



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



POLIMORFISMO DO GENE *TOLLIP* (rs5743899) EM PACIENTES
COM TUBERCULOSE PULMONAR

ANDREZA MENDES DOS SANTOS

MANAUS-AM

Agosto, 2017



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



POLIMORFISMO DO GENE *TOLLIP* (rs5743899) EM PACIENTES
COM TUBERCULOSE PULMONAR

ANDREZA MENDES DOS SANTOS

Dissertação apresentada para Defesa de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada PPGIBA – UFAM, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Dra. Aya Sadahiro

Ficha Catalográfica

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

S237p Santos, Andreza Mendes
Polimorfismo no gene de TOLLIP (rs5743899) em pacientes com
tuberculose pulmonar / Andreza Mendes Santos . 2017
72 f.: 31 cm.

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

1. Tuberculose. 2. Pumonar. 3. Gene. 4. Polimorfismo rs5743899.
5. TOLLIP-Proteína do tipo Toll. I. Sadahiro, Aya. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título



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



DEFESA DE MESTRADO

BANCA EXAMINADORA

PROFESSORA DOUTORA AYA SADAHIRO
(PRESIDENTE DA BANCA)

PROFESSOR DOUTORA ADRIANA MALHEIRO ALLE MARIE
(MEMBRO TITULAR)

PROFESSORA DOUTORA MARLÚCIA DA SILVA GARRIDO
(MEMBRO TITULAR)

MANAUS, 28 DE AGOSTO DE 2017

Conceda-nos Senhor, serenidade necessária para aceitar as coisas que não podemos modificar, coragem para modificar aquelas que podemos e sabedoria para distinguir umas das outras.

Reinhold Niebuhr

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado saúde, discernimento e permitiu chegar até aqui para concluir as batalhas que sozinha não conseguiria vencer.

Aos meus pais, Ana Lídice Fortes Mendes e José Artur Rozário dos Santos, meus apoiadores fieis, só o amor verdadeiro é capaz de suportar os piores dias, e vocês nunca me abandonaram. Aos meus irmãos, Anderson José Mendes dos Santos e Marcia Monick Mendes Cabral, a minha eterna /afeição.

A Antonia Alves, minha companheira nessa jornada, me deu apoio em momentos de grande tristeza, segurou a minha mão, foi uma amiga, uma pessoa mais que especial nas adversidades, meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Doutor Rajendranath Ramasawmy, professor do PPGIBA e pesquisador do Instituto de Medicina Tropical, que gentilmente forneceu os reagentes para a realização da genotipagem para *TOLLIP*.

Ao George Allan Villarouco da Silva que ajudou na padronização inicial dos testes para a genotipagem de *TOLLIP*.

Agradeço a todos meus amigos queridos, eles sempre me fizeram sorrir e me apoiaram nas dificuldades vividas, não citarei nomes, mas é mister saberem que estão em meu coração.

A equipe do laboratório de imunologia, Dr. Mauricio Morishi Ogusku, Vanessa Alves de Almeida, Mariana Brasil de Andrade Figueira, Luana Souza Felix, Dhemerson Souza de Lima, todos os amigos do PPGIBA, e os queridos Edson Brazão e Ana Paula Araújo.

Aos profissionais e dirigentes da Policlínica Cardoso Fontes, que tão gentilmente nos receberam e apoiaram durante toda a pesquisa.

E, especialmente, a Dra. Aya Sadahiro minha orientadora, foi rígida em muitos momentos, mas a ela devo todo esse trabalho, foi minha irmã mais velha, minha mãe e minha amiga, sem ela nada disso seria possível. Nunca desistiu de mim, obrigada Doutora.

RESUMO

Os casos novos de tuberculose (TB) têm sido crescentes no Amazonas, em 2016, o coeficiente de incidência foi de 67,2 casos de TB/100 mil habitantes, a mais elevada do Brasil. Os fatores socioeconômicos podem ser uma das explicações para essa alta taxa, porém os fatores genéticos também podem influenciar na resposta imunológica ao patógeno. Neste contexto, os polimorfismos nos genes de *TOLLIP* podem estar envolvidos na regulação das respostas imunológicas contra *Mycobacterium tuberculosis*, já que estudos comprovaram que a proteína de interação aos receptores do tipo Toll, o Tollip, exerce um papel regulador na sinalização intracelular, principalmente em macrófagos e células dendríticas, exercendo um “feedback” negativo na liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e TNF através da via MyD88, assim como também teria influência na secreção de IL1 β através dos inflamassomas, respostas fundamentais na defesa imune inata contra patógenos. Dessa forma, investigou-se os polimorfismos de base única (SNPs), em genes de *TOLLIP* (rs5743899), com foco nos pacientes com TB pulmonar e controles. Para este estudo foi avaliado um total de 547 amostras, distribuídas em: 251 amostras de pacientes com TB pulmonar, e 296 indivíduos controles. A genotipagem para *TOLLIP* (rs5743899) foi realizada por PCR. Após análise dos resultados da frequência dos alelos e genótipos, não houve associação para maior chance de risco ou não a TB, divergindo de estudos realizados em outras populações. Avaliou-se também os genótipos de *TOLLIP* (rs5743899) (AA e AG) *versus* as concentrações de IL1- β em 67 amostras de plasmas de pacientes (n=30) e controles (n=37), mas não foi observada nenhuma relação dos genótipos com a concentração de IL1- β . No presente estudo não foi observada associação dos genes de *TOLLIP* (rs5743899) com a TB, porém este estudo deve ser ampliado, incluindo outras regiões gênicas de *TOLLIP*, considerando o papel crucial da proteína tollip na regulação da resposta inflamatória na tuberculose.

Palavras-chave: Tuberculose Pulmonar; Gene *TOLLIP*; Polimorfismo rs5743899

ABSTRACT

New cases of tuberculosis (TB) have been increasing in Amazonas, in 2016, it was about 67.2 cases of TB/100 thousand inhabitants, the highest in the country. Socioeconomic factors may be one of the explanations for this high rate. However, genetic factors can influence the immune response to the pathogen. In this context, polymorphisms in *TOLLIP* genes may be involved with immunological alterations in the response to *Mycobacterium tuberculosis*, since studies have shown that the protein associated with Toll-like receptors plays a regulatory role in intracellular signaling, mainly in macrophages and dendritic cells, exerting a negative feedback on the release of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF through the MyD88 pathway, as well as influencing the secretion of IL1 β through the inflammasome, fundamental responses in the innate immune defense against pathogens, including *Mycobacterium tuberculosis*. Thus, single-base polymorphisms (SNPs) in *TOLLIP* genes (rs5743899) were investigated, focusing on pulmonary TB patients and controls. For this study, a total of 547 samples were evaluated, distributed in: 251 samples from patients with pulmonary TB, and 296 control subjects. Genotyping for *TOLLIP* (rs5743899) was performed by PCR. After analyzing the results of the frequency of alleles and genotypes, there was no association for a greater chance of risk or not for TB, which differs from studies carried out in other populations. We also evaluated *TOLLIP* (rs5743899) genotypes (AA and AG) versus IL1- β concentrations in 67 plasma samples from patients (n=30) and controls (n=37), but no relationship between genotypes with the concentration of IL1- β . In the present study, no association of *TOLLIP* genes (rs5743899) with TB was observed, but this study should be expanded to include other *TOLLIP* gene regions, considering the crucial role of tollip protein in regulating the inflammatory response in tuberculosis.

Key words: Pulmonary Tuberculosis; Gene *TOLLIP*; Polymorphism rs5743899

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

TOLLIP	“Toll-Interacting Protein” – Proteína de interação com toll
TLR	“Toll-like receptors” – Receptores semelhantes a toll
TCR	“T cell receptor” - Receptor de célula T
APCs	“Antigen presenting cells” - Células apresentadoras de antígeno
BCG	“Bacillus Calmette-Guérin”
CCL2	Quimiocinas com duas cisteínas próximas (CC) ligantes 2
CCL3	Quimiocinas com duas cisteínas próximas (CC) ligantes 3
CCL5	Quimiocinas com duas cisteínas próximas (CC) ligantes 5
CXCL8	Quimiocinas com cisteínas separadas por um aminoácido diferente de cisteína (CXC) ligantes 8
CXCL10	Quimiocinas com cisteínas separadas por um aminoácido diferente de cisteína (CXC) ligantes 10
DAMP	“Damage-associated molecular pattern” Padrão molecular associado ao dano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IFN-γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
MHC II	“Major histocompatibility complex”- Complexo principal de histocompatibilidade
NLRP	“NLR-NOD-like receptors, pyrin-domain-containing proteins” Receptores semelhantes a NOD com domínio pirina
NLR	“NOD-like receptors” Receptores semelhantes a NOD

NK	Célula “Natural Killer”
PAMP	“Pathogen-associated molecular pattern“- Padrão molecular associado ao patógeno
SNPs	“Single nucleotide polymorphism” - Polimorfismos de base única
Th0	Células T helper 0
Th1	Células T helper 1
Th2	Células T helper 2
Th17	Células T helper 17
TB	Tuberculose
TNF	Fator de necrose tumoral
HIV	“Human Immunodeficiency Virus” - vírus da imunodeficiência humana

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ordem	Título da Figura	Página
1	Resposta Imune a Tuberculose	17
2	Sinalização através de IL-1R e Tollip	18
3	Gel de Agarose a 1,5%	33
4	Gel de Agarose a 3,0%	33
5	Distribuição da frequência dos genótipos de <i>TOLLIP</i> (rs5743899) em pacientes com TB pulmonar e controles.	34
6	Concentração de IL-1 β (pg/mL) em amostras de plasmas obtidas do sangue de pacientes com TB pulmonar	36
7	Análise das concentrações de IL-1 β e genótipos de <i>TOLLIP</i> (rs5743899) AA vs AG. Amostras de Pacientes TB e Controles estimulados com Antígeno	38

QUADRO

Ordem	Título do Quadro	Página
1	Estudos de polimorfismos em genes relacionados a <i>TOLLIP</i> e resposta imune ao complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20

LISTA DE TABELAS

Ordem	Título das Tabelas	Página
1	Características gerais dos pacientes de TB pulmonar e controles	32
2	Análise de associação do polimorfismo genético de <i>TOLLIP</i> em pacientes com TB pulmonar e Controles	35

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA TUBERCULOSE PULMONAR	23
2.3. FUNÇÃO DO TOLLIP NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA	27
2.4. ESTUDOS IMUNOGENÉTICOS NA TUBERCULOSE.....	28
2.5. POLIMORFISMOS DO GENE <i>TOLLIP</i>	30
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVO GERAL:.....	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. TIPO DE ESTUDO	36
4.2. POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA	36
4.3. INFORMAÇÕES ÉTICAS	36
4.4. GRUPOS ESTUDADOS.....	36
4.4.1. GRUPO 1: Pacientes com TB pulmonar.....	36
4.4.2. GRUPO 2: Controle	36
4.5. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	37
4.6. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	37
4.7. RECRUTAMENTO DOS PACIENTES E CONTROLES.....	37
4.8. SELEÇÃO DOS PACIENTES E INDIVÍDUOS SADIOS	38
4.8.1. Seleção de pacientes com TB pulmonar:	38
4.8.2. Seleção dos Indivíduos saudios:	38
4.9. COLETA DE DADOS.....	38
4.10. CÁLCULO AMOSTRAL	38
4.11. AMOSTRAS BIOLÓGICAS E EXAMES A SEREM REALIZADOS.....	38
4.11.1. Exames Bacteriológicos e de Biologia Molecular	39
4.11.2. Extração de DNA de sangue periférico e Genotipagem (PCR-RFLP)	40
4.11.3. Quantificação de Interleucina-1 β (IL-1 β).....	41
4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO	44

5.2 GENOTIPAGEM DE <i>TOLLIP</i> (rs 5743899)	45
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE IL-1 β	48
5.4 ANÁLISE DE IL-1 β E GENÓTIPOS de <i>TOLLIP</i> (rs5743899)	50
6. CONCLUSÃO	52
Considerações finais	53
7. EQUIPE DO PROJETO	54
8. REFERÊNCIAS.....	Erro! Indicador não definido.
APÊNDICE.....	66

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa de alta prevalência, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2015, foram notificados 10,4 milhões de pessoas tiveram TB no mundo, com 6,1 milhões de novos casos registrados, e continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países de baixa e média renda (OMS, 2016).

O agente causador da TB pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, formado por um grupo de espécies geneticamente semelhantes, possuem uma parede celular complexa e são patógenos intracelulares com a capacidade de se replicar dentro de fagócitos, principalmente em macrófagos (FORRELAD, 2013, FERRI et al., 2014).

O Brasil está entre os 30 países de alta carga para TB, de acordo com Boletim Epidemiológico, do Ministério da Saúde do Brasil, em 2016 foram registrados 66.796 casos novos de TB no país, atingindo um coeficiente de incidência de 32,4/100 mil habitantes (BRASIL, 2017). Neste mesmo ano, o estado do Amazonas registrou um coeficiente de incidência de 67,2/100 mil habitantes, ou seja, o dobro do coeficiente nacional e foi o estado com a maior de incidência da TB no Brasil (BRASIL, 2017).

A transmissão primária da doença ocorre de pessoa para pessoa quando o indivíduo tosse ou espirra, propagando gotículas contaminadas pelo ar, o bacilo da tuberculose, *M. tuberculosis*, alcança o sistema alveolar e é ativamente combatido pelos macrófagos alveolares, mas o indivíduo infectado poderá evoluir para TB pulmonar (QUESNIAUX, 2004).

Há a estimativa que dos indivíduos infectados por *M. tuberculosis*, menos de 10%, evoluem para a TB doença (SHALER et al., 2012), fato que reforça o importante papel da resposta imune na TB. Portanto, o perfil genético e o estado imunológico do indivíduo ao ser infectado por *M. tuberculosis*, seguramente são fatores importantes para a evolução e desfecho para TB doença ou não, considerando-se ainda a virulência da cepa.

A resposta imune inicial contra o bacilo ocorre, a partir do reconhecimento dos PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) de *M. tuberculosis*, por células e componentes da imunidade inata. Estas células expressam PRR (*Pattern Recognition Receptors*), tais como os TLRs (*Toll-Like Receptors*), uma família de

receptores que reconhecem padrões associados ao patógeno e capazes de modular uma resposta imune contra o bacilo. Estudo de meta-análise demonstrou que determinados polimorfismos em genes de *TLR*, como, *TLR1*, *TLR2*, *TLR4* e *TLR6* foram associados a TB para proteção ou risco (SCHURZ et al. 2015).

