



Universidade Federal do Amazonas - UFAM
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada - PPGIBA
Instituto de Ciências Biológicas – ICB

ALLINY ALMEIDA QUEIROZ

Alelos de *HLA-ABDR* genérico e variantes do gene *TNFA* em indivíduos com tuberculose

MANAUS - AM
2025

ALLINY ALMEIDA QUEIROZ

Alelos de *HLA-ABDR* genérico e variantes do gene *TNFA* em indivíduos com tuberculose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade do Amazonas como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Linha de pesquisa: Genômica, imunogenética e epidemiologia de doenças infecciosas e inflamatórias

Orientador(a): Profa. Dra. Aya Sadahiro

Coorientador(a): Prof. Dr. Mauricio Morishi Ogusku

Dra. Mariana Brasil de Andrade Figueira

MANAUS - AM
2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Q3a

Queiroz, Alliny Almeida

Alelos de HLA-ABDR genérico e variantes do gene TNFA em indivíduos com tuberculose / Alliny Almeida Queiroz. - 2025.
83 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Aya Sadahiro.

Coorientador(a): Maurício Morishi Ogusku.

Coorientador(a): Mariana Brasil de Andrade Figueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Manaus, 2025.

1. Tuberculose. 2. HLA. 3. SNVs. 4. TNFA. 5. Imunogenética. I. Sadahiro, Aya. II. Ogusku, Maurício Morishi. III. Mariana Brasil de Andrade Figueira. IV. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. V. Título

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Valdenilson Queiroz** e **Joelma Almeida**, que sempre incentivaram meus estudos e acreditaram que eu poderia ser e fazer tudo o que sonhasse.

À minha orientadora, **Aya Sadahiro**, por ser nossa mãe-científica no LIM, sempre cuidar dos seus alunos e ensiná-los com compreensão e empatia, mas, principalmente, por ser a professora e pessoa mais inspiradora que conheci em minha vida! Amo a senhora, de coração!

Aos meus incríveis coorientadores, **Maurício Ogusku** e **Mariana Brasil**, por toda a ajuda e ensinamentos ao longo desse tempo.

Aos meus irmãos do LIM, **Marcos Henrique**, **Gilberto Bazé**, **Renata Gualberto** e **Laianne Lopes** (e a Mariana novamente!). Por tornarem essa caminhada mais leve e divertida. Crescemos, aprendemos e enlouquecemos um pouco juntos.

Ao **Filipe Mendes**, por sempre me apoiar, entender e ouvir minhas maluquices. Por manter meus pés no chão e minha mente com vontade de aprender mais.

Ao meu gato! Que tentou escrever essa dissertação tanto quanto eu, sempre fazendo questão de passear no teclado para contribuir com a escrita (do jeito dele, eu imagino).

O SNV do meu coração sempre vai dar associação para um IMENSO carinho por vocês!

Por fim, agradeço ao apoio da FAPEAM, CAPES, INPA, LIM e UFAM, bem como a todos os participantes desse estudo e a equipe de saúde da Policlínica Cardoso Fontes, que auxiliaram na coleta de amostras, sem as quais esse projeto como tantos outros não seriam possíveis.

*“Eu continuo acreditando, mas não sei por que
Eu nunca fui boa, tudo o que faço é tentar, tentar, tentar ”*

– Taylor Swift, Mirrorball (tradução livre).

RESUMO

A tuberculose (Tb) é uma doença infecciosa, causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo a espécie que mais acomete o homem *M. tuberculosis*. O estado do Amazonas tem um dos maiores coeficientes de incidência da Tb do Brasil, com 81,6 casos de Tb/100 mil habitantes. Na capital Manaus, os números são ainda mais preocupantes por apresentar a incidência de 113,2 novos casos de Tb/100 mil habitantes. A Tb é uma doença associada a fatores como a condição socioeconômica, nutricional, ambiental e perfil genético do hospedeiro, bem como virulência do bacilo. As características genéticas dos indivíduos com Tb têm sido frequentemente exploradas, tais como os genes de HLA (Antígeno Leucocitário Humano) e SNVs (Variantes de Nucleotídeo Único) que regulam as respostas imunológicas em diversas doenças. O presente estudo teve como objetivo avaliar a frequência dos alelos de HLA genérico (A, B e DR) e de SNVs do gene *TNFA*, rs1799964 e rs1800610. A tipagem do HLA foi realizada por PCR-SSP (sequence specific primer) em 148 amostras, sendo 51 indivíduos com Tb pulmonar, 10 com Tb extrapulmonar e 87 controles. Após análise, o *HLA-A*29* foi associado a suscetibilidade a Tb ($p=0,0005$; OR= 4,31; IC95%= 1,869 – 9,504), ao passo que os *HLA-A*31* ($p=0,0002$; OR= 0,06; IC95%= 0,0057 – 0,3384), *HLA-A*68* ($p=0,0175$; OR= 0,122; IC95%= 0,0112 – 0,6990) e *HLA-DRB1*14* ($p=0,027$; OR= 0,248; IC95%= 0,0756 – 0,8162) foram associados a proteção a Tb. A genotipagem do SNV *TNFA* foi realizada por qPCR em 913 amostras, sendo 355 indivíduos com Tb pulmonar, 86 indivíduos com Tb extrapulmonar e 472 controles. Para o gene de *TNFA*, somente o rs1800610 apresentou associação à Tb nos seguintes modelos genéticos: dominante ($p=0,035$; OR= 1,37; IC95%= 1,02–1,83), overdominante ($p=0,028$; OR= 1,40; IC95%= 1,04–1,90) e log-Additive ($p=0,056$; OR= 1,27; IC95%= 0,99–1,64). Os nossos resultados sugerem que as moléculas de HLA podem estar associadas a Tb, influenciando na resposta aos linfócitos T, mas como o sistema HLA é hiperpolimórfico, estes resultados devem ser avaliados com cautela. O gene de *TNFA*, rs1800610, foi associado a suscetibilidade a Tb, o que nos estimula a investigar as regiões gênicas da via de sinalização e produção de TNF- α , bem como as citocinas envolvidas durante a infecção por *M. tuberculosis*.

Palavras-chave: Tuberculose, HLA, SNVs, rs1799964, rs1800610, *TNFA*, Imunogenética.

ABSTRACT

Tuberculosis (Tb) is an infectious disease caused by mycobacteria of the complex *Mycobacterium tuberculosis*, being the species that most affects the man *M. tuberculosis*. The state of Amazonas has one of the highest incidence coefficients of Tb in Brazil, with 81,6 cases of Tb/100.000 inhabitants. In the capital Manaus, the figures are even more worrying because they present the incidence of 113,2 new cases of Tb/100.000 inhabitants. Tb is a disease associated with factors such as socioeconomic, nutritional, environmental and genetic profile of the host, as well as virulence of the bacillus. The genetic characteristics of individuals with Tb have often been explored, such as the HLA (Human Leukocyte Antigen) and SNVs (Single Nucleotide Variants) genes that regulate immune responses in several diseases. The present study aimed to evaluate the frequency of generic HLA alleles (A, B and DR) and SNVs of the *TNFA* gene, rs1799964 and rs1800610. HLA typing was performed by PCR-SSP (sequence specific primer) in 148 samples, 51 individuals with pulmonary Tb, 10 with extrapulmonary Tb and 87 controls. After the analysis, the *HLA-A*29* was associated with Tb susceptibility ($p=0,0005$; OR= 4,31; IC95%= 1,869 – 9,504), while *HLA-A*31* ($p=0,0002$; OR= 0,06; IC95%= 0,0057 – 0,3384), *HLA-A*68* ($p=0,0175$; OR= 0,122; IC95%= 0,0112 – 0,6990) e *HLA-DRB1*14* ($p=0,027$; OR= 0.248; IC95% = 0.0756 - 0.8162) were associated with Tb protection. Genotyping of SNV *TNFA* was performed by qPCR in 913 samples, being 355 individuals with pulmonary Tb, 86 individuals with extrapulmonary Tb and 472 controls. For the *TNFA* gene, only rs1800610 showed association with Tb in the following genetic models: dominant ($p=0.035$; OR= 1.37; IC95% = 1.02-1.83), overdominant ($p=0.028$; OR= 1.40; IC95% = 1.04-1.90) and log-Additive ($p=0.056$; OR= 1.27; IC95% = 0.99-1.64). Our results suggest that HLA molecules may be associated with Tb, influencing the response to T lymphocytes, but as the HLA system is hyperpolymorphic, these results should be evaluated with caution. The *TNFA* gene, rs1800610, was associated with Tb susceptibility, which stimulates us to investigate the gene regions of the TNF- α signaling and production pathway, as well as the cytokines involved during infection by *M. tuberculosis*.

Keywords: Tuberculosis, HLA, SNVs, rs1799964, rs1800610, *TNFA*, Immunogenetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. a. Esquema transversal demonstrando diferentes camadas do bacilo de <i>M. tuberculosis</i> em divisão.	18
Figura 2. Modelo de formação de granuloma em zebrafish com infecção por <i>Mycobacterium marinum</i> , que causa a formação granulomatosa semelhante à <i>M.tuberculosis</i>	24
Figura 3. Citocinas e mediadores envolvidos na resposta Anti- <i>M.tuberculosis</i> e na resposta Pro- <i>M.tuberculosis</i>	25
Figura 4. Organização dos genes de HLA ao longo do cromossomo 6. Telômero; braço curto; braço longo; centrômero.....	29
Figura 5. Estrutura das moléculas de HLA classe I e II.	30
Figura 6. Fluxograma de atividades do projeto.	37
Figura 7. A. Produtos da PCR em gel de agarose a 2,5%, coradas com SYBR GREEN® visualizadas em transluminador de luz azul. B. Produtos da PCR da mesma amostra de DNA humano, registro em preto e branco.	41
Figura 8. Curva de amplificação gerada para c entre de indivíduos com Tb e controles dos SNVs de <i>TNFA</i> selecionados.....	43
Figura 9. Distribuição dos tipos de alelos <i>HLA-A</i> e frequências (%) de indivíduos com Tb e controles.	50
Figura 10. Distribuição dos alelos de <i>HLA-B</i> e frequência (%) entre de indivíduos com Tb e controles.	52
Figura 11. Distribuição dos alelos de <i>HLA-DRB</i> e frequência (%) entre de indivíduos com Tb e controles.....	55
Figura 12. Desequilíbrio de ligação da população de pacientes com Tb e controles avaliados para as duas variantes do gene <i>TNFA</i>	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Especificações da PCR para HLA.....	40
Quadro 2. Reagentes da qPCR para genotipagem.	42
Quadro 3. Dados das sondas para <i>TNFA</i>	42
Quadro 4. Parâmetros de termociclagem para qPCR.....	43
Quadro 5. Formas clínicas de TbE recrutados para o estudo.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição de características avaliadas na população de indivíduos com Tb e grupo controle.	48
Tabela 2. Frequência dos alelos de <i>HLA-A</i> encontrados em indivíduos com Tb (n=61) e controles (n=87) e resultado da análise de dados.	51
Tabela 3. Frequência dos alelos de <i>HLA-B</i> encontrados em indivíduos com Tb (n=61) e controles (n=87) e resultado da análise de dados.	53
Tabela 4. Frequência dos alelos de <i>HLA-DRB</i> encontrados em indivíduos com Tb (n=61) e controles (n=87) e resultado da análise de dados.	56
Tabela 5. Frequências genotípicas e alélicas e resultados da análise de associação dos SNVs de <i>TNFA</i> selecionados no melhor modelo genético e após os ajustes com as variáveis sexo e idade.	58
Tabela 6. Comparação entre as frequências dos alelos dos rs1799964 e rs1800610 de <i>TNFA</i> da população controle em relação às outras populações globais.....	59
Tabela 7. Análise do SNV rs1799964 de <i>TNFA</i> entre indivíduos com Tb vs. Controles nos modelos genéticos.	60
Tabela 8. Análise do SNV rs1799964 de <i>TNFA</i> entre indivíduos com Tb vs. Controles, após os ajustes por sexo e idade nos modelos genéticos.	61
Tabela 9. Análise do SNV rs1800610 de <i>TNFA</i> entre indivíduos com Tb vs. Controles nos modelos genéticos.	62
Tabela 10. Análise do SNV rs1800610 de <i>TNFA</i> entre indivíduos com Tb vs Controles, após os ajustes por sexo e idade nos modelos genéticos.	63
Tabela 11. Resultados da análise de haplótipos no grupo de Tb vs Controles nos SNVs de <i>TNFA</i> (rs1799964-rs1800610).....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Aids – *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Humana)
- APC – *Antigen Presenting Cells* (Células apresentadoras de antígenos)
- BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente
- BALT – *Bronchus-associated lymphoid tissue* (Tecido linfoide associado aos brônquios)
- BCG – Bacille Calmette-Guérin
- CFP-10 – *10kDa Culture Filtrate Protein* (Proteína filtrada de cultura 10)
- CLR – *C like lectin receptor* (Receptor de lectina tipo C)
- CMTB – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
- Covid-19 – *Coronavirus disease 19* (Doença do coronavírus 19)
- CTAB – *Cetyl trimethyl ammonium bromide* (Brometo de cetiltrimetil amônio)
- DC – *Dendritic cell* (Célula dendrítica)
- DL – *Linkage disequilibrium* (Desequilíbrio de ligação)
- DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- DTAB – *Dodecyltrimethylammonium bromide* (Brometo de doceciltrimetilamônio)
- dNTPs – *Deoxyribonucleotide triphosphate* (Desoxirribonucleicos trifosfatados)
- EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
- ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático)
- ELISPOT – *Enzyme-linked immunosorbent spot* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
- ESAT-6 – *6kDa early secreted antigen target* (Antígeno secretado precocemente 6)
- FVS - AM – Fundação de Vigilância e Saúde do Amazonas
- GWAS – *Genome-Wide Association Studies* (Estudos de associação genômica ampla)
- HLA – *Human Leukocyte Antigen* (Antígeno leucocitário humano)
- HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- ICB – Instituto de Ciência Biológicas
- IFN – Interferon
- IFN- γ – Interferon Gamma
- IGRA – *Interferon Gamma Release Assay* (Ensaio de liberação interferon-Gamma)
- ILTb – Infecção latente da tuberculose
- IL-1 – Interleucina 1
- IL-2 – Interleucina 2
- IL-4 – Interleucina 4
- IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-17 – Interleucina 17

IL-17 – Interleucina 21

IL-17 – Interleucina 22

IL-23 – Interleucina 23

INPA – Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas

IRIS – *Immune reconstitution inflammatory syndrome* (Síndrome inflamatória de reconstituição imune)

KIR – *Killer cell immunoglobulin-like receptor* (receptores semelhantes à imunoglobulina de células Natural killer)

LAMs – Lipoarabinomananas

LIM – Laboratório de Imunologia Molecular

LIMs – Lipomananas

LPMN – Leucócitos polimorfonucleares

LTA – gene que expressa linfotóxina α

LTB – gene que expressa linfotóxina β

MAF – Frequência do alelo menor

MALT – *Mucosa-associated lymphoid tissue* (Tecido linfóide associado a mucosa)

MHC – *Major histocompatibility complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)

mL – Mililitro

MNT – Micobactérias não causadoras de tuberculose

MyD88 – gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88

$\text{NF}\kappa\text{-}\beta$ – *Nuclear factor kappa B*

NLR – Receptor tipo NOD

NK – *Natural killer*

PAMP – Padrões moleculares associados ao patógeno

PBMCs – *Peripheral blood mononuclear cells* (Células mononucleares do sangue periférico)

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PD-1 – Proteína de morte celular programada 1

PKO – Petroff, Kudoh e Ogawa

PPD – *Purified Protein Derivative* (Derivado proteico purificado)

PRR – Receptor de Reconhecimento Padrão

QFT-TB – Quantiferon-TB *golden test*

qPCR – PCR quantitativa em tempo real

SNV – *Single Nucleotide Variants* (Variantes de Nucleotídeo Único)

Tb – Tuberculose

TbP – Tuberculose Pulmonar

TbE – Tuberculose Extrapulmonar

TBER – Tuberculose Extensivamente Resistente

TBRM – Tuberculose Resistente a Medicamentos

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta

T $\gamma\delta$ – Célula T gamma delta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TNFA – gene que expressa TNF- α

Th – *Helper T Lymphocytes* (Linfócito T auxiliar)

TLR – *Toll-like receptor* (Receptor tipo Toll)

TIR – Domínio de receptor Toll-interleucina 1

TIRAP – Proteína adaptadora associada a TIR

TRAM – *Translocation associated membrane protein* (Proteína de translocação de membrana)

Tregs – Células T reguladoras

TRIF – Domínio TIR contendo molécula adaptadora

TRM – Teste Rápido Molecular

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Aspectos gerais e cenário epidemiológico da tuberculose.....	16
2.1.1. Características de <i>M. tuberculosis</i>	17
2.1.2. Sintomas e diagnóstico da tuberculose	18
2.1.3. Prevenção e tratamento da tuberculose	20
2.2. Resposta imunológica contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
2.3. Aspectos imunogenéticos da tuberculose	26
2.3.1. Variantes de nucleotídeo único do gene <i>TNFA</i>	27
2.3.2. Antígeno Leucocitário Humano	28
3. JUSTIFICATIVA.....	33
4. OBJETIVOS	35
4.1. Objetivo Geral.....	35
4.2. Objetivos Específicos	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5.1. Fluxograma de atividades	37
5.2. Tipo de estudo.....	38
5.3. População de estudo.....	38
5.4. Local	38
5.5. Cálculo amostral	38
5.6. Aspectos éticos	38
5.7. Critérios de inclusão	39
5.8. Critérios de exclusão.....	39
5.9. Amostras biológicas.....	39
5.10. Exames bacteriológicos	40
5.11. Extração de DNA e Genotipagem de HLA.....	40

5.12. Genotipagem de <i>TNFA</i> por qPCR	41
5.13. Análise estatística	44
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1. Características gerais da população de estudo	46
6.2. Frequência e análise dos alelos de <i>HLA-A</i> , <i>HLA-B</i> e <i>HLA-DRB</i>	49
6.3. Resultado da associação dos SNVs de <i>TNFA</i> selecionados	57
6.3.1. Análise de associação do SNV rs1799964 para o gene <i>TNFA</i>	59
6.3.2. Análise de associação do SNV rs1800610 para o gene <i>TNFA</i>	61
6.4. Análise de haplótipos.....	63
7. CONCLUSÃO	65
8. ORÇAMENTO E FONTE DE FINANCIAMENTO	68
9. CRONOGRAMA	68
10. EQUIPE DO PROJETO	70
11. REFERÊNCIAS	72
12. ANEXOS	83
Anexo 1.....	83

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (Tb) é uma doença infecciosa, causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) que inclui sete espécies, sendo *M. tuberculosis* a que mais acomete o homem. (Brasil, 2022). A transmissão da doença ocorre pelas vias aéreas superiores, a partir da inalação de aerossóis contendo bacilos liberados por pessoas com a doença ativa. Apesar de existir tratamento específico para Tb, a doença ainda continua sendo um problema grave de saúde pública global. A Tb atinge principalmente países de baixa e média renda e, antes da pandemia de Covid-19, liderava o ranking de causa de morte por um único patógeno, superando até mesmo doenças como a Síndrome da Imunodeficiência Humana (Aids) causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2022).

