podem infectar humanos e causar doenças. Dentre as espécies de micobactérias deste complexo, a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* é a mais prevalente. O sistema imune do hospedeiro, pode controlar e eliminar o bacilo da TB, ou ainda o bacilo poderá permanecer viável e a infecção continuar de forma latente com quadro assintomático. Quando a infecção está ativa e progressiva no pulmão (TB pulmonar), apresenta os quadros sintomáticos conhecidos. Uma reativação pode acontecer meses após a infecção primária ou resultar da disseminação do bacilo para outros órgãos e tecidos (TB extrapulmonar) (AGUILAR-AYALA et al., 2016).

A intensidade da transmissão local da tuberculose depende da prevalência de indivíduos com formas infecciosas de tuberculose, da frequência e proximidade das interações entre indivíduos infecciosos e suscetíveis, bem como características biológicas do *Mycobacterium tuberculosis* que afetam a transmissão (WOOD, MORROW, BARRY, 2016). Fatores ambientais, como aglomeração e ventilação, têm impacto direto na troca de ar de pessoa para pessoa necessária para a transmissão. Além disso, as maneiras pelas quais diferentes cepas de *M. tuberculosis* podem ser adaptadas para sobrevivência, aerobiologia da tuberculose e infecção bem-sucedida são temas de pesquisa crescente (FENNELLY et al., 2012).

Estima-se que mediante o contato com *M. tuberculosis*, em torno de 30% dos indivíduos tornam-se infectados. Destes, menos de 10% falham na resposta imune, não conseguem limitar a multiplicação micobacteriana, ocorrendo o estabelecimento da primo-infecção e doença. A maioria dos infectados, aproximadamente 90% dos casos, desenvolvem uma resposta imune eficiente, inibindo a ação bacteriana inicial, mas não o suficiente para eliminá-lo completamente, estabelecendo a forma latente da doença. Por isso, estima-se que 25% da população mundial evolua para a TB latente, com possibilidade de reativação em aproximadamente 10% dos casos, causada por uma imunossupressão futura. Certamente, as variações na constituição genética, especialmente em genes responsáveis pela resposta imune ditam a predisposição e a imunopatogênese da TB (AHMAD, 2011; VANNBERG et al., 2011; SHALER et al., 2012).

A evolução das micobactérias que compõem o complexo *M. tuberculosis*, assim como sua distribuição pelo mundo, ainda não foram completamente elucidadas. Evidências utilizando-se marcadores genéticos são importantes para a determinação do tempo de divergência, diversidade e distribuição das espécies. Este processo evolutivo é coincidente com a expansão do homem moderno da África para o resto do mundo. Com a explosão populacional e influenciados pela Revolução Industrial, os operários passaram a viver aglomerados e em péssimas condições de higiene, condições que favoreceram a propagação e expansão da TB (GAGNEUX et al., 2006; WIRTH et al., 2008).

Dentre os fatores que contribuíram para o elevado número de novos casos de TB, destacaram-se o avanço da pobreza em escala mundial, o comprometimento do sistema imune, diabetes, tabagismo, aumento da coinfeção com HIV/AIDS e a elevação dos casos de multidrogas-resistentes (MDR) (KRITSKI, 2007; WARNER et al., 2015).

2.2 Aspectos epidemiológicos da tuberculose

Os esforços globais evitaram cerca de 54 milhões de mortes por TB desde o ano 2000, mas a TB continua a ser a doença infecciosa mais letal do mundo. Segundo estimativas da OMS, 25% da população mundial, está infectada pelo *M. tuberculosis*. O agravo atinge a todos os grupos etários, com maior predomínio nos indivíduos economicamente ativos (15-54 anos) e do sexo masculino. Em nível global, cerca de 10 milhões de pessoas desenvolveram TB em 2020 e houve aproximadamente 1,4 milhão de mortes, incluindo 251 mil com HIV, em 2019 (WHO, 2020).

Em 2018, as mortes estimadas para a Região das Américas eram de 22.900 (21.200 - 25.600), das quais 26% (5.900) correspondiam a pessoas com coinfeção TB / HIV. Na Região das Américas, foram notificados 235.345 novos casos (3% dos casos globais). Destes, 185.000 (64%) correspondiam a homens com 15 anos ou mais de idade. A taxa de incidência estimada para a Região foi de 28,7/100 mil habitantes, com tendência de aumento nos últimos 5 anos (WHO, 2019).

Entre 2017 e 2018, o número de casos de TB nas Américas aumentou 2%. O aumento no número absoluto de casos de TB na Região vem do Brasil (3.187), Peru (1.581), México (514) e Venezuela (370). Em 2018, 69% dos casos de TB estimados correspondiam a cinco países: Brasil, Peru, México, Haiti e Colômbia e 86% a doze países (**Tabela 1**) (WHO, 2019).

Embora a TB seja curável, é atualmente a doença infecciosa relacionada à maior morbidade da região e sua persistência se deve, em grande parte, às graves desigualdades sociais e econômicas nas Américas (WHO, 2018).

Tabela 1: Países com maior número de casos estimados de TB nas Américas em 2018.

Nº	PAÍS	CASOS ESTIMADOS	PORCENTAGEM DO TOTAL DE CASOS
1	Brasil	95.000	32,9%
2	Peru	39.000	13,5%
3	México	29.000	10,0%
4	Haiti	20.000	6,9%
5	Colômbia	16.000	5,5%
6	Venezuela	14.000	4,8%
7	Argentina	12.000	4,2%
8	Bolívia	12.000	4,2%
9	República Dominicana	4.800	1,7%
10	El Salvador	7.200	1,6%
11	Panamá	2.200	0,8%
12	Guyana	640	0,2%
Restante da América		39.860	13,7%
Total		249.140	86,3%

Fonte: OMS (2019)

Há estimativa que mais de 50 mil pessoas na região não sabem que têm a doença e não foram tratadas. Essa lacuna de diagnóstico aumentou em 3 mil pessoas, em comparação a 2016. O teste de diagnóstico rápido, uma nova ferramenta que poderia ajudar a reduzir a diferença, foi usado em apenas 13% dos casos confirmados, um pouco acima dos 9% em 2016 (WHO, 2018).

As metas internacionais estabelecidas pela OMS e pactuadas pelo governo brasileiro serão diagnosticar 70% dos casos de TB estimados e curá-los em 85%. A TB ainda é um sério problema da saúde pública, com profundas raízes sociais. Está intimamente ligada à pobreza e à má distribuição de renda. O surgimento da epidemia de Aids e dos focos de TB multirresistente agravaram ainda mais o problema da doença no mundo (BRASIL, 2016).

Para acelerar o progresso de cura dos pacientes, o relatório da OMS recomenda que os países melhorem o monitoramento dos pacientes, para garantir o acompanhamento do tratamento e abordar as barreiras de acesso à saúde, entre outras questões. A TB multirresistente também é uma ameaça, houve cerca de meio

milhão de novos casos de TB resistente à rifampicina em 2018, dos quais 78% apresentavam TB multirresistente (WHO, 2019).

No Brasil, em 2020, foram notificados 66.819 casos novos de TB. Nesse mesmo ano, o coeficiente de incidência foi igual a 31,6 casos/100 mil habitantes (**Tabela 2**). Entre os estados, os maiores coeficientes de incidência foram registrados no Amazonas (64,8 casos/100 mil habitantes.) e no Rio de Janeiro (60,0 casos/100 mil habitantes.) (BRASIL, 2021), cujas capitais também apresentaram os maiores coeficientes, 90,1 casos/100 mil hab. em Manaus e 84,9 casos/100 mil habitantes no Rio de Janeiro. A situação da TB nas capitais do país exige atenção, uma vez que apresentaram coeficientes de incidência elevados em relação à média nacional (BRASIL, 2021).

O Estado do Amazonas tem se destacado, nos últimos anos, como detentor da 1ª maior taxa de incidência de tuberculose (TB) do Brasil. O Município de Manaus, capital do Amazonas, concentra mais de 50% da população do Estado e 73% dos casos notificados de tuberculose (TB) (BRASIL, 2021). Vários fatores contribuem para a manutenção dessa incidência: clima tropical, desnutrição, condições precárias de moradia e saneamento básico, além das dificuldades operacionais de diagnóstico e tratamento da TB, superlotação do transporte público urbano que favorece a aglomeração em locais de ambientes fechados que, conseqüentemente, beneficiam a transmissibilidade do bacilo e pode-se teorizar que há uma grande diversidade genética de *M. tuberculosis* circulantes (GOMES et al., 2012).

Tabela 2: Indicadores epidemiológicos e operacionais da TB, por Unidade da Federação e região, Brasil, 2021.

Unidade da Federação/região de residência	Casos novos de TB notificados (n)	Indicadores epidemiológicos	
		Coefficiente de incidência de TB (/100 mil hab.)	Coefficiente de mortalidade de TB (/100 mil hab) ¹
Acre	473	52,9	3,2
Amapá	231	26,8	1,5
Amazonas	2.728	64,8	4,1
Pará	3.735	43,0	3,0
Rondônia	441	24,5	1,1
Roraima	257	40,7	3,3
Tocantins	173	10,9	0,8
Região Norte	8.038	43,0	2,8
Alagoas	715	21,3	2,3
Bahia	3.511	23,5	2,1
Ceará	2.965	32,3	2,4
Maranhão	1.955	27,5	2,4
Paraíba	999	24,7	1,5
Pernambuco	4.658	48,4	3,9
Piauí	615	18,7	1,8
Rio Grande do Norte	1.215	34,4	2,1
Sergipe	654	28,2	1,6
Região Nordeste	17.287	30,1	2,4
Espírito Santo	1.176	28,9	2,2
Minas Gerais	3.209	15,1	1,1
Rio de Janeiro	10.421	60,0	3,8
São Paulo	15.823	34,2	2,0
Região Sudeste	30.629	34,4	2,1
Paraná	2.190	19,0	1,4
Rio Grande do Sul	4.440	38,9	2,5
Santa Catarina	1.225	16,9	1,1
Região Sul	7.855	26,0	1,7
Distrito Federal	291	9,5	1,0
Goiás	799	11,2	0,9
Mato Grosso	979	27,8	2,0
Mato Grosso do Sul	900	32,0	1,8
Região Centro-Oeste	2.969	18,0	1,3
Brasil	66.819	31,6	2,2

Fonte: BRASIL (2020)

¹ Dados referentes ao ano de 2019.

2.3 Aspectos imunopatogênicos da tuberculose (TB)

A fonte de transmissão mais comum da TB é a forma pulmonar da doença, cujo os sintomas destacam-se a tosse persistente por mais de duas semanas, produtiva ou não (com muco e eventualmente sangue), dor torácica, febre vespertina com sudorese noturna, dispneia, falta de apetite, emagrecimento, cansaço fácil e aumento dos linfonodos (NOGUEIRA, 2012).

A transmissão da TB ocorre de pessoa a pessoa, quando pacientes bacilíferos, durante a fala, o espirro e a tosse, lançam no ar partículas infectantes de diversos tamanhos. As gotículas mais densas se depositam no solo e as mais leves permanecem em suspensão no ar. A maioria das partículas contidas nas gotículas são retidas pela mucosa do trato respiratório superior através do mecanismo mucociliar. Somente os núcleos secos das gotículas (núcleos de Wells), com diâmetros de até 5 μm (micrômetros) e com 1 a 2 bacilos em suspensão, podem atingir os bronquíolos e alvéolos, iniciando o foco infeccioso (**Figura 2**) (BRASIL, 2008).

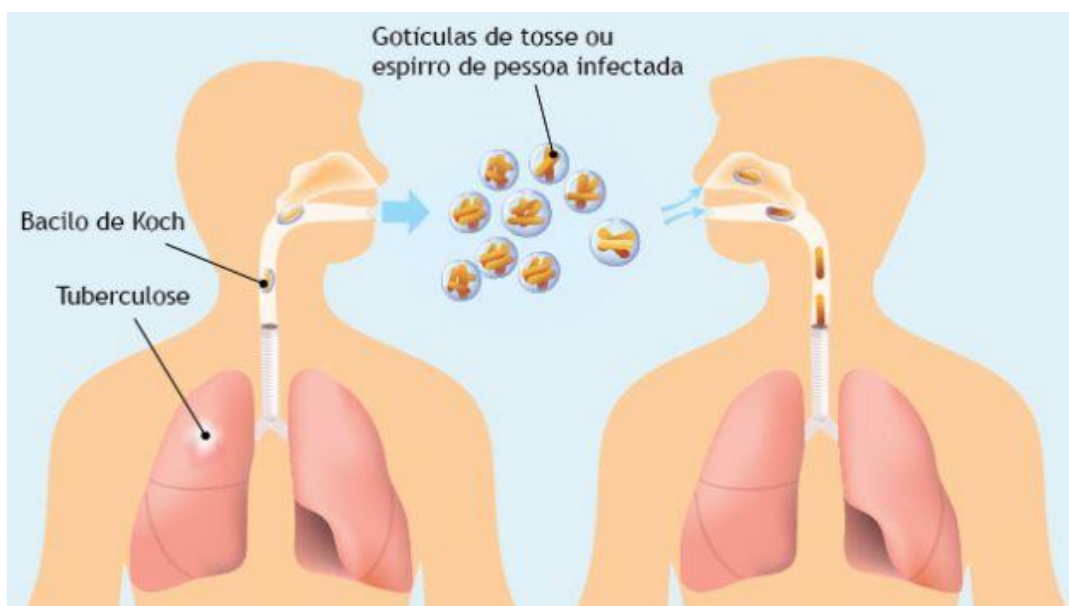


Figura 2: Esquema de transmissão da TB entre pacientes bacilíferos e contatos.

Fonte: BRASIL, 2008.

Ao atingir os alvéolos pulmonares, os bacilos serão englobados por macrófagos alveolares residentes, ativando o sistema imune inato. Os neutrófilos e as células dendríticas que foram recrutados para o local da infecção também

realizam a fagocitose dos bacilos (BEHAR et al., 2014). 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). Outro mecanismo de evasão do sistema imunológico envolve a neutralização de moléculas antimicrobianas de macrófagos, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (FLYNN, CHAN, 2003).

Os receptores de reconhecimento de padrão (PRR) reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes na parede celular da micobactéria, como as lipomananas (LM), lipoarabidomanana (LAM), glicolipídeos, ácidos micólicos e peptidoglicano, e realizam sua internalização pelas células fagocíticas (AMARAL et al., 2016). Esses eventos caracterizam a resposta imune inata, primeira linha de defesa do organismo.

Essa interação entre PRR e PAMP é responsável por ativar as cascatas de sinalização intracelular, como NF- κ B (*Nuclear fator Kappa B*), para a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-18, IL-12, IFN γ , TNF- α , ativação do inflamassoma e autofagia (DEY; BISHAI, 2014).

As micobactérias também podem ser reconhecidas por PRR citosólicos da família dos receptores NLR, fazendo com que um complexo do inflamassoma seja formado devido a detecção de PAMPs bacterianos. Os inflamassomas induzem respostas imunes inatas contra uma ampla variedade de agentes patogênicos (OSAWA et al., 2011). Eles recrutam e ativam caspases, estas vão atuar ativando e secretando citocinas pró-inflamatórias (DORHOI, 2012).

Em casos de evasão das micobactérias do sistema imune inato, cerca de três semanas após a infecção, desenvolve-se a resposta imune adaptativa. Os bacilos são internalizados por células apresentadoras de antígenos (APC), como as células dendríticas, e ocorre o processamento das proteínas em peptídeos antigênicos micobacterianos.

Posteriormente, as APCs migram para os linfonodos, onde interagem com os linfócitos T helper *naive*, mais especificamente, as APCs apresentam os peptídeos antigênicos da micobactéria para o receptor de célula T (TCR) através de moléculas MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe II (BOOM et al., 2003).

Também ocorre a interação de moléculas coestimuladoras, como moléculas B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) presentes na APC se ligando a molécula CD28 presente na superfície do linfócito T. Estes são o primeiro e segundo sinal de ativação do linfócito T, respectivamente, seguido da expansão clonal e diferenciação celular de acordo com o microambiente de citocinas (BEHAR et. al., 2014).

Citocinas como o interferon-gama (IFN- γ) ativa os macrófagos, aumentando capacidade de destruição das micobactérias por essas células. Essa reação do organismo visa à contenção desses agentes em tubérculos, pequenos granulomas (MIMS et al., 1995). Granulomas são massas de tecido cronicamente inflamadas, circundados por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos e fibroblastos. Forma-se uma massa de tecido fibroso, com uma porção central, chamada de tubérculo de Ghon, constituída de tecido necrótico caseoso (CHEEVER; HINKLE, 2016).

Ao tentarem destruir os bacilos, sem sucesso, podem causar danos consideráveis ao tecido pulmonar, pela liberação de enzimas lisossomais e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Por outro lado, os bacilos contidos podem sobreviver e multiplicar-se no interior de macrófagos, com isso novos fagócitos migram para a área e liquefazem o tubérculo. Dessa forma, os bacilos podem escapar mais facilmente, sendo expelidos ou disseminando para outras partes do organismo. Cardona (2017) aponta essa discussão em relação a dinâmica do granuloma. Alguns pesquisadores o consideram protetor, pois controla a replicação e disseminação da micobactéria. Porém outros pesquisadores o consideram responsável pela reinfecção pulmonar.

Esses são apenas alguns mecanismos do sistema imune frente ao bacilo da TB, este ainda pode apresentar outros mecanismos de evasão do sistema imune, como induzir macrófagos a produzirem citocinas inibitórias, como IL-10, inibindo assim a função do linfócito T (FLYNN, CHAN, 2003).

A capacidade do bacilo da TB se adaptar e desencadear mudanças na resposta imune do hospedeiro, somado a variabilidade genética e ao estado imunológico dos indivíduos, dificulta o controle da infecção. Alguns grupos populacionais tendem a ser mais suscetíveis ou resistentes a uma determinada doença. Os estudos com polimorfismos podem auxiliar na compreensão desse fato (STUCKI; GAGNEUX, 2013).

2.4 Polimorfismos

Os polimorfismos são constituídos de variações na sequência de DNA, ou seja, geram modificações na estrutura original da cadeia. O polimorfismo de base única (SNP) ocorre quando há substituição ou troca de um único nucleotídeo, originados a partir de um erro da DNA polimerase, durante a duplicação do DNA na meiose. Esta variação genética é a mais frequente no genoma, sendo encontrado em mais de 1% da população (KIM; MISRA, 2007).

O projeto genoma humano estimou a existência de aproximadamente 11 milhões de SNP. Variações genéticas do alelo menor (MAF), com frequência acima de 1%, são consideradas comuns em uma população, abaixo deste índice são considerados mutações pontuais raras (FRAZER et al., 2009). Atualmente, se discute muito quanto à importância destas variações na evolução humana, na sensibilidade a drogas e, sobretudo na predisposição a doenças (CALABRESE et al., 2009; FRAZER et al., 2009).

Alguns SNP estão sendo apontados como causadores de certas características fenotípicas, entre elas estão o maior risco de desenvolvimento de algumas patologias, como diabetes (BAN et al. 2010) e doenças autoimunes (SIROTA et al., 2009). E também há polimorfismos associados a fatores como a resposta negativa a tratamentos com drogas ou terapias (MCKINNEY et al., 2009). Há estimativa que dos resultados dos SNP associados às patologias, 80% causam a doença pela desestabilização da proteína, 10% são nocivos porque afetam a estrutura quaternária da proteína e 10% afetam outros mecanismos como a interação entre as proteínas (FERRER-COSTA et al., 2002).

É possível que SNP na região dos íntrons pode regular a maior ou menor expressão gênica (NEININGER, MARSCHALL, HELMS, 2019). Dados sugerem que a variação estrutural intrônica dos genes que codificam proteínas faz uma importante contribuição para a variabilidade da expressão e do processamento de genes em populações humanas. Como as mutações nos íntrons não afetam as sequências de proteínas, elas geralmente são ignoradas ao procurar variações genômicas normais ou patogênicas. No entanto, os íntrons compreendem cerca de metade do genoma humano não codificante e podem ter importantes papéis reguladores (RIGAU et al., 2019). É sabido que os íntrons contribuem para o controle da expressão gênica pela

inclusão de regiões reguladoras e genes de RNA funcionais não codificadores ou diretamente pelo seu comprimento (ROSE, 2008; JO; CHOI, 2015).

Quando o polimorfismo cria novos alelos tem-se uma variabilidade genética que pode ocasionar características desejáveis ou indesejáveis em uma determinada população. Estudos realizados com SNP tem o objetivo de verificar se existe uma possível associação entre os polimorfismos e o desenvolvimento de doenças, como a TB, já que as alterações presentes na sequência do DNA podem influenciar na suscetibilidade ou na resistência à infecção (PONTILLO et al., 2012). Sendo assim, os SNP podem atuar como biomarcadores de risco para doenças (SHEN et al., 2015).