A proteína Tollip (*Toll-interacting protein*) participa das vias de sinalização do IL-1R e TLR, inibindo a ativação celular por produtos microbianos. Além disso, inibe a fosforilação de IRAK e atividades de quinase. A super expressão de Tollip inibe a ativação de NF- κ B mediada por TLR4 e TLR2 de maneira dose-dependente, sugerindo que essa molécula de sinalização também é compartilhada entre as vias de sinalização de IL-1R, TLR4 e TLR2 (BURNS et al. 2000; BULUT et al 2001, BRISSONI et al., 2006). O Tollip é uma molécula expressa endogenamente que limita os sinais pró-inflamatórios do sistema imune inato e adaptativo e pode ser explorada como uma estratégia anti-inflamatória (BURNS et al. 2000; ZHANG e GHOSH, 2002; LI et al., 2004; PIAO et al., 2009).

Apesar das diversas pesquisas desenvolvidas para entender a funcionalidade e a relevância clínica de Tollip na modulação da TB, ainda são muitos os questionamentos sobre a sua importância no decorrer da resposta imunológica contra *M. tuberculosis* e como os polimorfismos do gene de *TOLLIP* podem influenciar na evolução da doença. Neste aspecto, o presente estudo investigou a frequência do polimorfismo do gene *TOLLIP* (rs5743899) em pacientes com TB pulmonar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A humanidade convive com a tuberculose (TB) ao longo da história, é considerada uma enfermidade antiga e já matou milhões de pessoas, sendo denominada a “Peste Branca”. Novas técnicas genéticas através do sequenciamento do genoma de várias cepas do *M. tuberculosis* estão permitindo uma estimativa mais precisa do tempo de existência das micobactérias, mas, há hipóteses de que a sua origem ocorreu há mais de 150 milhões de anos (SHEPPARD, 2001).

A TB sempre esteve presente na história das várias sociedades, era considerada uma doença fruto de castigo divino pela desobediência humana. Hipócrates (Grécia, XXX, a.C) já dizia que era uma doença natural e capaz de causar um grande esgotamento físico no indivíduo, por isso a chamou de tísica, (palavra grega = *phthisikos*) que significa declínio, pois consumia o corpo do hospedeiro e causava a expressão de morte iminente (MEDCALF et al., 2013).

No século XVIII houve contribuições significativas, na Europa, para a caracterização da tuberculose, cientistas como Franciscus le Boe (1614-1672), Thomas Willis (1621-1675) e Richard Morton (1673-1698) colaboraram com a descrição do padrão miliar da disseminação e a identificação das formas agudas e crônicas (KEERS, 1978). Johann Schoenlein, em 1839, denominou a doença como tuberculose, derivada da palavra latina *tubércula*, pequenos nódulos (DUBOS, 1952).

A grande contribuição foi do médico alemão Robert Koch (1843-1910), que a partir da coleta das bactérias de tecidos infectados, cultivou o bacilo e inoculou este microrganismo em modelo animal, reproduzindo a doença. Nestes procedimentos, Robert Koch reformulou e demonstrou as características necessárias para que um germe fosse considerado causador de determinada doença: a) o germe deve ser encontrado em todas as lesões do corpo; b) deve ser cultivado puro, fora do corpo, por várias gerações; c) após a cultura por tempo suficiente e várias gerações, deve ser capaz de reproduzir a doença original no corpo de um animal. A partir dessas indagações Robert Koch desmistificou a crença na hereditariedade da moléstia e classificou a TB nos grupos de doenças infecciosas (ANTUNES et al., 2000, DUTAU, 2005).

Em 1920, com a Reforma Carlos Chagas, no Brasil, houve a instauração da Profilaxia Contra Tuberculose. Assim, o Estado passou a se comprometer de forma mais ativa com a prevenção da doença. O século XX foi importante para as medidas de combate a TB, foi nesse período que houve, sob a supervisão da “Liga Brasileira Contra a Tuberculose”, a vacinação de recém-nascidos com a BCG (Bacilo de Calmette e Guérin) (MACIEL et al., 2012).

Na atual conjuntura do século XXI, a TB merece um olhar diferenciado, pois representa um agravo de grande magnitude, para os pacientes com doenças que causam vulnerabilidade imunológica, como a exemplo do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana, (NETO, 2012).

A tuberculose (TB) é causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, constituídas pelas seguintes espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* (BCG); *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (BRASIL, 2008). É a espécie que mais acomete os pacientes de TB é *M. tuberculosis* que é capaz de ocasionar inflamação granulomatosa no pulmão podendo evoluir para a cronicidade com perda relativa ou total da funcionalidade do tecido pulmonar (FONTANA, 2008; FORRELLAD et al.; 2013 DHEDA et al., 2016).

Os séculos de convivência com a população humana permitiram o aparecimento de alterações genéticas no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, tornando algumas cepas mais resistentes e virulentas. A exemplo dessa afirmativa temos a linhagem “East Asian/Beijing”, cepa HN878, causou um surto de TB no Texas. Essa virulência incomum foi atribuída a produção do glicolípido fenólico (PGL) presente na parede celular bacteriana, que suprimia a liberação de TNF- α (*tumour necrosis factor-alpha*) e IL-12p40 (*interleukin-12p40*) em macrófagos, quando comparada a cepa H37Rv (*Mycobacterium tuberculosis strains*) (REED et al., 2004). No entanto, a cepa, H37Rv, que também possui PGL suprimiu a produção de mediadores pró-inflamatórios de monócitos humanos *in vitro*, mas não demonstrou maior virulência em camundongos ou em “guinea pigs”, sugerindo que o efeito da PGL deve ser influenciado pelo *background* da cepa (SINSIMER et al., 2008, KRISHNAN et al., 2011).

A transmissão da tuberculose ocorre por vias aéreas superiores, através do indivíduo acometido com a forma pulmonar da doença, a capacidade de infecção

também depende do estado bacteriológico (resultado da baciloscopia) do indivíduo transmissor (BARRETO et al., 2008 in FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ).

Métodos diagnósticos da TB:

1. Baciloscopia, realizada através da pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente – BAAR, pelo método de Zhiel-Neelsen, possui sensibilidade de 60 a 80%, desde que as etapas do exame sejam realizadas corretamente em todas as suas fases (BRASIL, 2011).

A classificação bacteriológica é definida como:

- a. Doentes bacilíferos (B+) – a baciloscopia de escarro é positiva e o paciente está com TB;
 - b. Doentes não bacilíferos – a baciloscopia do escarro é negativa, e a cultura pode ser positiva (C+) ou negativa (C-) (BRASIL, 2011).
2. Teste Rápido Molecular para Tuberculose (TRM-TB) é utilizado, prioritariamente, para diagnóstico pulmonar e laríngea em adolescentes e adultos. Consiste na amplificação de ácidos nucleicos, capaz de detectar o DNA dos bacilos do complexo *M. tuberculosis* e detecção de cepas resistentes à rifampicina pela técnica de reação em cadeia polimerase (PCR) em tempo real. Para processamento do teste é necessário uma amostra de escarro. A sensibilidade do TRM-TB em amostras de escarros foi de 90%, superior à da baciloscopia (BRASIL, 2011).

São cinco os possíveis resultados para TRM-TB:

- a. MTB não detectado – Negativo
- b. MTB detectado e resistência à rifampicina não detectada – Positivo para tuberculose, **sem** resistência a rifampicina.
- c. MTB detectado e resistência à rifampicina detectada – Positivo para tuberculose, **com** resistência à rifampicina.
- d. MTB detectado e resistência à rifampicina indeterminada – Positivo para tuberculose e resistência à rifampicina inconclusiva – repetir o teste em nova amostra.
- e. Sem resultado/inválido/erro – Inconclusivo – repetir o teste em uma nova amostra (BRASIL, 2011).

O indivíduo com TB convivendo em uma comunidade será capaz de contaminar de 10 a 15 pessoas de sua convivência, pois, doentes bacilíferos positivos eliminam uma quantidade de bacilos superior a 5.000 por ml de escarro, (BRASIL, 2011).

Os contatos de tuberculose possuem risco substancial de serem contaminados com o bacilo e evoluir com a doença, um estudo retrospectivo (1999 a 2008) de Matos et. al, 2012, com uma amostra de 473 adolescentes diagnosticados com TB foram avaliados, desse grupo 66% tinham história de contato com paciente de tuberculose pulmonar, principalmente por contato intradomiciliar.

As manifestações clínicas da TB podem ser classificadas em forma primária (mais comum em crianças), pós-primária ou secundária (mais comum em adolescentes e adultos jovens), e TB miliar (uma forma grave da doença), ocorre em 1% dos casos com tuberculose e HIV negativo e esse número aumenta em 10% quando o paciente é HIV positivo. Os sintomas clássicos do indivíduo com tuberculose são: tosse persistente (há mais de duas semanas), produtiva ou não (com muco e eventualmente sangue), febre vespertina e sudorese noturna e emagrecimento (SIQUEIRA, 2012; BRASIL, 2011).

A terapêutica da TB é eficaz, porém possui efeitos colaterais indesejáveis, e em alguns casos estão, inclusive, associadas ao abandono do tratamento (VIEIRA e GOMES, 2008). As medicações utilizadas na clínica da TB são: rifampicina (RMP), etambutol (EMB), pirazinamida (PZA), e a isoniazida, elas são empregadas conforme o padrão de resistência da doença (monorresistência, multirresistência e resistência extensiva) ao medicamento (BRASIL, 2017, SANTOS et al, 2012).

No mundo, em 2015, a tuberculose foi a doença que mais causou mortes, e esse cenário pode ser quando associadas a hábitos de vida prejudiciais, como o fumo, álcool, má nutrição. O óbito por essa doença é considerado um evento sentinela e indica uma fragilidade na assistência de saúde ao paciente (OMS, 2016; BRASIL, 2017).

2.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA TUBERCULOSE PULMONAR

Em 2015, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), houve a estimativa de 10,4 milhões de casos novos de tuberculose (TB) no mundo, dos quais 5,9 milhões foram em homens; 3,5 milhões em mulheres e 1 milhão em crianças. Além disso, 1,2 milhão de casos novos de TB foram em pessoas vivendo com HIV. Apesar dos avanços e progressos para novos diagnósticos, tratamentos e desenvolvimento de vacinas, as pesquisas em TB permanecem subfinanciadas. A doença preocupa, pois, apesar de ter apresentado queda em alguns países, ainda está entre as 10 principais causas de morte no mundo (OMS, 2016).

A meta de redução da TB no Brasil é de menos de 10 casos para cada 100.000 habitantes até 2035, porém, em 2016 ainda foram notificados no Brasil 66.796 novos casos de TB, correspondendo a 32,4 casos por 100.000 habitantes. Apesar de ter havido um declínio da doença de 2007 a 2016 de menos 1,7% a associação da TB com a AIDS tem dificultado o processo de combate à tuberculose, tornando longo o caminho a ser percorrido para o alcance da meta estabelecida pela OMS (BRASIL, 2017).

O Amazonas está entre os estados brasileiros com maior risco de adoecimento por TB, em 2016 apresentou um coeficiente de incidência de 67,2/100.000 habitantes. Neste mesmo ano, a capital, Manaus, apresentou incidência de 93,2/100.000 habitantes, quase três vezes o coeficiente de incidência nacional que foi de 32,4/100.000 habitantes (BRASIL, 2017).

2.2. RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis*

O sistema imunológico é altamente diversificado e complexo, resultado de milhões de anos de evolução, e capaz de manter a conexão com o primitivo e se adaptar ao novo (BUCHMANN, 2014). Do desenvolvimento fetal ao envelhecimento, a resposta imunológica se comporta de forma diferenciada para cada etapa da vida humana (SIMON et al., 2015).

A resposta imunológica é dividida em inata e adaptativa. A resposta imune adaptativa é capaz de distinguir entre diversas substâncias, microbianas ou não,

através de modificações gênicas de linfócitos com capacidade de gerar memória imunológica, já o sistema imune inato impede a ação invasora de muitos patógenos, prevenindo, e controlando a infecção. É a primeira linha de defesa do hospedeiro (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000; ZAK e ADEREM, 2015).

A interação entre as células do sistema imune inato e os microrganismos acontece pela conexão de PAMPs dos agentes patogênicos com as moléculas de reconhecimento associadas às células, *PRRs*, essas moléculas são expressas pelos fagócitos especialmente macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células epiteliais (JANEWAY e MEDZHITOV 2002; GEREMIA et al., 2014).

Dos *PRRs*, os mais amplamente estudados são os receptores semelhantes a Toll (*Toll-like receptors-TLRs*). Os *TLRs* são glicoproteínas integrais do tipo I com repetições ricas em leucina flanqueadas por locais com cisteína nas regiões extracelulares (KAISHO e AKIRA, 2001; JANEWAY e MEDZHITOV 2002; SATOH e AKIRA, 2016). Antes do conhecimento dos *TLRs* a resposta inata era considerada primitiva e não sofisticada. Foi a partir de experimentos genéticos e caracterização do *TLR4* que os mecanismos moleculares começaram a ser esclarecidos (O'NIEL et al., 2013).

Atualmente, são conhecidos 10 receptores semelhantes a Toll (*TLR*) em mamíferos de *TLR1* a *TLR10*, sendo que no homem são funcionais os *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR5* e *TLR6* que estão localizados na superfície celular, enquanto que *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* e *TLR9* estão localizados intracelularmente, no retículo endoplasmático (KAISHO e AKIRA, 2001; KAWAI e AKIRA, 2010, MORESCO et al., 2011; SATOH e AKIRA, 2016).

É cogitado que os *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR8* e *TLR9* estejam envolvidos na resposta imune ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Após estimulados, alguns *TLRs*, através de *MyD88*, levam a produção de citocinas pró-inflamatórias pela via *NF-kB*, como a *IL-1 (Interleukin-1)*. *TLR9* e *TLR7* são capazes de acionar tanto os fatores de transcrição de *NF-kB* como também o fator de *IRFs (Interferon regulatory factors)*, com produção de *IFN- γ (gamma interferon)* (ZHAO et al., 2015).

O bacilo da tuberculose, *M. tuberculosis*, ao alcançar o tecido pulmonar será fagocitado por macrófagos residentes, em resposta o bacilo utiliza meios de evasão

imunológica, interferindo na formação do fagolisossomo e inibindo também a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (FLYNN e CHAN, 2003; SHALER et al., 2012).