Estima-se que um quarto da população global tenha sido infectada pelo bacilo causador da Tb, tendo sido registrado cerca de 81.604 novos casos no Brasil em 2023, com o estado do Amazonas sendo detentor da segunda maior taxa de incidência do país, com cerca de 81,6 casos de Tb/100 mil habitantes (Brasil, 2024a).

A pandemia da Covid-19 gerou grande impacto no combate à Tb, a qual prejudicou e reduziu as notificações da doença. Entre os anos de 2020 e 2021, os registros da Tb tiveram queda em torno de 15 a 20% nas Américas. além da diminuição no avanço dos estudos e combate à doença (PAHO, 2021). As investigações epidemiológicas desse período da pandemia evidenciaram o aumento dos casos não diagnosticados e a crescente transmissão comunitária, principalmente entre pessoas consideradas vulneráveis ao adoecimento por Tb como a população privada de liberdade, a população em situação de rua, profissionais da saúde, imigrantes e indígenas (Brasil, 2023a). Porém, o ano de 2023 seguiu com a redução nos casos e risco de acometimento, sugerindo a diminuição do impacto negativo da pandemia de Covid-19 nas ações de controle da Tb (Brasil, 2024a).

A Tb desenvolve-se através de uma complexa combinação de fatores ambientais, socioeconômicos, imunológicos e genéticos. Dentre eles, o fator genético tem sido cada vez mais considerado importante na Tb. Há estudos sugerindo que as variações gênicas que ocorrem no antígeno leucocitário humano (HLA), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 12 (IL-12), C3 convertase (e outros zimogênios do sistema complemento), bem como moléculas co-estimuladoras cujo genes estão presentes no braço curto do cromossomo 6, ou mesmo outros fatores imunológicos expressos por genes presentes em outros cromossomos, podem ter relações com a suscetibilidade e/ou resistência à doença (Jacobs, 2007; Sharma *et al.*, 2016).

Sabe-se que a resposta imune celular é crucial para o combate à Tb, tendo ação principalmente de macrófagos, células predominantes na maior parte do ciclo infeccioso, além de células dendríticas e linfócitos T. Nesse contexto, as moléculas de HLA de classe I (A, B e C) e classe II (DR, DQ e DP), presentes principalmente nas células dendríticas, participam da apresentação de antígenos e ativação de células T CD8 e T CD4, respectivamente. Estudos sugerem que a expressão de determinados genótipos de HLA classe I, tais como: *HLA-A2*, *HLA-A9*, *HLA-B8*, *HLA-B15* estão associados à Tb pulmonar para maior chance de desenvolver a doença. Ao passo, que para HLA classe II, há um estudo de meta-análise que sugere que os seguintes HLA: *HLA-DRB1*08:03*, *HLA-DQB1*06:01*, *HLA-DQB1*06:09* e *HLA-DQA1*01:01* também estão associados para suscetibilidade para Tb pulmonar (Cox *et al.*, 1982; Oliveira-Cortez *et al.*, 2016).

Por sua vez, a fagocitose do patógeno por macrófagos pode induzir o aumento na produção de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória que leva ao aumento do catabolismo, produção, ativação e migração de leucócitos polimorfonucleares (LPMNs) para auxiliar na formação do granuloma e aumento da transcrição de genes de HLA classe I, consequentemente elevando a atividade citotóxica de células T CD8 (Spies, 1986). Diferentes variantes em genes de citocinas afetam a transcrição genética e influenciam na produção de citocinas, colocando os SNVs do *TNFA* e os genes de outras citocinas pró inflamatórias como fatores associados à suscetibilidade no desenvolvimento da Tb (Wu *et al.*, 2018).

Sendo assim, os ensaios genéticos e imunológicos como, por exemplo, a identificação de SNVs e dos alelos de HLA associados à doença em uma determinada população, podem ser úteis para compreendermos melhor os mecanismos envolvidos na resposta imune da Tb. Possibilitam também direcionar quais outros componentes envolvidos na ativação de linfócitos T podem ser alvos para novas investigações. Desta maneira, esse estudo teve como intuito investigar os genes de *HLA-ABDR* e SNV, rs1799964 e 1800610, do *TNFA*, ambos localizados no cromossomo 6, em indivíduos Amazonenses acometidos por Tb para a identificação de genes que possam estar associados à suscetibilidade ou proteção na Tb, bem como determinação da frequência alélica de *HLA-ABDR* e *TNFA*, na população selecionada para este estudo.

Revisão bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais e cenário epidemiológico da tuberculose

A tuberculose (Tb) tem como agente etiológico o bacilo da espécie *Mycobacterium tuberculosis*, membro do CMTB, composto também pelas espécies *M. bovis*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. africanum* e *M. microti*. Destas, a mais frequente é *M. tuberculosis*. As espécies do CMTB possuem grande similaridade genética, mas elas diferem com relação ao hospedeiro, à distribuição geográfica e à patogenicidade (Brasil, 2022).

A espécie *M. tuberculosis* é um patógeno que vem evoluindo com a espécie humana ao longo da história. Há diferentes estimativas para o tempo de surgimento, porém uma das origens prováveis indica um gargalo ocorrido há 70 mil anos, condizente com a grande migração de humanos para fora da África; outro estudo aponta o possível surgimento há menos de 6.000 anos (Sabin *et al.*, 2020). Apesar disso, a espécie *M. tuberculosis* foi descrita por Robert Koch apenas no ano de 1882, que realizou o isolamento do bacilo e demonstrou que a Tb é causada por um agente infeccioso externo (Cambau e Drancourt, 2014).

Atualmente, existem 7 linhagens filogenéticas de *M. tuberculosis* altamente adaptadas aos humanos, associadas a regiões geográficas específicas e diferindo em fatores como virulência, aptidão biológica e propensão a resistência a antibióticos. (Nguyen *et al.*, 2018). Essas linhagens consistem na linhagem 1, conhecida como Indo-Oceânica, que ocorre principalmente no Oceano Índico e Filipinas; linhagem 2 mais distribuída entre países do Leste Asiático; linhagem 3 distribuída pela África Oriental, Ásia Central e do Sul; linhagem 4, conhecida como Euro-Americana de ampla distribuição, sendo uma das mais frequentes nas infecções humanas é a principal circulante no Brasil, em especial as sub linhagens Latino-América e Mediterrâneo e Haarlem; linhagem 5, também conhecida como *M. africanum* Oeste Africano 1 e linhagem 6 conhecida como *M. africanum* Oeste Africano 2, ligadas a países da África Ocidental, e a recente descrita linhagem 7 que está predominantemente ligada a Etiópia (Brites e Gagneux, 2015; Salvato *et al.*, 2021).

No Brasil, no boletim epidemiológico publicado em 2023 pelo Ministério da Saúde, foi apontado que a crise social e sanitária ocorrida com a pandemia da Covid-19 teve grande impacto negativo na vigilância, diagnóstico e tratamento nos anos de 2020 e 2021, tendo uma melhora a partir do ano de 2022. Contudo, a exemplo de anos anteriores, o estado do Amazonas atingiu um coeficiente de incidência elevado, com 81,6 casos de Tb/100 mil habitantes, atrás apenas de Roraima com 85,7 casos de Tb/100 mil habitantes. Na capital Manaus, a situação também é preocupante por apresentar a incidência de 113,2 casos de Tb/100 mil habitantes, ou

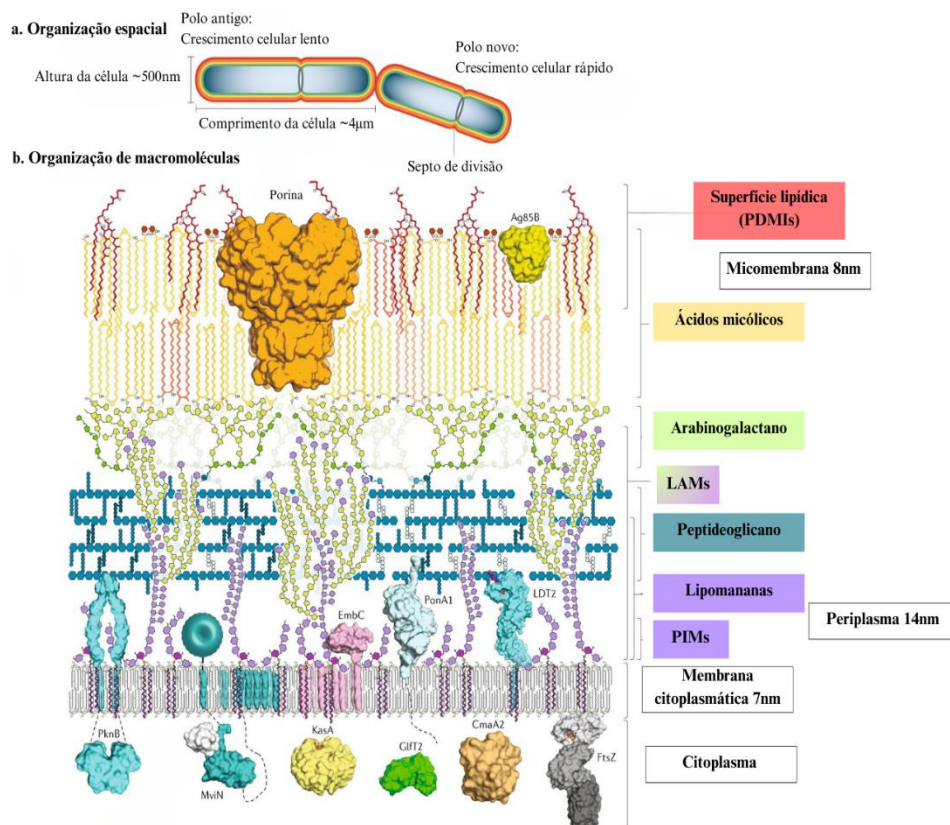
seja, coeficiente mais elevado entre as capitais do Brasil. O cenário observado reforça a importância da retomada dos esforços no combate à Tb, frente ao retrocesso das metas globais para a eliminação da Tb (Brasil, 2024a).

2.1.1. Características da *M. tuberculosis*

São bacilos intracelulares facultativos, aeróbicos retos ou ligeiramente curvos e imóveis, podem crescer em cadeias retas ou ramificadas, não esporulados, medindo de 1 a 10µm de comprimento e 0,2 a 0,6µm de espessura e apresentam características álcool-ácido resistentes (Velayati e Farnia, 2012). O crescimento do bacilo da Tb em cultivo é lento, levando de 14 a 30 dias, podendo se estender até oito semanas. A parede celular de *M. tuberculosis* é rica em lipídios (ácidos micólicos e arabinogalactano), o que lhe confere baixa permeabilidade, reduz a efetividade da maioria dos antibióticos (Brasil, 2022).

O envelope celular possui três componentes estruturais: membrana plasmática, parede e cápsula. A membrana é composta por lipídios como os glicerofosfolipídios, mas também possui manosídeos de fosfatidilinositol (PIMs), lipomananas (LIMs) e seus derivados como as lipoarabinomananas (LAMs). A parede celular é constituída principalmente por ácidos micólicos e lipoarabinomanano, como mostra a **Figura 1**, que são ácidos de cadeia longa que formam uma barreira hidrofóbica que as torna impermeáveis à coloração de Gram e lhes confere resistência ao processo de lise enzimática induzidas pelas células do hospedeiro. A cápsula é composta por polissacarídeos e proteínas com vestígios de lipídios. Além disso, essa condição fisiológica exige alta quantidade de oxigênio para o crescimento e desenvolvimento, estando atrelada a sua afinidade pelo tecido pulmonar (Dulberger *et al.*, 2020).

Figura 1. a. Esquema transversal demonstrando diferentes camadas do bacilo de *M. tuberculosis* em divisão. O polo antigo da cepa apresenta tamanho maior e crescimento acelerado, enquanto o novo polo apresenta menor tamanho e crescimento lento. Ambos apresentam septo de divisão que formará um novo bacilo de diferente proporção. b. Organização de macromoléculas do envelope celular, incluindo proteínas de membrana características de micobactéria.



Adaptado de Dulberger *et al.*, 2020.

2.1.2. Sintomas e diagnóstico da tuberculose

A Tb acomete principalmente os pulmões, sendo a forma pulmonar da doença a de maior contribuição para a transmissão da doença, mas podendo também ocorrer em diversos tecidos e sistemas na sua forma extrapulmonar. Os principais sintomas envolvem tosse persistente, seca ou produtiva, com possível expectoração purulenta ou mucoide, com ou sem sangue, febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento, que podem ocorrer em qualquer uma das apresentações da Tb. Contudo, a forma extrapulmonar pode ainda acarretar sintomas relacionados ao local de ocorrência, além da apresentação de sintomas inespecíficos (De Siqueira, 2012; Brasil, 2022).

Em relação ao diagnóstico laboratorial, este é dado a partir da identificação do bacilo em amostras biológicas como: escarro, lavado brônquico, bronco alveolar, gástrico e entre outros. As amostras necessárias para o diagnóstico da Tb extrapulmonar (TbE) podem variar entre sangue, urina, líquido pleural, cefalorraquidiano e outros, além de secreções ganglionares, nodulares, secreções purulentas de pele, nariz, ouvido, olhos e garganta (Brasil, 2022).

Para análise das amostras, podem ser utilizadas técnicas como a baciloscopia, cultura ou métodos moleculares, como o Teste Rápido Molecular (TRM). A baciloscopia, ou exame microscópico, consiste na identificação de bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) após a utilização do método de coloração de Ziehl-Neelsen ou Kinyoun, que cora de rosa/vermelho as micobactérias, contrastando com azul das estruturas celulares e demais microrganismos. A cultura permite a multiplicação e o isolamento de BAAR a partir de uma amostra clínica, em meios específicos para micobactérias como Lowenstein-Jensen ou Ogawa, detectando a partir de 10 bacilos/mililitros (mL). Sua alta especificidade e sensibilidade média permite o diagnóstico não somente de *M. tuberculosis*, mas também de micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT), sendo considerado o padrão “ouro” para o diagnóstico (Brasil, 2022; Santos *et al.*, 2020).

O TRM é utilizado no equipamento GeneXpert MTB/RIF Ultra (PCR em tempo real), conferindo não apenas um diagnóstico da presença de *M. tuberculosis* na amostra, mas também de resistência à rifampicina. Nesse sistema, tanto a extração de DNA e a PCR ocorrem integrados em um único cartucho de reação, que fornece resultados dentro de 2 horas. Porém, possui uma limitação intrínseca, não podendo detectar/identificar as espécies MNT em casos suspeitos de micobacterioses. Há ainda outros exames que podem auxiliar no diagnóstico inicial, como raios-x e tomografia (Silva Jr., 2004; Lima *et al.*, 2017).

Outros testes auxiliares, mais comuns para o diagnóstico da infecção latente por Tb são o teste tuberculínico intradérmico também conhecido como PPD (*Purified Protein Derivative*) e o ensaio de liberação de interferon gama (IGRA/*Interferon-gamma release assay*), que se baseiam na evidência da resposta imune celular aos antígenos micobacterianos (Lee *et al.*, 2022). O teste de PPD contém a proteína tuberculina de baixo peso molecular purificada sendo aplicado via intradérmica. Uma limitação deste teste é sua capacidade de identificar apenas uma história de resposta imune contra o bacilo em vez de uma infecção latente propriamente dita, além de estar sujeito a uma resposta cruzada, não distinguindo entre a resposta a uma vacina contra Tb aplicada anteriormente ou outras micobacterioses. Este teste é interpretado a partir da identificação de uma resposta de hipersensibilidade tardia (tipo IV), devendo ser lido entre 48 e 72h após a aplicação e observando-se no local da injeção há eritema e enrijecimento (Pahal *et al.*, 2023).

O teste de IGRA mede as respostas *in vitro* de linfócitos T ou células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) através da liberação de IFN- γ , ocasionado pela estimulação com antígenos de *M. tuberculosis* que não são encontrados na vacina Bacillus Calmette–Guérin (BCG) e na maioria das micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT). Tais como

peptídeos do antígeno RD1 do genoma da *M. tuberculosis*, o alvo antigênico secretado precocemente 6 (ESAT-6) e a proteína filtrada de cultura 10 (CFP-10), tendo, portanto, a especificidade maior que a do PPD.

Comercialmente, há dois modelos de teste disponíveis, o Quantiferon-TB (QTF-TB) *gold test*, baseado em ensaio imunoenzimático (ELISA/*enzyme-linked immunoabsorbent assay*) e o T-SPOT.TB, baseado em ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISPOT/*enzyme-linked immunoabsorbent spot*) (Diel *et al.*, 2009; Ruhwald *et al.*, 2017). Contudo, os resultados podem ser afetados pelas condições do indivíduo no momento da coleta, principalmente, as que atingem a regulação imunológica. O teste do IGRA foi realizado em pacientes hospitalizados com Covid-19 para descartar a infecção latente da tuberculose (ILTb) antes de prescrever tratamentos anti-inflamatórios e imunossupressores, mas isso não foi sistemático. Há relatos de uma taxa alta e inesperada de resultados indeterminados em pacientes com Covid-19 com doença pulmonar grave (Granozzi *et al.*, 2022).