2.5 Receptores P2X7

Uma das principais linhas de defesa contra a TB são os macrófagos, os quais expressam receptores em sua superfície com funções de reconhecimento de antígenos e efetivação da resposta imune (MILLER et al., 2011). Os receptores purinérgicos são classificados em P1, que reconhecem adenosina, e P2, que possui a capacidade de se ligar à adenosina trifosfato (ATP) extracelular. P2 é subdividido em P2X (sete subtipos de receptores) e P2Y (oito subtipos de receptores) (ZHENG et al., 2017). A subfamília mais encontrada nos macrófagos é a do receptor ionotrópico transmembrana P2X7 que age regulando a resposta inflamatória contra micro-organismos invasores e pode resultar na morte celular (MILLER et al., 2011).

O receptor P2X7 foi originalmente descrito em células de origem hematopoiética, tais como macrófagos, células da micróglia e certos linfócitos, e medeiam, o influxo de cálcio, bem como a liberação de citocinas pró-inflamatórias. O receptor P2X7 é o principal responsável pela morte de macrófagos e outras células do sistema imune, pois envolve a morte por necrose e por apoptose (ADINOLFI et al., 2005; COSTA-JUNIOR et al., 2009).

Durante a resposta imune inata, por uma condição de estresse ou por um processo infeccioso, as células que sofreram danos durante essa resposta inflamatória poderão induzir a liberação de ATP. O receptor P2X7 é um canal catiônico que se abre em resposta à essa ligação do ATP, permitindo a entrada e saída de íons nas células, mais especificamente a entrada de íons Na⁺ e Ca²⁺ e a

saída de K^+ que causa a despolarização da membrana celular, resultando na ativação de vias de sinalização diversas (SLUYTER, 2017). Além de abrir canais catiônicos na célula, ele é capaz de dilatar poros na membrana plasmática em resposta a altas concentrações de agonista ou exposição prolongada, o que torna a célula permeável a moléculas de peso molecular de até 900 Da (**Figura 3**) (NORTH, 2002; DONNELLY-ROBERTS e JARVIS 2007).

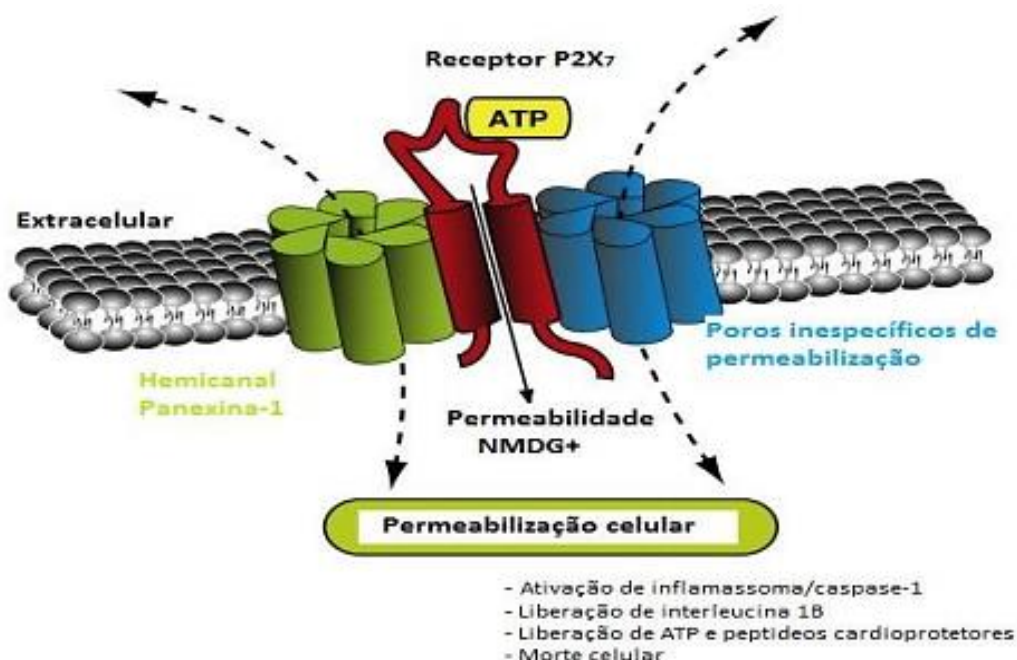


Figura 3: Atuação do receptor P2X7. ATP se liga ao receptor P2X7 acarretando no alargamento do mesmo, fazendo com que este seja permissivo a entrada de moléculas catiônicas de grande porte. Esta ligação também leva a abertura de poros na membrana, conseqüentemente gera ativação de inflamassoma, liberação de IL-1 β , ATP e peptídeos cardioprotetores, bem como levam a morte celular.

Fonte: Adaptado de BAROJA-MAZO, BARBERA-CREMADES, PELEGRIN (2012)

O receptor P2X7 ativado pode desencadear a ativação do fator de transcrição NF- κ B levando à produção de citocinas e quimiocinas. Também pode exercer sinal para ativação dos inflamassomas, como o NLRP3, e na sequência permitir a ativação da caspase - 1 e subsequente clivagem das formas imaturas pró-IL-1 β e pró-IL-18 nas citocinas IL-1 β e IL-18 ativadas que serão secretadas pelas células (SAVIO et al., 2018). A molécula de ATP extracelular atuando como sinal de

perigo, ativa a via do inflamassoma (**Figura 4**). Portanto, direcionar a sinalização ATP - P2X7 pode ser uma estratégia potencial.

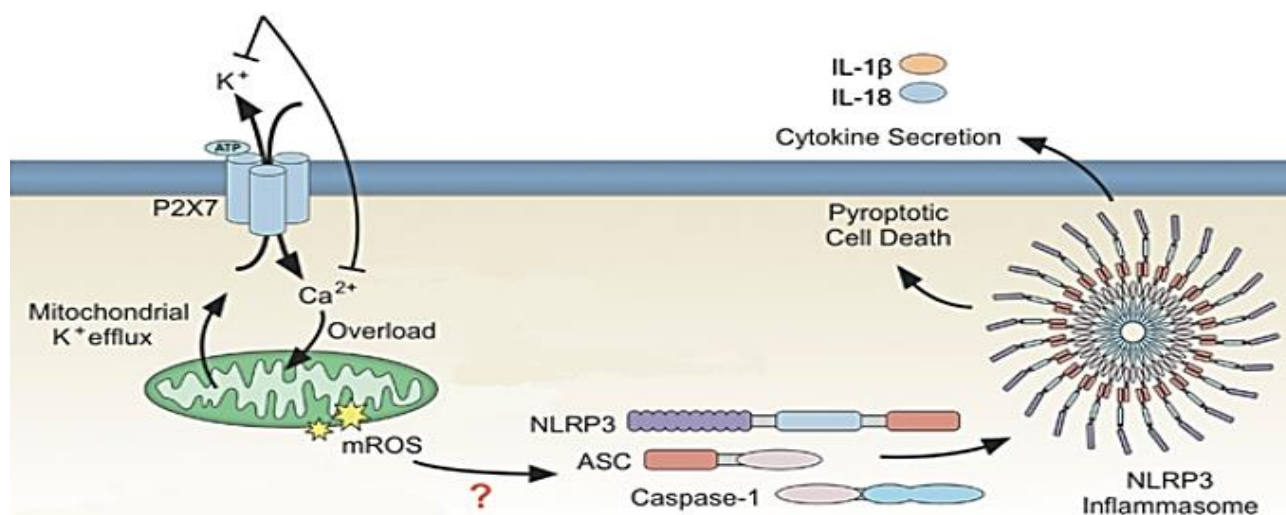


Figura 4: Via do receptor P2X7. A ativação da via do receptor P2X7 com ATP extracelular resulta na troca de potássio e cálcio através da membrana plasmática, predominantemente regulada pelo efluxo de potássio do citosol para o espaço extracelular. O influxo de cálcio e o efluxo de potássio causam uma sobrecarga mitocondrial resultando em desestabilização mitocondrial e geração de mROS, que ativa o inflamassoma NLRP3 através de um mecanismo desconhecido.

Fonte: Yaron et al. (2015)

Como já descrito anteriormente, a estimulação de células através do receptor P2X7 causa uma abertura de canais catiônicos que estão envolvidos na indução de apoptose e na liberação de IL-1 β (VERHOEF et al., 2003). A ativação contínua do receptor P2X7 induz a formação de poros na membrana permeáveis a solutos hidrofílicos e a apoptose. Já foi bem caracterizado que a indução de apoptose, através da ativação do receptor P2X7 em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, também resulta na morte da micobactéria (CANADAY et al., 2002; SHEMON et al. 2006). O receptor P2X7 é uma molécula chave na eliminação de MTB em macrófagos pela apoptose de macrófagos induzida por ATP (PLACIDO, 2006; MILLER, 2011).

Evidências crescentes propõem que os fatores genéticos do hospedeiro estão implicados na suscetibilidade à tuberculose (NADERI, HASHEMI, ANSARI, 2017; QIU et al., 2018). Variantes genética que levam a perda de função do receptor

P2X7 foram associadas a aumento do risco de desenvolver TB ativa (FERNANDO et al., 2005; SHEMON et al., 2006).

O gene *P2RX7* desempenha papel importante na codificação do receptor P2X7 na superfície dos macrófagos. Polimorfismos nesse gene podem levar à perda ou ao ganho de função do receptor (MILLER, 2011). O polimorfismo *P2RX7* rs3751143 responsável por uma perda de função, demonstrou que afeta a sensibilidade do *P2RX7* ao ATP e pode contribuir para o aumento da suscetibilidade à infecção por *M. tuberculosis* em humanos (BEN-SELMA et al., 2011; CHAUDHARY et al., 2018; WESSELIUS et al., 2012).

Um estudo feito por SOUZA DE LIMA e colaboradores (2016) com pacientes de tuberculose pulmonar na população do Amazonas, relacionou o SNP rs2230911 à perda de função do receptor P2X7. Enquanto que VARAHRAM e colaboradores (2014) estudaram esse gene na população Iraniana e não foi demonstrada associação com a TB. Tendo em vista as discordâncias em estudos, mais pesquisas imunogenéticas precisam ser realizadas para poderem contribuir para o melhor entendimento da doença.

2.6 Inflamassomas e a Gasdermina D

Os inflamassomas são um complexo multiproteico de sinalização intracelular do sistema imune inato, que desempenha funções críticas na defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos. Quando ativados são responsáveis por recrutar caspases que possuem papel importante no processamento de citocinas pró-inflamatórias e em um tipo de morte celular, denominada piroptose (MARTINON et al., 2009; LAMKANFI; DIXIT, 2012).

Os receptores promovem a montagem do inflamassoma após interação direta ou indireta com o ligante, após modificações citosólicas causadas pelo patógeno e/ou dano, como para o NLRP3 (LAMKANFI; DIXIT, 2014). O inflamassoma NLRP3 é o mais bem caracterizado e estudado até o momento (JO et al., 2016), seus mecanismos principais de ativação compreendem: o efluxo de K⁺ induzido por concentrações extracelulares de ATP (consequente a dano e morte celular) mediado pelo canal P2X7 (MUNOZ- PLANILLO et al., 2013); a liberação no citosol de catepsinas e outro conteúdo lisossomal após ruptura dessas organelas (HORNUNG

et al., 2008); a liberação no citosol de espécies reativas de oxigênio (ROS) e outras moléculas derivadas de danos as mitocôndrias (IYER et al., 2013; NAKAHIRA et al., 2011; SHIMADA et al., 2012); Os patógenos podem ativar o NLRP3 através de uma ou mais dessas vias (MUNOZ-PLANILLO et al., 2013) (**Figura 5**).

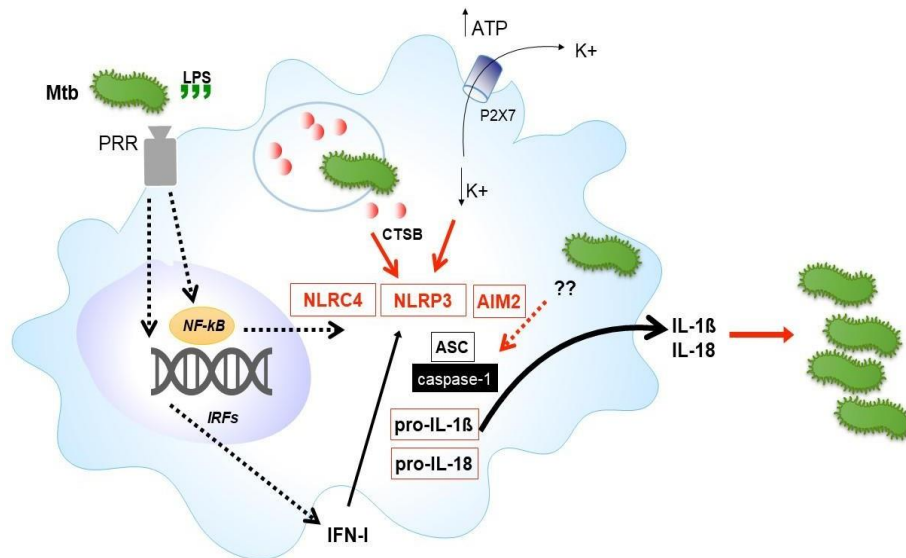


Figura 5: Mecanismos de ativação do inflamassoma. O bacilo da TB (Mtb) e o LPS são reconhecidos pelo PRR e induzem a expressão dos componentes do inflamassoma através da via NF-kB e do IFN-I. O bacilo fagocitado pode escapar para o citosol danificando o fagolisossomo e levando à liberação da catepsina-B lisossômica (CTSB). O CTSB ativa o inflamassoma NLRP3 e a consequente produção de IL-1 β e IL-18. Possivelmente outros mecanismos (??), independente de NLRP3, estão envolvidos na ativação do inflamassoma. O aumento do ATP extracelular ativa o receptor purinérgico P2X7, permitindo o efluxo de K⁺, que ativa o NLRP3.

Uma vez ativados, dar-se início a oligomerização e montagem do inflamassoma. A montagem ocorre através da associação entre NLR (*NOD-Like Receptor*) e a proteína adaptadora ASC que recruta pró-caspase-1, essa irá ativar caspase-1. (VLADIMER et al., 2013). A caspase-1 é a mais bem caracterizada e cliva precursores de citocinas, como pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas maturadas IL-1 β e IL-18, elas são potentes citocinas inflamatórias que são liberadas no meio extracelular (NADIRI et al., 2006).

A caspase-1 possui propriedades inflamatórias e é crucial para a piroptose canônica, mediada por inflamassoma e para a maturação de citocinas (LAMKANFI; DIXIT, 2012). A caspase-11 (também conhecida como caspase-4 ou -5 em humanos), outra caspase inflamatória, é o componente central do inflamassoma não-canônico. Ela atua diretamente como um receptor do lipopolissacarídeo bacteriano citosólico (LPS) e pode desencadear a piroptose, mas seu efeito na maturação da IL-1 β e IL-18 é indireto, porque esse processo requer a ativação da caspase-1 dependente de NLRP3 (KAYAGAKI et al., 2011).

A piroptose é um tipo de morte celular programada que apresenta formação de poros na membrana plasmática, edema celular e ruptura da membrana plasmática. A IL-1 β e a IL-18 afetam as células e componentes das imunidades inata e adaptativa, por meio de uma infinidade de mecanismos que contribuem para as respostas do hospedeiro contra patógenos infectados (NETEA et al., 2010). Embora a piroptose tenha mecanismos desconhecidos, demonstrou-se que ela restringe a replicação *in vivo* e a dispersão de micróbios (MIAO, 2010). O efeito pró-inflamatório da IL-1 β , IL-18 e da piroptose pode contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias (LAMKANFI, 2014).

Na via não canônica do inflamassoma, o LPS liberado no citoplasma pelas bactérias gram-negativas se liga às caspases 4 e 5 em humanos e à caspase 11 em camundongos. Estas caspases clivam a Gasdermina D de 53 kDa em um fragmento N-terminal de 31 kDa e um C-terminal de 22 kDa. O fragmento N-terminal inicia a piroptose da célula e ativa o inflamassoma NLRP3, para conduzir a maturação dependente de caspase 1 da citocina pró-inflamatória IL-1 β . A IL-1 β é liberada da célula quando ocorre a ruptura da membrana (MAN; NLR, 2015).

Na via canônica do inflamassoma, a ativação dos receptores NLRP3, NLRC4, AIM2 ou Pyrin desencadeia o recrutamento da proteína adaptadora ASC e da caspase 1 para a mesma plataforma de inflamassoma. Neste caso, a caspase 1 cliva tanto a Gasdermina D como a pró-IL-1 β para iniciar a piroptose e a maturação da IL-1 β , respectivamente (**Figura 6**) (MAN; KANNEGANTI, 2015).

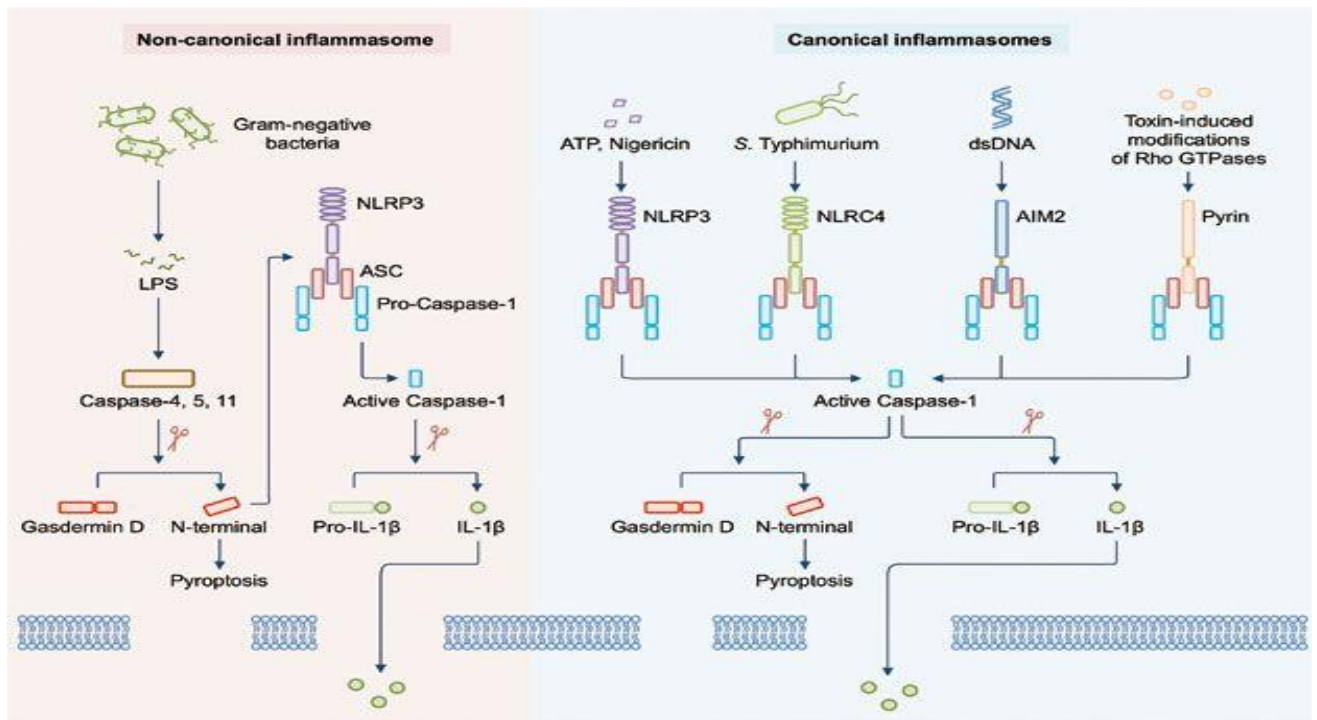


Figura 6: O papel da Gasdermina D na piroptose induzida por inflamassomas canônicos e não canônicos.

Fonte: MAN; KANNEGANTI, 2015.

Gasderminas (GSDMs) pertencem a uma superfamília de proteínas que é encontrada apenas em vertebrados e consiste em GSDMA, GSDMB, GSDMC, GSDMD, GSDME (também conhecido como DFNA5) e DFNB59 em humanos (FENG S, FOX D, MAN SM, 2018). Exceto para DFNB59, todos os membros da superfamília GSDM contêm uma estrutura conservada de dois domínios: domínios N-terminal e C-terminal e compartilham um mecanismo autoinibitório (KOVACS E MIAO, 2017). Quando o domínio N-terminal desses GSDMs é liberado, ele possui atividade formadora de poros que causa morte inflamatória associada à perda de integridade da membrana celular e liberação de mediadores inflamatórios. Também foi descoberto que mutações espontâneas que ocorrem nos genes de GSDMs têm sido associadas ao desenvolvimento de certas doenças autoimunes, bem como cânceres (ZHENG et al., 2020).