Após a inibição da formação do fagolisossomo, o bacilo da TB é capaz de controlar a expressão de moléculas co-estimuladoras em APC's (*Antigen-presenting cells*) ocasionando falhas no processo de apresentação do antígeno através do TCR (*T cell receptor*) para linfócitos T. A interação dos macrófagos infectados as células T coloca em ação as moléculas associadas ao microrganismo, que são capazes de estimular a resposta imune adaptativa, a exemplo temos a lipoarabinomanana (LAM), mas curiosamente esta mesma substância, também é capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, via TLR2. Além disso, a proteína ESAT-6 (*ESAT-6-like protein EsxB*) do bacilo é capaz de desregular a apresentação do antígeno por MHC de classe I para as células T, levando a interferência na produção de IFN- γ (FLYNN e CHAN, 2005; ROJAS et al., 2006; WELIN et al., 2008; LANÇIONI et al., 2010; SREEJIT et al., 2014).

Estudos realizados com camundongos nocautes para TLR2 e TLR4 (TLR2-/- e TLR4-/-) desafiados com *Mycobacterium bovis* (da BCG), demonstraram que os TLR2 e TLR4 exercem funções distintas direcionadas as respostas imunes inata e adaptativas contra a BCG. O TLR2 parece ser necessário para a expansão das células T efectoras e para secreção de IFN- γ . Em contraste, o TLR4 pode ser necessário para o desenvolvimento de uma resposta Th1 normal contra BCG, particularmente quando um número maior de bacilos estiver presente. Estes resultados sugerem a importância das TLRs na resposta a vacina BCG (HELDWEIN et al., 2003).

Não há dúvidas que o reconhecimento inicial de componentes micobacterianos, por células da imunidade inata são importantes, em especial, por PRR, tais como o TLR2 e TLR4 (QUESNIAUX et al., 2004). Há também descrito que a combinação de TLR1/TLR6 com TLR2, foram implicados no reconhecimento de antígenos micobacterianos (BULUT et al., 2001; HAJJAR et al., 2001). Além disso, um antagonista de TLR4 é capaz de bloquear a produção de TNF por macrófagos induzida por *M. tuberculosis* (MEANS et al., 2001). No entanto, a maioria dos

antígenos micobacterianos purificados, que foram testados, sinalizaram através de TLR2 (QUESNIAUX et al., 2004).

É importante destacar que outros PRR, além dos TLRs, estão envolvidos no reconhecimento de antígenos micobacterianos. Estes incluem os receptores NLRs (NOD-like receptors) e Lectina tipo C (SAIGA et al., 2011).

Embora seja evidente que nos pacientes com TB e nos estudos com modelos experimentais, a participação de macrófagos, linfócitos Th1 e de citocinas, como a IL-12, IFN- γ e TNF- α , são fundamentais para o controle da infecção por *M. tuberculosis*. No entanto, ainda não está claro quais fatores existentes no hospedeiro determinam, após infecção pelo bacilo, se o desfecho será uma resposta protetora ou se evoluirá para TB doença (O'GARRA et al., 2013).

Neste contexto, investigar outras citocinas, que estão envolvidas na resposta contra as micobactérias, tais como as quimiocinas, que são ativadoras e recrutadoras de leucócitos, auxiliando na formação de granulomas, podem ajudar na compreensão da resposta imune a *M. tuberculosis*. As principais quimiocinas produzidas em resposta a infecção pelo bacilo da TB foram MIP-1 alfa (CCL3), MIP-1 beta (CCL4) e RANTES (CCL5).

Saukkonen et al. (2002) observaram que cepas distintas de *M. tuberculosis* podem elicitar perfis diferentes de quimiocinas, por exemplo, *M. tuberculosis* virulento (H37Rv) induziu menos secreção MIP-1 alfa que a cepa avirulenta (H37Ra), enquanto a produção de MIP-1 beta e RANTES foi comparável para ambas as cepas. Além disso, os macrófagos alveolares de indivíduos infectados pelo HIV produziram menos TNF-alfa e MIP-1 beta, em resposta a qualquer uma das cepas de *M. tuberculosis*. O MIP-1 beta e RANTES suprimiram o crescimento intracelular de *M. tuberculosis*. Neste passo, a redução destas duas quimiocinas podem alterar a resposta da imunidade inata e promover a sobrevivência e manutenção do bacilo no interior da célula hospedeira.

Além disso, é importante também avaliar as subpopulações das células TCD4+, por exemplo, os linfócitos Th17 que secretam IL-17 e recrutam neutrófilos. Outra subpopulação são os linfócitos Th2 que secretam IL-4 e IL-13 que contrapõem as ações de macrófagos ativados por IFN- γ , e os linfócitos T

regulatórios (Treg) que liberam IL-10, que suprimem a resposta Th1 (SIVEKE; HAMANN, 1998; CHEN et al., 2007). O granuloma nem sempre possui uma característica protetora e permite a sobrevivência do patógeno durante anos, além de estar envolvido com a resistência a medicamentos (KIRAN et al., 2016).

Ainda neste processo de supressão da resposta imune, a proteína, Tollip, e suas variantes, regulam negativamente TLRs em monócitos humanos do sangue periférico. Entre uma de suas ações, está o fato do Tollip conseguir suprimir a produção de TNF- α e IL-6, após a estimulação dos TLR2 e TLR4, mas em contraste estimula a secreção de IL-10, demonstrando um papel regulador na resposta imune, porém também associado a TB. Esta associação a doença, pode ser devido aos polimorfismos do gene *TOLLIP* rs3750920 e rs5743899, que alterariam a expressão do RNAm (SHAH et al., 2012; LUIZ et al., 2014)

Neste aspecto, é possível sugerir que polimorfismos no gene de *TOLLIP* que estejam ligados a perda de função ou uma redução na função da proteína Tollip podem aumentar a resposta inflamatória, sem controle, e representar um risco para a forma grave em diversas doenças, inclusive para a TB.

2.3. FUNÇÃO DO *TOLLIP* NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A proteína Tollip foi estudada pela primeira vez em um experimento com levedura (triagem em sistema de duplo híbrido) através de um homólogo do receptor de interleucina-1 (*Interleukin-1 receptor- IL-1R*), o IL-RAcP (*Interleukin-1 receptor accessory protein*). O IL-1R contém domínios TIR (Toll Interleukin Related) citoplasmáticos, que permitem a ligação da IL-1 induzindo o recrutamento da proteína adaptadora MyD88, levando a transdução de genes responsáveis pela resposta inflamatória através de NF- κ B. A IL-1 também estimula o recrutamento dos genes IRAK (*Interleukin receptor-associated kinase*), IRAK2 e/ ou IRAKT (*Interleukin receptor-associated treonine*), levando a uma regulação positiva do fator de transcrição de NF- κ B com produção de mediadores inflamatórios (BURNS et al., 2000; ZHU et al., 2012).

Estruturalmente a proteína Tollip está localizada no endossoma, possui 274 aminoácidos, contém um domínio de ligação N-terminal, (*Tom1 binding domain* -

TDB), um domínio central conservado (C2) e uma região C terminal de ubiquitina associado a degradação do retículo endoplasmático (*C-terminal portion of coupling ubiquitin to endoplasmic reticulum degradation - CUE*). A superexpressão de *TOLLIP* pode levar a inibição de TLR2 e TLR4 e IL-1R. Esse fato demonstra o papel modulador dessa proteína na resposta imune (LUIZ et al., 2014).

A proteína Tollip foi implicada como um regulador negativo da sinalização de NF- κ B, o que compromete as vias de ativação e sinalização desencadeadas pelos receptores de IL-1 (IL-1R), TLR2 e TLR4, conseqüentemente implicando na produção e secreção de várias citocinas envolvidas na resposta inflamatória e imune contra diversos patógenos (CAPELLUTO, 2012). No entanto, em estudos realizados em células de camundongos deficientes em Tollip demonstraram que a sinalização do NF- κ B, assim como MAPK, parecia normal estimuladas com IL-1 β ou ao ligante de TLR4, o lipopolissacarídeo (LPS). Da mesma forma, a ativação de células dendríticas e linfócitos induzida por IL-1 β e TLR era comparável em relação as células selvagens. A produção das citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α foi significativamente reduzida após o tratamento com IL-1 β e LPS em baixas doses, mas não em doses letais de LPS. Portanto, o Tollip, controla a magnitude da produção de citocinas inflamatórias em resposta a IL-1 β e LPS (DIDIERLAURENT et al., 2006).

Os estudos imunogenéticos têm demonstrado que polimorfismos de base única (SNPs - *single nucleotide polymorphisms*) dos genes de *TLR* e de *TOLLIP*, podem influenciar funcionalmente na maior ou menor expressão, produção e secreção de moléculas envolvidas nas vias de sinalização das proteínas destes genes, contribuindo ou não para maior suscetibilidade a TB.

2.4. ESTUDOS IMUNOGENÉTICOS NA TUBERCULOSE

Os estudos imunogenéticos são importantes ferramentas na detecção de várias doenças. Barreiro et al. (2012) , realizaram um estudo de mapeamento de loci de traços quantitativos de expressão (eQTL) associados a variação funcional na resposta imune contra *Mycobacterium tuberculosis*, em células dendríticas (DCs) primárias de 65 indivíduos, antes e após a infecção pelo bacilo da TB. Neste estudo,

198 eQTL foram associados à variação nos níveis de expressão gênica em DCs. Estes loci estão associados a variação regulatória natural, que provavelmente afeta a interação do indivíduo a *M. tuberculosis*. Ao compararem esses resultados eQTL aos do *genome-wide association study* (GWAS) para TB pulmonar, corroborou para a provável associação genética com a doença. Dentre os vários loci o MAPK fosfatase *DUSP14*, em especial, são genes promissores associados a suscetibilidade para TB pulmonar.

A partir dessas pesquisas do genoma humano, é inevitável investigar também os fatores epigenéticos que podem estar relacionados ao risco à doenças e que influenciam o impacto da variação genética na associação da doença. Os fatores epigenéticos incluem metilação do DNA, acetilação de histonas e mediadores, como microRNAs (miRNAs), etc. A metilação do DNA e a acetilação de histonas regulam a taxa de transcrição e/ou a expressão específica de tecidos de genes sem alterar a sequência de DNA (AZAD et al., 2012).

No entanto, avaliar as contribuições e as consequências funcionais de variações genéticas específicas (polimorfismos) no genoma humano para suscitar suscetibilidade ou resistência à TB continua a ser um desafio com muitas perguntas a serem respondidas, e é integrativo os esforços para compreender os mecanismos genéticos envolvidos na evasão do *Mycobacterium* e na influência da resposta imune do hospedeiro (AZAD et al., 2012).

A avaliação das contribuições e as consequências funcionais das variações genéticas específicas (polimorfismos) com características de risco ou proteção para TB no hospedeiro estão sendo investigadas em vários países (Quadro-1).

Quadro 1 - Estudos de polimorfismos em genes, envolvidos na resposta imune, associados a tuberculose (TB) pulmonar e/ou extrapulmonar:

Ordem	Autores	Gene	Polimorfismo	População	Categoria	Associação
1	WILKINSON et al. 2000	<i>VDR</i>	25(OH)DT/Tt	Ásia	Pulmonar Extrapulmonar	risco
2	AKAHOSHI et al. 2003	<i>IL12</i>	IL-12R β 2A/G	Japão	Pulmonar	risco
3	ATES et al. 2008	<i>IL10/TN F</i>	-308GA/ 1,082 GA	Istambul	Pulmonar Extrapulmonar	risco
4	SESHADRI et al. 2014	<i>CD1</i>	089A/G	Vietnã	Pulmonar	risco
5	BHARTI et al. 2014	<i>TLR9</i>	1486C/T	Índia	Pulmonar	risco

6	CAMPOS et al. 2014	<i>CAMP DEFB1</i>	972CG/ 812AG 065 CCAGGCC	México	Pulmonar Extrapulmonar	risco
7	MILANO et al. 2016	<i>IL17A IL6</i>	795G/C 036C/T	Brasil	Pulmonar	proteção
8	HIJIKATA et al. 2016	<i>DUSP1 4</i>	838A/A	África Ocidental	Pulmonar	proteção
9	BUTOV et al. 2016	<i>IL2/IL4 IL10</i>	T330G/C589T G1082A	Ucrânia	Pulmonar	risco
10	AGGELOU et al. 2016	<i>MYD88</i>	938C/A	Grécia	Pulmonar	risco

2.5. POLIMORFISMOS DO GENE *TOLLIP*

Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs - *Single nucleotide polymorphisms*) têm sido, nas últimas duas décadas, o foco de muitas pesquisas, considerando que uma única alteração no gene pode afetar o indivíduo, ou ainda a somatória ou combinação de fatores genéticos e ambientais podem ser relevantes biologicamente e influenciar na evolução e desfecho de diversas doenças (OLIVEIRA et al., 2011).

Dentre os genes relacionados ao sistema imune, há o gene *TOLLIP*, que codifica para a proteína Tollip, que regula negativamente as vias de ativação e sinalização do IL-1R, TLR2 e TLR4, inibindo as funções de NF- κ B, alterando a produção de citocinas pró-inflamatória como IL-6 e TNF- α (SHAH et al., 2012).

A partir desse conhecimento funcional sobre o Tollip e também devido aos trabalhos já descritos, associando os polimorfismos dos genes de *TOLLIP* a doenças infecciosas e inflamatórias, torna-se relevante conhecer melhor sobre os SNPs que podem estar associados a TB.

Nos seres humanos o gene *TOLLIP* está localizado no cromossomo 11 na região p15.5 e contém 6 exons que se traduzem em uma proteína de 274 aminoácidos. Quatro isoformas de Tollip foram caracterizadas em macrófagos humanos (CAPELLUTO, 2012).

Nos estudos realizados em pacientes de TB utilizando os SNPs rs5743899 e rs3750920, foi verificado que o genótipo GG (rs5743899) estaria associado ao aumento da IL-6 na resposta ao *Mycobacterium tuberculosis* (SHAH et al., 2012).

Outros estudos foram realizados investigando os mesmos polimorfismos do gene *TOLLIP* para doenças como a leishmaniose cutânea, infecção por rinovírus (RV) na asma, hanseníase e malária conforme descrito a seguir.

No estado do Amazonas, Brasil, Araujo et al. (2015) investigaram os polimorfismos no gene *TOLLIP* em pacientes com leishmaniose cutânea (LC), demonstrando que houve associação significativa de SNPs de *TOLLIP* rs5743899 (alelo G) e rs3750920 (alelo T) para risco a LC, causada por *Leishmania guyanensis*. No entanto, esta associação dos alelos a LC não é absoluta, pois esses alelos também estão presentes nos controles saudáveis das mesmas áreas endêmicas. Estes resultados, ou seja, estes SNPs de *TOLLIP* podem ser adicionados a vários outros fatores de risco para LC, considerando que esta é uma doença complexa, nos quais vários fatores, tanto genéticos quanto ambientais, podem atuar em conjunto no desenvolvimento da doença.