2.1.3. Prevenção e tratamento da tuberculose

A prevenção contra Tb grave é feita através da vacinação na infância com a BCG, uma vacina essencial do calendário de imunização e a mais utilizada no mundo. Estudos de metanálise indicam que a BCG confere proteção contra a infecção e o desenvolvimento de Tb ativa e principalmente contra as formas mais graves (meningite tuberculosa e Tb miliar), quando comparado entre crianças vacinadas e não vacinadas (Mangtani *et al.*, 2014). Porém a proteção se mostra variável em adolescentes e adultos, podendo gerar 0 a 80% de proteção de acordo com a cepa utilizada na vacina. Isso porque a BCG não é mais uma vacina única, tendo a cepa original sofrido variações genéticas em sua reprodução laboratorial que originaram os quatro grupos de cepas atenuadas atuais, diferindo nos perfis de imunogenicidade e de reações adversas. Outros fatores como genética do hospedeiro e contato prévio com micobactérias ambientais que podem conferir uma proteção subjacente contra o *M. tuberculosis*, e estão relacionados à possível variação da efetividade da vacina na vida adulta (Lobo *et al.*, 2021).

A estratégia para tratamento da Tb inclui fármacos como a isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol nos dois primeiros meses, seguido do uso da rifampicina e isoniazida nos quatro meses seguintes. Embora esse tratamento seja eficaz, sua aplicação representa um grande desafio. O longo período de tratamento muitas vezes leva os indivíduos a interromperem o manejo dos medicamentos, aumentando as chances de falha da terapia e de gerar cepas de Tb multirresistentes (TBMR) e/ou extensivamente resistente (TBER). Em 2019, foi aprovado o primeiro regime de 6 meses para o tratamento dessas formas resistentes de Tb, compreendendo

apenas três medicamentos com dois novos mecanismos de ação: bedaquilina, pretomanida e linezolida. No entanto, são necessários tratamentos mais curtos e bem tolerados para todas as populações de indivíduos (Brasil, 2022; Dartois e Rubin, 2022).

2.2. Resposta imunológica contra *Mycobacterium tuberculosis*

A resposta imune contra *M. tuberculosis* ocorre após o primeiro contato com os bacilos liberados por indivíduos com tuberculose pulmonar (TbP) (forma mais bacilífera e comum da Tb ativa), estando contidos em gotículas ou aerossóis que podem ser liberados ao tossir, espirrar e falar e que podem continuar viáveis por cerca de 6 horas (Lee, 2016).

A entrada de *M. tuberculosis* ocorre primeiro pelo nariz ou boca, encontra células nas vias aéreas superiores e, posteriormente, passa para o pulmão distal para chegar ao espaço alveolar. Para que a infecção primária ocorra, é necessário que o patógeno ultrapasse barreiras físicas e químicas. Um exemplo são as células epiteliais da mucosa que liberam substâncias antimicrobianas, como as células M (*Microfold cells*), encontradas no tecido linfóide associado a mucosa (MALT) ou tecido linfóide associado aos brônquios (BALT), responsáveis também por ingerir e transitar antígenos estranhos (Nair *et al.*, 2016). Outras células especializadas presentes nos alvéolos como macrófagos alveolares, células dendríticas (DCs) intersticiais e células epitelioides tipo II também podem exercer papel de proteção, bem como ser uma rota de infecção primária caso não sejam capazes de eliminar o bacilo de *M. tuberculosis* (Rahlwe *et al.*, 2023).

Nos estágios iniciais da infecção pelo bacilo da Tb, os macrófagos alveolares exercem um papel de destaque. Uma vez que os macrófagos reconhecem e fagocitam *M. tuberculosis*, começam a produzir espécies reativas de oxigênio (ROS/*Reactive oxygen species*) e de nitrogênio (RNS/*Reactive nitrogen species*) citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ além de quimiocinas como CCL2, CXCL5 e CXCL8. Por intermédio desses componentes outras células imunes são recrutadas para o local de infecção, incluindo neutrófilos, monócitos, macrófagos, CD4 e células Natural Killer (NK) que são importantes na formação inicial do granuloma. Porém, nos primeiros dias pós-infecção, os macrófagos alveolares são também as principais células de infecção e replicação de *M. tuberculosis* (Aiello *et al.*, 2023; Rodrigues *et al.*, 2020).

Os neutrófilos, por sua vez, fornecem um ambiente de vida curta para o bacilo da Tb em comparação com os macrófagos. Os neutrófilos são capazes de liberar diversos peptídeos antimicrobianos e ROS que são mantidos em diferentes grânulos (Dallenga e Schaible, 2016).

As NKs são uma linhagem distinta de células que compõem a imunidade inata, não são restritas ao complexo de histocompatibilidade (MHC) e possuem vários mecanismos de citotoxicidade como grânulos contendo perforina, granulicina, granzimas e receptores que podem iniciar a apoptose (Allen *et al.*, 2015).

As células do sistema imune inato reconhecem estruturas altamente conservadas também denominadas padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) através dos seus receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Através desses receptores, as células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B) são capazes de detectar a presença da *M. tuberculosis* por PAMPs como ácidos micólicos, lipopeptídeos e ESAT-6 (Liu *et al.* 2017). Ao amadurecerem as APCs podem migrar aos linfonodos para expressar citocinas que auxiliam a maturação e ativação de células, proteínas do MHC, também conhecido como HLA, ativando células imunes de resposta adaptativa. (Rodrigues *et al.*, 2020).

Existem uma variedade de receptores inatos que atuam na resposta imune contra *M. tuberculosis* como os receptores de lectina tipo C (CLRs), capazes de reconhecer carboidratos da superfície da micobactéria, os receptores tipo NOD (NLRs) que apresentam importantes componentes de ativação do inflamassoma, e receptores *scavengers*, e os mais estudados, são os receptores do tipo Toll (TLRs) (Mortaz *et al.*, 2015). O bacilo da Tb é inicialmente reconhecido pelos receptores TLR4 e TLR9, bem como pelos heterodímeros formados pelo TLR2 com o TLR1 ou com TLR6. A ligação de PAMPs a esses receptores ativa múltiplas cascatas de sinalização como a da via dependente e a via independente do gene de resposta primária de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e o domínio de receptor Toll-interleucina 1 (TIR) contendo a proteína adaptadora associada a TIR (TIRAP). Estes induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e IFNs tipo I, através da ativação dos genes pró-inflamatórios TRIF e TRAM, levando a diversas defesas imunes inatas, como ativação de NF- κ B, fagocitose, autofagia, apoptose, piroptose e ativação do inflamassoma (Liu *et al.*, 2017).

O inflamassoma é um importante mediador da resposta imune inata contra micobactérias, principalmente por possuir diversas vias de ativação sendo algumas delas NLRP1, NLRP3, NAIP/NLRC4, e AIM2 e levar à produção de IL-1 β e IL-18. Ensaios realizados por De Lima e colaboradores (2016) apontaram que a ativação aumentada do inflamassoma pela via NLRP3, ocasionada pela maior disponibilidade da molécula em certos indivíduos, auxilia na resposta contra Tb pulmonar ativa.

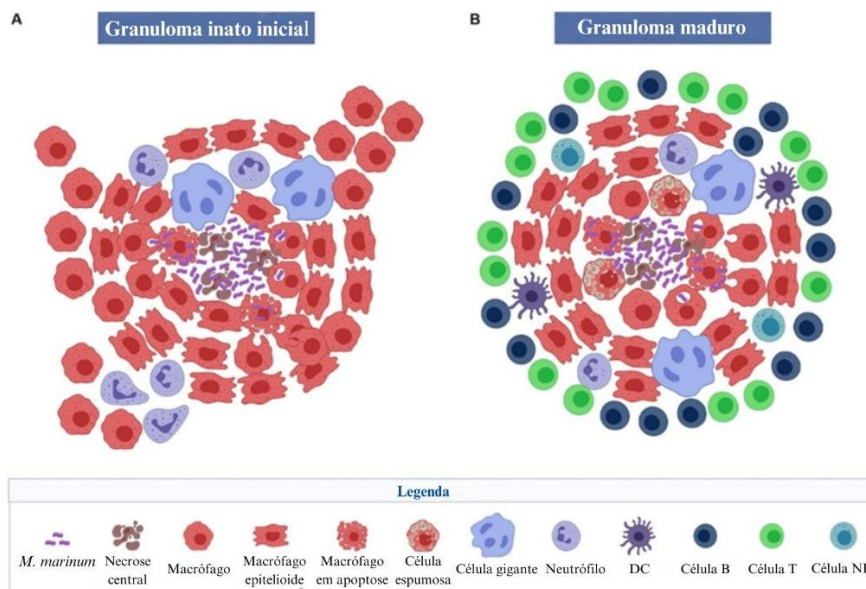
Esses mecanismos inatos podem, por vezes, ser efetivos e ajudarem a limitar a infecção no seu estágio inicial, eliminando o bacilo, sem ativar a resposta imune adaptativa. Contudo,

M. tuberculosis possui diversos mecanismos de evasão capazes de manter a infecção tais como inibir a formação de fagolisossomo e induzir a morte por necrose em vez de apoptose (Aiello *et al.*, 2023). Uma vez que a infecção continua, a permanência do ambiente inflamatório segue recrutando células que propiciam a formação do granuloma e a ativação da imunidade adaptativa.

É importante ressaltar que a infecção causada pelo bacilo da Tb é diferente de doença ativa, ou seja, um indivíduo infectado pode não apresentar os sinais e sintomas da Tb, uma vez que a infecção se refere à presença de bactérias no corpo, que pode ocorrer de forma sintomática na doença ativa ou de forma assintomática na sua forma latente. Por vezes, a Tb primária em indivíduos imunocompetentes é assintomática, tendo como única evidência da infecção a visualização de granuloma em exames de imagem através da presença de um pequeno nódulo pulmonar fibrocalcificado no local da infecção, que pode manter microrganismos viáveis em seu interior por várias décadas (Kumar *et al.*, 2023).

A composição de granulomas pode ser diferente entre os indivíduos, possuindo características histológicas distintas e que progridem de forma independente ao longo do tempo (MacCraffey *et al.*, 2022). Estudos realizados em modelos animais com o uso da *Mycobacterium marinum* em zebrafish, apontou para a formação do granuloma envolvendo duas fases: uma fase inicial imatura e uma fase tardia madura, como demonstrado na **Figura 2**. Acredita-se que, da mesma forma em humanos, os macrófagos alveolares residentes, em conjunto com as células epitelioides tipo II, DCs, neutrófilos e células gigantes multinucleadas de Langherans são as primeiras células a envolver e proteger a micobactéria na área de infecção (Röltgen e Pluschke, 2020; Cohen *et al.*, 2018). Devido a atividade de APCs, a resposta imune adaptativa é ativada, levando a migração e proliferação de linfócitos nas margens do granuloma, podendo também estar revestidos de fibrina para fazer a contenção do patógeno. Dependendo das condições do microambiente, os macrófagos podem se tornar células espumosas, levando à caseificação, que auxilia no processo de inflamação crônica, dano tecidual, perda de função pulmonar e disseminação do patógeno uma vez que ocorra a cavitação do granuloma (Guerrini *et al.*, 2018).

Figura 2. Modelo de formação de granuloma em zebrafish com infecção por *Mycobacterium marinum*, que causa a formação granulomatosa semelhante à *M. tuberculosis*. (A) O granuloma inato inicial possui bacilos tanto no meio extracelular, quanto no interior de fagócitos, sua população celular é formada primariamente por macrófagos células epitelioides, células gigantes e neutrófilos. (B) O granuloma maduro, por sua vez, conta com células da imunidade inata e adaptativa, (linfócitos B e T) podendo ocorrer o posterior acúmulo de lipídeos que geram células espumosas.



Adaptado de Röltgen e Pluschke, 2020.

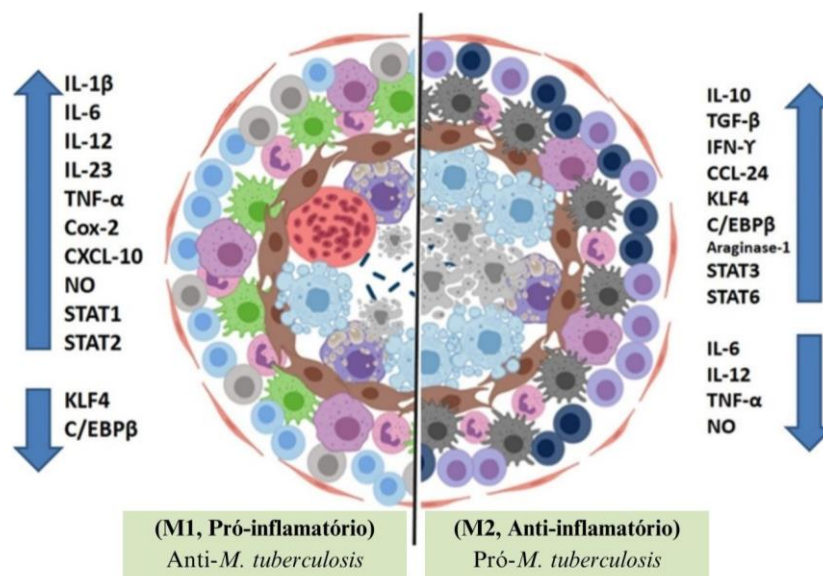
Quando ativada a resposta imune adaptativa, os linfócitos ativados se proliferam em linhagens específicas para reconhecer antígenos de *M. tuberculosis*. Os linfócitos T CD4+ tornam-se então a principal fonte de IFN- γ , seguido dos linfócitos T CD8+ e linfócitos T com receptor $\gamma\delta$. Sua produção é essencial para a sobrevivência do hospedeiro, uma vez que baixos níveis dessa citocina já foram associados à maior gravidade da doença (De Martino *et al.*, 2019). Os linfócitos T CD8+ atuam na lise de células infectadas, sendo importante diferenciador do granuloma tuberculoso, uma vez que sua população é maior na Tb em comparação com granulomas que ocorrem em resposta a corpos estranhos e em doenças autoimunes, como a sarcoidose (McCaffrey *et al.*, 2022).

Os linfócitos T CD4+ efetores podem ser divididos em pelo menos três subpopulações distintas sendo elas as células Th1, Th2 e Th17, que são altamente especializadas. Sabe-se que a participação da IL-2, IL-17 e IL-23 contribui na resposta e desenvolvimento de células Th1 do hospedeiro contra micobactérias e que as citocinas IL-17, IL-21 e IL-22 são produzidas por células Th17, que também participam da resposta precoce na Tb (Cavalcanti *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2023). A atividade de células Th2, por sua vez, foi descrita na Tb relacionada à produção de IL-4, IL-5 e IL-6, para ativação de macrófagos, inibição de autofagia e indução de degradação intracelular de micobactérias (Carabalí-Isajar *et al.*, 2023). Porém a produção contínua de IFN- γ impede a proliferação de células Th2, garantindo que as citocinas

inflamatórias produzidas pelas células Th1 não sejam inibidas. Os linfócitos B, por sua vez, tiveram seu papel pouco estudado, devido à ideia de que infecções intracelulares tinham a resposta imune mediada por células, não por anticorpos. Porém, estas células também são eficientes APCs e produzem uma ampla gama de citocinas que auxiliam na resposta pró-inflamatória, podendo influenciar fortemente na função de outras células imunes (Rijnink *et al.*, 2021).

O estabelecimento do ambiente pró-inflamatório, apesar de ser importante, precisa ser controlado para evitar danos extensivos ao hospedeiro. Numerosas citocinas exercem efeitos pró ou anti-inflamatórios em doenças e infecções imunomediadas. Consequentemente, *M. tuberculosis* é capaz de explorar a sinalização de citocinas do hospedeiro para atuar na sua proliferação e invasão (Boni *et al.*, 2022). Uma das formas de utilizar a sinalização para sobrevivência é realizar a troca do perfil de células M1 para o perfil anti-inflamatório M2. Granulomas exaustos de IFN- γ passam a produzir altas quantidades de TGF- β e IL-10, que auxiliam na troca para M2, esse nicho é também desfavorável à atividade e proliferação de linfócitos T auxiliares e citotóxicos, porém favorável para proliferação de linfócitos T reguladores (Tregs) periféricos, que ajudam na produção de outras citocinas anti-inflamatórias, estabelecendo um ambiente favorável ao bacilo da Tb, como demonstrado na **Figura 3** abaixo.

Figura 3. Citocinas e mediadores envolvidos na resposta Anti-*M.tuberculosis* e na resposta Pro-*M.tuberculosis*. As citocinas e mediadores regulados positivamente são mostrados com setas para cima e os regulados negativamente com setas para baixo durante a polarização M1 e M2.



Adaptado de Ferluga *et al.*, 2020.

Essas variações nos perfis de citocinas e celulares apontam que a trajetória de cada granuloma varia ao longo de um espectro entre a eliminação bacteriana completa e a

disseminação descontrolada. Esta discordância sugere que a dinâmica local da bactéria dentro do microambiente tecidual do hospedeiro desempenha um papel central na formação e qualidade do granuloma. Com isso, um número crescente de estudos constatou que a estrutura do granuloma, função das células imunológicas e seus produtos estão interligadas à infecção por *M. tuberculosis* (Macffrey *et al.*, 2022).

2.3. Aspectos imunogenéticos da tuberculose

A Tb é uma doença multifatorial, tendo alguns agravantes de risco de desenvolvimento como idade, sexo, nutrição, tabagismo, etilismo, diabetes, HIV e uso de imunossupressores, além dos fatores demográficos, socioeconômicos e culturais que também se mostram atrelados a uma maior incidência da doença. Porém, com o avanço das técnicas moleculares, cada vez mais os fatores imunogenéticos ganharam evidência. As variantes em genes do cromossomo 6 relacionados à resposta imune à infecção por Tb podem ter influência na suscetibilidade ou proteção contra a doença e ser variável entre famílias, etnias ou mesmo regiões geográficas (Alcântara *et al.*, 2012; Harishankar *et al.*, 2018).