A Gasdermina D (*GSDMD*) é um componente proteico crucial dos inflamassomas, presente em NLRP3. Mais recentemente, a *GSDMD* foi identificada como o executor chave da morte celular inflamatória conhecida como piroptose, que é desencadeada por vias de inflamassoma imune inata (KAYAGAKI, 2015). O fragmento N-terminal da *GSDMD*, gerado pela ação de clivagem da caspase-1, tem a função de executar a piroptose e promover a secreção de IL-1 β maturada, gerada pela proteólise pela caspase-1 madura (HE et al., 2015).

Outros estudos descobriram que *GSDMD* N-terminal se liga a fosfolipídios que estão localizados no folheto interno da membrana plasmática e é então translocado para a membrana celular onde se transforma, se inserindo na membrana e formando poros na membrana celular (SBORGI et al., 2016; MULVIHILL, 2018). A formação de poros é uma característica da piroptose. Embora continue a ser testado experimentalmente, a *GSDMD* pode promover a secreção de IL-1 β através da mesma ação molecular que induz a piroptose. Enquanto isso, o inflamassoma NLRP3 poderia ativar uma via de apoptose quando a via piroptótica é bloqueada (ELE et al., 2015; ZHAO; SHI; SHAO, 2018).

Estudos realizados por ELE e colaboradores (2015) demonstraram que a *GSDMD* foi recrutada para inflamassomas NLRP3 com cinética semelhante à caspase-1. A *GSDMD* foi clivada pela pró-caspase-1 e mais provavelmente também pela caspase-1 em inflamassomas, e a clivagem proteolítica da *GSDMD* liberou seu fragmento N-terminal necessário para mediar a piroptose e a secreção de IL-1 β , mas sem atuação no processamento da citocina. A deleção do gene da *GSDMD* demonstrou que ela é necessária para piroptose e para a secreção, mas não para a maturação proteolítica de IL-1 β em ambas as respostas de inflamassomas canônico e não canônico. Outros dois estudos em 2015 demonstraram que *GSDMD* é essencial para iniciar a piroptose (SHI, 2015; KAYAGAKI et al, 2015) e também sugerem que o desencadeamento da produção de IL-1 β por LPS citosólico é dependente de *GSDMD* (KAYAGAKI et al., 2015).

A *GSDMD-N* é capaz de matar micro-organismos livres de células e intracelulares e pode ser considerada um novo agente antibacteriano. No entanto, ainda não se sabe se a *GSDMD-N* é capaz de permeabilizar a membrana dos fagossomas e eliminar as bactérias escondidas dentro dessas organelas. Até agora, não há evidências de tal função. É provável que a inibição do crescimento

bacteriano seja mediada por outros componentes da caspase (GAIDT; HORNING, 2016).

Descobriu-se que as proteínas formadoras de poros relacionadas à morte celular demonstram um alto grau de variação na população (LEK et al., 2016). Especificamente, alguns desses SNPs interrompem os locais de fosforilação e ubiquitinação putativos ou são encontrados em locais que são estruturalmente importantes para a função piroptótica. Foi demonstrado que a diversidade genética em *GSDMD* altera a função bioquímica para criar variação fenotípica na função piroptótica, resultando em respostas de morte celular inflamatória diferencial (KAYAGAKI et al., 2015; SHI et al., 2015).

Diante da importância dos componentes do inflamassoma para a resposta imune frente à infecção por *M. tuberculosis*, mutações nos genes que codificam para tais receptores e suas vias de sinalização, podem resultar em uma inadequada ou excessiva resposta inflamatória, elevando o risco a TB assim como em sua imunopatogênese resultante (CASANOVA et al., 2011; ZHANG et al., 2013). É importante realizar estudos envolvendo polimorfismos em diferentes regiões de genes para analisar se este pode estar associado à susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento da TB, isso inclui estudos imunogenéticos ao gene da Gasdermina D, que pode elucidar mecanismos envolvidos na resposta imune a essa doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar se os polimorfismos de base única (SNP) em genes de Gasdermina D (*GSDMD*) e receptores P2X7 (*P2RX7*) estão associados à tuberculose (TB) pulmonar.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos em genes da *GSDMD* e do *P2RX7* em paciente com TB pulmonar e grupo controle;
- Analisar a possível relação dos polimorfismos em genes da Gasdermina D e/ou *P2RX7*, como marcadores demográficos e imunogenéticos, quanto ao risco ou proteção para desenvolvimento de TB;
- Verificar se os polimorfismos dos genes da *GSDMD* e *P2RX7* estão relacionados às concentrações da IL-1 β no plasma sanguíneo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Estudo prospectivo observacional para avaliar os polimorfismos de base única (SNP) nos genes da Gasdermina D e *P2RX7* e sua relação em pacientes com tuberculose (TB) pulmonar e controles saudáveis.

4.2 Aspectos éticos

O projeto é vinculado a um projeto maior intitulado “Avaliação de polimorfismos genéticos relacionados à resposta imunológica na tuberculose”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (via Plataforma-Brasil/CEP-UFAM), sob responsabilidade da professora Aya Sadahiro, aprovado em 25 de agosto de 2019, CAAE: 19021519.9.0000.5020, Número do Parecer: 3.530.854 (Anexo 1).

4.3 População de estudo

Constituída por indivíduos da região Norte, principalmente do estado do Amazonas, selecionados na Policlínica de Referência em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes, com idade entre 18 e 60 anos e de ambos os sexos.

4.4 Local de coleta de amostra biológica

Os pacientes foram recrutados na Policlínica Cardoso Fontes, localizada no município de Manaus, onde está sendo realizada a coleta das amostras biológicas necessárias para a pesquisa após a aceitação dos participantes do projeto e após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.5 Cálculo da amostra

A definição do tamanho da amostra foi calculada de acordo com o número de casos de TB atendidos pela Policlínica Cardoso Fontes. Em 2018, a policlínica diagnosticou 311 novos casos de TB pulmonar. As amostras biológicas necessárias para esse projeto foram estimadas usando o programa Gpower versão 3.1, utilizando $\alpha = 0,05$ (5%) e $\beta = 0,1$ (10%), poder da amostra de 0,95. O tamanho amostral foi de 190 indivíduos com TB e 190 controles.

4.6 Critério de inclusão e exclusão

4.6.1. Critérios de Inclusão:

Grupos que participaram do presente estudo:

- Pacientes com TB pulmonar: pessoas sintomáticas ou assintomáticas, que apresentaram resultados positivos pelo GeneXpert (Teste Rápido Molecular - TRM) para *Mycobacterium tuberculosis*, ou que tiveram baciloscopias de escarro positivas e/ou cultivo positivo do escarro com isolamento de *M. tuberculosis*, ou pacientes com exames de imagem pulmonar compatíveis, com sinais e sintomas da TB.
- Controles: são os indivíduos que mantêm contato com os pacientes com TB, pessoas saudáveis e que convivem com esses pacientes (acompanhantes dos pacientes ou profissionais de saúde).

4.6.2. Critérios de Exclusão:

Foram excluídos do estudo as gestantes, indivíduos transplantados, indivíduos HIV positivos, indivíduos com neoplasias, diabetes, doenças autoimunes ou ainda, indivíduos fazendo uso de algum imunorregulador.

Além disso, foram excluídos os pacientes que tiveram resultados positivos na cultura para micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*.

Contatos que no decorrer do projeto apresentaram sintomas respiratórios e/ou resultados da baciloscopia e/ou cultivo positivo para *Mycobacterium tuberculosis* foram realocados para o grupo de pacientes.

4.7 Exames micobacteriológicos

As amostras biológicas dos pacientes e controles utilizadas nesse projeto foram escarro e sangue total. As amostras de escarro coletadas foram registradas no Laboratório de Micobacteriologia do INPA e foram submetidas a exames de microscopia e cultivo. Foi utilizada a técnica de baciloscopia direta (BRASIL, 2008) e pós-concentração (SALEM et al. 1990) juntamente com a coloração da lâmina pela técnica de Kinyoun para a microscopia do escarro, visualizada em objetiva com aumento de 1000x. O cultivo foi pelo método PKO (Petrof/Kudoh/Ogawa) (SALEM et al., 2007) e por último a identificação de *M. tuberculosis* foi feita por PCR, utilizando os primers para o elemento de inserção IS6110, de acordo com Hermans et al. (1990) e atualizado por Van Embden et al. (1993).

4.8 Extração de DNA

As amostras de sangue foram registradas no laboratório de Imunologia Molecular (código) e a extração de DNA dessas amostras coletadas foi realizada pela técnica descrita por Gustincich et al. (1991), com modificações.

Após retirar o sobrenadante formado para a coleta da camada de leucócitos (buffy coat), o DTAB (detergente catiônico) a 12% lisou as membranas celulares e nucleares. Adicionou-se o clorofórmio que levou a uma desproteíntização, fazendo com que o DNA ficasse em uma fase aquosa. A precipitação do DNA foi feita com o CTAB a 0,5% e foram feitas lavagens para a purificação do DNA.

Realizou-se a quantificação dessas amostras de DNA em espectrofotômetro e foi feito o armazenamento a -20 °C, até o momento de sua utilização.

4.9 Genotipagem por PCR em tempo real

A identificação dos polimorfismos da Gasdermina D e dos receptores P2X7 foi realizada pela técnica de PCR quantitativa em tempo real em equipamento da QuantStudio 3 Real-Time PCR, da *Applied System*. Foi utilizado software de discriminação alélica que gera uma curva de amplificação, o que permite a

identificação dos genótipos classificados em: heterozigoto, homozigoto para o alelo normal e homozigoto para o alelo mutado.

A genotipagem dos indivíduos para os polimorfismos de base única foi realizada utilizando sondas fluorescentes TaqMan com sequências específicas para determinada região (**Quadro 1**). Foram feitas reações em microplacas com 96 poços para cada gene e os devidos reagentes foram adicionados: TaqMan Genotyping Master mix, sondas TaqMan específicas para Gasdermina D e *P2RX7*, DNA e água ultrapura, em um volume final de 11 μ L, conforme o **Quadro 2**. As microplacas foram submetidas à termociclagem com 50 ciclos a temperaturas de 60 a 95°C.

Foi incluído um controle negativo em cada microplaca, com todos os reagentes acima mencionados, exceto o DNA, para garantir que não houve contaminação dos reagentes.

Quadro 1: Características das sondas utilizadas.

Gene	Polimorfismo	Cromossomo	Sequência da sonda [VIC/FAM]	Alelo	Região SNP
GSDMD	rs7834318	8:143555087	TTTGTGGCTGCAGCATTCC AACGCA[A/C]ACACCACCAG AAATCCCCTTCAGCA	Selvagem: C Polimórfico: A	Intron
	rs2290414	8:143561433	CAGCCACCCGCGACAGGTG AGAGCC[A/G]AGAGCCCCC AGCATGGGGTGTCCGG	Selvagem: G Polimórfico: A	Intron
P2RX7	rs208290	12:121156253	ACCCTGGGGTGTATTTGAG CCCACA[A/G]ATATCTACTG AGCACCTGCCTCTTT	Selvagem: A Polimórfico: G	Intron
	rs2230911	12:121177328	GTGTTTCATCGACTTCCTCAT CGACA[C/G]TTACTCCAGTA ACTGCTGTGCTCC	Selvagem: C Polimórfico: G	Éxon
	rs3751143	12:121184501	CCTGAGAGCCACAGGTGCC TGGAGG[A/C]GCTGTGCTG CCGAAAAAGCCGGGG	Selvagem: A Polimórfico: C	Éxon

Quadro 2: Condições para a qPCR usadas para *GSDMD* e *P2RX7*.

Reagentes	Concentração	Quantidade para 1 reação
Água ultrapura	1x	4,5 µL
TaqMen Genotyping Master mix 2x	1x	5,0 µL
Sonda 20x	0,5x	0,5 µL
DNA	50 ng/µL	1,0 µL
Volume final	-	11,0 µL

4.10 Quantificação de Citocina

A quantificação da citocina IL-1 β foi realizada, a partir do plasma sanguíneo, pela a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) sanduíche. Os reagentes foram do Kit BioLegend ELISA MAXtm Deluxe Set. O ensaio imunoenzimático foi realizado conforme sugerido pelo fabricante do Kit. A leitura da reação foi feita no espectrofotômetro de placas de 96 wells (BioRad) com filtro de 450 nm. Os resultados do ELISA foram emitidos em densidade ótica (DO), e posteriormente convertidos para pg/mL.

4.11 Análise dos dados

Foi utilizada a estatística descritiva para análise dos dados de pacientes e controles. As análises genéticas de associação e comparações múltiplas foram realizadas por regressão logística múltipla, empregando o software estatístico "R", versão 3.6.2, juntamente com o pacote "SNPassoc". O programa Haploview (BARRETT et al., 2005) utilizado para investigar o desequilíbrio de ligação (LD) e para derivar os haplótipos.

Para avaliação dos resultados da citocina IL-1 β versus genótipos, será utilizada a Análise de Variância (ANOVA) pelo programa GraphPad Prism 7.0. Será adotado o limiar significativo de $p < 0,05$ com intervalo de confiança de 95%.

4.12 Orçamento e Fonte de Financiamento

Este projeto tem apoio financeiro do Laboratório de Imunologia Molecular (LIM) e do Laboratório de Micobacteriologia do INPA, com projetos aprovados pela FAPEAM e CNPq.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Descrição da população recrutada

Foram incluídos no estudo 504 participantes, sendo 245 pacientes de tuberculose (TB) pulmonar e 259 controles saudáveis, de acordo com o fluxograma abaixo (**Figura 7**). 406 amostras foram testadas para identificação dos polimorfismos do gene *GSDMD* (202 de TB e 204 de controle) e 400 amostras foram testadas para o gene *P2RX7* (200 de TB e 200 de controle). A extração de DNA das amostras coletadas foi realizada com total sucesso. Os modelos das fichas de cadastro dos pacientes podem ser encontrados nos **apêndices III** (pacientes) e **IV** (controles) e é possível ver quais informações foram coletadas dos participantes. Nesse estudo, as variáveis idade, sexo, naturalidade, tabagismo, alcoolismo e vacinação por BCG são consideradas.

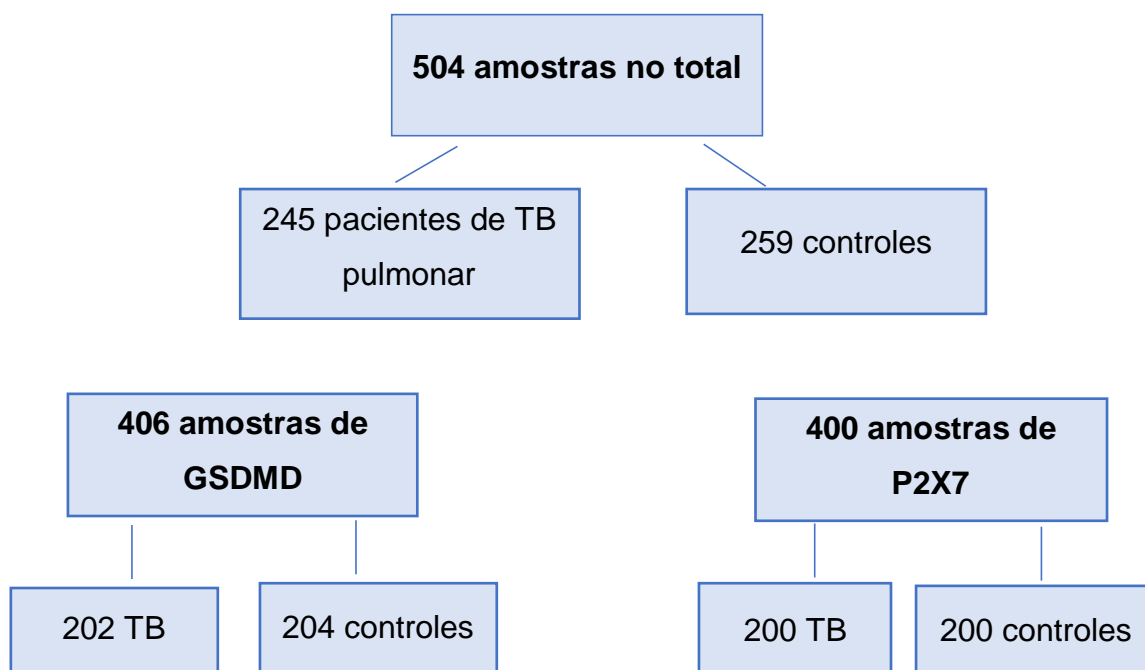


Figura 7: Fluxograma do número total de amostras e depois dividido entre os grupos gênicos da Gasdermina D e os receptores P2X7, respectivamente.

Foi possível realizar a genotipagem em 399 amostras testadas para o gene *GSDMD* e 396 amostras testadas para o gene *P2RX7*. Sete amostras não amplificaram ou tiveram resultados inconclusivos nos ensaios de qPCR para o gene *GSDMD*, o mesmo ocorreu com quatro amostras para o gene *P2RX7*.

5.2 Características gerais da população estudada

As características gerais da população estudada estão descritas na **Tabela 3**. Observou-se uma distribuição de faixa etária semelhante entre pacientes com TB e controles. Os pacientes apresentaram média de 38 anos e eram compostos em sua maioria pelo sexo masculino (60,1%) como já é evidenciado na literatura (BRASIL, 2016), visto que essa idade reflete o período de alta produtividade profissional, logo as pessoas podem estar mais expostas nos ambientes de trabalho, e em contatos com indivíduos infectados e doentes.

Uma revisão realizada por Rodrigues e Mello (2018) concluiu que realmente a tuberculose afeta mais homens, em idade economicamente ativa e com baixa escolaridade, e isso possui relação com a exclusão social e a pobreza, podendo levar ao abandono do tratamento. Esses dados corroboram os apresentados no presente estudo, porquanto há um desencadeamento cíclico correspondente ao conhecimento sobre a patologia, que incide no não tratamento ou abandono do mesmo, que resulta em mais transmissibilidade e incremento na incidência da doença. A maior prevalência de tuberculose (TB) em indivíduos do sexo masculino também foi evidenciada em estudos realizados por Figueira et al. (2021) e Santos et al. (2017), atrelado ao déficit de utilização dos serviços de saúde.

A maioria dos pacientes e controles eram originários da cidade de Manaus, 51% e 71% respectivamente. É necessário destacar que há anos a capital apresenta o maior coeficiente de incidência para TB (BRASIL, 2020), sendo assim um local de risco de exposição ao agente causador da TB.

Tabela 3 - Características gerais dos pacientes de TB pulmonar e controles saudáveis.

Características	Pacientes de TB (n=245)	Controles (n=259)
Idade (Média e Desvio padrão)	38,70 ± 14,32	31,34 ± 12,14
Sexo:		
Masculino	60,1%	43,6%
Feminino	39,9%	56,4%
Naturalidade:	(n=244)	(n=222)
Manaus	51,6%	70,7%
Outros municípios do Amazonas	32,8%	15,8%
Municípios de outros estados	15,6%	13,5%

As variáveis tabagismo, alcoolismo e vacinação por BCG também foram analisadas (**Tabela 4**). As duas primeiras foram associadas ao risco de desenvolver a doença clínica ($p < 0,0001$, $OR = 5,26$; $p = 0,0250$, $OR = 1,72$) e esses resultados corroboram com outras pesquisas. Desde 1918 o tabagismo foi identificado como um fator de risco para o desenvolvimento da tuberculose (TB) (WEBB, 1918). Uma revisão sistemática concluiu que o tabagismo está fortemente associado à tuberculose latente, assim como à tuberculose ativa, à recidiva e ao aumento da mortalidade. Esses efeitos parecem ser independentes de outros fatores de risco de tuberculose, como o alcoolismo e as condições socioeconômicas (WHO e INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASES, 2007).

O tabagismo, além de contribuir para o surgimento da tuberculose (TB), apresenta interferência no seu tratamento, com relatos de que fumantes apresentam maior positividade na baciloscopia do escarro, registram elevada transmissibilidade e grandes lesões cavitárias, além de maiores recidivas (CENTIS, 2018; MATSUMOTO et al., 2012; TRIFUNOVIĆ et al., 2009; WHANG e SHEN, 2009). Segundo dados da OMS, mais de 20% da incidência global de TB pode ser atribuída ao tabagismo, que aumenta em duas vezes e meia o risco da doença (WHO, 2014) e nove vezes maior risco de mortalidade quando comparados aos não fumantes

(CHI-PANG WEN et al., 2010; INCA, 2019). A fumaça do cigarro promove a redução do clearance mucociliar do trato respiratório e reduz a produção de TNF- α por macrófagos, aumentando a aderência das bactérias e rompendo o epitélio protetor. Além disso, existem também evidências de que o nível sérico de imunoglobulinas esteja 10-20% menor nos fumantes quando comparados com os não fumantes (ZYL SMIT, 2010; COSIO, 2009).