O SNP rs5743899 de *TOLLIP* também foi investigado na infecção por rinovírus (RV) na asma. Esta condição, é a principal causa de exacerbação da asma, induzindo vários níveis de inflamação das vias aéreas. As células epiteliais traqueobrônquicas humanas (ETBH) de doadores sem doença pulmonar foram cultivadas para determinar respostas pró-inflamatórias e antivirais a IL-13 e RV16. Indivíduos com as asmas de genótipos AG ou GG em comparação com o genótipo AA, para SNP rs5743899 de *TOLLIP*, demonstraram maior limitação ao fluxo aéreo. As células ETBH com AG/GG expressaram menos Tollip. Após o tratamento com IL-13 e RV16, as células com AG/GG (versus AA) produziram mais CXCL8 (IL-8) e expressaram menos genes antivirais, o que foi associado ao aumento da atividade de NF-κB. Estes resultados sugerem que o polimorfismo do gene de *TOLLIP*, SNP rs5743899, pode prever a resposta variável das vias aéreas à infecção por RV na asma (HUANG et al. 2016).

Outro estudo foi realizado por Shah et al. (2016) que analisaram a expressão de RNA mensageiro (mRNA) de genes imunes, em biópsia de pele de pacientes com hanseníase, que é uma doença crônica com acometimento da pele e nervos periféricos. Na hanseníase há alteração da resposta imune do hospedeiro, que não consegue controlar a ação contra *Mycobacterium leprae*. O mRNA de *TOLLIP* foi altamente correlacionado como antagonista de IL-1R (IL-1Ra).

Ainda no estudo de Shah et al. (2016) o SNP de *TOLLIP* rs3793964 TT foi associado ao aumento da suscetibilidade à hanseníase e ao aumento da expressão cutânea de Tollip e IL-1Ra. A estimulação com *M. leprae* de monócitos deficientes em *TOLLIP*, produziu significativamente menos IL-1Ra, em comparação com o controle. Esses dados sugerem que *M. leprae* regula positivamente IL-1Ra por um mecanismo Tollip-dependente. A inibição de Tollip pode diminuir a suscetibilidade de um indivíduo à hanseníase e oferecer um novo alvo terapêutico para doenças dependentes de IL-1.

As variantes rs3750920 e rs5743899 de *TOLLIP* também foram investigadas nos pacientes com malária, causada por *Plasmodium vivax* na Amazônia brasileira, nos municípios de Manaus e Careiro. Neste estudo foi demonstrado a associação do alelo T com a variante rs3750920, que predispõe a suscetibilidade a malária (BRASIL et al., 2017).

Os polimorfismos do gene *TOLLIP* podem estar envolvidos na regulação negativa de respostas imunológicas, levando a maior chance para o desenvolvimento às doenças, conforme comentado nos parágrafos anteriores. Em relação a TB, embora já tenham sido descritos SNPs de *TOLLIP*: rs5743899 (Shah et al., 2012), rs3750920 (Shah et al., 2012), rs4963062 e rs5743867 (HALL et al., 2015) associados a doença, ainda há muitas controvérsias, pois o SNP de *TOLLIP* rs3750920 parece estar associado a proteção para TB, pelo aumento na produção de mRNA.

Finalmente, é evidente que os genes de *TOLLIP* exercem um papel crucial na resposta imune inata a diversos patógenos, assim como para o bacilo causador da TB, as investigações dos polimorfismos imunogenéticos podem certamente contribuir para o melhor entendimento acerca dos mecanismos envolvidos na regulação da resposta imunológica na TB. Por isto, a proposta deste trabalho foi analisar a frequência do SNP (rs5743899) em pacientes com TB pulmonar.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar o polimorfismo do gene *TOLLIP* (rs5743899) em pacientes com tuberculose (TB) pulmonar.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

3.2.1. Estimar a frequência do polimorfismo (SNP) do gene *TOLLIP* (rs5743899) em pacientes com TB pulmonar e controles.

3.2.2. Analisar a possível associação do gene *TOLLIP* (rs5743899) para proteção ou suscetibilidade a TB pulmonar.

3.2.3. Avaliar se o polimorfismo do gene *TOLLIP* (rs5743899) pode estar relacionado a concentração da citocina IL-1 β em pacientes com TB pulmonar e controles.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. TIPO DE ESTUDO

O estudo foi observacional prospectivo para investigação de polimorfismo de base única (SNPs) no gene de *TOLLIP* em pacientes com tuberculose (TB) e contatos, com foco na TB pulmonar.

4.2. POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA

Para a realização deste estudo foram estudados grupos provenientes da região Norte, de ambos os sexos, com idade entre 18 a 60 anos, os quais foram recrutados na Policlínica Cardoso Fontes.

4.3. INFORMAÇÕES ÉTICAS

Este projeto está vinculado ao projeto maior sob título Polimorfismos de base única (SNP) em genes de inflamassomas associado a tuberculose extrapulmonar, foi avaliado pelo CEP-UFAM e aprovado em, 17 de agosto de 2016, sob N° CAAE 57978916.3.0000.5020. Vale ressaltar, que embora o projeto aprovado pelo CEP tenha como foco a tuberculose extrapulmonar, os pacientes com tuberculose pulmonar e controles também estão contemplados neste projeto.

4.4. GRUPOS ESTUDADOS

4.4.1. GRUPO 1: Pacientes com TB pulmonar

Os pacientes com TB pulmonar que foram incluídos neste estudo, estavam no início do tratamento, com resultados de exame positivo para *Mycobacterium tuberculosis*, por: Pesquisa de BAAR (baciloscopia) positiva ou GeneXpert MTB positivo para *M. tuberculosis* ou cultivo positivo para *M. tuberculosis*.

4.4.2. GRUPO 2: Controle

Este grupo foi constituído por indivíduos saudáveis, sem sintomas respiratórios para TB pulmonar, a maioria teve contato com pacientes com TB pulmonar ou extrapulmonar.

4.5. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com diagnóstico clínico e/ou laboratorial para TB pulmonar e os indivíduos controles, assintomáticos e sem história pregressa para TB pulmonar.

4.6. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Não foram incluídos indivíduos que apresentavam doenças como: câncer, diabetes, Aids, hepatites e doenças autoimunes. Além disso, não foram incluídos os indivíduos HIV positivos, gestantes, transplantados ou que estavam fazendo uso de algum medicamento imunorregulador.

Foram excluídos pacientes que obtiveram resultado de cultivo do escarro para micobactérias não causadoras de TB. Indivíduos do grupo controle que no decorrer do projeto apresentaram sintomas respiratórios e/ou resultados positivos para baciloscopia e cultivos positivos para *M. tuberculosis*.

4.7. RECRUTAMENTO DOS PACIENTES E CONTROLES

O recrutamento dos pacientes e controles foi na Policlínica Cardoso Fontes. As coletas das amostras foram realizadas no setor de coleta da própria Policlínica Cardoso Fontes.

4.7.1. Os pacientes de TB pulmonar que estavam iniciando ou já estavam em tratamento foram recrutados no setor de “Aprazamento 1”, local onde rotineiramente são fornecidas as informações sobre o tratamento e as autorizações para liberação dos medicamentos. O convite para participar do projeto foi realizado pelo funcionário da Policlínica, antes ou depois do atendimento destes pacientes no setor de “Aprazamento 1”.

4.7.2. Os indivíduos saudáveis acompanhantes de outros pacientes da Policlínica foram convidados a participar do projeto, antes ou após os atendimentos daqueles pacientes nos respectivos setores.

4.8. SELEÇÃO DOS PACIENTES E INDIVÍDUOS SADIOS

4.8.1. Seleção de pacientes com TB pulmonar:

Para inclusão dos pacientes no projeto foi realizada uma seleção aleatória simples, no qual todos os pacientes tinham a mesma chance de entrar no projeto. Foi realizado o sorteio do número dos prontuários dos pacientes com TB.

4.8.2. Seleção dos Indivíduos sadios:

Os indivíduos sadios eram os acompanhantes de pacientes atendidos na Policlínica Cardoso Fontes.

4.9. COLETA DE DADOS

A explicação do projeto, a leitura e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a coleta de dados epidemiológicos (entrevista), foi realizada no setor de “Aprazamento 1”. O referido setor é um local reservado e livre de barulho onde o paciente normalmente recebe as orientações sobre tratamento sem interferências externas.

4.10. CÁLCULO AMOSTRAL

Para realizar o cálculo do tamanho da amostra tomou-se como base os dados disponibilizados pela Policlínica Cardoso Fontes. No ano de 2015, a Policlínica diagnosticou o total de 395 casos novos de TB pulmonar. O cálculo aproximado de amostras necessárias para o projeto foi realizado pelo programa Gpower versão 3.1. Os parâmetros utilizados no programa foram: $\alpha = 0,05$ (5%), $\beta = 0,1$ (10%), poder da amostra = 0,95. O resultado estimado pelo programa foi de 195 pacientes com TB pulmonar e o mesmo número para os controles, sendo o total estimado de 390 participantes.

4.11. AMOSTRAS BIOLÓGICAS E EXAMES A SEREM REALIZADOS

As amostras biológicas dos pacientes e indivíduos sadios foram coletadas na sala de coleta da Policlínica Cardoso Fontes. Neste local foram realizados os exames rotineiros, a Baciloscopia direta e/ou GeneXpert MTB. Para os Laboratórios de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e de Imunologia Molecular da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) foram

encaminhados o escarro e o sangue respectivamente, para a realização dos seguintes exames:

4.11.1. Exames Bacteriológicos e de Biologia Molecular

As amostras de escarros coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Micobacteriologia do INPA, estas foram registradas e receberam um código numérico e a data da coleta. Os escarros foram submetidos aos exames de baciloscopia concentrada (SALEM et al., 1990), sendo que a coloração da lâmina foi realizada conforme a técnica de Kinyoun (Kent & Kubica, 1985) e posteriormente visualizada em microscópio óptico de campo claro, em objetiva de imersão, com aumento de 1000X. O cultivo do escarro foi executado pelo método de PKO (SALEM et al., 2007).

Para identificação de *M. tuberculosis* por PCR, a extração de DNA dos isolados micobacterianos foi realizada de acordo com Leão et al. (2004). Uma alçada do cultivo em meio sólido foi transferida para um microtubo contendo 100 µL de água ultrapura, incubado a 95°C por 60', centrifugado a 14.000 x g por 5'. O sedimento foi ressuspenso em solução salina e centrifugado. Foram adicionados 0,2 mL de tampão de TET (Triton X-100 a 1% em TE). A suspensão foi incubada a 100°C por 10 minutos e armazenado a -20°C até sua utilização. Para a PCR, 5 µL do sobrenadante (20-200 ng de DNA) foram utilizados.

A PCR com primers (iniciadores) para a sequência de inserção IS6110 do Complexo *M. tuberculosis*, foi realizada de acordo com Leão et al. (2004). Para cada reação de amplificação de DNA, a concentração final dos reagentes em um volume final de 25 µL foi: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (tampão da Taq DNA Polimerase), 1,5 mM MgCl₂, 100 mM dNTP, 0,2 µM de cada primer INS-1 (5' - CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC - 3') e INS-2 (5' - GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA - 3') e 1 U de Taq DNA Polimerase. Os parâmetros de amplificação foram: 94°C por 4 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, em termociclador Veriti da Applied Biosystems.

Os produtos de PCR (245 pb) foram observados após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), em transiluminador de luz azul (Safe Imager) (Invitrogen).

Os isolados de *M. tuberculosis* das amostras de escarro obtidos no cultivo foram armazenados em biorrepositório em freezer -80°C, mantidos no Laboratório de Micobacteriologia do INPA, sob responsabilidade do pesquisador Mauricio Morishi Ogusku, conforme estabelecido pela Resolução CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011. Para a realização de pesquisas futuras com os isolados de micobactérias das amostras de escarro, será feita submissão do novo projeto ao CEP-CONEP, e também a formulação de um novo TCLE para o consentimento dos participantes da pesquisa, para uso de suas amostras biológicas armazenadas no biorrepositório.

4.11.2. Extração de DNA de sangue periférico e Genotipagem (PCR-RFLP)

As amostras de sangue periférico foram coletadas (5 mL) em tubos contendo EDTA, para os ensaios de PCR-RFLP. Estas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia Molecular (LIM) do Instituto de Ciências Biológicas-ICB/UFAM. Neste local a amostra foi registrada e recebeu um código numérico e a data da coleta. Este número foi etiquetado no tubo de sangue e na sequência submetida à extração de DNA, pelo método de sais de brometo de tetrametilamônio (DTAB/CTAB), adaptado de Gustinich et al., 1991.

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro de luz UV (GeneQuant pro, Pharmacia) e armazenadas em biorrepositório a -20°C, no freezer do LIM/ICB/UFAM, em tubos de polipropileno devidamente codificados e datados.

O estudo de polimorfismo do gene *TOLLIP* foi realizado pela investigação da variante rs5743899 por PCR-RFLP, conforme Araújo et al. (2015). Em resumo, para cada reação de amplificação de DNA (200 ng), a concentração final dos reagentes em um volume final de 25 uL foi: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (tampão da Taq DNA Polimerase), 1,5 mM MgCl₂, 200 uM dNTP, 0,1 uM de cada rs5743899F (5' - GGC AAT GGC AGT GGC CAC CAG TGA - 3') e rs5743899R (5' -CCG ATGCCC GCA CAC CTG TGT GAT - 3') e 1 U de Taq DNA Polimerase. Os parâmetros de amplificação foram: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 62°C por

15 segundos e 72°C por 30 segundos, em termociclador Veriti da Applied Biosystems.

Os produtos da PCR (279 pb) foram observados após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR Safe DNA (Invitrogen), em transiluminador de luz azul (Safe Imager) (Invitrogen).

Posteriormente, o produto da PCR (10 uL) foi digerido em um volume final de 15 uL, contendo 2 U da enzima de restrição *HhaI* (New England Biolabs) e seu respectivo tampão CutSmart. A reação de digestão foi incubada a 37°C em termobloco, por no mínimo 3 horas.

Os fragmentos da restrição foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (3%), corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), em transiluminador de luz azul (Safe Imager) (Invitrogen).