A maioria dessas variações é gerada por um único nucleotídeo e pode ocorrer em regiões codificantes e não codificantes. Alguns SNVs estão correlacionados com alterações fenotípicas com repercussões diretas nas doenças humanas. Nas doenças infecciosas, os SNVs em genes que controlam a expressão de citocinas envolvidas na resposta inflamatória demonstraram forte influência na produção e níveis plasmáticos das mesmas, modulando a resposta imune do hospedeiro (Betancourth-Arteaga *et al.*, 2022).

A detecção de fatores genéticos associados à atividade de outros componentes imunes como o HLA, TLRs, NLRs ou mesmo de proteínas citoplasmáticas envolvidas na regulação e sinalização desses receptores também é essencial para compreensão da resposta imune contra a Tb. Estudos imunogenéticos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram uma forte associação entre o alelo *HLA-DRB1*04* e a suscetibilidade à Tb no Amazonas, especialmente o subtipo *HLA-DRB1*04:11:01* (Souza de Lima *et al.*, 2016).

Além disso, na meta-análise realizada para o gene *PTPN22* (1858C/T), com inclusão de quatro populações diferentes de indivíduos com Tb e controles, sendo que uma das populações foi do Amazonas, resultou na associação do alelo T (alelo menor) para proteção à Tb (Boechat *et al.*, 2013). Em outro estudo, realizado por nosso grupo de pesquisa, identificou-se a associação do gene de inflamassoma, *AIM2* (rs1103577) para proteção à Tb pulmonar, no modelo dominante (CC vs. CT+TT), sendo que os indivíduos com genótipo CC apresentaram

maior concentração da IL-1 β no plasma. Ainda neste mesmo estudo, o gene de *CTSB* (rs1692816, alelo C) foi associado ao menor risco para a TbE (Figueira *et al.*, 2021).

Esses resultados sugerem que a resposta imune à Tb é influenciada por múltiplos genes, incluindo aqueles que codificam moléculas do HLA, receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e proteínas envolvidas na regulação da resposta inflamatória. A investigação dos vários genes do hospedeiro se mostrou eficiente para melhorar a compreensão da patogênese da Tb e o desenvolvimento de estratégias de tratamento ou profiláticas.

2.3.1. Variantes de nucleotídeo único do gene *TNFA*

As variantes de nucleotídeo único ocorrem quando um nucleotídeo é alterado na sequência de DNA, sendo o tipo mais comum de variação genética e podendo ocorrer de forma endógena ou exógena, com impacto variando de acordo com sua região de ocorrência. Os SNVs também podem mediar a maneira como humanos são suscetíveis a doenças ou respondem a fatores ambientais como bactérias, vírus, toxinas, produtos químicos, medicamentos e intervenções terapêuticas (Schleinitz, Distefano e Kovacs, 2011).

O gene *TNFA*, que expressa a citocina pró-inflamatória TNF- α , está localizado na região do HLA de classe III do cromossomo 6 e demonstra estreita ligação com o HLA classe I (HLA-B) e genes de classe II (HLA-DR). O TNF- α é produzido principalmente por monócitos e macrófagos ativados, e desempenha um importante papel imunoregulador. Destes, o TNF- α contribui para a patogênese da Tb devido ao seu papel na formação e manutenção de granulomas, além da sua ação conjunta com o IFN- γ para ativar macrófagos e, assim, impactar na perpetuação da doença (Sharma *et al.*, 2010).

Níveis elevados de TNF- α foram relatados em indivíduos com Tb em sua fase inicial quando comparados àqueles com Tb crônica e indivíduos saudáveis, demonstrando relação da sua produção com o estado da doença (Mootoo *et al.*, 2009). Já em estudos realizados por Tezera *et al.*, (2020), que avaliaram o crescimento de *M.tuberculosis* em microesferas, apontaram que a infecção induziu o aumento da produção de TNF- α , sendo os níveis de produção mais elevados ainda quando feita imunoterapia anti PD-1. Nesse mesmo estudo, o excesso de TNF- α foi apontado como a citocina que predominantemente aumentou o crescimento da micobactéria em comparação com outras citocinas. Devido a dualidade dessa citocina no microambiente da Tb, avaliar seus fatores de produção, funcionais e em especial os SNVs, que podem diferenciar a produção entre cada indivíduo, a depender do seu genótipo, é fundamental.

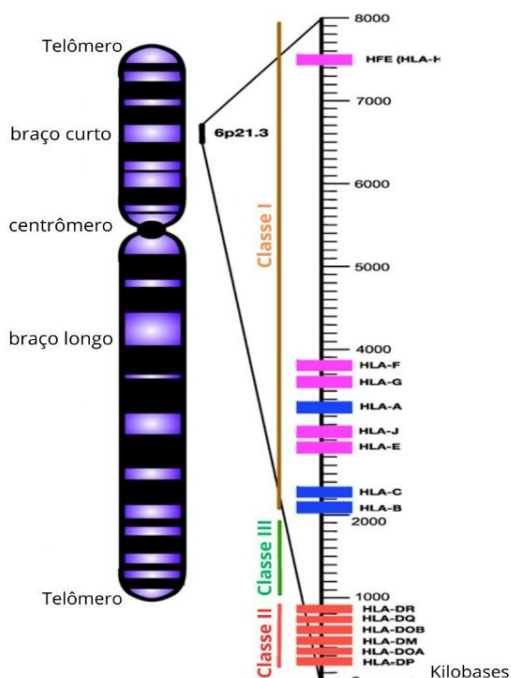
2.3.2. Antígeno Leucocitário Humano

O HLA corresponde ao agrupamento de genes mais variáveis do genoma humano, estando localizados no braço curto do cromossomo 6, contendo mais de 300 genes. Ele desempenha um papel essencial para a apresentação e reconhecimento de antígenos, atuando em conjunto com outros genes e pseudogenes presentes na mesma região, também relacionados ao sistema imunológico (Barquera *et al.*, 2020).

O sistema HLA codifica glicoproteínas da superfície celular capazes de se ligar a fragmentos peptídicos derivados de proteínas de patógenos, exibindo esses fragmentos na superfície celular para apresentação às células efectoras imunes. Os genes do HLA são divididos em duas subfamílias principais, as classes I e II. Os genes de classe I são subdivididos em genes de classe Ia clássicos A, B e C, e os genes de classe Ib, não clássicos E, F e G (Jeffery e Bangham, 2000). Os de classe II, por sua vez, são compostos pelos genes clássicos DR, DQ e DP e os não clássicos DM e DO. Devido a diferenças nas vias de apresentação de antígenos, os genes de classe I estão associados a apresentação de antígenos intracelulares para células T CD8 e os de classe II, a antígenos extracelulares para células TCD4 (Crux e Ehali, 2017).

Entre as regiões dos genes de classe I e II, estão contidos ainda os genes de classe III que, apesar de não expressar nenhum fator conhecido que esteja associado com o processo de apresentação de antígenos, contém genes de importantes fatores do sistema complemento como C2, C4 e fator B, além dos genes *TNFA*, *LTA* e *LTB* que expressam importantes componentes imunes (**Figura 4**). Além disso, também estão relacionados à presença de genes que atuam em atividades celulares importantes como regulação de transcrição, transporte de elétrons, biossíntese e outros (Shiina, Inoko e Kulski, 2004).

Figura 4. Organização dos genes de HLA ao longo do cromossomo 6. Telômero; braço curto; braço longo; centrômero.



Adaptado de Crux e Ehali, 2017.

Uma das razões para a hipervariabilidade é a pressão seletiva causada por alta diversidade de patógenos em contato com populações humanas, uma vez que indivíduos com mais variação neste complexo genético tendem a ter maior aptidão contra diferentes patógenos, pela capacidade de apresentar mais antígenos às células T, fazendo com que mais alelos de HLA persistam na população. Outros fatores como a distância geográfica e densidade populacional, também são considerados essenciais para a diversidade (Prugnolle *et al.*, 2005; Spurgin e Richardson, 2010).

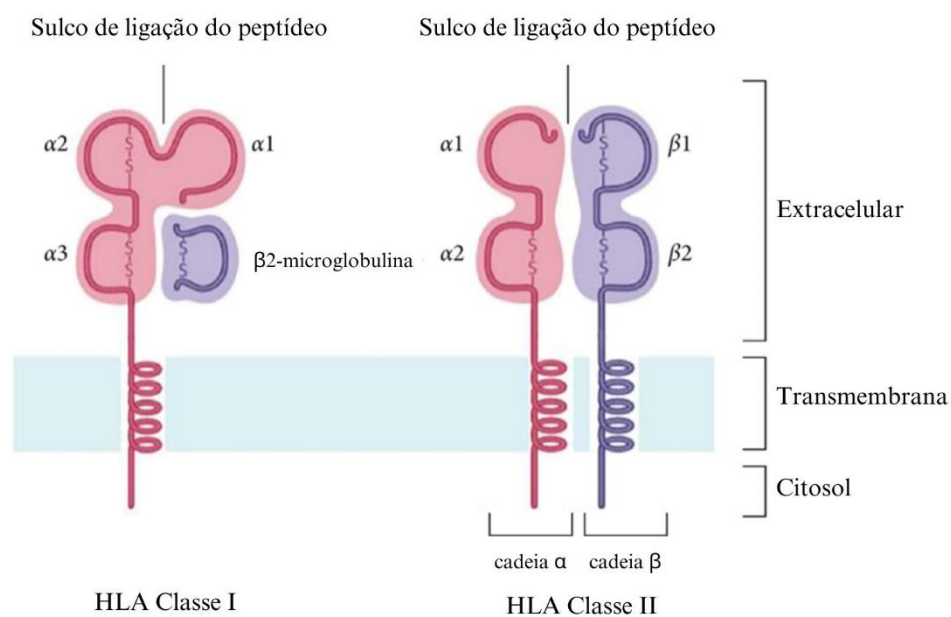
A variação no HLA também pode influenciar no repertório de ligação da molécula. Certos alelos são considerados promíscuos e podem se ligar a uma gama considerável de peptídeos de epítomos (Manczinger *et al.*, 2019). Isso faz com que seja possível observar diferentes associações com doenças relacionadas a um mesmo alelo. Alguns exemplos são a relação observada entre o alelo *HLA-B*39* encontrado em indivíduos com Tb, doença de Chagas e complicações osteoarticulares devido à brucelose, os alelos *DRB1*03*, **07* e **15* que predis põem à sarcoidose e protegem contra a Tb, e o alelo *DRB1*04* que predis põe à Tb e protege contra a sarcoidose (Lorente *et al.*, 2021; Dawkins *et al.*, 2022).

Em humanos, os *loci* clássicos de HLA classe I estão presentes como glicoproteínas transmembrana na superfície de quase todas as células nucleadas. Essas moléculas apresentam antígenos próprios ou não próprios intracelulares para receptores de células T CD8 e receptores semelhantes à imunoglobulina de células NKs (KIR). Sua estrutura consiste em duas cadeias

polipeptídicas heterodiméricas, sendo uma cadeia pesada e uma cadeia de β 2-microglobulina mais leve. A cadeia possui três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática C-terminal. Os dois domínios, $\alpha 1$ e $\alpha 2$, dobram-se para formar um sulco de ligação ao peptídeo e são chamados de região de reconhecimento. A cadeia β 2-microglobulina está associada principalmente ao domínio 3 e é responsável pela estabilidade do HLA (Medhasi e Chantratita, 2022).

Os três *loci* de HLA classe II, por sua vez, codificam proteínas heterodiméricas compostas por uma cadeia α e uma cadeia β que formam juntas uma proteína de membrana tipo 1, com dois domínios extracelulares bem definidos ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\beta 2$), uma extensão intramembranosa, e um curto trecho citoplasmático. A função de ligação e apresentação do antígeno reside no domínio $\alpha 1\beta 1$ combinado, formado pelo entrelaçamento das cadeias polipeptídicas dos respectivos domínios, resultando em um sulco peptídico de ligação ao antígeno (**Figura 5**). Os domínios $\alpha 2$ e $\beta 2$ são semelhantes à imunoglobulina e estão supostamente envolvidos em funções complementares e efetoras das moléculas do HLA de classe II, tais como a ligação ao CD4 e outras possíveis funções que ainda vem sendo estudadas, como ligação através de uma alça RGD (no caso de certos alelos HLA-DQ) e possível interação com tetraspaninas (TSPANs) específicas (Bondinas *et al.*, 2007).

Figura 5. Estrutura das moléculas de HLA classe I e II.



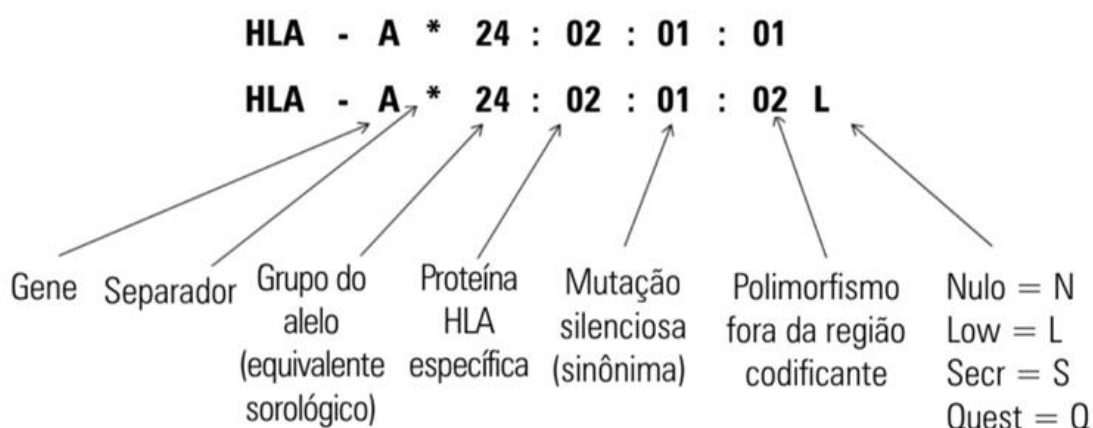
Adaptado de Medhasi e Chantratita, 2022.

Quanto à nomenclatura para fatores do sistema HLA, inicialmente foi definida pela OMS no Relatório de Nomenclatura de 1987. Com isso, foi estabelecida a convenção de se usar

um código de 4 dígitos para distinguir os alelos de HLA, a posição dos alelos e as proteínas que codificam. Mais à frente, durante o 15º Workshop Internacional de Histocompatibilidade, ocorrido em 2008, novas regras foram atribuídas e seguem sendo implementadas até o momento (Robinson *et al.*, 2020).

De acordo com o que foi proposto, os dois primeiros dígitos descrevem a família de alelos, esta muitas vezes corresponde também ao antígeno sorológico transportado pelo alótipo. O terceiro e quarto dígitos se referem à ordem que a sequência gênica foi determinada, ou seja, a especificidade do alelo. Os alelos, que se diferenciam nos quatro primeiros dígitos, diferem também na sequência de aminoácidos da proteína codificada. Alelos diferenciados por substituições de nucleotídeos sinônimos dentro da sequência codificadora, podem ser identificados e diferenciados pelo quinto e sexto dígito. Por fim, variantes da sequência nos íntrons ou regiões não traduzidas 5' e 3' que flanqueiam éxons e íntrons são diferenciados pelo uso do sétimo e oitavo dígito. Além do código numérico específico, há sufixos opcionais que podem indicar o status de expressão do alelo (N - nulo; L - baixa expressão; S - proteína secretada; C - proteína do citoplasma; A - expressão anormal (Robinson *et al.*, 2020; Torres e Moraes, 2011; Marsh *et al.*, 2010), permitindo, dessa forma, não apenas diferenciar os alelos, mas também informar características moleculares importantes), como mostra a **Figura 6**.

Figura 6. Elementos da nomenclatura de alelos de HLA.



Torres e Moraes, 2011.

Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

A tuberculose (Tb), causada por *Mycobacterium tuberculosis*, é endêmica no estado do Amazonas. Na série histórica dos coeficientes de incidência no Brasil, entre 2013 e 2023, o Amazonas foi detentor de indicadores mais elevados do País, com incidências entre 66,9 e 86,3 casos de Tb/100 mil habitantes (Brasil, 2024b). Dados preocupantes que mostram a necessidade de atenção e estudos contínuos sobre Tb na nossa região.

Os fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro são essenciais para a compreensão da complexa rede de respostas contra o bacilo da Tb e, conseqüentemente, para diferentes evoluções clínicas da doença. A forma clínica mais frequente da Tb é a pulmonar, sendo a responsável pela transmissão e manutenção do ciclo de transmissão da Tb. No entanto, as formas extrapulmonares também merecem atenção especial, pois são igualmente importantes e preocupantes. Estima-se que a partir da exposição ao bacilo da Tb, aproximadamente 30% dos indivíduos tornam-se infectados, e destes mais de 90% conseguem controlar a infecção e menos de 10% desenvolvem a doença (Lobue *et al.*, 2010; Shaler *et al.*, 2012). Esta estimativa indica que, além dos fatores já conhecidos como as condições sociais, econômicas, nutricionais, ambientais e tempo de contato como indivíduo com Tb, o “status” imunológico do hospedeiro é um fator fundamental associado ao desenvolvimento da doença.

Há várias evidências indicando que variações genéticas do hospedeiro contribuem de forma relevante na evolução da resposta contra o bacilo da Tb, *M. tuberculosis* (Bellamy, 1998; Hill, 2001; Goldfeld, 2004; Hill, 2006; El Baghdadi *et al.*, 2013). Nesse contexto, os alelos de HLA (Human Leukocyte Antigen) e de *TNFA* continuam sendo alvos de investigação de várias doenças, inclusive na Tb. Este fato deve-se as funções importantes que as moléculas de HLA e TNF- α exercem nas respostas imunológicas aos patógenos.