O uso nocivo do álcool está classificado entre os cinco principais fatores de risco para doenças, incluindo a tuberculose (TB), incapacidades e morte (WHO, 2009). Estima-se que aproximadamente 10% de todos os casos de tuberculose são atribuíveis ao uso de álcool (REHM, 2009). Feidman (1961) e Raviglione et al. (2011) relatam que o álcool tem sido associado como uma das causas de deficiência de nutrientes, prejudicando a imunidade do hospedeiro e finalmente aumentando o risco do indivíduo de adquirir a tuberculose.

O abuso de álcool influencia não apenas a incidência de tuberculose, mas também sua evolução clínica e seus desfechos. Os indivíduos com transtorno do uso de álcool são considerados mais infectáveis que aqueles que não o têm, pois, o alcoolismo tem sido associado à descoberta de doença cavitária em radiografias de tórax e à positividade da baciloscopia (HERMOSILLA, 2017; FISKE, 2009). Além disso, tem sido associado a taxas mais altas de abandono de tratamento e recaída (JAKUBOWIAK, 2007).

Neste estudo, a variável vacinação por BCG teve associação com efeito protetor ($p=0,0098$, $OR=0,34$). Sabe-se que a vacina BCG é amplamente utilizada com a finalidade de proteger contra as formas mais graves da TB (MARTIN et al., 2018), como a meningite tuberculose e TB miliar (disseminada pelo corpo através da corrente sanguínea), estudos experimentais e observacionais realizados em vários países apresentaram proteção acima de 80% (CAMARGOS, 1988; COSTA, 1991).

Já o efeito protetor da vacina BCG para TB pulmonar foi heterogêneo, apresentou variação entre zero e 80% (ARONSON, 1948; ROMANUS, 2006). Essa variação da proteção da vacina tem sido atribuída a diversos fatores, como diferenças na exposição a micobactérias ambientais, características genéticas da população, diferenças na virulência do *M. tuberculosis*, diferenças nas cepas de BCG, diferenças nutricionais. Aspectos metodológicos relacionados aos diferentes

estudos também foram identificados como fatores contribuintes para esta variação (SPRINGETT, 1984; STARKE, 2004).

Tabela 4: Características gerais dos pacientes de TB pulmonar e controles saudáveis quanto as variáveis: tabagismo, alcoolismo e vacinação BCG.

Características	Pacientes de TB	Controles	TB vs. Controles		
			OR	IC95%	Valor-p
Tabagismo:	(n=211)	(n=205)			
Sim	30,8%	7,8%	5,26	2,90- 9,32	<0,0001
Não	69,2%	97,2%			
Alcoolismo:	(n=183)	(n=192)			
Sim	33,9%	22,9%	1,72	1,10- 2,69	0,0250
Não	66,1%	77,1%			
BCG:	(n=224)	(n=217)			
Sim	88,8%	95,9%	0,34	0,15- 0,75	0,0098
Não	11,2%	4,1%			

5.3 Análise dos polimorfismos nos genes *GSDMD* e *P2RX7*

A genotipagem foi realizada com base no perfil das curvas de amplificação geradas para os SNPs dos genes *GSDMD* (rs7834318 e rs2290414) e *P2RX7* (rs208290, rs2230911 e rs3751143) nos grupos de pacientes com TB pulmonar e controles. Foram analisadas 497 amostras, sete foram excluídas da análise de polimorfismos pela ausência de amplificação no ensaio da qPCR. Alguns dos resultados obtidos podem ser visualizados abaixo nas **figuras 8, 9, 10, 11 e 12**. Os gráficos de discriminação alélica dos SNP dos genes estudados são apresentados na **figura 13**.

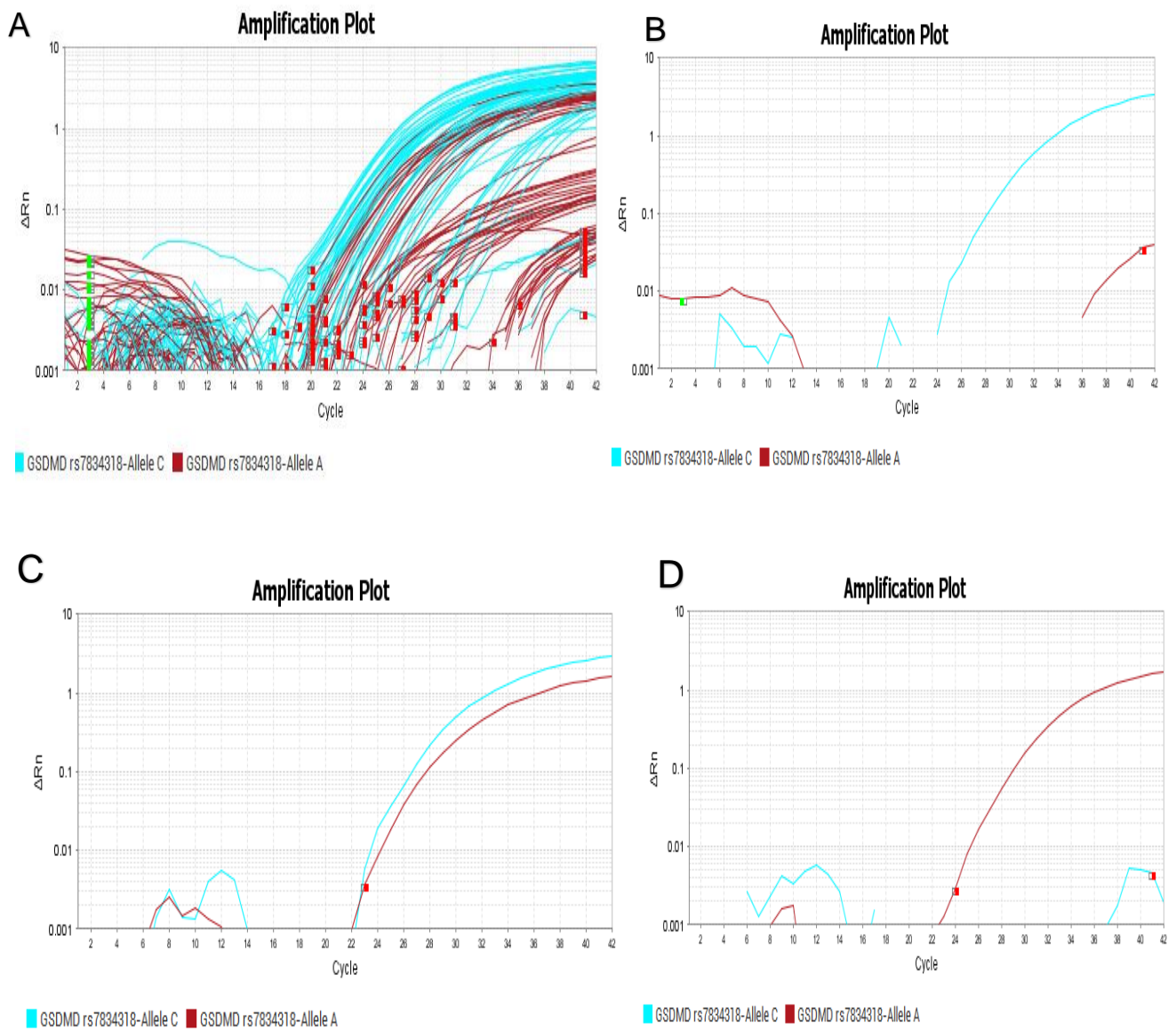


Figura 8: Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs7834318 do gene *GSDMD*. A – Curvas das amostras testadas (placa total). B - Homozigoto selvagem (CC). C - Heterozigoto (AC). D- Homozigoto mutado (AA).

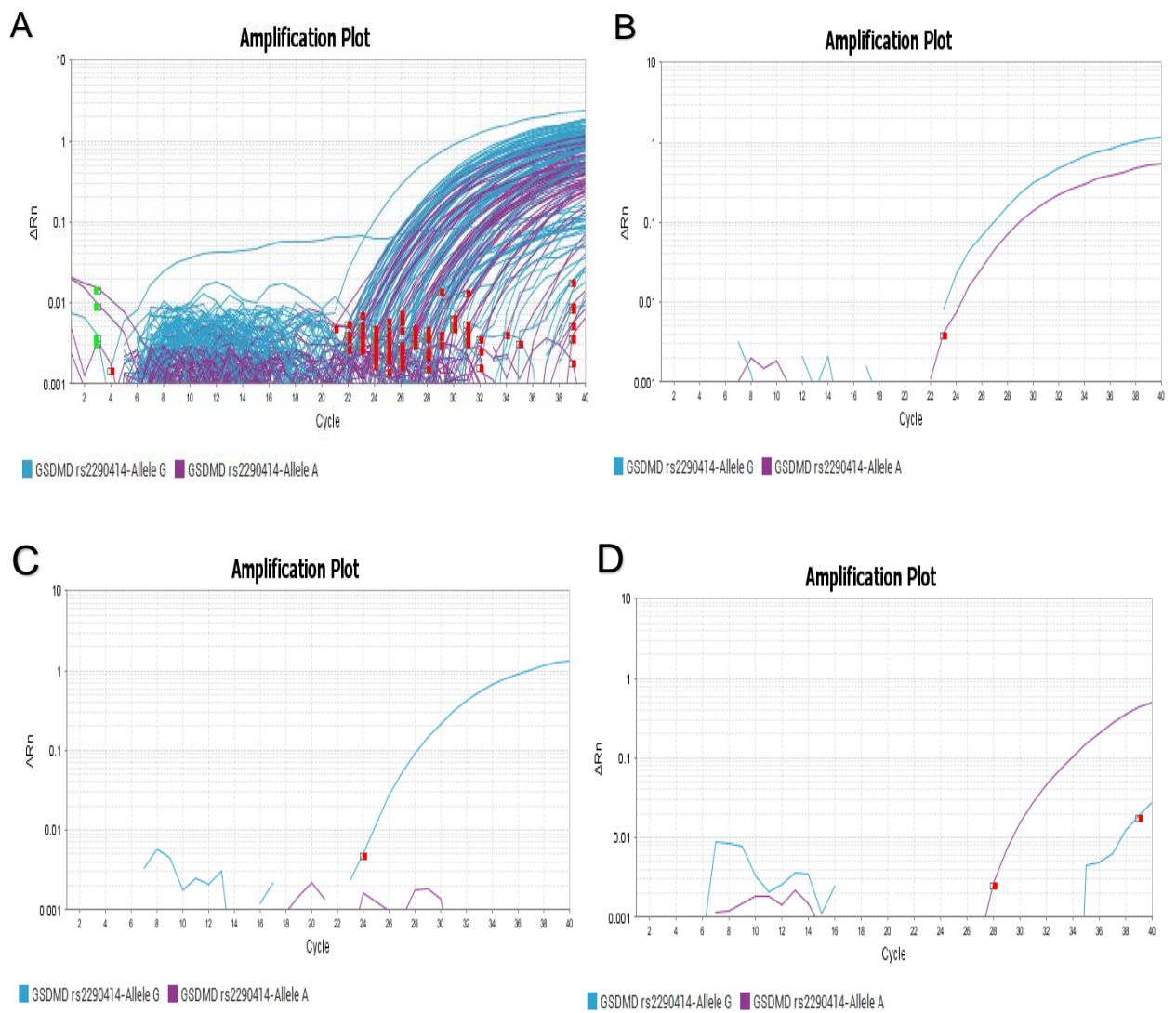


Figura 9: Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs2290414 do gene *GSDMD*. A – Curvas das amostras testadas (placa total). B - Heterozigoto (AG). Homozigoto selvagem (GG). C - D- Homozigoto mutado (AA).

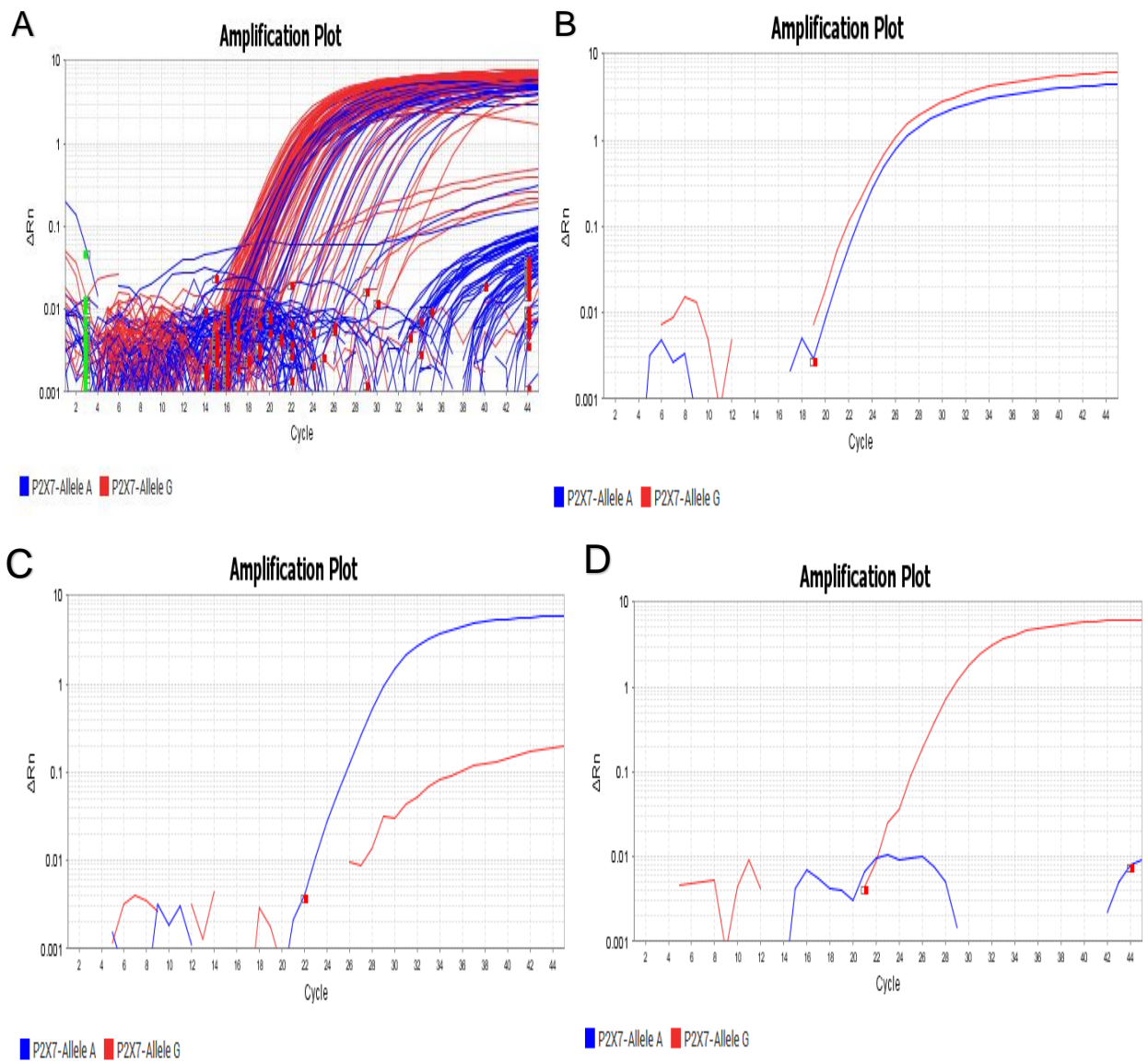


Figura 10: Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs208290 do gene *P2RX7*. A – Curvas das amostras testadas (placa total). B - Heterozigoto (AG). C - Homozigoto selvagem (AA). D - Homozigoto mutado (GG).

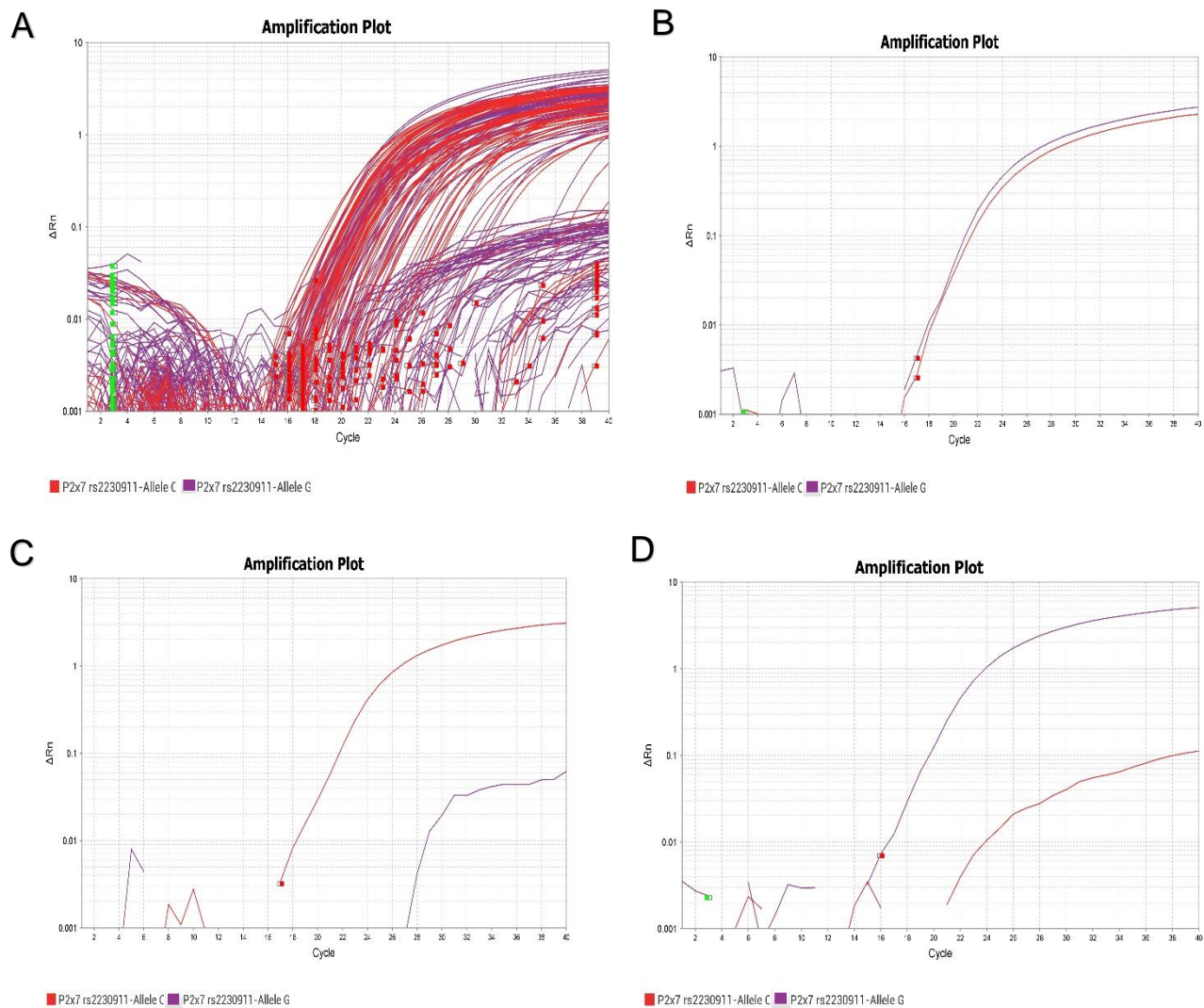


Figura 11: Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs2230911 do gene *P2RX7*. A – Curvas das amostras testadas (placa total). B - Heterozigoto (CG). C - Homozigoto selvagem (CC). D - Homozigoto mutado (GG).