Os DNAs extraídos das amostras de sangue de pacientes e indivíduos sadios foram armazenados no freezer a -20°C e estão sob responsabilidade da professora Aya Sadahiro, no Laboratório de Imunologia Molecular (LIM), do Instituto de Ciências Biológicas-ICB/UFAM, sem fim comercial, no prazo de 10 anos. O armazenamento das amostras biológicas ocorreu com a autorização dos pacientes e indivíduos sadios no ato da entrevista com a assinatura do TCLE consentindo de forma esclarecida, livre e autônoma, a autorização do armazenamento das suas amostras. As amostras biológicas foram armazenadas, conforme estabelecido pela Resolução CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011. Estas amostras poderão ser utilizadas para pesquisas futuras, mas primeiramente será feito a submissão de um novo projeto ao CEP-CONEP, e também a formulação de um novo TCLE para o consentimento dos participantes da pesquisa, para uso de suas amostras biológicas armazenadas no referido biorrepositório.

4.11.3. Quantificação de Interleucina-1 β (IL-1 β)

A quantificação de IL-1 β foi executada em amostras de plasmas, pela técnica de ELISA, com kit comercial ELISA MAXTM Deluxe Sets (BioLegend), de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras de plasmas foram obtidas a partir de

sangues coletados sem estímulos (controle negativo), com estímulos de antígenos de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP 10 e TB.7.7) e mitógeno (controle positivo) do Kit comercial QuantiFERON TB Gold, in tube (Cellestis). A leitura foi realizada em espectrofotômetro para placas de 96 poços (BioRad), foi lida em 450 nm. Os resultados foram liberados em D.O (densidade ótica) e em seguida convertidos em pg/mL.

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados gerais dos pacientes e controles foi realizada a estatística descritiva. Para análise dos resultados das genotipagens foram aplicados o teste do desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg e na sequência o teste de qui-quadrado para avaliação de associação. Estes dois testes foram realizados pelo aplicativo disponível no sítio: <https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>

Para avaliação dos resultados de citocinas foram utilizados o teste de ANOVA (para comparação de 3 grupos) e o teste *t* student (para comparação de 2 grupos), o programa utilizado foi o GraphPad Prism, versão 6.0.

O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$, com o intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No total foram coletadas 547 amostras de sangue, sendo 251 de pacientes diagnosticados para tuberculose (TB) pulmonar e 296 de indivíduos controles. Do total de amostras coletadas, 224 de pacientes e 274 de controles foram genotipadas com sucesso para o polimorfismo de *TOLLIP* (rs5743899), ou seja, aproximadamente 91%. As amostras não genotipadas foi por não ter alcançado sucesso nas etapas de extração ou de amplificação do DNA, provavelmente, pela existência de algum interferente na amostra.

Além disso, 67 amostras de sangue de pacientes (n=30) e controles (n=37) foram estimuladas com antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* e Mitógeno, pelo Kit do Quantiferon TB Gold (in tube method). E no plasma dessas amostras foram dosadas a citocina IL-1 β .

5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO

Os dados das características gerais dos pacientes e controles estão descritos na Tabela 1. Os resultados em relação à idade e sexo são comparáveis aos relatados pela maioria dos estudos epidemiológicos para Tuberculose (TB), demonstrando que a doença é mais frequente nos homens e na fase produtiva de trabalho, tendo um grande impacto social.

Quanto à naturalidade, o maior percentual foi de pacientes e controles oriundos da cidade de Manaus. Este resultado já era o esperado, considerando que o recrutamento foi realizado na Policlínica Cardoso Fontes. Além disso, outro dado relevante publicado recentemente no Boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017), a cidade de Manaus, dentre as capitais brasileiras, apresentou o maior coeficiente de incidência da TB em 2016, com 93,2 casos de TB/100 mil habitantes.

Tabela 1. Características gerais dos pacientes de TB pulmonar e controles (contatos saudáveis).

Característica	Pacientes de TB (n=251)	Controles (n=296)
Idade (anos) (Média e Desvio padrão)	40,0 ± 14	36,0±12
Gênero:		
Masculino	60,2%	57,1%
Feminino	39,8%	42,9%
Naturalidade:		
Manaus	52,2 %	52,4%
Outros municípios do Amazonas	26,7 %	25,0%
Municípios de outros estados	21,1 %	22,6%

5.2 GENOTIPAGEM DE *TOLLIP* (rs 5743899)

As amostras de DNA foram genotipadas por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), conforme descrito em materiais e métodos. Na figura 3 constam algumas amostras, do presente estudo, que foram amplificadas, formando um produto de 279 pares de base.

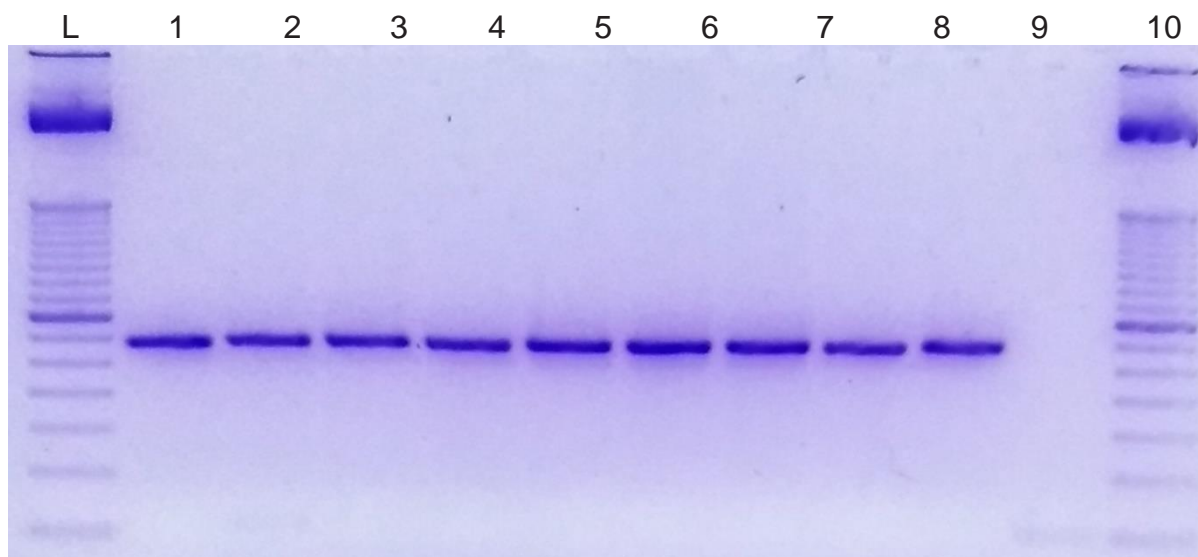


Figura 3: Gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR safe DNA gel stain, Ladder de 50 pb (L), produtos amplificados de 279 pb (1-9) e controle negativo (10).

Na próxima figura 4, estão também amostras amplificadas, que foram submetidas a digestão, pela enzima de restrição *HhaI*, e após este processo, foi realizada a genotipagem de acordo com o perfil eletroforético.

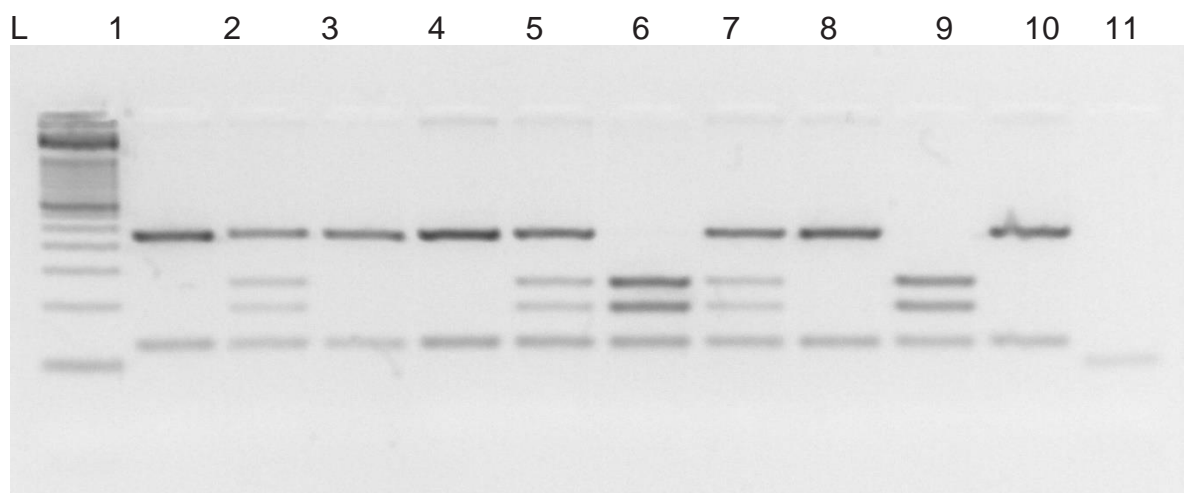


Figura 4: Gel de agarose a 3,0%, após digestão dos produtos amplificados com a enzima *HhaI*, corado com SYBR safe DNA gel stain, Ladder de 50 pb (L) e genótipos: AA de 218pb e 61pb (1,3,4,8,10), GG de 125pb, 93pb e 61pb (6,9), AG 218pb, 125pb, 93pb e 61pb (2,5,7) e controle negativo (11).

A distribuição das frequências genóticas de *TOLLIP* (rs5743899) observadas, nos grupos dos pacientes com TB pulmonar e controles, está apresentada à figura 5.

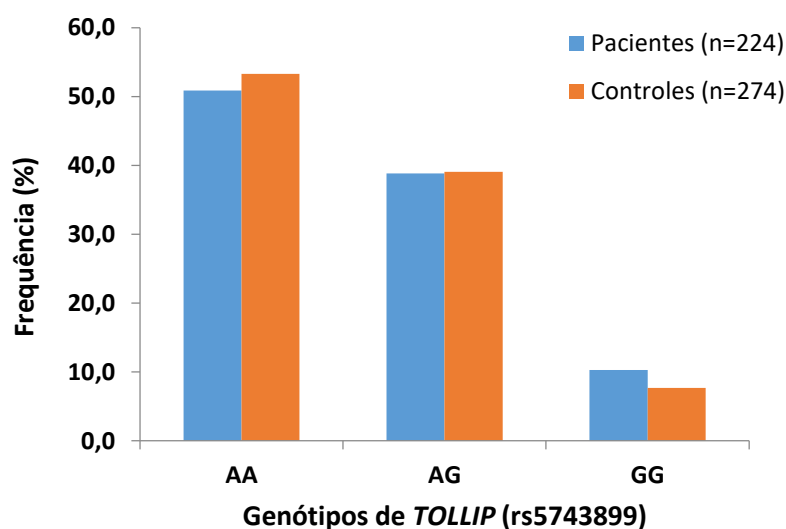


Figura 5: Distribuição da frequência dos genótipos de *TOLLIP* (rs5743899) em pacientes com TB pulmonar (n=224) e controles (n=274).

As frequências dos genótipos de *TOLLIP* (rs5743899) observadas em pacientes: AA 50,9%; AG 38,8 % e GG 10,3% e em controles: AA 53,3%; AG 39,1 % e GG 7,7%, foram comparáveis às frequências observadas nos trabalhos realizados no estado do Amazonas por Araújo et al., (2015) e Brasil et al., (2017), com pacientes e controles para Leishmaniose e Malária, respectivamente. Em relação ao estudo realizado no Vietnam por Shah et al., (2012), envolvendo tanto

pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar, a frequência do genótipo GG (22,0%) foi o dobro do observado no nosso estudo. Além disso, os autores encontraram uma forte associação deste genótipo ao risco para TB.

A frequência do alelo menor (MAF), o alelo G, no nosso estudo foi de 29,7% nos pacientes e 27,2% nos controles (Tabela 2) a para verificar se o polimorfismo de *TOLLIP* está associado ao risco ou proteção para TB pulmonar, não foi identificado nenhum alelo ou genótipo associado para doença, conforme dados contidos na Tabela 2. Este resultado difere do observado por Shah et al. (2012) que encontrou forte associação do genótipo GG para TB.

Tabela 2. Análise de associação do polimorfismo genético de *TOLLIP* em pacientes com TB pulmonar e Controles:

Polimorfismo <i>TOLLIP</i> (rs5743899)	Pacientes n=224(%)	Controles n=274(%)	OR (IC95%)	Valor <i>p</i>
A/A	114 (50,9)	146 (53,2)	0,9086 (0,6380 –1,294)	0,6589
A/G	87 (38,8)	107 (39,1)	0,9911(0,6900 –1,424)	0,9648
G/G	23 (10,3)	21(7,7)	1,3790 (0,7416–2,563)	0,3899
A	315 (70,3)	399 (72,8)	0,8844 (0,6707–1,166)	0,4239
G	133 (29,7)	149 (27,2)	1,1310 (0,8574–1,491)	

O teste aplicado foi o qui-quadrado com correção de Yates, e OR (Odds Ratio) com IC 95% (Intervalo de Confiança).

O genótipo GG de *TOLLIP* hipofuncional tem sido associado a suscetibilidade para TB, reduzindo a regulação negativa e permitindo a livre ativação e sinalização intracelular do TLR (Toll like receptor), e assim contribuindo para o aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (SHAH et al., 2012).

Há uma grande e longa discussão na TB sobre proteção e risco, quando se trata das respostas inflamatórias, tanto em estudos com modelo experimental (SMITH et al., 2002; EHLERS, 2003), quanto estudos em humanos (FIORENZA et al., 2005). Por exemplo, o TNF-alfa dependendo das circunstâncias, que pode estar associado ao duplo papel de proteger e prejudicar o hospedeiro durante a resposta imune ao bacilo da TB (STENGER, 2005; ATES et al., 2007; SMITHA et al., 2011; CILFONE et al., 2013; CARDONA, 2017).

Em atenção aos dados apresentados por Shah et al. (2012), observamos que o genótipo GG de *TOLLIP* (rs5743899) teve frequência de 10% nos pacientes versus 7,7% nos controles, mas após as análises estatística não foi observada a maior chance de risco para TB. Neste caso, o ideal seria ampliar o número amostral, para verificar se estes resultados serão mantidos ou se o genótipo, em questão, está de fato associado a risco para TB. Além disso, outra contribuição importante seria investigar as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , considerando que a proteína Tollip, atua na sinalização dos receptores de TLR.