Finalmente, a principal proposta desse projeto foi investigar a distribuição dos alelos de HLA classe I (A e B) e classe II (DR) e das variantes de nucleotídeo único (SNV- *Single Nucleotide Variant*) de *TNFA* (rs1799964 e rs1800610) com enfoque nos indivíduos com Tb, os quais provavelmente devem estar associados na evolução ou direcionamento para as diferentes formas clínicas da Tb.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Investigar os alelos de HLA classe I e II (ABDR), bem como variantes do gene *TNFA* em indivíduos com tuberculose (Tb).

4.2. Objetivos Específicos

Estimar a frequência dos alelos de HLA classe I e II (ABDR) e dos SNVs de *TNFA* (rs1799964 e rs1800610) em indivíduos com Tb e grupo controle.

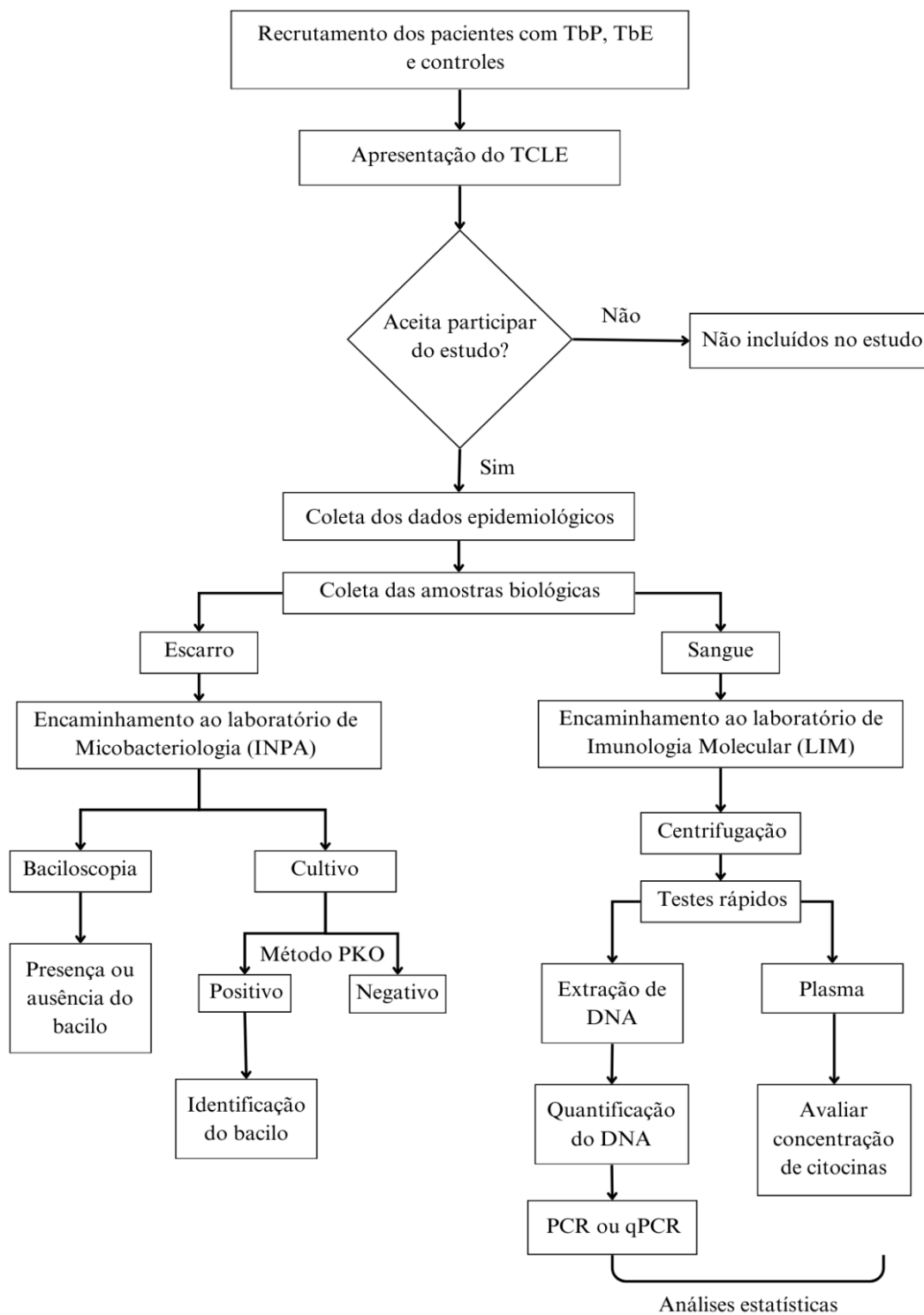
Avaliar se existe associação entre os alelos e haplótipos dos SNVs de *TNFA* e alelos de *HLA-ABDR* com Tb.

Materiais e Métodos

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Fluxograma de atividades

Figura 6. Fluxograma de atividades do projeto.



5.2. Tipo de estudo

Este é um estudo de caso-controle, prospectivo que avaliou os alelos de *HLA* classe I e II (ABDR) e variantes do gene *TNFA* em indivíduos com Tb e em grupo controle (contatos).

5.3. População de estudo

Indivíduos oriundos do estado do Amazonas, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos residentes em Manaus ou em outros municípios da região Norte. Dentre estes, foram incluídos os com tuberculose pulmonar (TbP), os com tuberculose extrapulmonar (TbE) e os contatos (controles). Os contatos foram os acompanhantes dos indivíduos com Tb, que convivem com eles e/ou funcionários da Policlínica Cardoso Fontes que atendem os indivíduos com Tb. Os participantes acometidos por TbP e/ou TbE apresentaram resultados positivos para o Teste Rápido Molecular (TRM, GeneXpert MTB/RIF) e/ou BAAR positivos.

5.4. Local

Os indivíduos acometidos por Tb foram recrutados na Policlínica Cardoso Fontes, situada na cidade de Manaus. Os controles foram recrutados na Policlínica Cardoso Fontes ou no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (ICB-UFAM).

5.5. Cálculo amostral

A escolha dos SNVs de *TNFA* foi baseada nas frequências das variantes de nucleotídeo único de aproximadamente 10% da população global segundo a plataforma Ensembl (<https://www.ensembl.org/>). Para a realização do cálculo amostral foi utilizado o programa Gpower versão 3.1, o valor de $\alpha = 0,05$ (5%), $\beta = 0,1$ (10%), poder da amostra de 0,95. O resultado do número amostral foi de 404 indivíduos com Tb e 404 controles.

Para a avaliação da frequência alélica do HLA, foram utilizados os mesmos parâmetros no Gpower ($\alpha = 0,05$ (5%), $\beta = 0,1$ (10%), poder da amostra de 0,95 e tamanho de efeito 0,5), obtendo-se tamanho amostral de 105 indivíduos com Tb e 105 controles.

5.6. Aspectos éticos

Este projeto está vinculado a um projeto maior, sob o título: “Avaliação de polimorfismos genéticos relacionados à resposta imunológica na tuberculose”, aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa CEP/UFAM, aprovado em 12/07/2023. CAAE: 19021519.9.0000.5020; Nº. do Parecer: 6.178.672 (**Anexo 1**).

5.7. Critérios de inclusão

Grupo 1: Indivíduos com idade entre 18 e 65 anos, de ambos os sexos e recém diagnosticados para Tb, com resultados positivos para um dos seguintes exames: baciloscopia direta, TRM ou cultura para micobactérias, com resultado positivo para a presença de *M. tuberculosis*.

Grupo 2: Contatos, com idade entre 18 e 65 anos, de ambos os sexos, sem sinais clínicos da doença, aparentemente saudáveis e que convivem regularmente com os indivíduos com Tb, que apesar de terem sido expostos aos bacilos da Tb, não relataram ter desenvolvido a doença.

5.8. Critérios de exclusão

Nos grupos estudados, os indivíduos que apresentaram: câncer, hepatites virais e doenças autoimunes, bem como os indivíduos que convivem com AIDS/HIV, gestantes, transplantados ou que estivessem fazendo uso de imunoregulador foram excluídos do projeto.

Também foram excluídos indivíduos que tiveram resultados de cultura com identificação de micobactérias não causadoras de Tb (MNT) e contatos, que no decorrer do projeto, apresentaram sintomas respiratórios e/ou resultados da baciloscopia e/ou cultivo positivos para *M. tuberculosis* ou outras micobacterioses.

5.9. Amostras biológicas

As amostras biológicas consistiram em escarro e sangue, havendo a obtenção de 1 frasco com aproximadamente 1 a 2 mL de escarro e/ou de sangue total coletando aproximadamente 3 a 5 mL em tubos contendo EDTA. Essas amostras foram coletadas em locais apropriados para cada tipo de amostra clínica, respectivamente, da Policlínica Cardoso Fontes, sendo analisadas por exames rotineiros. As coletas foram realizadas após consentimento dos indivíduos acometidos por Tb e contatos, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

As amostras de escarro foram encaminhadas ao laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e, as amostras de sangue foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia Molecular (LIM) do ICB-UFAM. As amostras de sangue no LIM foram registradas e codificadas e, na sequência, foram separados os plasmas em pelo menos 5 alíquotas e armazenados em freezer até o momento do uso para avaliação da concentração de citocinas, caso necessário. Do restante da amostra de sangue, foi coletada a camada de leucócitos (*buffy coat*) que é utilizada no processo de extração do DNA.

5.10. Exames bacteriológicos

As amostras de escarro foram submetidas a exames de microscopia, pela técnica de baciloscopia direta (Brasil, 2023a) ou baciloscopia pós-concentração (Salem *et al.*, 1990) e o cultivo foi feito pelo método de PKO (Petroff, Kudoh e Ogawa) (Salem *et al.*, 2007) na Policlínica Cardoso Fontes e/ou no Laboratório de Micobacteriologia do INPA, a fim de se identificar as micobactérias isoladas e permitir seu armazenamento.

5.11. Extração de DNA e Genotipagem de HLA

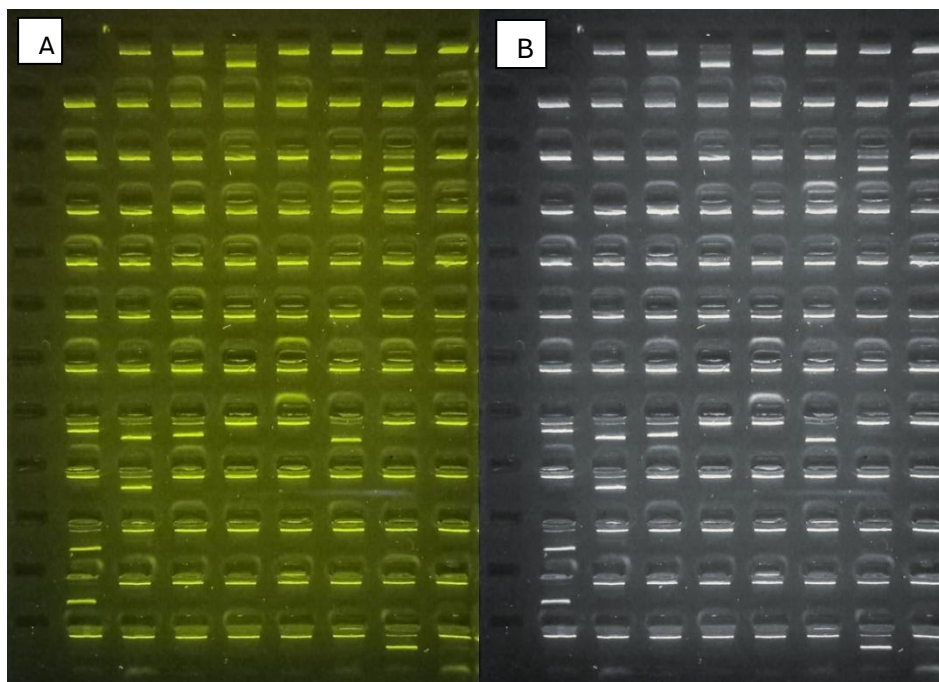
A extração de DNA foi feita pelo método descrito por Gustincich *et al.* (1991) com modificações (DTAB/CTAB). Após a extração, as amostras de DNA foram diluídas (1:10), quantificadas por espectrofotometria no Laboratório de Micobacteriologia, localizado no INPA. Após a quantificação, as amostras foram padronizadas na concentração de uso para realização dos experimentos e armazenadas na temperatura de -20°C, até o momento de uso.

A partir do DNA extraído, foi realizada a genotipagem genérica de HLA classe I e II (ABDR) por Sequence Specific Primer (SSP), de acordo com o fornecedor do kit de HLA One Lambda Inc. Esse kit oferece a possibilidade de identificar alelos de *HLA* classe I (*HLA-A*, *HLA-B*) e classe II (*HLA-DR*). A concentração utilizada de DNA foi de 100ng/μL. As condições de amplificação estão descritas no Quadro 1. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (2,5%), o corante utilizado foi o SYBR Green e visualizado no transiluminador de luz azul, conforme **Figura 7**. O controle interno de amplificação foi o gene da beta globina.

Quadro 1. Especificações da PCR para HLA.

Estágios	Condições de termociclagem
1	96 °C por 2 minuto e 10 segundos; 63 °C por 1 minuto (1 ciclo)
2	96 °C por 10 segundos; 63 °C por 1 minuto (9 ciclos)
3	96 °C por 10 segundos; 59 °C por 50 segundos; 72 °C por 30 segundos (20 ciclos)
4	“Hold” 4 °C

Figura 7. A. Produtos da PCR em gel de agarose a 2,5%, coradas com SYBR GREEN® visualizadas em transluminador de luz azul. B. Produtos da PCR da mesma amostra de DNA humano, registro em preto e branco.



Fonte: Arquivo pessoal.

5.12. Genotipagem de *TNFA* por qPCR

O ensaio de qPCR utilizou de sondas TaqMan para genotipagem de SNVs selecionados para o gene *TNFA*, em equipamento QuantStudio 3 Real-Time PCR (*Applied Biosystem*). Essa técnica é baseada no uso de sondas fluorescentes de hidrólise contendo sequências de ligação alelo-específicas que permitem caracterizar um alelo para um SNV específico em cada indivíduo.

Para isso, as sondas selecionadas para cada SNV do gene foram preparadas para a reação, com adição dos reagentes TaqMan Genotyping Master mix composto por dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), tampão, enzima DNA polimerase e o ROX (referência passiva responsável por conferir uma referência interna para reação necessária para corrigir variações de fluorescência devido mudanças de concentração e/ou volume causadas pela variação de pipetagem), DNA e água ultrapura para completar o volume final de 11µL na concentração e quantidade do **Quadro 2**, segundo recomendações do fabricante.

Quadro 2. Reagentes da qPCR para genotipagem.

Reagentes	Concentração utilizada	Quantidade utilizada em 1 reação (µL)
TaqMan Genotyping Master mix 2X	1X	5
Sonda 20X	0,5X	0,5
DNA	50ng/µl	1
Água ultrapura	1X	4,5
Volume total	-	11

Para cada microplaca de reação, foram incluídos um controle negativo e três controles positivos, sendo um para cada alelo homozigoto (referência e variante) e um para o alelo heterozigoto. Os controles positivos foram três amostras de DNA previamente analisados, a fim de possibilitar uma maior confiabilidade dos resultados. O controle negativo foi composto dos reagentes descritos anteriormente, porém, sem a adição de DNA, para garantir que não houve contaminação das amostras analisadas. A reação foi então realizada em placas de 96 poços.

As características das sondas alelo-específicas sintetizadas pela *Thermo Fisher Scientific* que foram utilizadas para os ensaios de genotipagem por qPCR e as condições de amplificação estão apresentadas nos quadros abaixo (**Quadros 3 e 4**, respectivamente).

Quadro 3. Dados das sondas para *TNFA*.