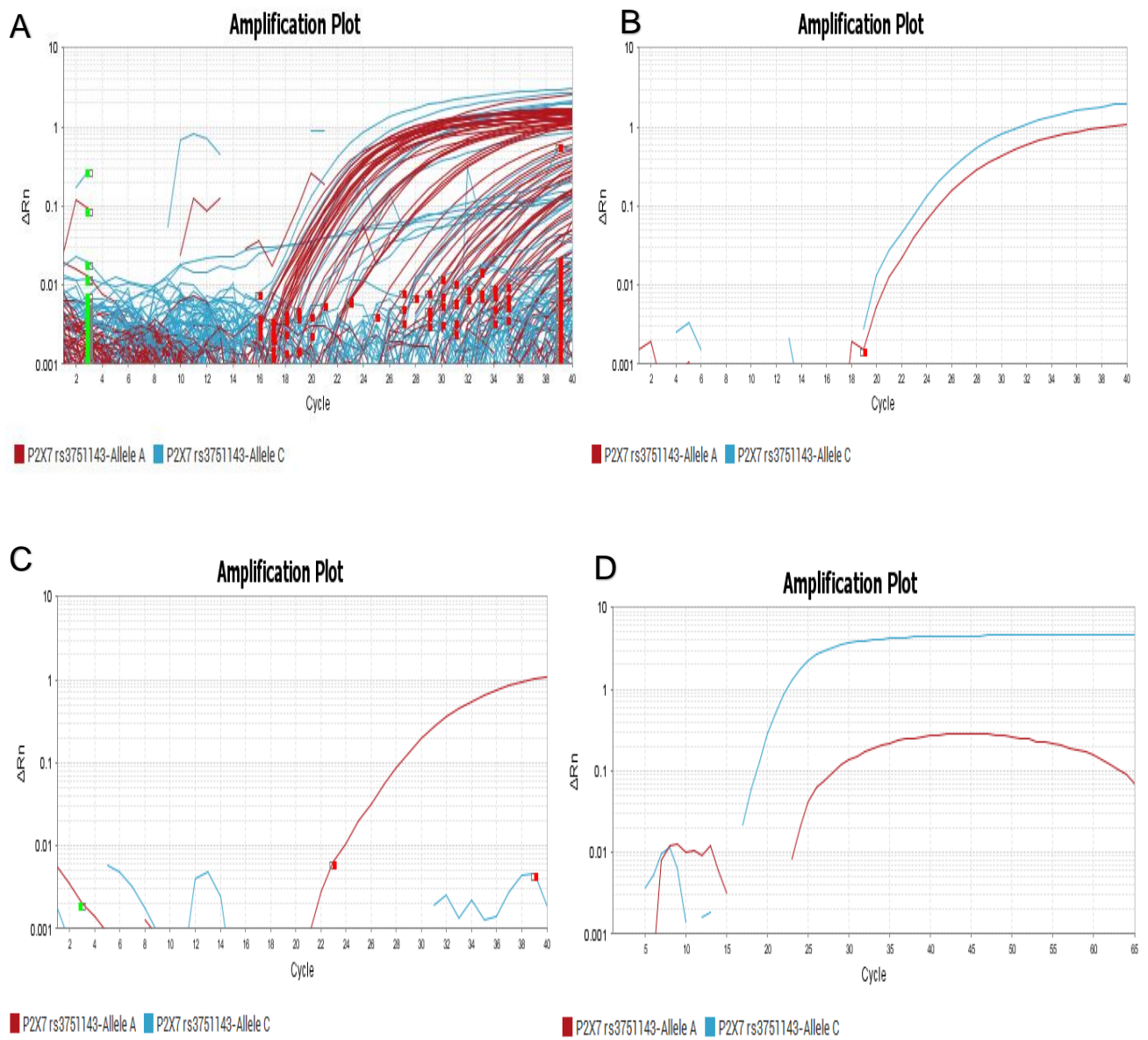


Figura 12: Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs3751143 do gene *P2RX7*. A – Curvas das amostras testadas (placa total). B - Heterozigoto (AC). C - Homozigoto selvagem (AA). D - Homozigoto mutado (CC).

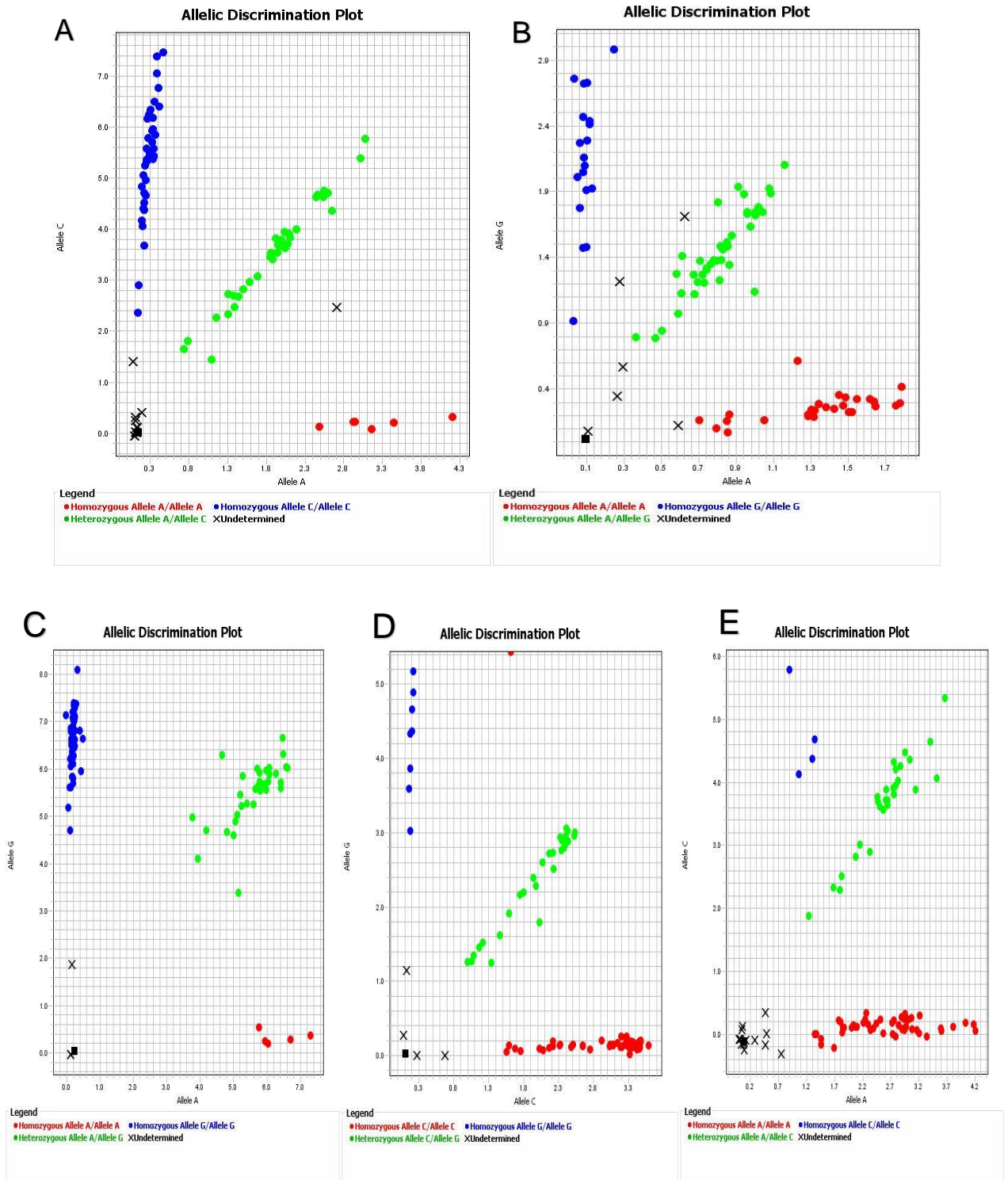


Figura 13: Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo nos genes *GSDMD* (A: rs7834318, B: rs2290414) e *P2RX7* (C: 208290, D: rs2230911, E: rs3751143).

5.4 Análise de associação para os polimorfismos

Todos os polimorfismos dos genes *GSDMD* e *P2RX7* estavam distribuídos de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos avaliados (**Quadro 3**).

Quadro 3: Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos SNPs nos genes *GSDMD* e *P2RX7* nos grupos controles e pacientes com TB.

Gene	ID SNP	EHW	
		Controle Valor-p	Paciente TB Valor-p
<i>GSDMD</i>	rs7834318	0,3165	0,0939
	rs2290414	0,5746	0,887
<i>P2RX7</i>	rs208290	0,0882	0,0596
	rs223911	0,0949	0,5281
	rs3751143	0,0580	0,2227

A partir da genotipagem realizada foram analisadas as distribuições dos diferentes SNPs estudados quanto as frequências genotípicas e alélicas na população nos grupos compostos de pacientes com TB pulmonar e controles. Também foi realizada a análise de associação dos SNPs e posteriormente uma análise em combinação com as variáveis: idade, sexo, tabagismo, alcoolismo e vacinação por BCG (**Tabela 5**).

Tabela 5: Distribuição das frequências dos genótipos e alelos dos polimorfismos *GSDMD* e *P2RX7* em controles saudáveis e pacientes com TB.

Genótipos	Controles	Pacientes TB	TB vs Controles	
			Valor-p	OR (95% IC)
<i>GSDMD</i> (rs7834318) (n=199)		(n=200)		
A/A	21 (0,11%)	24 (0,12%)	0.64760	R 1.16 (0.62-2.15)
A/C	78 (0,39%)	74 (0,37%)		
C/C	100 (0,50%)	102 (0,51%)		

Alelos				
A	120 (0,30%)	122 (0,31%)		
C	278 (0,70%)	278 (0,69%)		
GSDMD (rs2290414) (n=203)		(n=202)		
A/A	61 (0,30%)	55 (0,27%)		D
A/G	97 (0,48%)	100 (0,50%)	0.52993	1.15 (0.75-1.77)
G/G	45 (0,22%)	47 (0,23%)		
Alelos				
A	219 (0,54%)	210 (0,52%)		
G	187 (0,46%)	194 (0,48%)		
P2RX7 (rs208290) (n=198)		(n=200)		
A/A	12 (0,06%)	18 (0,09%)		O
G/A	93 (0,47%)	65 (0,33%)	0.003116	0.54 (0.36-0.82)
G/G	93 (0,47%)	117 (0,58%)		
Alelos				
A	117 (0,30%)	101 (0,25%)		
G	279 (0,70%)	299 (0,75%)		
P2RX7 (rs2230911) (n=199)		(n=200)		
C/C	127 (0,64%)	125 (0,62%)		O
C/G	59 (0,30%)	64 (0,32%)	0.61096	1.12 (0.73-1.71)
G/G	13 (0,06%)	11 (0,06%)		
Alelos				
C	313 (0,79%)	314 (0,78%)		
G	85 (0,21%)	86 (0,22%)		
P2RX7 (rs3751143) (n=199)		(n=198)		
A/A	127 (0,64%)	122 (0,61%)		O
A/C	58 (0,29%)	63 (0,32%)	0.56296	1.13 (0.74-1.74)
C/C	14 (0,07%)	13 (0,07%)		
Alelos				
A	221 (0,78%)	230 (0,80%)		
C	61 (0,22%)	58 (0,20%)		

Legenda. TB: pacientes com tuberculose. OR: odds ratio e IC95%: intervalo de confiança de 95%. Foi adotado o melhor modelo de herança genética para cada SNP, sendo R: recessivo, D: dominante e O: overdominante.

5.4.1 Análise de associação para o gene *GSDMD*

Apesar das frequências dos SNP rs7834318 e rs2290414 estarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos e os alelos na análise de associação para o gene *GSDMD*. Isso ocorreu em todos os modelos de herança genética estudados: dominante, recessivo, codominante e superdominante, conforme pode-se observar na **Tabela 4**. Na análise de associação do SNP combinando com as variáveis idade, sexo, tabagismo, alcoolismo e vacinação por BCG também não houve valores estatisticamente significativos (Dados não mostrados).

A respeito da distribuição alélica do SNP rs7834318, o alelo C foi o mais frequente, tanto no grupo controle (0,70%), quanto no grupo de pacientes (0,69%). Quanto à distribuição genotípica, os resultados obtidos mostraram uma frequência maior do genótipo homocigoto C/C para o grupo controle (0,50%) e para os pacientes de TB (0,51%) (**Tabela 5**).

Em relação a distribuição alélica do SNP rs2290414, o mais frequente foi o alelo A para os controles (0,54%) e para os pacientes (0,52%). Quanto à distribuição genotípica, o genótipo heterocigoto A/G apresentou uma frequência maior para o grupo controle (0,48%) e para o grupo de pacientes (0,50%) (**Tabela 5**).

Um estudo de Balgir e Rani (2017) utilizou diferentes ferramentas *in silico* para auxiliar na seleção de SNPs funcionais, um SNP de *GSDMD* (rs62000416) foi comumente previsto como deletério ou relacionado à doença por todos os softwares, como o software I-Mutant 3.0 que previu que todas as mutações submetidas afetam a estabilidade da proteína, o software PROVEAN predisse um SNP de *GSDMD* como deletério, SNP & GO previu que efeito do SNP na consulta foi neutro. Esses polimorfismos podem afetar direta ou indiretamente as interações intra e intermoleculares entre os aminoácidos que podem levar ao risco de doença.

Os polimorfismos em locais estruturalmente importantes alteram drasticamente a função da Gasdermina D, podendo levar à perda da formação de poros piroptóticos, liberação de citocinas por meio da perda de oligomerização e, em alguns casos, a conversão da morte celular piroptótica inflamatória para uma forma de morte celular apoptótica imunologicamente silenciosa. Essas descobertas

sugerem que a variação genética humana pode alterar os mecanismos de morte celular na inflamação (RATHKEY et al., 2020).

Esses achados demonstram que os polimorfismos genéticos alteram a função bioquímica e podem alterar as respostas de morte inflamatória a jusante da ativação do inflamassoma. Mas como estudos com polimorfismos do gene *GSDMD* são extremamente escassos, mais análises são necessárias para verificar o efeito desses SNPs. Mesmo com a não observação de dados significados para a TB é importante ressaltar que outras regiões de polimorfismos para esse gene devem ser estudadas para investigação da doença.

5.4.2 Análise de associação para o gene *P2RX7*

Para o SNP rs2230911 e rs3751143 não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com TB e controles quanto aos alelos e genótipos. Não houve também associações dos SNP nos quatro modelos de herança genética. Os resultados foram os mesmos para a análise de associação dos SNP por idade, sexo, tabagismo, alcoolismo e vacinação BCG (Dados não mostrados).

Em relação a frequência alélica do SNP rs2230911, o alelo C foi o mais predominante nos dois grupos: controles (0,79%) e pacientes (0,78%). A distribuição genotípica apontou o genótipo homozigoto C/C como o mais presente, 0,64% no grupo de controles e 0,62% no grupo de pacientes (**Tabela 5**).

Para o SNP rs3751143, a maior frequência alélica foi do alelo A, 0,78% para os controles e 0,80% para os pacientes. O genótipo que predominou foi o homozigoto A/A, tanto para o grupo controles (0,64%), quanto para o grupo pacientes (0,61%) (**Tabela 5**).

Um trabalho de meta-análise encontrou 2 estudos com 1.853 casos de TB e 1.797 controles para o SNP rs2230911 e 30 estudos com 5247 casos de TB e 7614 controles para o SNP rs3751143. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre o polimorfismo *P2RX7* rs2230911 e o risco de TB, enquanto que a variante rs3751143 aumentou significativamente o risco de TB pulmonar nos modelos genéticos codominante ($p = 0,0006$, OR = 1,44), dominante ($p = 0,0002$, OR = 1,50) e recessivo ($p = 0,001$, OR = 1,61) (TAHERI et al., 2019).

P2RX7 é polimórfico e vários estudos investigaram o impacto dos polimorfismos *P2RX7* na predisposição para TB (AMARI et al., 2018; BEN-SELMA et al., 2011, CHAUDHARY et al., 2018; DE e KUNDU, 2017; OZDEMIR et al., 2014; SOUZA DE LIMA, OGUSKU, SADAHIRO, PONTILLO, 2016; TAYPE et al., 2010; WU et al., 2015; ZHENG et al., 2017), mas esses estudos não chegaram a uma conclusão consistente. GE et al. (2016) descobriram que essa variante aumentava significativamente o risco de TB. ALSHAMMARI et al. (2016) não mostraram associação significativa entre o polimorfismo rs3751143 e o risco de TB.

Ficou evidente a heterogeneidade entre os estudos. Essa heterogeneidade pode surgir parcialmente nas diferenças de etnias e também devido os tamanhos das amostras para os polimorfismos. Um estudo realizado na população da região amazônica por Souza de Lima et al. (2016) apontou que no polimorfismo do gene *P2RX7* (rs2230911), o genótipo G/G foi significativamente mais frequente no grupo dos pacientes, sugerindo que a presença desta variante aumenta o risco ao desenvolvimento TB pulmonar.

Para o SNP rs208290, foi observada uma maior frequência alélica no alelo G (controles: 0,70%, pacientes: 0,75%) e o genótipo homocigoto G/G foi o que predominou para os pacientes, mas para o grupo controle o genótipo G/A e G/G tiveram a mesma predominância de 0,47% (**Tabela 5**).

Foi demonstrada uma associação do SNP rs208290 do gene *P2RX7* à proteção para TB, nos modelos de herança genética codominante ($p=0,0115$; OR=0,56), dominante ($p=0,0211$; OR=0,63) (**Tabela 6**) e superdominante ($p=0,0031$; OR=0,54) (**Tabela 5 e 6**). Esses resultados sugerem uma proteção do genótipo heterocigoto G/A deste SNP contra o desenvolvimento da TB pulmonar.

Um estudo em uma população tibetana chinesa mostrou que o alelo A de rs208290 no gene *P2RX7* foi associado a um risco aumentado de TB pulmonar (XIKAI, 2016). Enquanto que um estudo realizado na população amazonense apresentou resultados não significativos estatisticamente no que diz respeito à associação entre esse SNP e a tuberculose (RIBEIRO, SADAHIRO et al., 2018).

Tabela 6: Resultado da análise de associação do SNP rs208290 do gene *P2RX7* mostrando todos os modelos de herança genética.

Codominante	Controle	TB	OR	Valor-p	AIC
G/G	93 (0.47)	117 (0.59)	1.00		
G/A	93 (0.47)	65 (0.32)	0.56 (0.37 - 0.84)	0.0115	548.8
A/A	12 (0.06)	18 (0.09)	1.19 (0.55 - 2.60)		
Dominante					
G/G	93 (0.47)	117 (0.59)	1.00		
G/A – A/A	105 (0.53)	83 (0.41)	0.63 (0.42 - 0.93)	0.0211	550.4
Recessivo					
G/G – G/A	186 (0.94)	182 (0.91)	1.00		
A/A	12 (0.06)	18 (0.09)	1.53 (0.72 - 3.27)	0.2652	554.5
Superdominante					
G/G – A/A	105 (0.53)	135 (0.67)	1.00		
G/A	93 (0.47)	65 (0.33)	0.54 (0.36 - 0.82)	0.0031	547.0

Na **Tabela 7** é possível observar resultados de associação do SNP rs208290 com as variáveis sexo e idade. O genótipo heterozigoto G/A continuou apresentando valores significativos com efeito protetor contra a TB. Esse SNP também apontou resultados estatisticamente significativos para associação com tabagismo e alcoolismo nos modelos genéticos codominante ($p=0.01277$), dominante ($p=0.03044$) e superdominante ($p=0.00378$) (Dados não mostrados).

Tabela 7: Resultado da análise de associação do SNP rs208290 no gene *P2RX7* nos grupos controle e pacientes com TB com o fator de correção sexo e idade.

Codominante	Controle	TB	OR	Valor-p	AIC
G/G	77 (0.46)	117 (0.59)	1.00		
G/A	79 (0.48)	64 (0.32)	0.58 (0.37-0.91)	0.04855	479.8
A/A	10 (0.06)	18 (0.09)	1.01 (0.43-2.39)		
Dominante					
G/G	77 (0.46)	117 (0.59)	1.00		
G/A – A/A	89 (0.54)	82 (0.41)	0.63 (0.41-0.97)	0.03563	479.4
Recessivo					
G/G – G/A	156 (0.94)	181 (0.91)	1.00		
A/A	10 (0.06)	18 (0.09)	1.28 (0.55-2.95)	0.56467	483.5
Superdominante					
G/G – A/A	87 (0.52)	135 (0.68)	1.00		
G/A	79 (0.48)	64 (0.32)	0.58 (0.37-0.89)	0.01391	477.8

5.5 Frequência do alelo menor

De acordo com dados registrados no “Ensembl” (<http://www.ensembl.org/index.html>), o alelo menor do polimorfismo no gene *GSDMD* rs7834318 é o alelo A com uma frequência global de 0,35%. O “Ensembl” é utilizado para analisar genomas de vertebrados e oferece suporte à pesquisa em genômica comparativa, evolução, variação de sequência e regulação da transcrição.

A frequência do alelo menor (MAF) para o rs7834318 no grupo controle e de pacientes foi de 0,30% e 0,31% (Alelo A) (**Tabela 8**). A MAF do presente estudo para o gene *GSDMD* é semelhante da população europeia (0,30%). A menor frequência registrada do alelo menor foi na população africana (0,22%) e a maior foi da população do Leste da Ásia (0,59%) (Ensembl Genomes, 2021).

De acordo com os dados registrados na NCBI (HapMap ou 1000Genomes), globalmente os alelos A e G, do gene *GSDMD* rs2290414, apresentam uma distribuição equitativa, ou seja, frequência global de 50% cada. No presente estudo,

o alelo G é o alelo menor com uma frequência de 0,46%, similar a frequência da população do Leste da Ásia (0,46%). Há variações nas frequências dos alelos de acordo com a população investigada. O alelo G também apresenta uma menor frequência nas populações americana (0,45%) e do Sul da Ásia (0,41%). Nas populações europeia e africana o alelo menor é o A com uma frequência de 0,43%.

A MAF encontrada para o gene *P2RX7* rs208290 (Alelo A) foi semelhante a população de Medellín na Colômbia (0,29%). Globalmente o alelo menor para polimorfismo no gene *P2RX7* é o alelo A com a frequência de 0,47%. A população americana apresenta a menor frequência registrada do alelo menor (0,23%) e a maior foi a africana (0,83%).