Por este motivo, a etapa de determinação da citocina IL-1 β só foi incluída no estudo posteriormente ao início deste estudo.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE IL-1 β

As amostras de plasmas, a partir de células sanguíneas submetidas ao teste de Quantiferon TB Gold (method in tube) foram analisadas para IL-1 β . Foram testadas 67 amostras, sendo 30 de pacientes com TB pulmonar e 37 controles. De cada indivíduo foram obtidas 3 (três) amostras de plasmas: a) sem estímulo (controle negativo), b) estimuladas com antígenos de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP 10 e TB.7.7) e c) estimuladas com mitógeno (controle positivo). Os resultados obtidos para IL-1 β em pacientes e controles estão apresentados nas Figuras 6A e 6B.

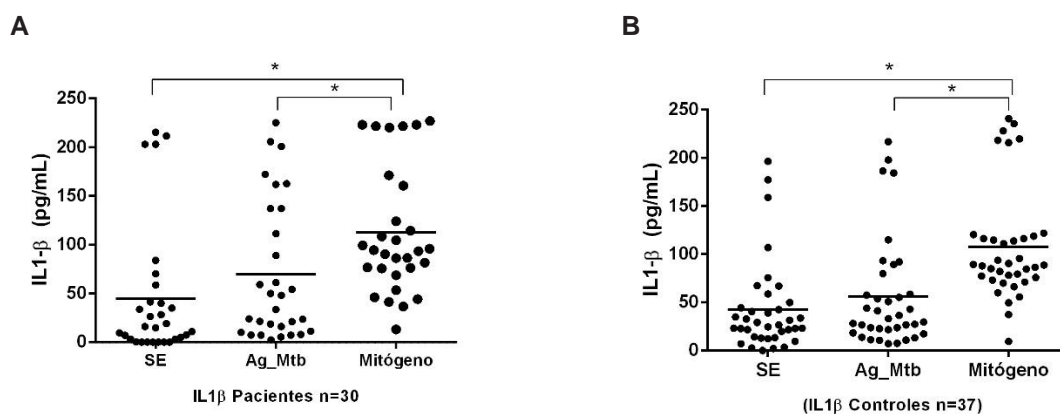


Figura 6: Concentração de IL-1 β (pg/mL) em amostras de plasmas obtidas do sangue de pacientes com TB pulmonar (A) e controles (B). Teste de ANOVA foi aplicado: (A) SE vs Ag_Mtb vs Mitógeno $p=0,0009$ (Tukey: SE \neq Mitógeno; Ag_Mtb \neq Mitógeno); (B) SE vs Ag_Mtb vs Mitógeno $p=0,0001$ (Tukey: SE \neq Mitógeno; Ag_Mtb \neq Mitógeno). SE: sem estímulo; estimulados Ag_Mtb: antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*

Nos resultados para as amostras de pacientes de TB pulmonar (Figura 6A), mesmo “sem estímulos”, indicaram que 4/30 indivíduos apresentaram concentrações elevadas para IL-1 β , acima de 200 pg/mL. No entanto, a maioria dos pacientes, 23/30, apresentaram concentrações de IL-1 β inferiores a 50 pg/mL e, destes, 13/23 indivíduos tiveram resultados inferiores a 10 pg/mL de IL-1 β . Estes resultados sugerem que a maioria dos pacientes com TB, na doença ativa, mantém a produção de IL-1 β , em nível sistêmico, mesmo em concentrações mais baixas, e esta produção, certamente, é controlada pela imunidade inata, para que respostas imunes intensas não ocorram.

O fato é que nos pacientes que apresentaram concentrações elevadas de IL-1 β , é provável que o sistema imune não esteja conseguindo controlar adequadamente a expressão desta citocina, ou é a resposta desejada, para a fase aguda na TB, conforme descrito por Mayer-Barber et al., (2014), que sugere o papel protetor da IL-1 β no estágio inicial da infecção por *M. tuberculosis*, por induzir a produção de eicosanoides, na resposta inflamatória, e assim limitar a ação do bacilo.

Em relação as amostras de pacientes submetidas a estímulos para antígenos de *M. tuberculosis*, esperava-se observar concentrações mais elevadas de IL-1 β , porém a média das concentrações da IL-1 β foi mais elevada (Figura 6A), em relação aos dados “sem estímulo”. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa.

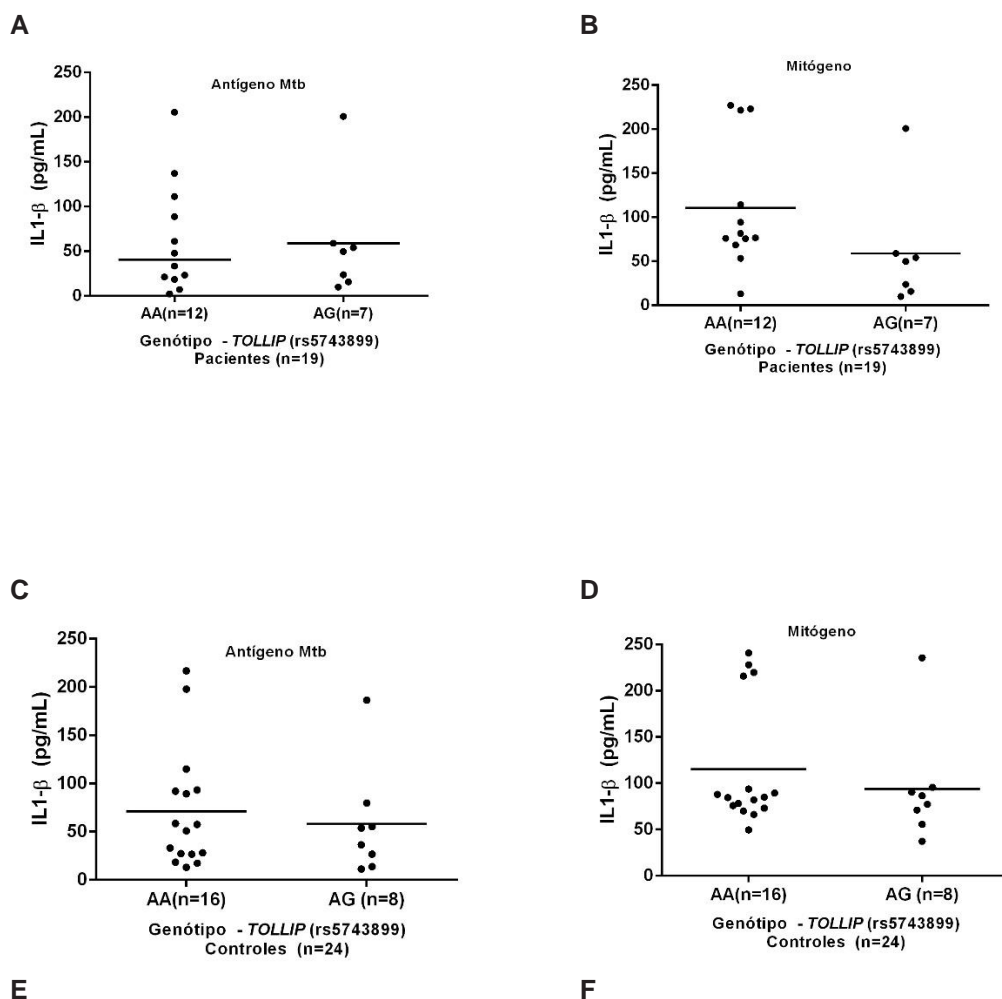
Os resultados obtidos nas amostras estimuladas com mitógeno, houve diferenças significativas nas concentrações de IL-1 β em comparação aos estímulos com antígenos de *M. tuberculosis* e sem estímulos (Figuras 6A e 6B), certamente por ser um estimulador celular inespecífico.

Na análise dos resultados do grupo controle (Figura 6B), as amostras apresentaram concentrações de IL-1 β comparáveis aos resultados observados no grupo dos pacientes (SE, Ag_Mtb e Mitógeno). A presença de IL-1 β , nas amostras “sem estímulo”, pode ser justificada pelo fato do grupo controle ser formado, prioritariamente, pelos contatos dos pacientes de TB e, assim, o sistema imune inato, parece estar continuamente sendo ativado.

Análises entre as concentrações de IL-1 β de pacientes *versus* controles foram testadas, mas não houve diferenças estatisticamente significativas, considerando que os resultados, conforme citado anteriormente, foram comparáveis entre os grupos.

5.4 ANÁLISE DE IL-1 β *versus* GENÓTIPOS de *TOLLIP* (rs5743899)

A avaliação entre as concentrações de IL-1 β e os genótipos de *TOLLIP* (rs5743899), estão representados à figura 7. Para esta análise, só foi possível quantificar a IL-1 β em 19 pacientes com TB pulmonar e 24 controles, pois somente estas amostras tinham resultados combinados para IL-1 β e genótipos.



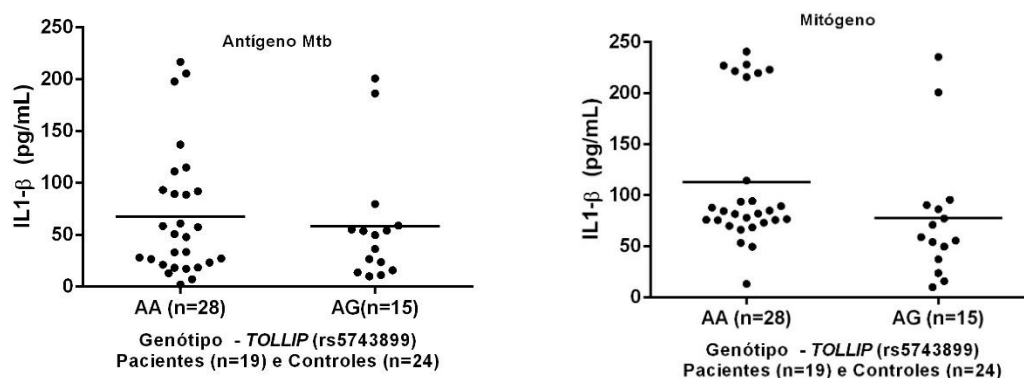


Figura 7: Análise das concentrações de IL-1 β e genótipos de *TOLLIP* (rs 5743899) AA vs AG. Amostras de Pacientes TB estimulados com Antígenos Mtb $p=0,8923$ (A) ou Mitógeno $p=0,1415$ (B); Amostras de Controles estimulados com Antígenos Mtb $p=0,6222$ (C) ou Mitógenos $p=0,4589$ (D); Amostras de Pacientes TB + Controles, estimulados com Antígenos Mtb $p=0,6355$ (E) ou Mitógeno $p=0,1030$ (F). Teste *t* student foi aplicado. Valor significativo de $p=$ ou $< 0,05$.

Porém, não foi possível, neste estudo, incluir os dados dos indivíduos com genótipo GG, considerando que inicialmente não havia sido prevista a coleta de sangue para a quantificação da citocina IL1- β .

Os resultados das análises, de IL-1 β versus genótipos AA e AG de *TOLLIP* (rs5743899), não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, aos diferentes estímulos testados (antígenos de Mtb e Mitógeno). No entanto, observou-se que as concentrações de IL-1 β , nos indivíduos com genótipo AA para os estímulos com o mitógeno foram elevadas (a maioria acima de 50 pg/mL), sugerindo que o genótipo AA pode estar relacionado aos bons produtores de IL-1 β , mas isto necessita ser confirmado (Figura7A).

Para este mesmo SNP em *TOLLIP* (rs5743899), Shah et al., (2012) encontraram forte associação do genótipo GG, para alta produção da citocina inflamatória IL-6, após estímulos com ligantes para TLR, em monócitos de pacientes com TB. Recentemente, este mesmo grupo de pesquisadores publicou dois trabalhos, um com hanseníase, indicando que a expressão da proteína Tollip tem correlação na expressão de IL-1Ra, antagonista, de IL-1 β (Shah et al., 2016). Além disso, demonstrou que a deficiência em Tollip foi associada a baixa resposta imune para BCG e, conseqüentemente, maior suscetibilidade a desenvolver a doença (Shah et al., 2017). Embora, em nosso estudo, não tenha sido observada associação dos genótipos de *TOLLIP* versus citocina IL-1 β , não há dúvidas que o estudo sobre Tollip é relevante na TB e precisa ser melhor investigado.

6. CONCLUSÕES

6.1. As frequências dos genótipos de *TOLLIP* (rs5743899) observadas em pacientes com tuberculose (TB) pulmonar AA 50,9%; AG 38,8 % e GG 10,3% e em controles: AA 53,3%; AG 39,1 % e GG 7,7%, foram comparáveis às frequências observadas nos trabalhos realizados com as populações do estado do Amazonas, para outras doenças infecciosas.

6.2. Não houve associação, para suscetibilidade ou proteção, dos genótipos de *TOLLIP* (rs5743899) para TB pulmonar no grupo avaliado.

6.3. A citocina IL-1 β apresentou concentrações mais elevadas, estatisticamente significativas, nas amostras estimuladas com mitógeno, quando comparada as concentrações em amostras com estímulos de antígenos e sem estímulos, tanto no grupo dos pacientes com TB pulmonar, quanto no grupo dos controles.

6.4. Na avaliação entre os genótipos (AA e AG) de *TOLLIP* (rs 5743899) e IL-1 β , não houve influência dos genótipos na concentração de IL-1 β .

Considerações finais:

É de conhecimento que a proteína Tollip exerce um papel regulador durante a sinalização intracelular de TLR e também de IL1R, assim como está relacionada a maior expressão de IL-1Ra, antagonista de IL-1 β . No entanto, em nosso estudo não foi observada associação significativa dos genótipos de *TOLLIP* (rs5743899) para TB pulmonar, mas o estudo deve ser ampliado e outras regiões gênicas de polimorfismos devem ser investigadas, considerando o papel importante da proteína Tollip na regulação da resposta inflamatória na tuberculose.

7. EQUIPE DO PROJETO

Integrante	Titulação	Vinculação	Função
Andreza Mendes	Mestranda	PPGIBA/UFAM	Executora das atividades do Projeto
Aya Sadahiro	Doutora	PPGIBA/UFAM	Orientadora
Mauricio Morishi Ogusku	Doutor	INPA	Colaborador nos ensaios de diagnóstico microbiológico
Vanessa Alves de Almeida	Mestra	PPGIBA/UFAM	Colaboradora nos ensaios de biologia molecular
Mariana Brasil de Andrade Figueira	Mestranda	PPGIBA/UFAM	Colaboradora nos ensaios de biologia molecular
Dhemerson Souza de Lima	Doutorando	USP	Colaboração nos ensaios de biologia molecular e análises dos dados.
Rajendranath Ramasawmy	Doutor	IMT	Colaborador nas análises dos dados.
George Allan Villarouco da Silva	Doutorando	IMT	Colaborador nos ensaios de genotipagem

8. REFERÊNCIAS

ATES Ö.; MUSELLIM, B.; ONGEN, G.; SARIKAYA, A. T. Interleukin-10 and tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in tuberculosis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 28, n. 3, p. 232–236, 2008.