Gene	ID SNV	Localização cromossômica	Sequência da sonda 5'-[VIC/FAM] -3'	Alelo REF>Alelo VAR	Tipo de variante	ID ensaio	MAF Global
<i>TNFA</i>	rs1799964	6:31574531	GGAAGCAAAGGAG AAGCTGAGAAGA [C/T]GAAGGAAAA GTCAGGGTCTGGA GGG	T>C	substituição de transição	C__7514 871_10	C:0,20
<i>TNFA</i>	rs1800610	6:31576050	TAGGGAGGGATGG AGAGAAAAAAC [G/A]TGGAGAAAG ACGGGGATGCAGA AAG	G>A	substituição de transição	C__11918 224_10	A:0,10

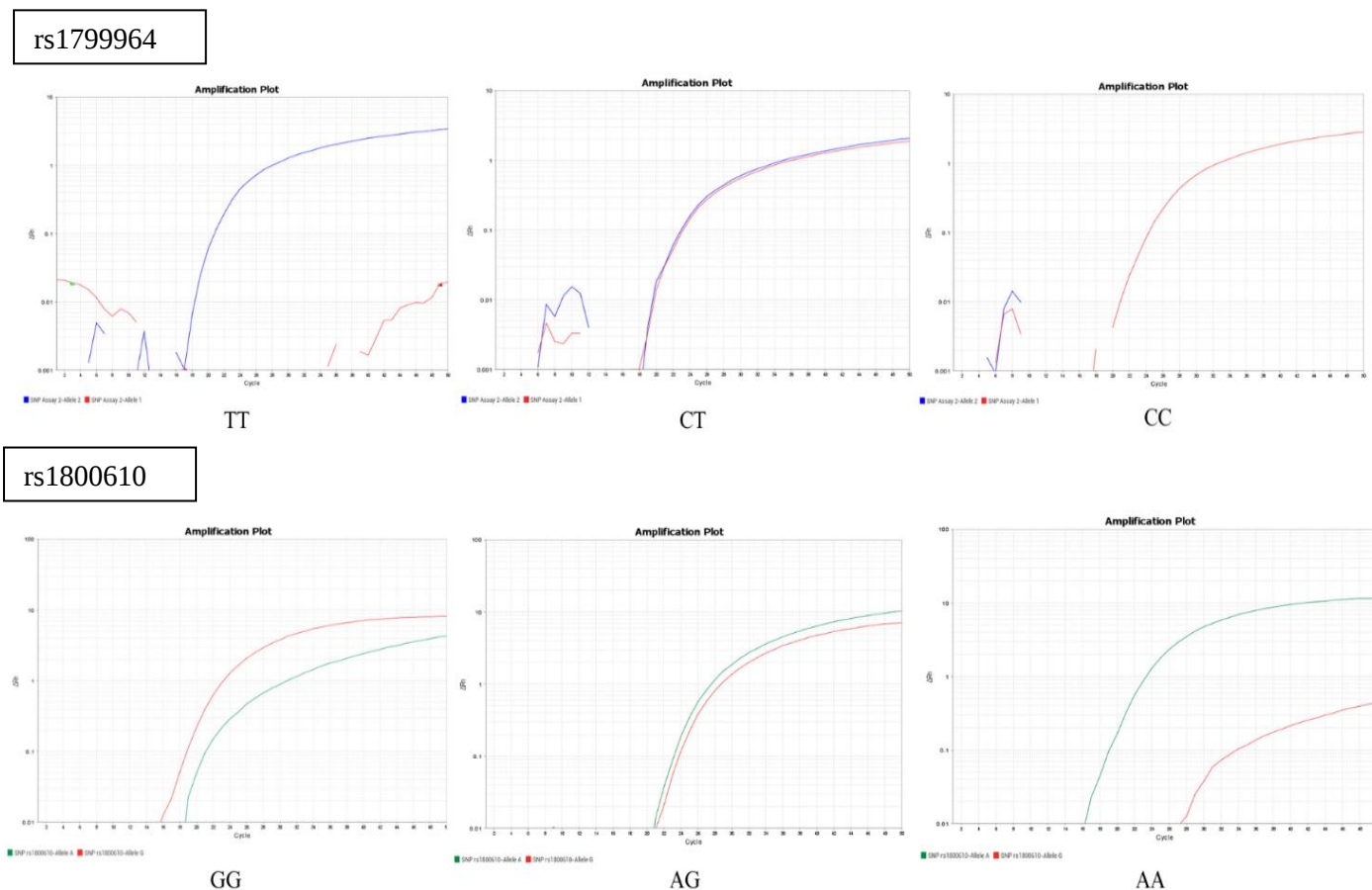
Legenda: ID SNV: Identificação da variante de nucleotídeo único; alelo REF: alelo referente; alelo VAR: alelo variante; ID ensaio: identificação disponível na Thermo Fisher Scientific.

Quadro 4. Parâmetros de termociclagem para qPCR.

Estágios	Condições de termociclagem
<i>Hold stage</i>	95 °C por 10 minutos (1 ciclo)
<i>PCR stage</i>	95 °C por 15 segundos (50 ciclos)
<i>PCR stage</i>	60 °C por 1 minuto (50 ciclos)
<i>Post-read stage</i>	60 °C por 30 segundos (1 ciclo)

O programa QuantStudio Design & Analysis Software versão 1.5.0 foi utilizado para interpretação dos resultados conforme a curva de amplificação gerada para identificar os genótipos. Os genótipos foram classificados como homozigoto para o alelo de referência, homozigoto para o alelo variante ou heterozigoto. As curvas de amplificação obtidas a partir das genotipagens por qPCR para os SNVs rs1799964 e rs1800610 do gene *TNFA* estão exemplificadas na **Figura 8**.

Figura 8. Curvas de amplificação geradas por qPCR com as amostras de DNA de indivíduos com Tb e controles para os SNVs de *TNFA* selecionados.



5.13. Análise estatística

A priori, foi realizada uma análise estatística descritiva dos dados obtidos nos grupos controle (contatos) e indivíduos com Tb, considerando as variáveis, idade, sexo, vacinação por BCG, naturalidade, tabagismo e etilismo.

Para análise dos SNVs, foi utilizado o programa R versão 4.4.2, pacote SNPassoc, versão 1.9-2, para avaliar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na população de estudo e para as análises de associação de genótipos. O programa Haploview foi utilizado para avaliar frequência, análise de haplótipos e desequilíbrio de ligação.

A análise de associação foi realizada em cinco modelos genéticos: codominante, dominante, recessivo, overdominante e log-additive. Para cada SNV, foi apresentado o melhor modelo genético segundo os critérios de AIC (Critério de Informação de Akaike). Foi adotado um limiar significativo de $p < 0,05$.

Para análise de alelos, tanto de HLA quanto de SNVs, de forma adicional, o teste χ^2 (qui quadrado) foi utilizado no programa GrahPadPrism® versão 10.1.2, a fim de garantir a confiabilidade dos dados.

5.14. Apoio financeiro

Este projeto teve apoio financeiro da FAPEAM, Programa Amazônidas, Edital N°. 002/2021, Laboratório de Imunologia Molecular (LIM), Laboratório de Micobacteriologia do INPA, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da UFAM (PPGIBA/UFAM).

Resultados e Discussão

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram coletadas 981 amostras para os ensaios de qPCR, das quais 913 foram incluídas e 29 amostras foram excluídas durante a execução do projeto, por não se enquadrarem em um dos critérios estabelecidos para o estudo, por exemplo, ter sido isolado no cultivo espécies não pertencentes as micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). Outras 39 amostras foram excluídas da análise, nas quais não foi possível obter o resultado de genotipagem, pois a amplificação não foi detectada em ambas as sondas (rs1799964 e rs1800610). Das 913 amostras, 355 correspondem a indivíduos com Tb pulmonar (TbP), 86 a Tb extrapulmonar (TbE) (**Quadro 5**) e 472 controles.

Das amostras, foram realizadas a genotipagem de HLA de 61 pacientes, sendo 51 TbP e 10 TbE (**Quadro 5**), além da genotipagem de 87 controles. Devido os genes de HLA serem codominantes, resultou-se um quantitativo de 122 alelos de pacientes e 174 alelos de controle.

Quadro 5. Formas clínicas de TbE recrutados para análise de SNVs do *TNFA* e HLA.

Forma clínica TbE	SNVs <i>TNFA</i> , n (%) n= 86	HLA, n (%) n=10
Pleural	60 (70%)	7 (70%)
Ganglionar	20 (23%)	2 (20%)
Outros	6 (7%)	1 (10%)

Devido as amostras TbE serem de quantidade diminuta nas análises de HLA e SNVs, essas amostras foram agrupadas para análise de associação com amostras TbP, formando o grupo: indivíduos com Tb. Levou-se em conta que, apesar de a TbE possuir suas particularidades, todo caso de Tb inicia-se pela forma pulmonar.

6.1. Características gerais da população de estudo

As variáveis consideradas para análise foram sexo, idade, naturalidade, vacinação por BCG, tabagismo e etilismo. Os resultados encontrados estão descritos na **Tabela 1**. O sexo masculino foi a maioria no grupo dos indivíduos com Tb, representando 58%. No boletim epidemiológico de março de 2024, publicado pelo Ministério da Saúde, 69,2% dos casos de Tb foram do sexo masculino no Brasil, e 63,3% na cidade de Manaus (Brasil, 2024a). Para a variável idade, a média foi em torno de 40 anos para os indivíduos com Tb e 32 anos para os controles. A Tb pode acometer qualquer pessoa, independente de sexo e idade, porém, a maioria dos casos ocorrem em homens adultos, numa faixa etária produtiva de trabalho. Essa proporção

é consistente com as evidências dos inquéritos de prevalência da Tb, que mostram que as lacunas nos casos de detecção e notificação são maiores entre os homens (WHO, 2024).

Tabela 1. Descrição de características avaliadas na população de indivíduos com Tb e grupo controle.

Variáveis	Indivíduos com Tb	Controles	OR	IC95%	Valor- <i>p</i>
Sexo	n =438	n =468			
Masculino, n (%)	255 (58%)	241 (51%)	1,32	1,01 – 1,71	0,0456
Feminino, n (%)	183 (42%)	227 (49%)			
Idade (anos), (M^a e (SD^b))	40,05±13,30	32,46±11,53	-	-	<0,0001
Naturalidade	n =411	n =300			
Manaus, n (%)	220 (54%)	197 (65%)			
Outros municípios AM, n (%)	139 (34%)	62 (21%)		NA	
Outros Estados, n (%)	52 (13%)	41 (14%)			
Vacina BCG	n =333	n =269			
Sim, n (%)	284 (85%)	256 (95%)	0,29	0,15 – 0,55	0,0001
Não, n (%)	49 (15%)	13 (5%)			
Tabagismo	n =319	n =269			
Sim, n (%)	74 (23%)	30 (11%)	2,32	1,47 – 3,72	0,0003
Não, n (%)	245 (77%)	239 (89%)			
Etilismo	n =235	n =247			
Sim, n (%)	93 (40%)	55 (23%)	2,24	1,50 – 3,34	<0,0001
Não, n (%)	142 (60%)	192 (77%)			

Legenda: M^a = Média; SD^b = Standart deviation; AM = Amazonas; NA = Não avaliado. Para as análises de associação do sexo entre os grupos estudados, foi aplicado o teste de χ^2 (qui quadrado) com correção de Yates. Para análise de idade foi utilizado o teste t student não paramétrico. Valores de *p* igual ou inferior a 0,05 (5%) foram considerados significativos e destacados em negrito, odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Na variável naturalidade, a maioria foi da capital Manaus (54% dos casos e 65% dos controles), resultado já esperado, devido ao local de coleta das amostras para esse estudo, bem como as altas taxas da Tb na cidade de Manaus (113,2 casos de Tb/100 mil habitantes) (Brasil, 2024a).

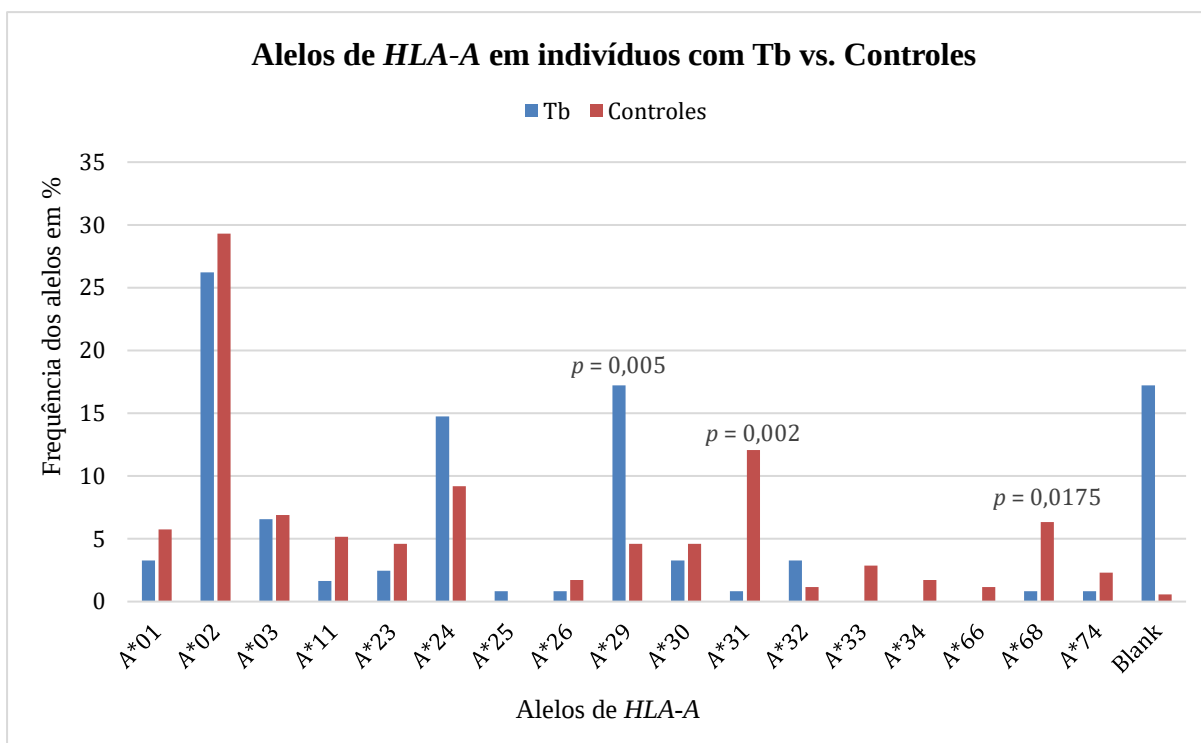
Referente a vacinação por BCG, a maioria dos indivíduos foram vacinados (85% dos casos e 95% dos controles). A BCG pode conferir proteção, especialmente contra as formas mais graves da Tb em crianças e faz parte do programa de imunização como uma vacina obrigatória no Brasil, sendo aplicada em dose única na infância segundo a OMS. Além disso, tem sido publicado que a vacina por BCG poderia também evitar a progressão de infecção para doença ativa (Pereira *et al.*, 2007).

Adicionalmente, foi observado que a maioria dos indivíduos não relatou hábitos como tabagismo e etilismo (**Tabela 1**). Sabe-se que o consumo de cigarros, álcool e outros entorpecentes está associado a um desfecho desfavorável nos casos de Tb, uma vez que o consumo altera significativamente a resposta imune, podendo também estar relacionado a danos ao fígado, deficiência nutricional, ou a fatores sociais (De Oliveira *et al.*, 2020).

6.2. Frequência e análise dos alelos de *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB*

Referente à distribuição dos alelos de *HLA-A*, os alelos com frequência superior a 10% no grupo de indivíduos com Tb (TbP e TbE) foram *HLA-A*02*, *HLA-A*24* e *HLA-A*29*, enquanto no grupo controle foram os alelos *HLA-A*02* e *HLA-A*31* (**Figura 9**).

Figura 9. Distribuição dos tipos de alelos *HLA-A* e frequências (%) de indivíduos com Tb e controles.



As frequências de alelo superiores a 20% podem ser consideradas elevadas, visto o grande polimorfismo existente no sistema HLA. Nesse aspecto, o *HLA-A*02* se mostrou mais frequente nas populações de estudo, com 26,23% de prevalência no grupo Tb e 29,31% no grupo controle. Esse dado é compatível com um estudo que apontou o *HLA-A*02* como um dos alelos mais comuns na população humana, variando de 10-40% de prevalência em diferentes lugares do mundo (Khazei *et al.*, 2007). Foram observadas associações significativas para três alelos na população de estudo, no qual o alelo *HLA-A*29* apresentou possível associação com a suscetibilidade para Tb ($p= 0,0005$; OR= 4,31; IC95%= 1,869 – 9,504). Os alelos *HLA-A*31* e *HLA-A*68*, por sua vez, apresentaram possível associação com proteção ($p= 0,0002$; OR= 0,06; IC95%= 0,0057 – 0,3384; e $p= 0,0175$; OR= 0,122; IC95%= 0,0112 – 0,6990, respectivamente) (**Tabela 2**).

Em contrapartida, há possível associação com risco de desenvolvimento de Tb em brasileiros com HIV que apresentaram o alelo *HLA-A*31* em um estudo realizado por Figueiredo e colaboradores em 2008. O *HLA-A*68*, no entanto, foi associado à proteção contra a conversão imune do teste cutâneo de tuberculina (TST) em indivíduos sul africanos que tiveram contato domiciliar com Tb, mas permaneceram livres da doença ($p= 0,007$), o que sugere um papel protetor contra a infecção por Tb (Seedat *et al.*, 2021).

Tabela 2. Frequência dos alelos de *HLA-A* encontrados em indivíduos com Tb (n=61) e controles (n=87) e resultado da análise de dados.