A frequência global do alelo menor para polimorfismos no *P2RX7* rs2230911 foi de 0,16% (Alelo G). No presente estudo, a MAF no grupo controle foi de 0,21%, semelhante com a população de Beijing, China (0,21%). A menor frequência do alelo menor foi na população europeia (0,08%) e a maior foi na americana (0,26%).

Em relação ao polimorfismo no gene *P2RX7* rs3751143, o alelo C representou o alelo menor com uma frequência global de 0,21%. A MAF deste estudo foi semelhante à da população europeia, mais especificamente Inglaterra e Escócia (0,22%). A população do Sul da Ásia apresentou maior frequência do alelo menor (0,32%) e a população africana apresentou o menor MAF (0,08%).

Tabela 8: Frequências dos alelos menores (MAF) dos SNPs obtidas nos grupos estudados.

Gene	SNP	Alelo menor	MAF	
			Controles	Pacientes
<i>GSDMD</i>	rs7834318	A	0.30%	0.31%
	rs2290414	G	0.46%	0.48%
<i>P2RX7</i>	rs208290	A	0.30%	0.25%
	rs2230911	G	0.21%	0.22%
	rs3751143	C	0.22%	0.20%

5.6 Análise de haplótipos

A análise da combinação de haplótipos foi realizada entre os polimorfismos dos genes *GSDMD* e *P2RX7* (Tabela 9 e 10).

Resultados da interação não foram estatisticamente significativos para a combinação de alelos dos SNPs rs7834318 e rs2290414 do gene *GSDMD*. No presente momento, ainda não foram relatados estudos sobre associação de haplótipos em genes de Gasdermina D, principalmente na TB e com esses SNPs selecionados.

Valores significativos ($p=0,0020$) foram observados para a combinação rs208290/ A, rs2230911/ C e rs3751143/ A no gene *P2RX7* que foi associada à proteção para o desenvolvimento de TB pulmonar (OR=0,51) (Tabela 10).

A quantidade relativa de função do *P2RX7* varia entre indivíduos devido a numerosos polimorfismos que podem resultar em perda ou ganho de função. As combinações desses polimorfismos dão origem a vários haplótipos que também podem modificar a função do *P2RX7* (SLUYTER e STOKES, 2011).

Dada essa natureza altamente polimórfica do gene *P2RX7* e seu receptor, permanece a possibilidade de que alguns haplótipos *P2RX7* podem reduzir ou aumentar a expressão de *P2RX7* na superfície celular (STOKES et al., 2010; SHEMON, 2006). Futuros estudos de associação genética precisarão incluir análise de haplótipos *P2RX7* e a caracterização dos receptores codificados, incluído a compreensão dos mecanismos pelos quais os SNPs *P2RX7* alteram a expressão e função do receptor (WILEY et al., 2003).

Tabela 9: Resultado de combinações de haplótipos dos polimorfismos nos genes *GSDMD*

	Frequência	OR (95% CI)	Valor-p
AA	0.094567	1.03 (0.58 – 1.82)	0.9171
AG	0.208177	1.06 (0.74 - 1.53)	0.7484
CG	0.262327	1.10 (0.77 - 1.59)	0.5996
CA	0.434929	1.00	Reference haplotype

Tabela 10: Resultado de combinações de haplótipos dos polimorfismos nos genes *P2X7*

	Frequência	OR (95% CI)	Valor-p
ACG	0.3491	1.00	Reference haplotype
ACA	0.2327	0.51 (0.33 – 0.78)	0.0020
CCG	0.1919	0.77 (0.51 - 1.16)	0.2029
AGG	0.1673	0.66 (0.42 - 1.03)	0.0648

Levando em conta que entre as variantes selecionadas estão localizadas no mesmogene e que estudos apontaram pela transmissão agrupada (haplótipos) dos SNPs de uma geração para outra, foi realizada a análise de desequilíbrio de ligação (LD).

Como representado graficamente na **Figura 14**, os SNPs nos genes *P2RX7* (rs208290, rs2230911 e rs3751143) resultaram em moderado LD ($D'/LOD=77$), podendo segregarem juntos. A associação de haplótipos ACA foi a única que apresentou um valor estatisticamente significativo ($p=0,0167$).

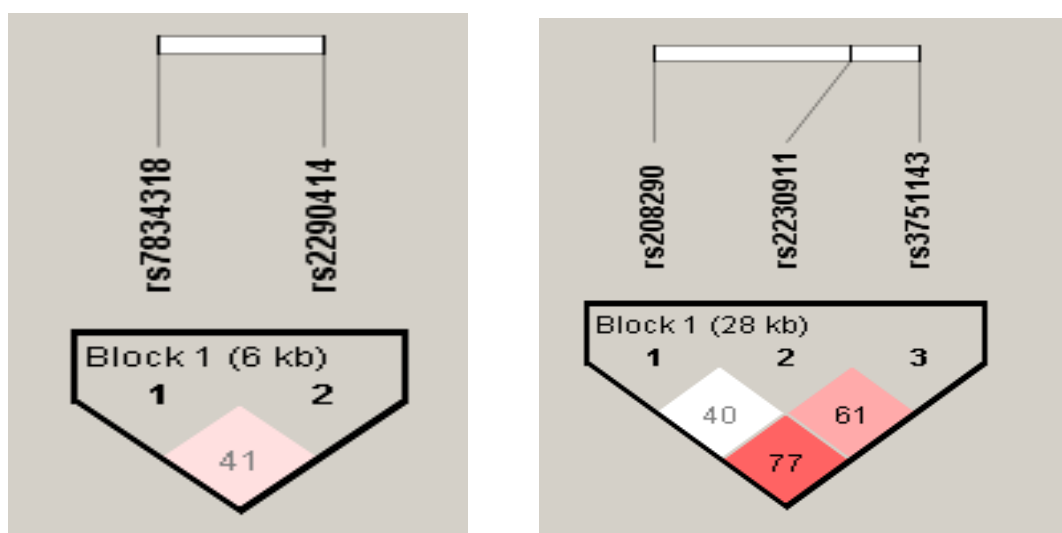


Figura 14: Resultado da análise de LD para os SNPs dos genes *GSDMD* e *P2RX7* respectivamente. Valores de LD são reportados de acordo com o software Haploview.

5.7 Análise da quantificação de IL-1 β

Para determinação de IL-1 β foi realizado ELISA em 44 amostras de pacientes com TB pulmonar, 40 amostras de indivíduos do grupo controle para o gene *GSDMD* e 39 amostras do grupo controle para o gene *P2RX7*.

Observou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas após a comparação da distribuição dos genótipos *versus* resultados da citocina IL-1 β (**Figura 15**), com exceção para o *P2RX7* rs208290 ($p=0,0462$). Este resultado foi em função do genótipo AA do grupo controle, mas é preciso avaliar com cautela, pois o número de casos foi muito pequeno ($n=3$) e um dos indivíduos apresentou concentrações de citocinas muito mais elevada que os demais (27,92 pg/mL), o que de fato fragiliza este resultado. Para confirmarmos esse último resultado, o ideal seria aumentar o número de casos, inclusive para os demais grupos avaliados.

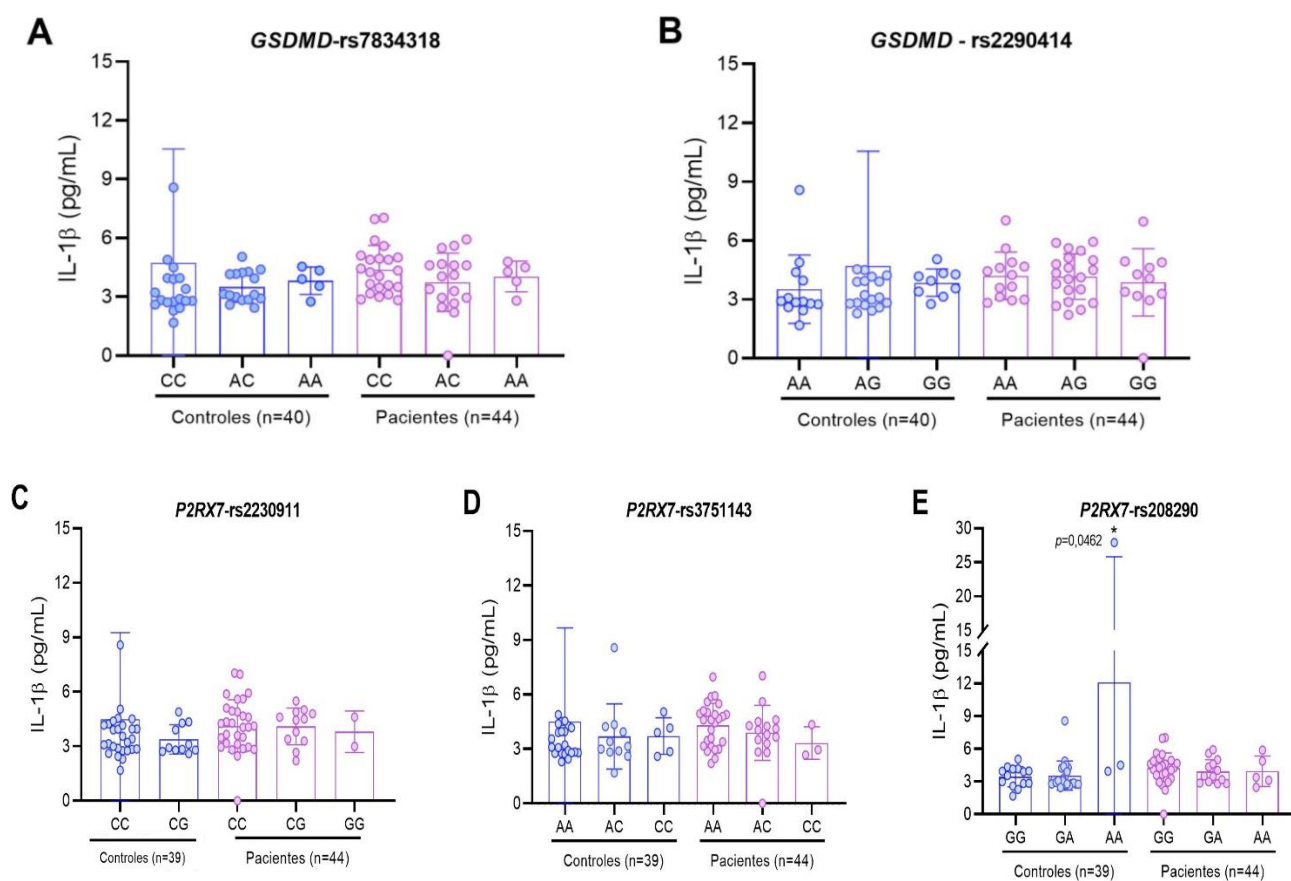


Figura 15: Concentração da citocina IL-1 β *versus* os genótipos do gene *GSDMD* (A) rs7834318, (B) rs2290414 e do gene *P2RX7* (C) rs2230911, (D) rs3751143 e (E) rs208290 através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

Estudos têm demonstrado que a maturação e liberação da forma ativa da IL-1 β depende da ativação dos receptores P2X7, pois a ativação desses receptores ativa a enzima caspase-1, que converte a pró-IL-1 β (forma inativa) em IL-1 β (forma ativa) e libera a IL-1 β para o meio extracelular (PERREGAUX e GABEL, 1994, SOLLE et al., 2001, KAHLENBERG e DUBYAK, 2004; FERRARI et al. 2006).

Acredita-se que a citocina pró-inflamatória IL-1 β desempenha um papel importante na proteção do hospedeiro contra a infecção pelo agente causador da tuberculose (TB), *Mycobacterium tuberculosis*. Estudos realizados em camundongos geneticamente deficientes em IL-1 β demonstram que esses animais são extremamente suscetíveis à doença, bem como a estimulação in vitro de macrófagos infectados pelo *M. tuberculosis* com IL-1 β resulta em redução de cargas micobacterianas, o que demonstra a atividade anti-micobacteriana desta citocina (AMARAL EDUARDO et al., 2018).

Os resultados, deste estudo, poderão trazer significativas contribuições para auxiliar a esclarecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da tuberculose (TB), além da possibilidade de associar os polimorfismos estudados com a suscetibilidade ou proteção para TB. As associações observadas para o gene *P2RX7* rs208290 e para a análise dos haplótipos sugerem que o receptor P2X7 pode ter ação positiva durante a infecção ao bacilo da TB.

6. CONCLUSÃO

Nesse estudo, foi possível determinar frequências alélicas e genotípicas para os SNPs dos genes *GSDMD* e *P2RX7* na população amazonense.

A partir dos objetivos propostos e dos resultados obtidos também foi possível concluir:

- As variáveis tabagismo e alcoolismo foram associadas à suscetibilidade a infecção por TB pulmonar;
- A vacinação por BCG pode ser associada a um efeito protetor contra a TB;
- As frequências dos SNPs rs7834318 (A/C) e rs2290414 (A/G) para o gene da *GSDMD* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados;
- As frequências dos SNPs rs208290 (A/G), rs2230911 (C/G) e rs3751143 (A/C) para o gene *P2RX7* também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos;
- O genótipo G/A do SNP rs208290 no gene *P2RX7* foi associado para proteção em pacientes com TB pulmonar de acordo com o modelo de herança codominante, dominante e superdominante;
- O haplótipo no gene *P2RX7* (rs208290/ A, rs2230911/ C e rs3751143/ A) foi associado à proteção para o desenvolvimento de TB pulmonar.

Deve-se destacar a existência de outros fatores combinados a esses genes que podem estar envolvidos na resposta imunológica contra o desenvolvimento da tuberculose, além da relação às diferentes respostas individuais de cada sistema imune. É necessário investigá-los em futuras pesquisas com a finalidade de se ter uma melhor compreensão da complexidade da doença.

7. EQUIPE DO PROJETO

NOME	INSTITUIÇÃO	FORMAÇÃO ACADÊMICA	FUNÇÃO NO PROJETO
Laianne Lopes Rocha	UFAM	Bióloga Mestranda Imunologia	Executou as atividades propostas no projeto
Aya Sadahiro	PPGIBA/UFAM	Farmacêutica Doutorado Ciências (USP)	Orientadora
Maurício M. Ogusku	INPA	Farmacêutico Doutorado Biotecnologia (UFAM)	Coorientador Colaborou nos exames bacteriológicos para TB e na genotipagem dos SNP.
Mariana B. de A. Figueira	PPGIBA/UFAM	Doutoranda Imunologia (UFAM)	Colaborou no treinamento dos ensaios de qPCR
Thaís Rodrigues de Albuquerque Ribeiro	UFAM	Graduanda em Medicina	Compartilhou dados de genotipagem do SNP rs208290 para o gene <i>P2RX7</i>
Joycenea da S. Matsuda	ILMD- Fiocruz/AM Cardoso Fontes/ SUSAM	Médica Pneumologista Mestre em Clínica Médica (UFRJ)	Colaborou para avaliar os dados clínicos dos pacientes com TB.
Alessandra Pontillo	Imunologia ICB/USP	Bióloga Doutora Patologia experimental Pós-doutorado em genética	Colaborou nas análises dos dados genéticos
Dhêmerson S. de Lima	Imunologia ICB/USP	Pós-doutorando (Inserm – FR)	Colaborou nas análises dos dados genéticos

UFAM: Universidade Federal do Amazonas; PPGIBA: Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada; INPA: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; ICB/USP: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; ILMD: Instituto Leônidas e Maria Deane; UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro; SUSAM: Secretaria do Estado de Saúde do Amazonas.

8. REFERÊNCIAS

ABBADI, S.; EL HADIDY, G.; GOMAA, N.; COOKSEY, R. Strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from sputum of pulmonary tuberculosis patients. **International Journal Infectious Diseases**, v.13, n. 2, p. 236-4. Mar, 2009.

ABDALLA, H. et al. *Mycobacterium tuberculosis* infection dendritic cells leads to partially caspase-1/11 independent IL-1 β and IL-18 secretion but not to pyroptosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p.1-10, 2012.

ADINOLFI, E.; PIZZIRANI, C.; IDZKO, M.; PANTHER, E.; NORGAUER, J.; DI VIRGILIO, F. e FERRARI, D. P2X7 receptor: death or life? **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 219-227, 2005.

AGUILAR-AYALA, D. A. et al. Genetic regulation of *Mycobacterium tuberculosis* in a lipid-rich environment. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 55, p. 392-402, 2016.

AHMAD, S. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p. 1-17. Oct, 2011.

ALSHAMMARI, E. M.; MANDAL, R. K.; WAHID, M.; DAR, S. A.; JAWED, A.; AREESHI, M.Y.; KHAN, S.; KHAN, M.E.A.; PANDA, A.K.; HAQUE, S. Genetic association study of P2X7 A1513C (rs 3751143) polymorphism and susceptibility to pulmonary tuberculosis: A meta-analysis based on the findings of 11 case-control studies. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 9, p. 1150-1157, 2016.

AMARAL, E. P.; LASUNSKAIA, E. B.; D'IMPÉRIO-LIMA, M. R. Innate immunity in tuberculosis: How the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 1, p. 11-20, 2016.

AMARAL, E. P.; RITEAU, N.; MOAYERI, M.; MAIER, N.; MAYER-BARBER, K. D.; PEREIRA, R. M.; LAGE, S. L.; KUBLER, A.; BISHAI, W. R.; D'IMPÉRIO-LIMA, M. R.; SHER, A.; ANDRADE, B. B. Lysosomal Cathepsin Release Is Required for NLRP3-Inflammasome Activation by *Mycobacterium tuberculosis* in Infected Macrophages, **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1427, 2018.

AMIRI, A.; SABOOTEH, T.; AHMADI, S. A. Y.; AZARGOON, A.; SHAHSAVAR, F. Association of *P2X7* gene common polymorphisms with pulmonary tuberculosis in Lur population of Iran. **Egypt. J. Med Hum. Genet**, v. 19, p. 231–234, 2018.

ARONSON, J. D. Protective vaccination against tuberculosis with special reference to BCG vaccination. **Am Rev Tuberc**, v. 58, p. 255-81, 1948.

BALGIR P. P.; RANI, S. In silico analysis of human *GSDMA* and *GSDMD* genes for functional and structural impact of non-synonymous SNPS. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 8, n. 6, p. 17977-17984, 2017.

BAN, H.J.; HEO, J.Y.; OH, K.S; PARK, K.J. Identification of type-2 diabetes-associated combination of SNPs using Support Vector Machine. **BMC Genetics**, v. 11, p. 26-37, 2010.

BAROJA-MAZO, A.; BARBERÀ-CREMADES, M.; PELEGRÍN, P. The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. **Biochim Biophys Acta**, v. 1828, n. 1, p. 79-93, Jan 2012.

BEHAR, S. M. et al. Orchestration of pulmonary t cell immunity during *Mycobacterium tuberculosis* infection: Immunity interrupted. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 559-577, 2014.

BEN-SELMA, W.; BEN-KAHLA, I.; BOUKADIDA, J.; HARIZI, H. Contribution of the *P2X7* 1513A/C loss-of-function polymorphism to extrapulmonary tuberculosis susceptibility in Tunisian populations. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 63, p. 65–72, 2011.

BOOM, W. H.; CANADAY. D. H.; FULTON, S. A.; GEHRING, A. J; ROJAS, R. E.; TORRES, M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 83, n. 1-3, p. 98–106, jan. 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Controle da Tuberculose - Uma proposta de Integração Ensino – Serviço 2002. Disponível em

<http://www.saude.mt.gov.br/adminpublicacao/arquivo/Controladatuberculoseumapropostadeintegracaoensinoservico.pdf>. Acessado em fevereiro de 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias – 2008. Disponível em http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculosis.pdf. Acessado em fevereiro de 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Boletim Epidemiológico 02. Volume 44, 2014. Disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/10/Boletim-Tuberculose-2014.pdf>. Acessado em junho de 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose – 2016. Disponível em <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/21/Apresentacao-sobre-os-principais-indicadores-da-tuberculose.pdf>. Acessado em fevereiro de 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico 11. Volume 49, setembro 2018. Disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/26/2018-009.pdf>. Acessado em fevereiro de 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Especial. Número especial, março 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/24/boletim-tuberculose-2021_24.03. Acessado em junho de 2021.

BRIKEN, V.; AHLBRAND, S. E.; SHAH, S. *Mycobacterium tuberculosis* and the host cell inflammasome: a complex relationship. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 62. Oct, 2013.

CADENA, A. M.; FORTUNE, S. M; FLYNN, J. L. Heterogeneity in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, p. 1-12, 2017.

CALABRESE R, CAPRIOTTI E, FARISELLI P, MARTELLI PL, CASADIO R. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. **Human Mutation**, v. 30, n. 8, p. 1237-44, 2009.

CANADAY, D. H.; BEIGI, R.; SILVER, R. F.; HARDING, C. V.; BOOM, W. H. et al. ATP and control of intracellular growth of mycobacteria by T cells. **Infect Immun**, v. 70, n. 11, p. 6456-6459, 2002.