AGGELOU, K.; SIAPATI, E. K.; GEROGIANNI, I.; DANIIL, Z.; GOURGOULIANIS, K.; NTANOS, I.; SIMANTIRAKIS, E.; ZINTZARAS, E.; MOLLAKI, V.; VASSILOPOULOS, G. The-938C>A Polymorphism in MYD88 Is Associated with Susceptibility to Tuberculosis: A Pilot Study. **Disease Markers**, v. 2016, p. 1–5, 2016.

AKAHOSHI, M.; NAKASHIMA, H.; MIYAKE, K.; INOUE, YASUSHI.; SHIMIZU, S.; TANAKA, Y.; OKADA, K.; OTSUKA, T.; HARADA, M. Influence of interleukin-12 receptor beta1 polymorphisms on tuberculosis. **Human genetics**, v. 112, n. 3, p. 237–43, 2003.

ANKEM, G.; MITRA, S.; SUN, F.; MORENO, A.; CHUTVIRASAKUL, B.; AZURMENDI, H. F.; LI, L.; CAPELLUTO, D. G. S. The C2 domain of Tollip, a Toll-like receptor signalling regulator, exhibits broad preference for phosphoinositides. **The Biochemical journal**, v. 435, n. 3, p. 597–608, 2011.

ANTUNES, J. L. F.; WALDMAN, E. A.; MORAES, M. DE. A tuberculose através do século: ícones canônicos e signos do combate à enfermidade. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 5, n. 2, p. 367–79, 2000.

ARAUJO, F. J.; SILVA, L. D. O.; MESQUITA, T. G.; PINHEIRO S. K.; VITAL W. S.; TALHARI, A. C.; GUERRA J. A. O.; TALHARI S.; RAMASAWMY R. Polymorphisms in the TOLLIP gene influence susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by leishmania guyanensis in the amazonas state of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1–10, 2015.

AZAD, A. K.; SADEE, W.; SCHLESINGER, L. S. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 10, p. 3343–3359, 2012.

BARREIRO, L. B. L.; TAILLEUX, L.; PAIATHMA, A.; GICQUEL, B.; MARIONI J.;

GILAD, Y. Deciphering the genetic architecture of variation in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 4, p. 1204–1209, 2012.

BARRETO, A. M. W.; CAMPOS, C. ; CALDAS, P. ; MARTINS, F. Etiopatogenia e diagnóstico da tuberculose, capítulo III, **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço, 6ª. Edição Fundação Oswaldo Cruz, 2008**. 207p *in* Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Educação a Distância. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensinosserviço**. Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Educação a Distância; coordenado por Maria José Procópio. – Rio de Janeiro: EAD/ENSP, 2008 348 p., il., tab., graf., mapas. ISBN - 978-85-61445-07-2

BHARTI, D.; KUMAR, A.; MAHLA, R. S.; KUMAR, S.; INGLE, H.; SHANKAR, H.; JOSHI, B.; RAUT, A. A.; KUMAR, H. The role of TLR9 polymorphism in susceptibility to pulmonary tuberculosis. **Immunogenetics**, v. 66, n. 12, p. 675–681, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2008.436 p. : il. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) ISBN 978-85-334-1447-1

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, vol. 48, n.8, 2017. ISSN: 2358-9450.

BRISSONI B, AGOSTINI L, KROPF M, MARTINON F, SWOBODA V, LIPPENS S, EVERETT H, AEBI N, JANSSENS S, MEYLAN E, FELBERBAUM-CORTI M, HIRLING H, GRUENBERG J, TSCHOPP J, BURNS K. Intracellular trafficking of interleukin-1 receptor I requires Tollip. *Curr Biol*. 2006, 16(22):2265-70. doi: 10.1016/j.cub.2006.09.062. PMID: 17113392.

BRODIN, P.; DAVIS, M. Human immune system variation. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 1, p. 69–77, 2016.

BUCHMANN, K. Evolution of innate immunity: Clues from invertebrates via fish to mammals. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. SEP, p. 1–8, 2014.

BULUT Y, FAURE E, THOMAS L, EQUILS O, ARDITI M. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. **J Immunol.** 2001, 167(2):987-94. doi: 10.4049/jimmunol.167.2.987.

BURNS, K. CLATWORTHY, J.; MARTIN L.; MARTINON, F.; PLUMPTON, C.; MASCHERA, B.; LEWIS, A.; RAY, K.; TSCHOPP, J.; VOLPE, F. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. **Nature cell biology**, v. 2, n. 6, p. 346–351, 2000.

BUTOV, D. O.; KUZHKO, M. M.; MAKEEVA, N. I.; BUTOVA, T. S.; STEPANENKO, H. L.; DUDNYK A. B. Association of interleukins genes polymorphisms with multi-drug resistant tuberculosis in Ukrainian population. **Pneumonologia i Alergologia Polska**, v. 84, n. 3, p. 168–173, 2016.

CAMPOS, G. N. L.; RAMÍREZ, L. S.; SALAZAR, S. C.; NAKAMURA, A. L. C.; TAPIA, G. A.; OCA, E. P. M. Polymorphism in cathelicidin gene (CAMP) that alters Hypoxia-inducible factor (HIF-1 α : ARNT) binding is not associated with tuberculosis. **International Journal of Immunogenetics**, v. 41, n. 1, p. 54–62, 2014.

CAPELLUTO, D. G. S. Tollip: A multitasking protein in innate immunity and protein trafficking. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 2, p. 140–147, 2012.

DUBOS R & DUBOS E 1952. **A peste branca**. Little Brown and Company, Boston, 277pp.

DHEDA, K.; BARRY, C. E.; MAARTENS, G. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 387, n. 10024, p. 1211–1226, 2016.

CHEN X, ZHOU B, LI M, DENG Q, WU X; LE X *et al.* CD4(+)CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mtb immunity in patients with active disease. **Clin Immunol.** 2007; 123(1):50-9

DIDIERLAURENT, A.; BRISSONI, B.; VELIN, D.; AEBI, N.; TARDIVEL, A.; KA, E.; SIRARD, J, C.; ANGELOV, G.; TSCHOPP, J.; BURNS, K. Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 3, p. 735–42, 2006.

DISORDERS, C. FOR C. D. AND. **Tuberculose uma Breve História**. 1. ed. New York. Orient Blackswan Private Limited, 2013.

DUTAU, G. Petite histoire illustree de la tuberculose The history of tuberculosis. **Archives de pediatrie**, v. 12, p. 88–95, 2005.

FERRI, A. O; AGUIAR, B; WILHELM, C. M; SCHMIDT, D; PICOLI, S. M. Diagnóstico da Tuberculose: uma revisão. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 15, n. 24, p. 105-212, jul./dez. 2014.

FLYNN JL, CHAN J. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Immunol*. 2003, 15(4):450-5. doi: 10.1016/s0952-7915(03)00075-x.

FLYNN JL, CHAN J. What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol*. 2005, 13(3):98-102. doi: 10.1016/j.tim.2005.01.005.

FORRELLAD, M. A. KLEPP, L. I.; GIOFFRÉ, A.; GARCÍA, J. S.; MORBIDONI, H. R.; SANTANGELO, M. P.; CATALDI, A. A.; BIGI, F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.

FONTANA, R. T. As Micobactérias de Crescimento Rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. **REBEn**, v. 61, n. 3, p. 371–376, 2008.

GEREMIA, A.; *BIANCHERI, P.; ALLAN, P.; CORAZZA, G.; SABATINO, A. D.* Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 1, p. 3–10, 2014.

GOPALAKRISHNAN, A.; SALGAME, P. Toll-like receptor 2 in host defense against *Mycobacterium tuberculosis*: To be or not to be - that is the question. **Current Opinion in Immunology**, v. 42, p. 76–82, 2016.

HALL NB, IGO RP JR, MALONE LL, TRUITT B, SCHNELL A, TAO L, OKWARE B, NSEREKO M, CHERVENAK K, LANCIONI C, HAWN TR, MAYANJA-KIZZA H, JOLOBA ML, BOOM WH, STEIN CM; Tuberculosis Research Unit (TBRU).

Polymorphisms in TICAM2 and IL1B are associated with TB. **Genes Immun.** 2015 Mar;16(2):127-133. doi: 10.1038/gene.2014.77.

HAJJAR AM, O'MAHONY DS, OZINSKY A, UNDERHILL DM, ADEREM A, KLEBANOFF SJ, WILSON CB. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. **J Immunol.** 2001;166(1):15-9. doi: 10.4049/jimmunol.166.1.15.

HELDWEIN, K. A.; LIANG, M. D.; ANDRESEN, T. K.; THOMAS, K. E.; MARTY, A. M.; CUESTA, N. S.; VOGEL, N.; FENTON, M. J. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. **Journal of leukocyte biology**, v. 74, n. 2, p. 277–286, 2003.

HUANG, C.; JIANG, D.; FRANCISCO, D.; BERMAN, R.; WU, Q.; LEDFORD, J. G.; MOORE, C. M.; ITO, Y.; STEVENSON, C.; MUNSON, D.; LI, L.; KRAFT, M.; CHU, H. W. Tollip SNP rs5743899 modulates human airway epithelial responses to rhinovirus infection. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 46, n. 12, p. 1549–1563, 2016.

JANEWAY CA JR, MEDZHITOV R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol.** 2002;20:197-216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.

KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. **Acta Odontol Scand.** 2001, 59(3):124-30. doi: 10.1080/000163501750266701.

KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol.** 2010, 11(5):373-84. doi: 10.1038/ni.1863.

KEERS RY. **Pulmonary tuberculosis: a journey down the centuries.** London: Baillere-Tindall, 1978.

KIRAN, D.; PODELL, B. K.; CHAMBERS, M.; BASARABA, R. J. Host-directed therapy targeting the Mycobacterium tuberculosis granuloma: a review. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 2, p. 167–183, 2016.

KRISHNAN, N. MALAGA, W.; CONSTANT, P.; CAWS, M.; CHAU, T. T. H.; SALMONS, J.; LAN, N. T. N.; BANG, N. D.; DAFFE, M., YOUNG, D. B.;

ROBERTSON, B. D.; GUILHOT, C.; THWAITES, G. E. *Mycobacterium tuberculosis* lineage influences innate immune response and virulence and is associated with distinct cell envelope lipid profiles. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

LACIONI, L. L.; LI, Q.; THOMAS, J. J.; DING, D. X.; THIEL, B.; DRAGE, M. G.; PECORA, N. D.; ZIADY, G. A.; SHANK, S.; HARDING, V. C.; BOOM, W. B.; ROJAS, R. E. *Lipoproteínas de Mycobacterium tuberculosis* Regulam Diretamente a Ativação de Células T CD4⁺ da Memória Humana via Receptores Toll-Like 1 e 2. **American Society for Microbiology - Infection and Immunity**, v. 79, n. 02, 2011.

LI T, HU J, LI L. Characterization of Tollip protein upon Lipopolysaccharide challenge. **Mol Immunol**. 2004, 41(1):85-92. doi: 10.1016/j.molimm.2004.03.009. PMID: 15140579.

LUIZ, D. P.; JÚNIOR, C. D. S.; BONETTI, A. M.; BRANDEBURGO, M. A. M. Tollip or not tollip: What are the evolving questions behind it? **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

MACIEL, M. D. S.; MENDES, P. D.; GOMES, A. P.; BATISTA, R. S. A história da tuberculose no Brasil : os muitos tons (de cinza) da miséria. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 3, p. 226–230, 2012.

MATOS, T. P, KRITSKI, A. L, NETO, A. R. Epidemiological aspects of tuberculosis in children and adolescents in Rio de Janeiro. **Jornal de Pediatria**, v. 88, p. 335-340, 2012.

MEDCALF J.Z, PORCO T.C, WESTENHOUSE J, DAMESYN M, FACER M, HILL J, XIA Q, WATT J.P, HOPEWELL C. P, FLOOD J. Tuberculosis and HIV Co-infection, California, USA, 1993 - 2008. **Doenças Infecciosas Emergentes**,19(3),400–406.

MEANS TK, JONES BW, SCHROMM AB, SHURTLEFF BA, SMITH JA, KEANE J, GOLENBOCK DT, VOGEL SN, FENTON MJ. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. **J Immunol**. 2001;166(6):4074-82. doi: 10.4049/jimmunol.166.6.4074.

MEDZHITOV R, JANEWAY C Jr. **Innate immunity**. N Engl J Med. 2000 Aug 3;343(5):338-44. doi: 10.1056/NEJM200008033430506. PMID: 10922424.

MILANO, M.; MORAES, M. O.; RODENBUSCH, R.; CARVALHO, C. X.; DELCROIX, M.; MOUSQUER, G. L. L.; COSTA, L.; UNIS, G.; COSTA, E. R. D.; ROSSETTI, M.

L. R. Single nucleotide polymorphisms in IL17A and IL6 are associated with decreased risk for pulmonary tuberculosis in southern Brazilian population. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–11, 2016.

MORESCO, E. M. Y.; LAVINE, D.; BEUTLER, B. Toll-like receptors. **Current Biology**, v. 21, n. 13, p. R488–R493, 2011.

NETO, M. S, SILVA, F. L, SOUZA, K. R, YAMAMURA, M, POPOLIN, M. P, ARCÊNIO, R. A. Clinical and epidemiological and prevalence of tuberculosis/HIV co-infection in a regional health district in the state of Maranhão, Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, p. 724-732, 2012.

NOVIKOV, A.; CARDONE, M.; THOMPSON, R.; SHENDEROV, K.; KIRSCHMAN, K. D.; MAYER-BARBER, K. D.; MYERS, T. G.; RABIN, R. L.; TRINCHIERI, G.; SHER, A., FENG, C. G. Mycobacterium tuberculosis triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1 β production in human macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 5, p. 2540–7, 2011.

O’GARRA, A.; REDFOR, P. S.; MCNAB, F.; CHLOE, W.; BLOOM, I.; WILKINSON, R. J.; BERRY, M. P.R. **The immune response in tuberculosis**. v. 31, p. 475-527, 2013

O’NEILL, L. A. J.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. **Nature reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 453–60, 2013.

OLIVEIRA, L. C.; RAMASAWMY, R.; BORGES, J. D.; MARIN, M. L. C.; MULLER, N. G.; KALIL, J.; GOLDBERG, A. C. Brasil Frequency of single nucleotide polymorphisms of some immune response genes in a. v. 9, p. 359–366, 2011.