<i>HLA-A*</i>	Tb		Controles		Tb vs. Controle		
	n=61	%	n=87	%	OR	IC95%	Valor-p
<i>A*01</i>	4	3,28	10	5,75	0,555	0,1884 – 1,688	0,410
<i>A*02</i>	32	26,23	51	29,31	0,857	0,5156 – 1,435	0,600
<i>A*03</i>	8	6,56	12	6,90	0,947	0,3862 – 2,265	>0,999
<i>A*11</i>	2	1,64	9	5,17	0,305	0,0654 – 1,194	0,132
<i>A*23</i>	3	2,46	8	4,60	0,523	0,1478 – 1,747	0,534
<i>A*24</i>	18	14,75	16	9,20	1,709	0,8557 – 3,446	0,144
<i>A*25</i>	1	0,82	0	0,0	+infinito	0,1585 – +infinito	0,412
<i>A*26</i>	1	0,82	3	1,72	0,471	0,0360 – 3,196	0,645
<i>A*29</i>	21	17,21	8	4,60	4,314	1,869 – 9,504	0,0005
<i>A*30</i>	4	3,28	8	4,60	0,703	0,2311 – 2,274	0,766
<i>A*31</i>	1	0,82	21	12,07	0,0602	0,0057 – 0,3384	0,0002
<i>A*32</i>	4	2,28	2	1,15	2,915	0,6681 – 15,47	0,233
<i>A*33</i>	0	0,0	5	2,87	0	0,000 – 0,9518	0,079
<i>A*34</i>	0	0,0	3	1,72	0	0,000 – 1,640	0,270
<i>A*36</i>	0	0,0	0	0,0	-	-	-
<i>A*43</i>	0	0,0	0	0,0	-	-	-
<i>A*66</i>	0	0,0	2	1,15	0	0,000 – 3,081	0,513
<i>A*68</i>	1	0,82	11	6,32	0,1225	0,0112 – 0,6990	0,0175
<i>A*69</i>	0	0,0	0	0,0	-	-	-
<i>A*74</i>	1	0,82	4	2,30	0,351	0,0285 – 2,159	0,652
<i>A*80</i>	0	0,0	0	0,0	-	-	-
Blank	21	17,21	1	0,57	35,97	6,367 – 376,2	<0,0001
Total	122	100	174	100			

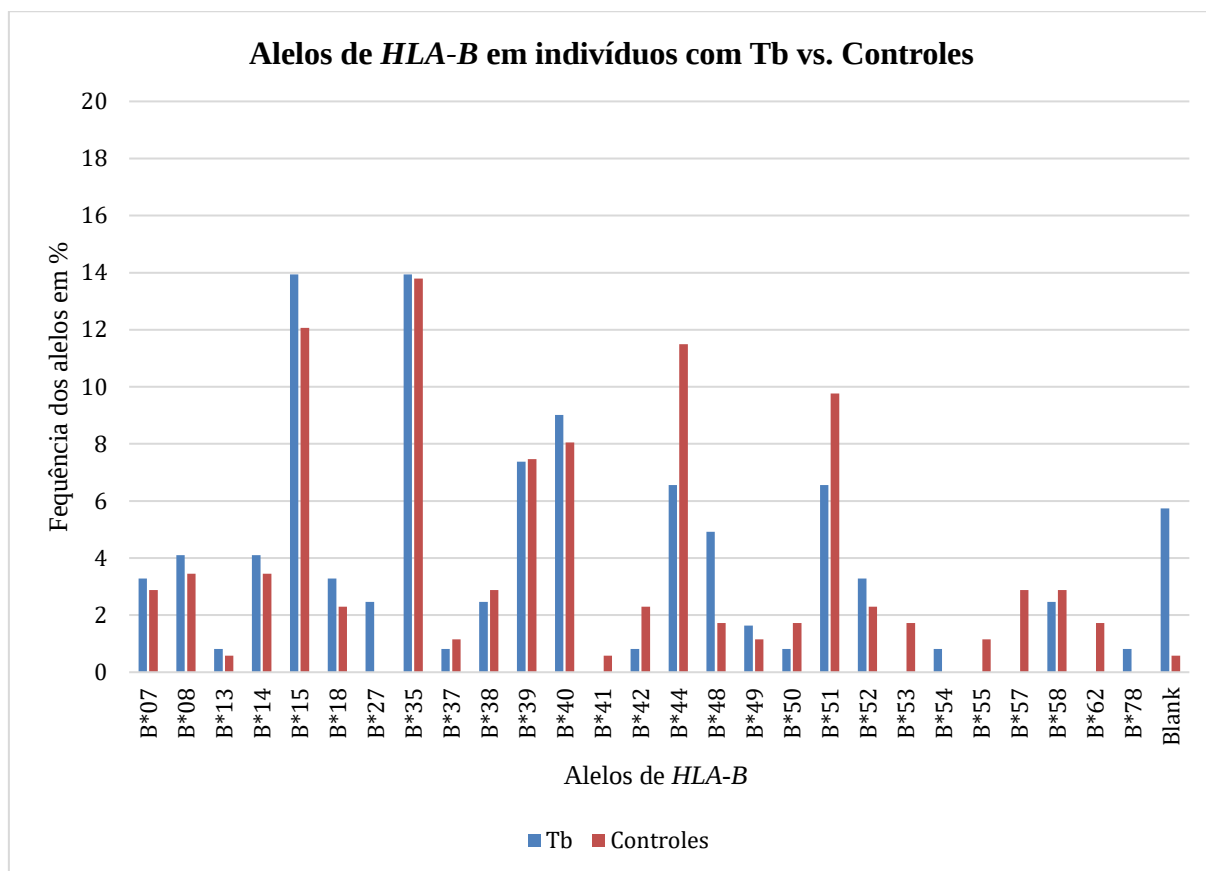
O teste aplicado para esta análise é o χ^2 (qui quadrado) com correção de Yates ou teste exato de Fisher, dependendo da natureza dos dados. O valor adotado como significativo foi *p* igual ou inferior a 0,05 (5%).

Informações adicionais: Os genes de HLA são codominantes, cada indivíduo expressará 2 alelos diferentes para cada tipo de HLA, por isso, o total de alelos é o dobro do número de indivíduos e controles.

A denominação “*Blank*” é utilizada quando o segundo alelo não é identificado, provavelmente pela presença de homozigose ou por ser um alelo novo, no qual não foi possível ser identificado com os *primers* utilizados. Para identificação dos homozigotos, os pais biológicos dos participantes teriam que ser genotipados.

Quanto aos alelos do *HLA-B*, os de frequência maior que 10% foram *HLA-B*15*, *HLA-B*35* no grupo Tb e *HLA-B*15*, *HLA-B*35* e *HLA-B*44* no grupo controle (**Figura 10**).

Figura 10. Distribuição dos alelos de *HLA-B* e frequência (%) entre de indivíduos com Tb e controles.



O *HLA-B* é o que possui a maior quantidade de variações do sistema HLA. Em um estudo de análise da distribuição de alelos *HLA-B* em populações de cinco continentes realizado por Williams *et al.* (2001), a maior variação foi detectada em amostras brasileiras, possivelmente, um reflexo de miscigenações de grupos étnicos ocorridas no passado.

De fato, os alelos *HLA-B*15*, *HLA-B*35* e *HLA-B*44* foram frequentes em um estudo realizado no Rio de Janeiro em indivíduos com Tb, HIV e com síndrome inflamatória de reconstituição imune (IRIS) (De Sá *et al.*, 2020). Um dos primeiros estudos de associação do HLA com a Tb identificou o *HLA-B*15* associado à suscetibilidade em negros norte-americanos (Al-Arif *et al.*, 1979) e em outras populações como a Chinesa, enquanto o *HLA-B*35* foi mais frequente em controles no estudo que avaliou a frequência dos alelos de classe I em indivíduos com TbP da cidade de Baghdad (Manhal, 2009). No entanto, resultados diferentes foram observados para o alelo *HLA-B*35* em outras populações estudadas como a Mexicana, na qual sua frequência foi maior em indivíduos com TbP (Soto *et al.*, 2007).

O alelo *HLA-B*51* também demonstrou associação com a Tb, sendo considerado um importante alvo terapêutico em previsões de *docking* por fazer boa ligação com o antígeno de membrana (Rv3083) de *M. tuberculosis* (Wamala *et al.*, 2015). Já o *HLA-B*44* encontrado

principalmente em controles foi associado principalmente à proteção contra *M. tuberculosis* e suscetibilidade à artrite de Takayasu (Soto *et al.*, 2007). Ainda assim, ao analisar os alelos *HLA-B* na população do presente estudo, associações não foram encontradas.

Nesse estudo, o *HLA-B*57* foi o mais próximo de alcançar significância estatística ($p=0,079$), ainda que não tenha apresentado frequência $<10\%$, como consta na **Tabela 3**. Em um ensaio realizado na Índia, o *HLA-B*57* foi associado à proteção, estando mais presentes em mulheres que convivem com HIV e que não desenvolveram Tb ($p = 0,0046$) (Jagannathan *et al.*, 2011). Este alelo é também capaz de se ligar a epítomos Gag imunodominantes e mutações nesses epítomos virais levarão à replicação reduzida do HIV (Raghavan, Alagarasu e Selvaraj, 2012).

Tabela 3. Frequência dos alelos de *HLA-B* encontrados em indivíduos com Tb (n=61) e controles (n=87) e resultado da análise de dados.

	Tb		Controles		Tb vs. Controle		
<i>HLA-B*</i>	n=61	%	n=87	%	OR	IC95%	Valor-p
<i>B*07</i>	4	3,28	5	2,87	1,146	0,3453 – 3,901	>0,999
<i>B*08</i>	5	4,10	6	3,45	1,197	0,4055 – 4,165	0,765
<i>B*13</i>	1	0,82	1	0,57	1,43	0,0767 – 27,30	>0,999
<i>B*14</i>	5	4,10	6	3,45	1,197	0,4055 – 4,165	0,765
<i>B*15</i>	17	13,93	21	12,07	1,18	0,5924 – 2,311	0,724
<i>B*18</i>	4	3,28	4	2,30	1,441	0,4120 – 5,025	0,721
<i>B*27</i>	3	2,46	0	0,0	+infinito	1,247 – +infinito	0,069
<i>B*35</i>	17	13,93	24	13,79	1,012	0,5064 – 2,013	>0,999
<i>B*37</i>	1	0,82	2	1,15	0,710	0,0486 – 6,174	>0,999
<i>B*38</i>	3	2,46	5	2,87	0,852	0,2222 – 3,288	>0,999
<i>B*39</i>	9	7,38	13	7,47	0,986	0,4065 – 2,434	>0,999
<i>B*40</i>	11	9,02	14	8,05	1,133	0,5191 – 2,523	0,427
<i>B*41</i>	0	0,0	1	0,57	0	0,000 – 12,84	>0,999
<i>B*42</i>	1	0,82	4	2,30	0,351	0,0285 – 2,159	0,652
<i>B*44</i>	8	6,56	20	11,49	0,540	0,2434 – 1,261	0,164
<i>B*45</i>	0	0,0	0	0,0	-	-	>0,999
<i>B*46</i>	0	0,0	0	0,0	-	-	>0,999
<i>B*47</i>	0	0,0	0	0,0	-	-	>0,999
<i>B*48</i>	6	4,92	3	1,72	2,948	0,7611 – 10,90	0,168

B*49	2	1,64	2	1,15	1,433	0,2218 – 9,240	>0,999
B*50	1	0,82	3	1,72	0,471	0,0360 – 3,196	0,645
B*51	8	6,56	17	9,77	0,648	0,2840 – 1,473	0,398
B*52	4	3,28	4	2,30	1,441	0,4120 – 5,025	0,721
B*53	0	0,0	3	1,72	0	0,000 – 1,640	0,270
B*54	1	0,82	0	0,0	+infinito	0,1585 – +infinito	0,412
B*55	0	0,0	2	1,15	0	0,000 – 3,687	0,532
B*56	0	0,0	0	0,0	-	-	>0,999
B*57	0	0,0	5	2,87	0	0,000 – 0,9518	0,079
B*58	2	2,46	5	2,87	0,563	0,1107 – 2,680	0,703
B*59	0	0,0	0	0,0	-	-	>0,999
B*62	0	0,0	3	1,72	0	0,000 – 1,640	0,270
B*67	0	0,0	0	0,0	-	-	>0,999
B*73	0	0,0	0	0,0	-	-	>0,999
B*78	1	0,82	0	0,0	+infinito	0,1585 – +infinito	0,412
B*81	0	0,0	0	0,0	-	-	>0,999
B*82	0	0,0	0	0,0	-	-	>0,999
B*83	0	0,0	0	0,0	-	-	>0,999
Blank	7	5,74	1	0,57	10,53	1,711 – 119,3	0,0095
Total	122	100	174	100			

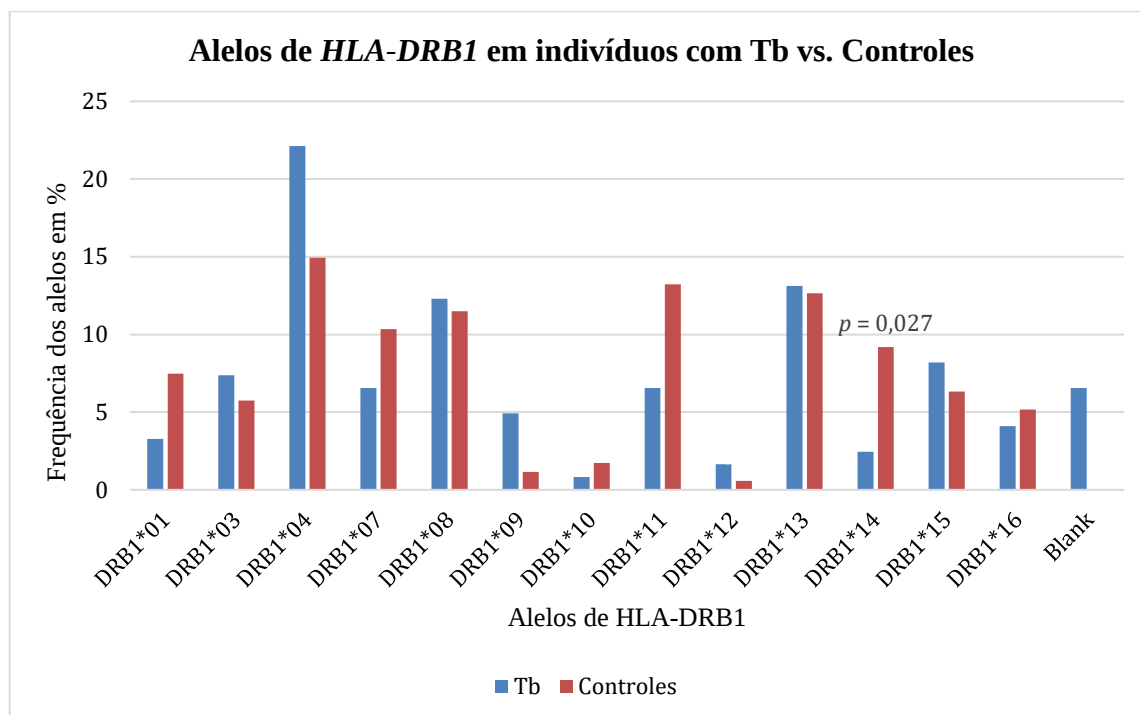
O teste aplicado para esta análise é o χ^2 (qui quadrado) com correção de Yates ou teste exato de Fisher, dependendo da natureza dos dados. O valor adotado como significativo foi p igual ou inferior a 0,05 (5%).

Informações adicionais: Os genes de HLA são codominantes, cada indivíduo expressará 2 alelos diferentes para cada tipo de HLA, por isso, o total de alelos é o dobro do número de indivíduos e controles.

A denominação “*Blank*” é utilizada quando o segundo alelo não é identificado, provavelmente pela presença de homozigose ou por ser um alelo novo, no qual não foi possível ser identificado com os *primers* utilizados. Para identificação dos homozigotos, os pais biológicos dos participantes teriam que ser genotipados.

Dentre os alelos *HLA-DR*, os mais frequentes (a partir de 10%) no grupo Tb foram *HLA-DRB1*04*, *HLA-DRB1*08* e *HLA-DRB1*13* e, entre os controles, foram os alelos *HLA-DRB1*04*, *HLA-DRB1*07*, *HLA-DRB1*08*, *HLA-DRB1*11* e *HLA-DRB1*13*. Entre esses alelos, foi observada frequência superior a 20% no alelo *HLA-DRB1*04* nos indivíduos com Tb (**Figura 11**).

Figura 11. Distribuição dos alelos de *HLA-DRB* e frequência (%) entre de indivíduos com Tb e controles.



O *HLA-DRB1*04* já foi relacionado anteriormente com o risco de desenvolver Tb na população amazonense (OR= 2.94; $p < 0.0001$) (Souza de Lima *et al.*, 2016). Apesar de não apresentar associação estatística significativa nesse estudo, o alelo permanece com frequência elevada. Sua relação com a Tb também foi observada em uma meta-análise que apontou os alelos *HLA-DRB1*04*, *HLA-DRB1*09*, *HLA-DRB1*10*, *HLA-DRB1*11*, *HLA-DRB1*15* e *HLA-DRB1*16* como fatores de risco para o desenvolvimento da Tb, enquanto os alelos *HLA-DRB1*08* e *HLA-DRB1*13* não tiveram associação detectada, ainda que o *HLA-DRB1*08* tenha sido relacionado à suscetibilidade em outros estudos, bem como a uma menor produção de IFN- γ (Tong *et al.*, 2015; Oliveira-Cortez *et al.*, 2016; Dheenadhayalan *et al.*, 2001.).

O *HLA-DRB1*11*, apesar de mais frequente nos controles desse estudo, foi também associado a possível suscetibilidade à Tb em haplótipos que continham o alelo em um estudo realizado na população africana (Lombard *et al.*, 2006). Porém esse alelo foi também relacionado à incidência reduzida de TbP na população asiática (Li *et al.*, 2015).

Em um estudo de revisão sistemática e meta-análise em populações caucasianas e asiáticas, o alelo *HLA-DRB1*07* indicou uma possível associação para proteção contra TbP ($p = 0,03$; OR= 0,74; IC95%= 0,56 – 0,97), apesar de perder a associação na análise por subgrupos e etnias (Oliveira-Cortez *et al.*, 2016).

Ainda que não possua frequência superior a 10%, o alelo *HLA-DRB1*14* apresentou nesse estudo possível associação com proteção ($p= 0,027$; $OR= 0,248$; $IC95\%= 0,0756 - 0,8162$), como apresentado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Frequência dos alelos de *HLA-DRB* encontrados em indivíduos com Tb (n=61) e controles (n=87) e resultado da análise de dados.

	Tb		Controles		Tb vs. Controle		
<i>HLA-DRB*</i>	n=61	%	n=87	%	OR	IC95%	Valor-p
<i>DRB1*01</i>	4	3,28	13	7,47	0,419	0,146 – 1,283	0,203
<i>DRB1*03</i>	9	7,38	10	5,75	1,306	0,541 – 3,379	0,633
<i>DRB1*04</i>	27	22,13	26	14,94	1,618	0,877 – 2,998	0,124
<i>DRB1*07</i>	8	6,56	18	10,34	0,608	0,269 – 1,475	0,301
<i>DRB1*08</i>	15	12,30	20	11,49	1,079	0,529 – 2,222	0,856
<i>DRB1*09</i>	6	4,92	2	1,15	4,448	1,067 – 21,89	0,068
<i>DRB1*10</i>	1	0,82	3	1,72	0,4711	0,036 – 3,196	0,645
<i>DRB1*11</i>	8	6,56	23	13,22	0,460	0,211 – 1,031	0,082
<i>DRB1*12</i>	2	1,64	1	0,57	2,883	0,373 – 42	0,570
<i>DRB1*13</i>	16	13,11	22	12,64	1,043	0,5382 – 2,040	>0,999
<i>DRB1*14</i>	3	2,46	16	9,20	0,248	0,0756 – 0,8162	0,027
<i>DRB1*15</i>	10	8,20	11	6,32	1,323	0,5412 – 3,102	0,646
<i>DRB1*16</i>	5	4,10	9	5,17	0,783	0,2880 – 2,306	0,785
Blank	8	6,56	0	0	+infinito	3,288 – +infinito	0,0007
Total	122	100	174	100			

O teste aplicado para esta análise é o χ^2 (qui quadrado) com correção de Yates ou teste exato de Fisher, dependendo da natureza dos dados. O valor adotado como significativo foi p igual ou inferior a 0,05 (5%).