CAMARGOS, P. A. M.; GUIMARÃES, M. D. C.; ANTUNES, C. M. F. Risk assessment for acquiring meningitis tuberculosis among children not vaccinated with BCG: a case-control study. **Int J Epidemiol**, v. 17, p. 193-97, 1988.

CARDONA, P. J. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 36, n. 1, p. 38–46, 2017.

CASANOVA, J.-L.; ABEL, L.; QUINTANA-MURCI, L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. **Annual review of immunology**, v. 29, n. 1, p. 447-91. Jan, 2011.

CAWS, M. et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 3, p. 1-9. Mar, 2008.

CENTIS, R. Tuberculosis, social determinants and co-morbidities (including HIV). **Pulmonology**, v. 24, n. 2, 2018.

CHATTERJEE, D.; KHOO, K. H. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. **Glycobiology**, v. 8, n. 2, p. 113-20. Fev, 1998.

CHAUDHARY, A.; SINGH, J.P.; SEHAJPAL, P.K.; SARIN, B.C. P2X7 receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in a North Indian Punjabi population. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.** v. 22, p. 884–889, 2018.

CHEEVER, H. Kerry; HINKLE, Janice L. Brunner. Tratado de enfermagem médico-cirúrgica. 13. ed., v. 1, p. 587-593. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

CHI-PANG WEN et al. The reduction of tuberculosis risks by smoking cessation. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 156-165, 2010.

COHEN, T. et al. Mixed-strain *Mycobacterium tuberculosis* infections and the implications for tuberculosis treatment and control. **Clinical Microbiology Review**, v. 25, n. 4, p. 708-19. Oct, 2012.

COSIO, M. G.; SAETTA, M.; AGUSTI, A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. **N Engl J Med**, v. 360, n. 23, p. 2445- 54, 2009.

COSTA, M. C. N.; MOTA, E. L. A.; PINTO, L. L. S. Efeito protetor do BCG intradérmico na Meningite Tuberculosa. **Bol Of Sanit Panam**, v. 110, p. 26-32, 1991.

COSTA-JUNIOR, H. M.; MENDES, A. N.; DAVIS, G. H. N. G.; MONTEIRODA-CRUZ, C.; VENTURA, A. L.; SEREZANI, C. H.; FACCIOLI, L. H.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; BISAGGIO, R. C. e PERSECHINI, P. M. ATP induced apoptosis involves a Ca²⁺-independent phospholipase A₂ and 5lipoxygenase in macrophages. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** v. 88, n. 1-2, p. 51-61, Jan 2009.

DE, R.; KUNDU, J. K. Tuberculosis risk in P2X₇ 1513A/C polymorphism of the tribes of Jhargram, West Bengal. **Int. J. Zool. Stud.**, v. 2, p. 189-193, 2017.

DEY, B.; BISHAI, W. R. Crosstalk between *Mycobacterium tuberculosis* and the host cell. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 486-496, 2014.

DONNELLY-ROBERTS, D. L.; JARVIS, M. F. Discovery of P2X₇ receptor-selective antagonists offers new insights into P2X₇ receptor function and indicates a role in chronic pain states. **Br J Pharmacol.**, v. 151, n. 5, p. 571-579, 2007.

DORHOI, A. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by *Mycobacterium tuberculosis* is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 2, p. 374-384, 2012.

ELE, W. T.; WAN, H.; HU, L.; CHEN, P.; WANG, X.; HUANG, Z.; YANG, Z. H.; ZHONG, C. Q.; HAN, J. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. **Cell Research**, v. 25, p. 1285-98, 2015.

FELDMAN, J. Resistência e susceptibilidade na tuberculose. In: Curso de fisiologia. Belo Horizonte, Departamento de Publicações do Diretório Acadêmico Alfredo Balena, p. 93-106, 1961.

FENG, S.; FOX, D.; MAN, S. M. Mechanisms of Gasdermin Family Members in Inflammasome Signaling and Cell Death. **J Mol Biol.**, v. 430, n. 18 p. 3068-3080, 2018.

FENNELLY, K. P.; Jones-López, E. C.; Ayakaka I et al. Variability of infectious aerosols produced during coughing by patients with pulmonary tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 186, p. 450-457, 2012.

FERNANDO, S. L. et al. Gene dosage determines the negative effects of polymorphic alleles of the P2X7 receptor on adenosine triphosphate-mediated killing of mycobacteria by human macrophages. **J Infect Dis**, v. 192, n. 1, p. 149-55, Jul 2005.

FERRARI, D.; PIZZIRANI, C.; ADINOLFI, E.; LEMOLI, R. M.; CURTI, A.; IDZKO, M.; PANTHER, E.; DI, V. F. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol*, v. 176, p. 3877–3883, 2006.

FERRER-COSTA, C. et al. Characterization of disease-associated single amino acid polymorphisms in terms of sequence and structure properties. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 4, p. 771-786, 2002.

FIGUEIRA, M. B. A.; SOUZA DE LIMA, D.; BOECHAT, A. L.; FILHO, M. G. N.; ANTUNES, I. A.; MATSUDA, J. S.; RIBEIRO, T.R. A.; FELIX, L. S.; COSTA, A. G.; RAMASAWMY, R.; PONTILLO, A.; OGUSKU, M. M.; SADAHIRO, A. Single-Nucleotide Variants in the AIM2 – Absent in Melanoma 2 Gene (rs1103577) Associated With Protection for Tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 824, 2021.

FISKE, C. T.; HAMILTON, C. D.; STOUT, J. E. Alcohol use and clinical manifestations of tuberculosis. **J Infect**, v. 58, n. 5, p. 395-401, 2009.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: Living with the enemy. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 4, p. 450–455, 2003.

FORD, C. B. et al. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. **Nature Genetics**. v. 45, n. 7, p. 784-90. Jul, 2013.

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

FRAZER, K. A; MURRAY, S. S.; SCHORK, N. J.; TOPOL, E. J. Human genetic variation and its contribution to complex traits. **Nature Review Genetics**, v. 10, n. 4, p. 241-51. Apr, 2009.

GAGNEUX, S; DERIEMER, K; VAN, T; KATO-MAEDA, M; DE JONG, B. C et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 103, p.2869–2873, 2006.

GAIDT, M. M. and HORNUNG, V. Pore formation by *GSDMD* is the effector mechanism of pyroptosis **EMBO Journal**, v. 35, n. 20, p. 2167–2169, 2016.

GALAGAN, J. E. Genomic insights into tuberculosis. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 5, p. 307-320, 2014.

GE, H. B.; CHEN, S. A meta-analysis of P2X7 gene-1513A/C polymorphism and pulmonary tuberculosis susceptibility. **Hum. Immunol.**, v. 77, p. 126–130, 2016.

GOMES, H. M. et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 649-56, 2012.

HE, W. T.; WAN, H.; HU, L.; CHEN, P.; WANG, X.; HUANG, Z.; YANG, Z. H.; ZHONG, C. Q.; HAN, J. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. **Cell Res.**, v. 25, n. 12, p. 1285-98, 2015.

HERMANS, P. W.; VAN SOOLINGEN, D.; DALE, J. W.; SCHUIITEMA, A. R.; MCADAM, R. A.; CATTY, D.; VAN EMBDEN, J. D. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 9, p. 2051-8, 1990.

HERMOSILLA, S.; YOU, P.; AIFAH, A.; ABILDAYEV, T.; AKILZHANOVA, A.; KOZHAMKULOV, U. et al. Identifying risk factors associated with smear positivity of pulmonary tuberculosis in Kazakhstan. **PLoS One**, v. 12, n. 3, 2017.

HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nat Immunol**, v. 9, n. 8, p. 847-56, Aug 2008.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Abordagem e tratamento do fumante: consenso. Rio de Janeiro, 2019.

IYER, S. S. et al. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 311-23, Aug 2013.

JAKUBOWIAK, W. M.; BOGORODSKAYA, E. M.; BORISOV, S. E.; DANILOVA, I. D.; KOURBATOVA, E. V. Risk factors associated with default among new pulmonary TB patients and social support in six Russian regions. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 11, n. 1, p. 46-53, 2007.

JO, B. S.; CHOI, S. S. Introns: The Functional Benefits of Introns in Genomes. **Genomics Inform**, v. 13, p. 112, 2015.

KAHLENBERG, J. M.; DUBYAK, G. R. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. **Am. J. Physiol.**, v. 286, p. C1100-C1108, 2004.

KALSCHEUER R, PALACIOS A, ANSO I, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis. **Biochem J.**, v. 476, n. 14, p.1995-2016, 2019.

KAYAGAKI N, WARMING S, LAMKANFI M, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, p. 117-121, 2011.

KAYAGAKI N. et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 666-71. 2015.

KIM, S.; MISRA, A. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 289-320, 2007.

KOVACS, S. B.; MIAO, E. A. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. Trends **Cell Biol.**, v. 27, n. 9, p. 673-684, 2017.

KRITSKI, AL; VILLA, TS; TRAJMAN, A; SILVA, JRL; MEDRONHO, RA; RUFFINO-NETTO, A. Duas décadas de pesquisa em tuberculose no Brasil: estado da arte das publicações científicas. **Revista de Saúde Pública**. vol. 41. São Paulo, 2007.

LAMKANFI, M; DIXIT, VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 137-161, 2012.

LAMKANFI, M; DIXIT, VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, p. 1013-1022, 2014.

LEK, M. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**, v. 536, p. 285–291, 2016.

LIU, X.; LIEBERMAN, J. A mechanistic understanding of pyroptosis: the fiery death triggered by invasive infection. **Advances in Immunology**, v. 135, p. 81–117, 2017.

MAN, SM; KANNEGANTI, TD. Gasdermin D: the long-awaited executioner of pyroptosis. **Cell Research**, v. 25, p. 1183-4, 2015.

MARTIN, C.; AGUILO, N.; GONZALO-ASENSIO, J. Vaccination against tuberculosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 36, n. 10, p. 648-656, 2018.

MARTINON, F. et al. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 27, p. 229-265, 2009.

MATSUMOTO, K. et al. The association between smoking and sputum smear-positive pulmonary tuberculosis in Osaka City. **Kekkaku**, Tokyo, v. 87, n. 8, p. 541-547, 2012.

MCKINNEY, B.A., CROWE, J.E., GUO, J.; TIAN, D. Capturing the spectrum of interaction effects in genetic association studies by simulated evaporative cooling network analysis. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 3, 2009.

MEYER, C. G.; THYE, T. Host genetic studies in adult pulmonar tuberculosis. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 445-453, 2014.

MIAO, EA; LEAF, IA; TREUTING, PM; et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **Nature Immunology**, v. 11, p. 1136-1142, 2010.

MILLER, C. M., BOULTER, N. R., FULLER, S. J., ZAKRZEWSKI, A. M., LEES, M. P., SAUNDERS, B. M., SMITH, N. C. The role of the P2X7 receptor in infectious diseases. **PLoS pathogens**, n. 7, v. 11, 2011.

MIMS, C. A.; PLAYFAIR, J. H. L.; ROITT, I. M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. Trad. Maria Terezinha Carneiro Leão Leme, Flávio Queiróz Telles, Nei Ferreira de Camargo Neto, Ida Cristina Gubert. São Paulo: Editora Manole Ltda., cap. 22, p. 14-17, 1995.

MISHRA et al. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potente activator of the NLRP3/ASC inflammasome. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 8, p. 1046-1063, 2010.

MULVIHILL, E.; SBORGI, L.; MARI, S. A.; PFREUNDSCHUH, M.; HILLER, S.; MÜLLER, D. J. Mechanism of membrane pore formation by human gasdermin-D. **EMBO J.**, v. 37, n. 14, 2018.

MUNOZ-PLANILLO, R. et al. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1142-53, Jun2013.

NADERI, M.; HASHEMI, M.; ANSARI, H. Macrophage migration inhibitory factor – 173 G > C polymorphism and risk of tuberculosis: A meta-analysis. **EXCLI J.**, v. 16, p. 313–320, 2017.

NADIRI, A et al. The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 7, p. 4239-4245, 2006.

NAKAHIRA, K. et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. **Nat Immunol**, v.12, n. 3, p. 222-30, Mar 2011.

NEININGER, K.; MARSCHALL, T.; HELMS, V. SNP and indel frequencies at transcription start sites and at canonical and alternative translation initiation sites in the human genome. **PLoS One.**, v.14, n. 4, 2019.

NETEA MG, SIMON A, VAN DE VEERDONK F, et al. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. **PLoS Pathog**, v. 6, 2010.

NOGUEIRA, A. F.; ACCHINETTI, V.; SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, p. 3-9, 2012.

NORTH, R.A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiol Ver.**, v. 82, n. 4, p. 1013-1067, 2002.

OSAWA, R.; WILLIAMS, K. L.; SINGH, N. The inflammasome regulatory pathway and infections: Role in pathophysiology and clinical implications. **Journal of Infections**, v. 62, n. 2, p. 119-129, 2011.

PERREGAUX, D.; GABEL, C. A. Interleukin-1 β maturation and release in response to ATP and nigericin: evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 15195-15203, 1994.

PLACIDO, R.; AURICCHIO, G.; FALZONI, S.; BATTISTINI, L.; COLIZZI, V.; BRUNETTI, E.; DI VIRGILIO, F.; MANCINO, G. P2X₇ purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis reducing the intracellular bacterial viability. **Cell. Immunol.**, v. 244, p. 10–18, 2006.

PONTILLO, A. et al. Polymorphisms in inflammasome genes and susceptibility to HIV-1 infection. **Journal of acquired immune deficiency syndromes**, v. 59, n. 2, p. 121-125, 2012.

QIU, Y.; CAO, S.; GOU, C.; YUE, Y.; JIANG, S.; MA, T.; XUE, X. Associations of tumor necrosis factor-alpha polymorphisms with the risk of tuberculosis: A meta-analysis. *Scand. J. Immunol.*, 2018.

QU, Y.; FRANCHI, L.; NUNEZ, G.; DUBYAK, G. R. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. **J. Immunol**, v. 179, n. 3, p. 1913-1925, 2007.

RATHKEY, J. K.; XIAO, T. S.; ABBOTT, D. W. Human polymorphisms in GSDMD alter the inflammatory response. **J Biol Chem.**, v. 295, n. 10, p. 3228–3238, 2020.

RAVIGLIONE, M.; YEW, W. W.; MIGLIORI, G. B. Tuberculosis and noncommunicable diseases: neglected links and missed opportunities. **European Respiratory Journal**, v. 37, n. 7, p. 1269-1282, 2011.

REHM, J.; SAMOKHVALOV, A. V.; NEUMAN, M. G.; ROOM, R.; PARRY, C.; LÖNNROTH, K.; PATRA, J.; POZNYAK, V.; POPOVA, S. The association between alcohol use, alcohol use disorders and tuberculosis (TB). A systematic review. **BMC Public Health**, v. 9, n. 450, 2009.

RIBEIRO, T. R. A.; SADAHIRO, A.; NASCIMENTO FILHO, M. G.; FIGUEIRA, M. B. A.; FELIX, L. S.; OGUSKU, M. M.; SOUZA DE LIMA, D.; PONTILLO, A. *P2RX7* (rs208290) single nucleotide polymorphism (SNP) evaluation in amazonian patients with pulmonary tuberculosis. **XLIII Congress of the Brazilian Society of Immunology**, 2018

RIGAU, M.; JUAN, D.; VALENCIA, A.; RICO, D. Intronic CNVs and gene expression variation in human populations. **PLoS Genet**, v. 15, n.1, 2019.

- RODRIGUES, M. W.; MELLO, A. G. N. C. Tuberculose e escolaridade: uma revisão da literatura. **Revista Internacional de Apoyo a la Inclusión, Logopedia, Sociedad y Multiculturalidad**, v.4, n. 2, p.1-2, 2018.
- ROMANUS, V. Selective BCG vaccination in a country with low incidence of tuberculosis. **Euro Surveill**, v. 11, p. 14-7, 2006.
- ROSE, A. B. Intron-mediated regulation of gene expression. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 326, p. 277-290, 2008.
- SALEM, J. I.; MAROJA, M. F.; CARVALHO, F. F.; LIMA, M. O.; LITAIFF, L. R. L. L.; CARDOSO, M. S. L.; BRIGLIA, M. F. S.; DAVID, H. L. Valor relativo do exame direto, após concentração e por cultivo de escarro no diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar no Amazonas. **Jornal de Pneumologia**, v. 16, n. 3, p. 133-136, 1990.
- SALEM, JULIA IGNEZ et al. PKO: alternative method for isolating mycobacteria from sputum. **Acta Amaz. Manaus**, v. 37, n. 3, p. 419-424, 2007.
- SANTOS, B. O.; BRITO, T. V. R.; MESQUITA, C. R.; GUIMARÃES, R. J. P. S.; LEÃO, L. A.; ROCHA, M. P. Space-temporal analysis of the incidence of tuberculosis in primary care. **Res Medicine Journal**, v.21, n.2, p.1-6, 2017.
- SAVIO, L. E. B.; et al. The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? **Frontiers of Pharmacology**, eCollection, 2018.
- SAVIO, L. E. B. et al. P2X7 receptor activation increases caveolin-1 expression and macrophage lipid raft formation boosting CD39 activity. **Journal of Cell Science**, 2020.
- SBORGI, L.; RÜHL, S.; MULVIHILI, E. et. al., *GSDMD* membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death **EMBO Journal**, v. 35, n. 16, p. 1766–1778, 2016.
- SHALER, CR; HORVATH, C; LAI, R; XING, Z. Understanding delayed T-cell priming, lung recruitment, and airway luminal T-cell responses in host defense against

pulmonary tuberculosis. **Clinical & developmental immunology**, v. 2012, p. 628293. Jan, 2012.

SHEMON, A. N.; SLUYTER, R.; FERNANDO, S. L.; CLARKE, A. L.; DAO-UNG, L. P.; SKARRATT, K. K.; SAUNDERS, B. M.; TAN, K. S.; GU, B. J.; FULLER, S. J.; BRITTON, W. J.; PETROU, S.; WILEY, J. S. A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. **J Biol Chem.**, v. 281, p. 2079-2086, 2006.

SHEN, W. et al. Genotyping and quantification techniques for single-nucleotide polymorphisms. **TrAC – Trends in Analytical Chemistry**, v. 69, p. 1-13, 2015.

SHI, J. et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**, v. 526, n. 7575, p.660-5, 2015.

SHIMADA, K. et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 401-14, Mar 2012.

SIROTA, M. et al. Autoimmune disease classification by inverse association with SNP alleles. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 12, 2009.

SLUYTER, R.; STOKES, L. Significance of P2X7 Receptor Variants to Human Health and Disease. **Recent Patents on DNA & Gene Sequences**, V. 5, P. 41-54, 2011.

SLUYTER, R. The P2X7 receptor. **Adv Exp Med Biol.**, v. 1051, p. 17–53, 2017.

SOLLE, M.; LABASI, J.; PERREGAUX, D. G.; STAM, E.; PETRUSHOVA, N.; KOLLER, B.H.; GRIFFITHS, R. J.; GABEL, C. A. Altered cytokine production in mice lacking P2X₇ receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 125-132, 2001.

SOUZA DE LIMA, D.; OGUSKU, M. M.; SADAHIRO, A.; PONTILLO, A. Inflammasome genetics contributes to the development and control of active pulmonary tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 41, p. 240-244, 2016.

SPRINGETT, V. H.; SUTHERLAND I. A re-examination of the variations in the efficacy of BCG vaccination against tuberculosis in clinical trials. **Tuber Lung Dis.** 1994; 75: 227-33, 1994.

STARKE, J. R.; CONNELLY, K. K. Bacille Calmette-Guerin vaccine. In: Plotkin MEA, editor. **Vaccines**. Philadelphia: W. B Saunders, p. 456-89, 2004.

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.

STOKES, L.; FULLER, S. J.; SLUYTER, R.; SKARRATT, K. K.; GU, B. J.; WILEY, J. S. Two haplotypes of the P2X7 receptor containing the Ala-348 to Thr polymorphism exhibit a gain-of-function effect and enhanced interleukin-1beta secretion. **FASEB J.**, v. 24, p. 2916-2927, 2010.

STUCKI, D.; GAGNEUX, S. Single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* and the need for a curated database. **Tuberculosis**, v. 93, n. 1, p. 30-39, 2013.

OZDEMIR, F. A.; EROL, D.; KONAR, V.; YUCE, H.; KARA SENLI, E.; BULUT, F.; DEVECI, F. Lack of association of 1513 A/C polymorphism in P2X7 gene with susceptibility to pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. **Tuberkuloz ve toraks**, 62, 7–11, 2014.

TAHERI, M.; SARANI, H.; MOAZENI-ROODI, A.; NADERI, M.; HASHEMI, M. Association between P2X7 Polymorphisms and Susceptibility to Tuberculosis: An Updated Meta-Analysis of Case-Control Studies **Medicina**, v. 55, n. 6, p. 298, 2019.