OLIVEIRA G. S.; LIMA, G. R. C. C.; SILVA, J. X. S.; NAVES, J. O.; SILVA, F. C. M. DO, R. M. F. Identificação laboratorial de micobactérias em amostras respiratórias de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). **Journal of Health and Biological Sciences**, v. 4, p. 6, 2016.

PIAO W, SONG C, CHEN H, DIAZ MA, WAHL LM, FITZGERALD KA, LI L, MEDVEDEV AE. Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-

containing adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling. **J Leukoc Biol.** 2009, 86(4):863-75. doi: 10.1189/jlb.0309189.

QUESNIAUX, V.; FREMOND, C.; JACOBS, M.; PARIDA, S.; NICOLLE, D.; YEREMEEV, V.; BIHL, F.; ERARD, F.; BOTHA, T.; DRENNAN, M.; SOLER, M. N.; BERT, M. L.; SCHNYDER, B.; RYFFEL, B. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 10, p. 946–959, 2004.

REED MB, DOMENECH P, MANCA C, SU H, BARCZAK AK, KREISWIRTH BN, KAPLAN G, BARRY CE 3rd. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. **Nature.** 2004, 431(7004):84-7. doi: 10.1038/nature02837.

ROCHA, A. L. C.; BARRETO, A. M. W.; SANT'ANA, C. C.; CAMPOS, C. E. D.; BRANCO, C. A. C.; CAPONE, D.; BETHLEM E. P.; MARTINS, F. M. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

SAIGA HIROYOUKI, SHIMADA YOSUKE, T. K. Innate immune effectors in mycobacterial infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, 2011.

SANTOS, D. P.; DIANA, V. S.; SILVANA, R. K. E. S. A. Resistência aos fármacos de primeira escolha utilizados no tratamento da tuberculose pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista de Saúde**, v. 3, p. 13–25, 2012.

SATOH T, AKIRA S. Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. **Microbiol Spectr.** 2016, 4(6). doi: 10.1128/microbiolspec.

SAUKKONEN, J. J.; BAZYDLO, B.; THOMAS, M.; STRIETER, R. M.; KEANE, J.; KORNFELD, H. Beta-chemokines are induced by *Mycobacterium tuberculosis* and inhibit its growth. **Infection and immunity**, v. 70, n. 4, p. 1684–93, 2002.

SCHURZ H, DAYA M, MÖLLER M, HOAL EG, SALIE M. TLR1, 2, 4, 6 and 9 Variants Associated with Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One.** 2015 Oct 2;10(10):e0139711. doi:

10.1371/journal.pone.0139711. PMID: 26430737; PMCID: PMC4592262.

SESHADRI, C.; THUONG, N. T. T.; YEN, N. T. B.; BANG, N. D.; CHAU, T. T. H.; THWAITES, G. E.; DUNSTAN, S. J.; HAWN, T. R.; A Polymorphism in Human CD1A is Associated with Susceptibility to Tuberculosis. **HHS.gov U.S. Department of Health & Human Services Human Services**, v. 15, n. 3, p. 195–198, 2014.

SREEJIT. G; AHMED, A; PARVEEN, N; JHA, V; VALLURI, V. L; GHOSH, S; MUKHOPADHYAY, S. A proteína ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* interage com beta-2-microglobulina (β 2M) afetando a função de apresentação do antígeno do macrófago. **Ploes Pathogens** - The Microbiome, 2014.

SHAH JA, VARY JC, CHAU TT, BANG ND, YEN NT, FARRAR JJ, DUNSTAN SJ, HAWN TR. Human TOLLIP regulates TLR2 and TLR4 signaling and its polymorphisms are associated with susceptibility to tuberculosis. **J Immunol**. 2012, 189(4):1737-46. doi: 10.4049/jimmunol.1103541.

SHAH, J. A. et al. Genetic variation in toll-interacting protein is associated with leprosy susceptibility and cutaneous expression of interleukin 1 receptor antagonist. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 7, p. 1189–1197, 2016.

SHALER, C. R.; VARY, J. C.; CHAU, T. T. H.; BANG, N. D.; YEN, N. T. B.; FARRAR, J. J.; DUNSTAN, S. J.; HAWN, T. R. Understanding delayed T-cell priming, lung recruitment, and airway luminal T-cell responses in host defense against pulmonary tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

SHEPPARD, D. DE S. A literatura médica brasileira sobre a peste branca: 1870-1940. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 8, n. 1, p. 173–192, 2001.

SIMON, A. K.; HOLLANDER, G. A.; MCMICHAEL, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. **Proc Biol Sci**, v. 282, n. 1821, p. pii: 20143085, 2015.

SINSIMER D, HUET G, MANCA C, TSENOVA L, KOO MS, KUREPINA N, KANA B, MATHEMA B, MARRAS SA, KREISWIRTH BN, GUILHOT C, KAPLAN G. The phenolic glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis* differentially modulates the early host cytokine response but does not in itself confer hypervirulence. **Infect Immun**.

2008, 76(7):3027-36. doi: 10.1128/IAI.01663-07.

SIVEKE, T. S; HAMANN, A. Vantagens: as células T Helper 1 e T Helper 2 respondem de forma diferenciada às quimiocinas. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 550-554, 1998.

SIQUEIRA, H. R. DE. Enfoque Clínico da Tuberculose Pulmonar. **Pulmão RJ**, v. 21, n. 1, p. 15–18, 2012.

SUDMANT, P. H. et al,. An integrated map of structural variation in 2 , 504 human genomes. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 75–81, 2015.

WELIN, A; WINBERG, M. E; ABDALA, H; SÄRNDAH, E; RASMUSSEN, B; STENDAHL, O; LERM, M. Incorporação de Mycobacterium tuberculosis Lipoarabinomanan em jangadas de membrana de macrófagos é um pré-requisito para o bloco de maturação fagossômica. **American Society for Microbiology Infection and Immunity**, v. 76, p. 2882-2887, 2008.

WILKINSON, R. J.; LLEWELYN, M.; TOOSI, Z.; PATEL, P.; PASVOL, G.; LALVANI, A.; WRIGHT, D.; LATIF, M.; DAVIDSON, R. N. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. **Lancet**, v. 355, n. 9204, p. 618–21, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report**. Genebra: World Health Organization; **2016**.

ZAK DE, ADEREM A. Systems integration of innate and adaptive immunity. **Vaccine**. 2015, 33(40):5241-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.05.098.

ZHANG G, GHOSH S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. **J Biol Chem**. 2002 Mar 1;277(9):7059-65. doi: 10.1074/jbc.M109537200.

ZHAO, L.; LIU, K.; KONG, X.; TAO, Z.; WANG, Y.; LIU, Y. Association of polymorphisms in toll-like receptors 4 and 9 with risk of pulmonary Tuberculosis: A meta-analysis. **Medical Science Monitor**, v. 21, p. 1097–1106, 2015.

ZHU, L.; WANG, L.; LUO, X.; ZHANG, Y.; DING, Q.; JIANG, X.; WANG, X.; PAN, Y.; CHEN, Y. Tollip, an intracellular trafficking protein, is a novel modulator of the transforming growth factor-beta signaling pathway. **Journal of Biological**

Chemistry, v. 287, n. 47, p. 39653–39663, 2012.

VIEIRA, O. E. D, GOMES, M. Efeitos adversos no tratamento da tuberculose: experiência em serviço ambulatorial de um hospital-escola na cidade de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Imunologia**, v.34, p. 1049-1055, 2008.

APÊNDICE



APENDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
Laboratório de Imunologia Molecular
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos a senhora para participar da Pesquisa Intitulada: **“Polimorfismo de base única (SNP) em genes do inflamassoma associado Tuberculose extrapulmonar”**. Neste projeto de pesquisa, iremos estudar se existem mudanças no material genético-DNA que possam estar relacionados com a forma clínica da tuberculose. Esta pesquisa contribuirá para aumentar o conhecimento sobre como a resposta imunológica à bactéria que causa a Tuberculose, está relacionada com as formas clínicas desta doença. Para este estudo, primeiramente você responderá um questionário. Depois, você irá coletar um pouco do seu escarro, não causará dor. Para a amostra de escarro iremos realizar os seguintes exames: A baciloscopia e o cultivo. Depois da coleta da amostra de escarro, será coletada uma pequena quantidade de sangue (5 mL). No momento da coleta de sangue, você poderá sentir um pouco de dor e posteriormente possa aparecer uma pequena mancha roxa transitória, que irá desaparecer em 3 a 4 dias depois da coleta. Mas não irá prejudicar a sua saúde, pois, a coleta de sangue será realizada por um profissional treinado e ainda para reduzir o risco de contaminação o material utilizado como a seringa, agulha entre outros, serão limpos e descartáveis, não apresentando qualquer risco de contaminação. Qualquer transtorno você poderá contactar os pesquisadores para possível avaliação, e daremos todo atendimento necessário para reverter o dano ou evento adverso, decorrente da participação nesta pesquisa. Neste estudo, você não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhum benefício financeiro. Os resultados dos exames serão informados diretamente para você. E a qualquer momento da pesquisa você terá o direito e a liberdade de retirar seu consentimento, sem dano algum ao seu atendimento. Os resultados da pesquisa serão analisados e divulgados nos meios científicos, sem nenhuma informação que possa identificar a identidade dos participantes. A amostra coletada será armazenada de acordo com as normas vigentes do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP do Ministério da Saúde. 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 para uso dessas amostras. Para qualquer detalhe sobre esta pesquisa, basta entrar em contato pelo número (92) 991923539 ou e-mail: vanessa_almeida1212@hotmail.com.


Você aceita que o seu material biológico seja utilizado em estudos futuros?

Sim Não

Você quer ser contactado novamente para o re consentimento do uso do seu material biológico em estudos futuros? Sim Não

Você quer ser informado dos resultados dos estudos futuros? Sim Não

Eu, _____, entendi a explicação dada pelo pesquisador e dou meu consentimento para realizarem os exames para o 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 pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

/...../.....
 Assinatura do paciente ou  Data

Impressão do polegar

 Assinatura do pesquisador /...../.....
 Data

Normas para utilização de Biorrepositório

1. Procedimento para armazenamento e uso do material biológico

- a. Declaramos para os fins nesta estabelecidos que após a coleta das amostras sanguíneas, o material biológico será identificado com etiquetas adesivas contendo numeração (por ordem de registro) e data da coleta, o armazenado será realizado a -20°C e -80°C e as quantidades serão registradas.
- b. Em caso de perda ou falta de volume insuficiente de amostra para análise o material será descartado conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa.
- c. Será assegurado a todos os participantes da pesquisa, doadores do material, a garantia de que resultados obtidos e que sejam de seu interesse lhes seja comunicada. Para tanto, informações sobre endereço para contato e telefone serão armazenadas em um programa de computador protegido por senha.

2. Funcionamento do biorrepositório

- a. O participante da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta.
- b. A retirada do consentimento deverá ser formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo participante da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes.
- c. O prazo de armazenamento do material biológico humano no Biorrepositório será de dez anos.
- d. Renovações da autorização de armazenamento serão permitidas após autorização do CEP da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).
- e. Ao final do período de realização da pesquisa, o material biológico humano armazenado deverá ser armazenado ou transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, mediante aprovação do CEP.

APÊNDICE II - FICHA DE CADASTRO DE PACIENTES

FICHA DE CADASTRO DE PACIENTES		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: Forma clínica da TB: _____		
BCG: <input type="checkbox"/> Não	PPD: <input type="checkbox"/> Não	Exames de imagens <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Tipo: _____
<input type="checkbox"/> Sim Data: ___/___/___	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não reator	Resultado: _____
<input type="checkbox"/> Não sabe informar	<input type="checkbox"/> Reator _____ mm	_____
Antecedente de Tuberculose:		
Pessoal: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	Quando pela 1ª vez: _____	
Familiar: <input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Tios <input type="checkbox"/> Sogros <input type="checkbox"/> Colega de trabalho <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Primos <input type="checkbox"/> Cônjuge <input type="checkbox"/> Agregados		
<input type="checkbox"/> Irmãos <input type="checkbox"/> Filho(s) <input type="checkbox"/> Namorado <input type="checkbox"/> Outros <input type="checkbox"/> Avós <input type="checkbox"/> Cunhado <input type="checkbox"/> Vizinho <input type="checkbox"/> Não sabe informar		
Resultados anteriores de BAAR <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Onde? _____		
Resultado: 1) ___ 2) ___		
Outros exames: _____		
Apresenta ou apresentou outras doenças?		
<input type="checkbox"/> Tabagismo, quantos cigarros por semana: _____ <input type="checkbox"/> Outra(s) Qual (is)? _____		
Consome bebidas alcólicas <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"/> Tosse <input type="checkbox"/> Expectoração <input type="checkbox"/> Hemoptise <input type="checkbox"/> Dispnéia <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. Quais? _____		
O paciente:		
<input type="checkbox"/> Não recebeu nenhum tratamento antes da coleta da amostra clínica atual		
<input type="checkbox"/> Está recebendo tratamento desde: _____ Medicação: _____		
Outras informações: _____		

APÊNDICE III - 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: ___/___/___	Exames de imagens <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Tipo: _____
<input type="checkbox"/> Não sabe informar	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não reator Resultado: _____
<input type="checkbox"/> Reator _____ mm	_____
Tuberculose na família: <input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Tios <input type="checkbox"/> Sogros <input type="checkbox"/> Colega de trabalho <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Primos <input type="checkbox"/> Cônjuge <input type="checkbox"/>	
Agregados <input type="checkbox"/> Irmãos <input type="checkbox"/> Filho(s) <input type="checkbox"/> Namorado <input type="checkbox"/> Avós <input type="checkbox"/> Cunhado <input type="checkbox"/> Vizinho <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: _____	

Apresenta ou apresentou outras doenças?	
<input type="checkbox"/> Tabagismo, quantos cigarros por semana: _____ <input type="checkbox"/> Outra(s) Qual (is)? _____	
Consome bebidas alcólicas <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"/> Dispnéia <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: _____	

ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PODER EXECUTIVO
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEPIUFAM

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº 51291915.1.0000.5020, intitulado: “Polimorfismo de base única (SNP) em genes do inflamassoma associado a Tuberculose Extrapulmonar”, tendo como Pesquisadora Responsável Aya Sadahiro.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 17 de agosto de 2016.

Eliana Maria Pereira da Fonseca
 Profª. MSc. Eliana Maria Pereira da Fonseca
 Coordenadora CEP/UFAM

UFAM
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
 Profª. Eliana Maria Pereira da Fonseca
 Coordenadora CEP/UFAM