TAYPE, C. A.; SHAMSUZZAMAN, S.; ACCINELLI, R. A.; ESPINOZA, J. R.; SHAW, M. A. Genetic susceptibility to different clinical forms of tuberculosis in the Peruvian population. **Infect. Genet. Evol.**, v. 10, p. 495–504, 2010.

TRIFUNOVIĆ, V. S. et al. Association between tobacco smoking and pulmonary tuberculosis. **Vojnosanit Pregl.**, Serbia, v. 66, n. 10, p. 797-801, 2009.

VAN EMBDEN JD, CAVE MD, CRAWFORD JT, DALE JW, EISENACH KD, GICQUEL B, HERMANS P, MARTIN C, MCADAM R, SHINNICK TM, et al. Strain

identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 406-409, 1993.

VANNBERG, F. O.; CHAPMAN, S. J.; HILL, A. V. Human genetic susceptibility to intracellular pathogens. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 105–16. Mar, 2011.

VARAHRAM, M.; FARNIA, P.; VELAYATI, A. A. Susceptibility to tuberculosis among pulmonary tuberculosis patients: P2X7 and TNF- α gene polymorphisms. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 4, p. 133, 2015.

VERHOEF, P. A.; ESTACION, M.; SCHILLING, W.; DUBYAK, G. R. P2X7 receptordependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. **J Immunol**, v. 170, n. 11, p. 5728-5738, 2003.

VLADIMER, G. I. et al. Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 23–31, 2013.

WANG, J.; SHEN, H. Review of cigarette smoking and tuberculosis in China: intervention is needed for smoking cessation among tuberculosis patients. **BMC Public Health**, London, v. 12, n. 9, p. 292, 2009.

WARNER, D. F. et al. Diversity and disease pathogenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**, South Africa, v. 23, n.1, p. 14-21, 2015.

WEBB, G. The effect of the inhálation of cigarette smoke on the lungs: avclinical study. **Am. Rev. Tuberc.**, v. 2, n. 1, p. 25-27, 1918.

WESSELIUS, A.; BOURS, M. J.; ARTS, I. C.; THEUNISZ, E. H.; GEUSENS, P.; DAGNELIE, P. C. The P2X₇ loss-of-function Glu496Ala polymorphism affects ex vivo cytokine release and protects against the cytotoxic effects of high ATP-levels. **BMC Immunol.**, v. 13, n. 64, 2012.

WILEY, J. S.; DAO-UNG, L. P.; LI, C.; SHEMON, A. N.; GU, B. J.; SMART, M. L.; FULLER, S. J.; BARDEN, J. A.; PETROU, S.; SLUYTER, R. An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor. **J Biol Chem.**, v. 278, p. 17108–17113, 2003.

WHO, Organização Mundial de Saúde; INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASES. A WHO/The union monograph on TB and tobacco control: joining efforts to control two related global epidemics. Geneva, 2007. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43812/9789241596220_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acessado em junho de 2021.

WHO, Organização Mundial de Saúde. Geneva: World Health Organization; Global Health Risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks, 2009. Disponível em: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf. Acessado em junho de 2021.

WHO, Organização Mundial de Saúde. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2018. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf?ua=1&ua=1>. Acessado em junho de 2021.

WHO, Organização Mundial de Saúde. TUBERCULOSIS EN LAS AMÉRICAS, informe regional 2019. Organización Panamericana de la Salud, 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52815>. Acessado em junho de 2021.

WHO, Organização Mundial de Saúde. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>. Acessado em junho de 2021.

WIRTH, T. et al. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 9. Jan, 2008.

WOOD, R.; MORROW, C.; BARRY, C. E et al. Real-time investigation of tuberculosis transmission: developing the respiratory aerosol sampling chamber. **PLoS One**, v. 11, 2016.

WU, J.; LU, L.; ZHANG, L.; DING, Y.; WU, F.; ZUO, W.; ZHANG, W. Single Nucleotide Polymorphisms in P2X7 Gene Are Associated with Serum Immunoglobulin G Responses to *Mycobacterium tuberculosis* in Tuberculosis Patients. **Dis. Markers**, 2015.

YARON, J.R. et al. K⁺ regulates Ca²⁺ to drive inflammasome signaling: Dynamic visualization of ion flux in live cells. **Cell Death & Disease**, v. 6, 2015.

ZHANG H. et al. Genome sequencing of 161 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China identifies genes and intergenic regions associated with drug resistance. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1255-60. Oct, 2013.

ZHAO Y, SHI J, SHAO F. Inflammatory Caspases: Activation and Cleavage of Gasdermin-D In Vitro and During Pyroptosis, **Methods in Molecular Biology**, v. 1714, p. 131-48, 2018.

ZHENG, X.; LI, T.; CHEN, Y.; PAN, H.; ZHANG, Z.; DAI, Y.; & WANG, J. Genetic polymorphisms of the P2X7 gene associated with susceptibility to and prognosis of pulmonary tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 53, p. 24-29, 2017.

ZHENG, Z. et al. Gasdermins: pore-forming activities and beyond, **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 52, n. 5, p. 467–474, maio 2020.

ZYL SMIT, R. N.; PAI, M.; YEWM W. W.; LEUNG, C. C.; ZUMLA, A.; BATEMAN, E. D. et al. Global lung health: the colliding epidemics of tuberculosis, tobacco smoking, HIV and COPD. **Eur Respir J.**, v. 35, n. 1, p. 27-33, 2010.

9. APÊNDICE

APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) – PACIENTE



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS (UFAM) LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA MOLECULAR TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Senhor (a) para participar da Pesquisa Intitulada: “**Polimorfismo de base única (SNP) em genes do inflamassoma associado à tuberculose extrapulmonar**”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Aya Sadahiro e Mauricio Morishi Ogusku. Neste projeto serão investigados os genes responsáveis pela expressão dos inflamassomas, que são componentes importantes na resposta imunológica (de defesa) contra as bactérias causadoras de tuberculose. Esta pesquisa contribuirá aumentando os conhecimentos sobre a tuberculose, e se existe de fato alguma relação dos genes de inflamassomas com a forma de acometimento da doença, ou seja, para tuberculose extrapulmonar e/ou pulmonar.

A sua participação é voluntária, se o (a) Senhor (a) aceitar participar, primeiramente responderá um questionário com a duração de aproximadamente cinco minutos, com perguntas pessoais gerais, relacionadas aos sintomas, aos exames médicos e laboratoriais realizados. Depois será realizada a coleta do seu escarro para o exame de baciloscopia, cultivo e de biologia molecular, em seguida será realizada a coleta de sangue para o estudo genético.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são: a perda do sigilo dos seus dados, mas tomaremos os devidos cuidados na identificação das amostras que serão registradas somente com números. E também os dados serão mantidos em segredo com os pesquisadores responsáveis, evitando a possibilidade de divulgação pública dos resultados que permita identificar o (a) Senhor (a). Na coleta da amostra de escarro, o (a) Senhor (a) poderá sentir uma irritação na garganta e começar a tossir. Na coleta de sangue, o (a) Senhor (a) poderá sentir um desconforto e dor, no momento que for introduzida a agulha para obtenção do sangue. Além disso, poderá aparecer uma pequena mancha roxa transitória, que irá desaparecer em 3 a 4 dias após a coleta de sangue. Há também risco de contaminação da agulha no momento da coleta, mas todos os riscos citados serão minimizados com as seguintes precauções: a) O (a) Senhor (a) tomará um pouco de água para aliviar a irritação na garganta e tosse no momento da coleta de escarro; b) A coleta de sangue será realizada por um profissional treinado e para reduzir o risco de contaminação, os materiais como a seringa e agulha, dentre outros serão limpos e descartáveis.

Em caso de dano ou efeito adverso decorrente da sua participação neste estudo, o (a) Senhor (a) poderá contatar os pesquisadores para avaliação, com direito ao atendimento gratuito, para solucionar os problemas ocorridos devido a sua participação nesta pesquisa, sendo assegurado ao (a) Senhor (a) o direito a indenização e cobertura material para reparação aos danos sofridos.

Neste estudo, não está previsto nenhuma despesa adicional e o (a) Senhor (a) também não receberá nenhum benefício financeiro. No entanto, caso o (a) Senhor (a) apresente algum

gasto adicional, devido a sua participação no projeto, o (a) Senhor (a) será ressarcido com valores para transporte e a alimentação pelos pesquisadores responsáveis.

A qualquer momento da pesquisa o (a) Senhor (a) terá o direito e a liberdade de retirar seu consentimento e suas amostras, sem prejuízo algum ao atendimento de rotina prestados pela Policlínica. Os resultados da pesquisa serão analisados e divulgados nos meios científicos, sem nenhuma informação que possa identificar a identidade do (da) Senhor (a) e ainda os resultados dos exames serão anexados no seu prontuário médico no serviço da Policlínica Cardoso Fontes.

Solicitamos ainda a sua autorização para o acesso ao seu prontuário para coleta de informações referentes ao seu tratamento e exames médicos e laboratoriais realizados.

Solicitamos também a sua autorização para o armazenamento de sua amostra de sangue e escarro para estudos futuros, a amostra coletada será armazenada de acordo com as normas vigentes do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP do Ministério da Saúde. As amostras serão identificadas com etiquetas adesivas contendo numeração (por ordem de registro) e data da coleta, o armazenamento será realizado a -20°C e -80°C e as quantidades serão registradas, o prazo de armazenamento do seu material será de dez anos. O (a) Senhor (a), a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização da sua amostra armazenada.

Além disso, as amostras armazenadas poderão ser utilizadas para estudos futuros, mas somente após a aprovação do novo projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP ou CONEP, e também com o seu reconsentimento por meio de um novo TCLE, para uso dessas amostras. Para qualquer detalhe sobre esta pesquisa, basta entrar em contato com a pesquisadora responsável ou um de seus colaboradores pelos telefones: (92) 991923539 ou 98116-0555 ou e-mails: vanessa_almeida1212@hotmail.com, aya.sadahiro@gmail.com, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM, na Rua Teresina, 495, Adrianópolis, Manaus-AM, telefone (92) 3305-1181, ramal 2004, ou pelo e-mail: cep.ufam@gmail.com. Você aceita que o seu material biológico seja utilizado em estudos futuros?

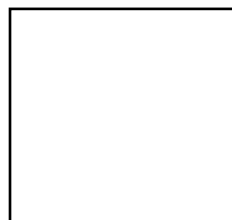
Sim Não

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, entendi a explicação dada pelo (a) pesquisador (a) e dou meu consentimento em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo (a) pesquisador (a), ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do paciente ou

Assinatura do pesquisador



Impressão do
polegar

...../...../.....
Data

...../...../.....
Data

APÊNDICE II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) - CONTATOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS (UFAM) LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA MOLECULAR TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Senhor (a) para participar da Pesquisa Intitulada: “**Polimorfismo de base única (SNP) em genes do inflamassoma associado à tuberculose extrapulmonar**”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Aya Sadahiro e Mauricio Morishi Ogusku. Neste projeto serão investigados os genes responsáveis pela expressão dos inflamassomas, que são componentes importantes na resposta imunológica (de defesa) contra as bactérias causadoras de tuberculose. Esta pesquisa contribuirá aumentando os conhecimentos sobre a tuberculose, e se existe de fato alguma relação dos genes de inflamassomas com a forma de acometimento da doença, ou seja, para tuberculose extrapulmonar e/ou pulmonar.

A sua participação é voluntária, se o (a) Senhor (a) aceitar participar, primeiramente responderá um questionário com a duração de aproximadamente cinco minutos, com perguntas pessoais gerais, relacionadas aos sintomas, aos exames médicos e laboratoriais realizados. Depois será realizada a coleta do seu escarro para o exame de baciloscopia, cultivo e de biologia molecular, em seguida será realizada a coleta de sangue para o estudo genético.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são: a perda do sigilo dos seus dados, mas tomaremos os devidos cuidados na identificação das amostras que serão registradas somente com números. E também os dados serão mantidos em segredo com os pesquisadores responsáveis, evitando a possibilidade de divulgação pública dos resultados que permita identificar o (a) Senhor (a). Na coleta da amostra de escarro, o (a) Senhor (a) poderá sentir uma irritação na garganta e começar a tossir. Na coleta de sangue, o (a) Senhor (a) poderá sentir um desconforto e dor, no momento que for introduzida a agulha para obtenção do sangue. Além disso, poderá aparecer uma pequena mancha roxa transitória, que irá desaparecer em 3 a 4 dias após a coleta de sangue. Há também risco de contaminação da agulha no momento da coleta, mas todos os riscos citados serão minimizados com as seguintes precauções: a) O (a) Senhor (a) tomará um pouco de água para aliviar a irritação na garganta e tosse no momento da coleta de escarro; b) A coleta de sangue será realizada por um profissional treinado e para reduzir o risco de contaminação, os materiais como a seringa e agulha, dentre outros serão limpos e descartáveis.

Em caso de dano ou efeito adverso decorrente da sua participação neste estudo, o (a) Senhor (a) poderá contatar os pesquisadores para avaliação, com direito ao atendimento gratuito, para solucionar os problemas ocorridos devido a sua participação nesta pesquisa, sendo assegurado ao (a) Senhor (a) o direito a indenização e cobertura material para reparação aos danos sofridos.

Neste estudo, não está previsto nenhuma despesa adicional e o (a) Senhor (a) também não receberá nenhum benefício financeiro. No entanto, caso o (a) Senhor (a) apresente algum gasto adicional, devido a sua participação no projeto, o (a) Senhor (a) será ressarcido com valores para transporte e a alimentação pelos pesquisadores responsáveis.

A qualquer momento da pesquisa o (a) Senhor (a) terá o direito e a liberdade de retirar seu consentimento e suas amostras, sem prejuízo algum ao atendimento de rotina prestados pela Policlínica. Os resultados da pesquisa serão analisados e divulgados nos meios científicos, sem nenhuma informação que possa identificar a identidade do (da) Senhor (a) e ainda os resultados dos exames serão anexados no seu prontuário médico no serviço da Policlínica Cardoso Fontes.

Solicitamos ainda a sua autorização para o acesso ao seu prontuário para coleta de informações referentes ao seu tratamento e exames médicos e laboratoriais realizados.

Solicitamos também a sua autorização para o armazenamento de sua amostra de sangue e escarro para estudos futuros, a amostra coletada será armazenada de acordo com as normas vigentes do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP do Ministério da Saúde. As amostras serão identificadas com etiquetas adesivas contendo numeração (por ordem de registro) e data da coleta, o armazenamento será realizado a -20°C e -80°C e as quantidades serão registradas, o prazo de armazenamento do seu material será de dez anos. O (a) Senhor (a), a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização da sua amostra armazenada.

Além disso, as amostras armazenadas poderão ser utilizadas para estudos futuros, mas somente após a aprovação do novo projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP ou CONEP, e também com o seu re consentimento por meio de um novo TCLE, para uso dessas amostras. Para qualquer detalhe sobre esta pesquisa, basta entrar em contato com a pesquisadora responsável ou um de seus colaboradores pelos telefones: (92) 991923539 ou 98116-0555 ou e-mails: vanessa_almeida1212@hotmail.com, aya.sadahiro@gmail.com, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM, na Rua Teresina, 495, Adrianópolis, Manaus-AM, telefone (92) 3305-1181, ramal 2004, ou pelo e-mail: cep.ufam@gmail.com. Você aceita que o seu material biológico seja utilizado em estudos futuros?

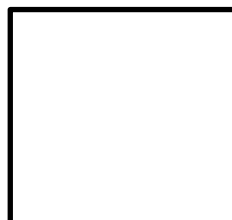
Sim Não

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, entendi a explicação dada pelo (a) pesquisador (a) e dou meu consentimento em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo (a) pesquisador (a), ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do Contato ou

Assinatura do pesquisador



Impressão do
polegar

...../...../.....
Data

...../...../.....
Data

APÊNDICE III - FICHA DE CADASTRO DE PACIENTES

FICHA DE CADASTRO DE PACIENTES

DATA: ___/___/___

Nº REGISTRO ESCARRO ___/___ Nº REGISTRO SANGUE ___/___

Nome: _____ Sexo: M F

Endereço: _____ Fone: _____

Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: ___ Profissão: _____

Cidade onde mora: _____ Naturalidade: _____

Naturalidade (País): _____ Naturalidade (Avós): _____

Informações Clínicas: Forma da TB: _____

BCG: Não PPD: Não Exames de imagens Não Sim Tipo: _____

Sim Data: ___/___/___ Sim Não reator Resultado: _____

Não sabe informar Reator ___ mm _____

Antecedente de Tuberculose:

Pessoal: Não Sim Quando pela 1ª vez: _____

Familiar:

Pai Tios Sogros Colega de trabalho Mãe Primos Cônjuge Agregados

Irmãos Filho(s) Namorado Outros Avós Cunhado Vizinho Não sabe informar

Resultados anteriores de BAAR Não Sim Onde? _____

Resultado: 1) ___ 2) ___ Outros exames: _____

Consome bebidas alcoólicas e/ou fuma?

Não Sim, quantos cigarros por semana: _____

Não Sim, Qual: cerveja (1 dose=330mL) vinho (1 dose 100mL) Destilados (1 dose= 30mL), quantas doses por semana: _____

Quadro clínico atual:

Tosse Expectoração Hemoptise Dispneia Febre Dor torácica Dor de cabeça Emagrecimento

Cansaço Outros. Quais? _____

O paciente:

Não recebeu nenhum tratamento antes da coleta da amostra clínica atual

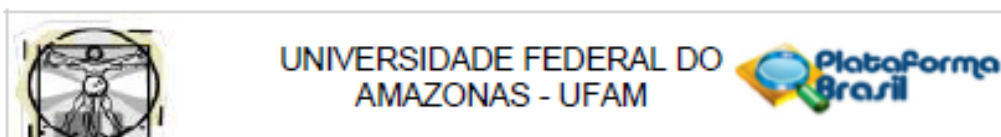
Está recebendo tratamento desde: _____ Medicação: _____

APÊNDICE IV - FICHA DE CADASTRO DE CONTATOS

FICHA DE CADASTRO DE CONTATOS	
DATA: ____/____/____	
Nº REGISTRO ESCARRO ____/____	Nº REGISTRO SANGUE ____/____
Nome: _____	Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F
Endereço: _____	Fone: _____
Data de Nascimento: ____/____/____	Idade: ____ Profissão: _____
Cidade onde mora: _____	Naturalidade: _____
Naturalidade (País): _____	Naturalidade (Avós): _____
Informações Clínicas:	
BCG: <input type="checkbox"/> Não	PPD: <input type="checkbox"/> Não
<input type="checkbox"/> Sim Data: ____/____/____	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não reator
<input type="checkbox"/> Não sabe informar	<input type="checkbox"/> Reator ____ mm
Exames de imagens <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Tipo: _____	Resultado: _____
Tuberculose na família: <input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Tio (a) <input type="checkbox"/> Sogro (a) <input type="checkbox"/> Colega de trabalho <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Primo (a) <input type="checkbox"/> Cônjuge	
<input type="checkbox"/> Agregados <input type="checkbox"/> Irmãos <input type="checkbox"/> Filho (a) <input type="checkbox"/> Namorado (a) <input type="checkbox"/> Avós <input type="checkbox"/> Cunhado (a) <input type="checkbox"/> Vizinho (a)	
<input type="checkbox"/> Não sabe informar <input type="checkbox"/> Outros	
Resultados anteriores de BAAR <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Onde? _____	
Resultado: 1) ____ 2) ____	
Outros exames: _____	
Consome bebidas alcoólicas e/ou fuma?	
<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim, quantos cigarros por semana: _____	
<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim, Qual: <input type="checkbox"/> cerveja (1 dose=330mL) <input type="checkbox"/> vinho (1 dose 100mL) <input type="checkbox"/> Destilados (1 dose= 30mL), quantas doses por semana: _____	
Quadro clínico atual:	
<input type="checkbox"/> Saudável, sem sintomas de doença aparente	
<input type="checkbox"/> Com sintomas, tais como:	
<input type="checkbox"/> Tosse <input type="checkbox"/> Expectoração <input type="checkbox"/> Hemoptise <input type="checkbox"/> Dispneia <input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Dor torácica	
<input type="checkbox"/> Dor de cabeça <input type="checkbox"/> Emagrecimento <input type="checkbox"/> Cansaço <input type="checkbox"/> outros	
Outras informações: _____	

Observação: Esta ficha ficará em arquivo restrito sob responsabilidade do pesquisador principal (coordenador do Projeto) para manter o sigilo dos dados dos participantes.

10. ANEXO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Aya Sadahiro

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 19021519.9.0000.5020

Instituição Proponente: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.530.854

Apresentação do Projeto:

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

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

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

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

Endereço: Rua Teresina, 495
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (32)3305-1181 E-mail: cep.ufam@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - UFAM



Continuação do Parecer: 3.530.854

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 25 de Agosto de 2019

Assinado por:
Ellana Maria Perreira da Fonseca
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Terezina, 495
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3305-1181 E-mail: cep.ufam@gmail.com

Página 06 de 06