Informações adicionais: Os genes de HLA são codominantes, cada indivíduo expressará 2 alelos diferentes para cada tipo de HLA, por isso, o total de alelos é o dobro do número de indivíduos e controles.

A denominação “Blank” é utilizada quando o segundo alelo não é identificado, provavelmente pela presença de homozigose ou por ser um alelo novo, no qual não foi possível ser identificado com os *primers* utilizados. Para identificação dos homozigotos, os pais biológicos dos participantes teriam que ser genotipados.

O *HLA-DRB1*14* foi também associado à proteção ao se analisar marcadores de predisposição genética para Tb, HIV-1 e coinfeção HIV-1/TB em um estudo de coorte na Letônia (Soha *et al.*, 2024). Contudo, há um estudo na população da Polônia que mostra que a presença do alelo no haplótipo *DRB1*14–DQB1*05* está associada com o risco para Tb (Dubaniewicz, Moszowska e Szczerkowska, 2005).

6.3. Resultado da associação dos SNVs de *TNFA* selecionados

Nas análises de associação genética apresentadas, foram realizadas comparações entre o grupo de indivíduos com TbP e TbE (Grupo Tb) e controles para os SNVs rs1799964 e 1800610 presentes no gene *TNFA*. Através das análises, observou-se que para as duas variantes as frequências genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências genotípicas e alélicas bem como os principais resultados das análises de associação dos SNVs selecionados no melhor modelo genético e após ajustes de sexo e idade estão compilados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Frequências genotípicas e alélicas e resultados da análise de associação dos SNVs de *TNFA* selecionados no melhor modelo genético e após os ajustes com as variáveis sexo e idade.

Gene ID SNV	Genótipos Alelos	Tb n%	Controles n%	Tb vs. Controles			
		n=438	n=472	Valor- <i>p</i> (mod)	OR (95%IC)	<i>p</i> adj (mod)	OR adj (mod)
<i>TNFA</i> rs1799964	TT	260 (0,594)	265 (0,561)	0,212 (O)	0,84 (0,64 - 1,10)	0,289 (O)	0,85 (0,62 – 1,15)
	CT	146 (0,333)	176 (0,373)				
	CC	32 (0,073)	31 (0,066)				
	T	666 (0,761)	706 (0,748)	<i>p</i> -EHW=0,1798			
	C	210 (0,239)	238 (0,252)				
<i>TNFA</i> rs1800610	GG	299 (0,692)	349 (0,752)	0,029 (O)	1,40 (1,03 – 1,90)	0,107 (D)	1,31 (0,94 – 1,83)
	AG	122 (0,276)	101 (0,218)				
	AA	14 (0,032)	14 (0,030)				
	G	720 (0,828)	799 (0,861)	<i>p</i> -EHW=0,1254			
	A	150 (0,172)	129 (0,139)				

Legenda: ID SNV de *TNFA*: identificação da variante de nucleotídeo único; Tb: tuberculose; *p*-EHW: valor *p* do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Mod: Modelos genéticos. C: codominante; D: dominante, R: recessivo; O: overdominante; LAdd: Log-Additive. Valores *p*<0,05 foram considerados significativos e destacados em negrito, odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%). Valor *p* adj: valor de *p* e OR adj: valores após os ajustes considerando as variáveis sexo e idade

Um dado importante fornecido por estudos de associação genética é a frequência do alelo menor (MAF= *Minor Allele Frequency*), por permitir a visualização de possíveis alelos raros e/ou frequentes em uma população (NCBI, 2023). O banco de dados *Ensembl Genome* avalia dados da população geral, não havendo distinção de casos e controles. Com isso, o alelo de menor frequência para o rs1799964, do gene de *TNFA*, foi o C, com resultado comparável a da frequência observada nas populações das Américas (MAF C= 0,22), especificamente na subpopulação mexicana (MAF C= 0,25). Ao passo que para o rs1800610 o alelo A teve a frequência semelhante a população do Leste Asiático (MAF A= 0,14) (**Tabela 6**).

Tabela 6. Comparação entre as frequências dos alelos dos rs1799964 e rs1800610 de *TNFA* da população controle em relação às outras populações globais.

Gene ID SNV	População de estudo			Populações globais					
	Valor <i>p</i> -EHW	Alelos	Controles	Global	Américas	África	Leste Asiático	Europa	Sul Asiático
<i>TNFA</i> rs1799964	0,8074	T	0,748	0,78	0,78	0,85	0,80	0,79	0,65
		C	0,252	0,22	0,22	0,15	0,20	0,21	0,35
<i>TNFA</i> rs1800610	0,0533	G	0,861	0,90	0,82	0,98	0,86	0,91	0,88
		A	0,139	0,10	0,18	0,02	0,14	0,09	0,12

Legenda: ID SNV: identificação da variante de nucleotídeo único; *p*-EHW: valor *p* do Equilíbrio de HardyWeinberg. Os dados de frequência dos alelos Global, das Américas, África, Leste Asiático, Europa e Sul Asiático foram extraídos do banco de dados do Ensembl Genome: www.ensembl.org

6.3.1. Análise de associação do SNV rs1799964 para o gene *TNFA*

O SNV rs1799964 (−1031T>C) está presente na região exônica do gene. Nas análises dessa variante não foram encontradas associações estatisticamente significativas (**Tabela 7**). Em relação à distribuição das frequências genotípicas em ambos os grupos avaliados, o genótipo homozigoto para o alelo de referência TT foi mais frequente (Tb= 0,59 e Controles= 0,56). O genótipo de menor frequência em ambos os grupos, por sua vez, foi para os homozigotos do alelo variante CC (Tb= 0,07 e Controles= 0,07).

Tabela 7. Análise do SNV rs1799964 de *TNFA* entre indivíduos com Tb vs. Controles nos modelos genéticos.

<i>TNFA</i> Modelo genético	Tb n%	Controles n%	Valor- <i>p</i>	OR (IC95%)	AIC
Codominante	n=438	n=472			
TT	260 (0,594)	265 (0,561)			
CT	146 (0,333)	176 (0,373)	0,451	0,85 (0,64 – 1,12)	1264,7
CC	32 (0,073)	31 (0,066)		1,05 (0,62 – 1,77)	
Dominante					
TT	260 (0,594)	265 (0,561)			
CT-CC	178 (0,406)	207 (0,439)	0,326	0,88 (0,67 – 1,14)	1263,3
Recessivo					
TT-CT	406 (0,927)	441 (0,934)			
CC	32 (0,073)	31 (0,066)	0,661	1,12 (0,67 – 1,87)	1264,1
Overdominante					
TT-CC	292 (0,667)	296 (0,627)			
CT	146 (0,333)	176 (0,373)	0,212	0,84 (0,64 – 1,10)	1262,7
Log-Additive					
0,1,2	438 (0,481)	472 (0,519)	0,549	0,94 (0,76 – 1,16)	1263,9

Legenda: Tb: tuberculose; AIC: critério de Informação de Akaike; Valor-*p*: valor de *p*. Valores *p*<0,05 foram considerados significativos e destacados em negrito, OR: odds ratio; e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Apesar das análises não indicarem associação, o rs1799964 já foi apresentado como fator de risco para suscetibilidade à Tb para indivíduos portadores do alelo variante C em um estudo realizado na população Han (*p*= 0,017; OR= 1,33; IC95%= 1,05–1,68) e vietnamita (*p*= 0,004; OR= 1,40; IC95%= 1,11–1,76) (Wu *et al.*, 2019). A presença do alelo variante C também foi tida como fator de risco para associação à resistência à medicamentos na Tb (TC+CC vs TT, OR= 4,037, IC95%= 2,403–6,784) (Li *et al.*, 2017).

Em contrapartida, um estudo com hanseníase, também causada por uma micobactéria, demonstrou que o genótipo –1031 C/C (rs1799964) foi associado à proteção, estando significativamente maior em indivíduos controle, quando comparado a pacientes com hanseníase do estado do Amazonas (*p*= 0,012; OR= 0,11; IC 95%= 0,01–0,82) (Silva *et al.*, 2015). Após análises com ajuste para sexo e idade, os modelos genéticos permaneceram sem apresentar associações, como mostra a **Tabela 8**.

Tabela 8. Análise do SNV rs1799964 de *TNFA* entre indivíduos com Tb vs. Controles, após os ajustes por sexo e idade nos modelos genéticos.

<i>TNFA</i> Modelo genético	Tb n%	Controles n%	Valor- <i>p</i> adj	ORadj (IC95%)	AICadj
Codominante	n=408	n=366			
TT	243 (0,596)	209 (0,571)	0,557	0,85 (0,62 – 1,17) 1,07 (0,58 – 1,98)	1009,2
CT	136 (0,333)	135 (0,369)			
CC	29 (0,071)	22 (0,060)			
Dominante					
TT	243 (0,596)	209 (0,571)	0,415	0,88 (0,65 – 1,19)	1007,7
CT-CC	165 (0,404)	157 (0,429)			
Recessivo					
TT-CT	379 (0,929)	344 (0,940)	0,672	1,14 (0,62 – 2,08)	1008,2
CC	29 (0,071)	22 (0,060)			
Overdominante					
TT-CC	272 (0,667)	231 (0,631)	0,289	0,85 (0,62 – 1,15)	1007,3
CT	136 (0,333)	135 (0,369)			
Log-Additive					
0,1,2	408 (0,527)	366 (0,473)	0,630	0,94 (0,74 – 1,20)	1008,2

Legenda: Tb: tuberculose; AICadj: critério de Informação de Akaike ajustado para sexo e idade; Valor-*p*_{adj}: valor de *p* ajustado. Valores *p*<0,05 foram considerados significativos e destacados em negrito, ORadj: odds ratio ajustado e IC95%adj intervalo de confiança de 95% (IC95%) ajustado.

6.3.2. Análise de associação do SNV rs1800610 para o gene *TNFA*

O SNV rs1800610 (+489G>A) está localizado na região intrônica do gene. Para essa variante, foi observada uma associação nos modelos dominante (*p*= 0,030; OR= 1,38; IC95%= 1,03–1,85), overdominante (*p*= 0,029; OR= 1,40; IC95%= 1,03–1,90), indicando possível relação com suscetibilidade, como mostra a **Tabela 9**.

Tabela 9. Análise do SNV rs1800610 de *TNFA* entre indivíduos com Tb vs. Controles nos modelos genéticos.

<i>TNFA</i> Modelo genético	Tb n%	Controles n%	Valor- <i>p</i>	OR (IC95%)	AIC
Codominante	n= 435	n= 464			
GG	299 (0,687)	349 (0,752)	0,086	1,41 (1,04 – 1,91) 1,17 (0,55 – 2,49)	1246,4
AG	122 (0,280)	101 (0,218)			
AA	14 (0,032)	14 (0,030)			
Dominante					
GG	299 (0,687)	349 (0,752)	0,030	1,38 (1,03 – 1,85)	1244,7
AG-AA	136 (0,313)	115 (0,248)			
Recessivo					
GG-AG	421 (0,968)	450 (0,970)	0,862	1,07 (0,50 – 2,27)	1249,3
AA	14 (0,032)	14 (0,030)			
Overdominante					
GG-AA	313 (0,720)	363 (0,782)	0,029	1,40 (1,03 – 1,90)	1244,6
AG	122 (0,280)	101 (0,218)			
Log-Additive					
0,1,2	435 (0,484)	464 (0,516)	0,056	1,27 (0,99 – 1,64)	1245,7

Legenda: Tb: tuberculose; AIC: critério de Informação de Akaike; Valor-*p*: valor de *p*. Valores *p*<0,05 foram considerados significativos e destacados em negrito, OR: odds ratio; e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Em relação a pesquisas do SNV 1800610 no gene *TNFA* na Tb, até o presente momento ainda não tinham sido descritas. Contudo, o SNV apresentou associação significativa do rs1800610 com a suscetibilidade a hanseníase na população Indiana (GG vs. AG + AA, *p* = 0,00028; OR = 1,45; IC 95% = 1,19–1,77) (Ali *et al.*, 2012).

Esse SNV está possivelmente associado a outras doenças respiratórias, como em um estudo que relacionou a portadores do alelo menor A com suscetibilidade e gravidade da pneumonia por adenovírus sendo maior que em portadores do alelo G (OR= 1,19; IC95%= 1,03–1,36, *p* = 0,02). Da mesma forma, os portadores do alelo A apresentaram um risco significativamente aumentado da progressão da pneumonia por adenovírus (OR = 1,34, IC95%= 1,13–1,55, *p* < 0,01), podendo apresentar elevadas concentrações séricas de TNF- α para os portadores dos genótipos AG/AA que aqueles com o GG (*p* < 0,001). Contudo, o genótipo AG não foi considerado um fator de suscetibilidade para pneumonia por adenovírus após ajustes para idade e sexo (*p* = 0,27) (Zhang *et al.*, 2020).

Ainda que o alelo A não tenha sido relacionado à suscetibilidade para DPOC, pacientes com genótipo AG/AA +489 (rs1800610) apresentaram maior presença de reações agudas exacerbadas (Yu *et al.*, 2021). Essa variante foi também associada à suscetibilidade para lúpus

eritematoso sistêmico e artrite psoriática (Lin *et al.*, 2009; Murdaca *et al.*, 2014). Além de estar associado a uma melhor resposta da medicação Adalimumabe para indivíduos da população Han com espondilite anquilosante que possuíam o genótipo AG ou AA (Liang *et al.*, 2023).

No presente estudo, os genótipos dos modelos genéticos não mantiveram a associação após os ajustes para sexo e idade nos modelos dominante, overdominante e Log-Additive ($p=0,107$, $p=0,139$ e $p=0,122$, respectivamente), sendo o modelo dominante o de menor valor- p após o ajuste como mostra a **Tabela 10**.

Tabela 10. Análise do SNV rs1800610 de *TNFA* entre indivíduos com Tb vs Controles, após os ajustes por sexo e idade nos modelos genéticos.

<i>TNFA</i> Modelo genético	Tb n%	Controles n%	Valor- p adj	ORadj (IC95%)	AICadj
Codominante	n= 406	n= 361			
GG	281 (0,692)	269 (0,745)			
AG	112 (0,276)	83 (0,230)	0,274	1,31 (0,93 – 1,85)	994,7
AA	13 (0,032)	9 (0,025)		1,34 (0,54 – 3,32)	
Dominante					
GG	281 (0,692)	269 (0,745)			
AG-AA	125 (0,308)	92 (0,255)	0,107	1,31 (0,94 – 1,83)	992,7
Recessivo					
GG-AG	393 (0,968)	352 (0,975)			
AA	13 (0,032)	9 (0,025)	0,628	1,25 (0,51 – 3,08)	995,0
Overdominante					
GG-AA	294 (0,724)	278 (0,770)			
AG	112 (0,276)	83 (0,230)	0,139	1,30 (0,92 – 1,83)	993,1
Log-Additive					
0,1,2	406 (0,529)	361 (0,471)	0,122	1,25 (0,94 – 1,67)	992,9

Legenda: Tb: tuberculose; AICadj: critério de Informação de Akaike ajustado para sexo e idade; Valor- p_{adj} : valor de p ajustado. Valores $p<0,05$ foram considerados significativos e destacados em negrito, ORadj: odds ratio ajustado e IC95%adj intervalo de confiança de 95% (IC95%) ajustado.

6.4. Análise de haplótipos

Os SNVs são o tipo de variação gênica mais frequente em humanos, sendo bialélicos na maioria dos casos, facilitando sua genotipagem. Os haplótipos, por sua vez, são combinações de variações que são herdadas em conjunto, e o desequilíbrio de ligação pode ser explorado para mapear com precisão os genes de suscetibilidade dentro de áreas de ligação replicadas (Beckmann, Estivill e Antonarakis, 2007; Ahmad *et al.*, 2003). Em relação à análise de haplótipos na população de estudo, não foram observadas associações (**Tabela 11**).

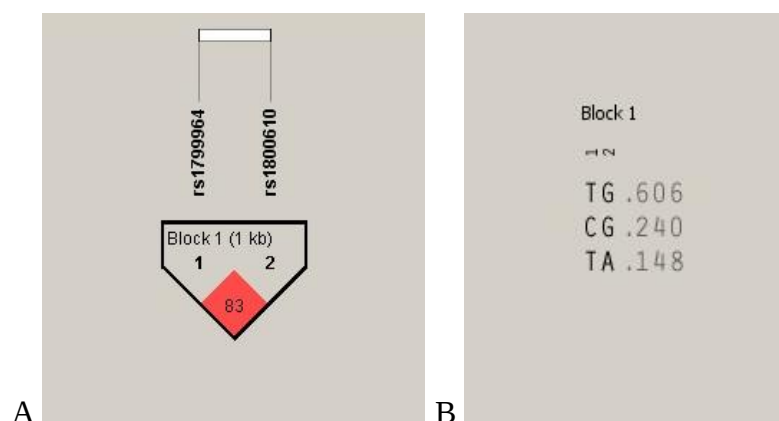
Tabela 11. Resultados da análise de haplótipos no grupo de Tb vs Controles nos SNVs de *TNFA* (rs 1799964-rs1800610).

Haplótipos rs1799964-rs1800610	Frequência Caso/Controle	Valor- <i>p</i>	OR (IC95%)
TG*	0,605	-	1,00
CG	0,239	0,75	0,97 (0,77 – 1,20)
TA	0,148	0,12	1,24 (0,94 – 1,63)
Geno.raro	0,006	0,49	1,84 (0,32 – 10,59)

Legenda: *=haplótipo referência, *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Além disso, ao analisar o desequilíbrio de ligação (DL) na população de estudo, observou-se DL entre os SNVs de *TNFA* rs1799964 e rs1800610 ($D' = 0,832$; $LOD = 10,49$), apesar dos loci analisados não indicarem grande compartilhamento de informação genética ($r^2 = 0,041$) (**Figura 12**).

Figura 12. Desequilíbrio de ligação da população de pacientes com Tb e controles avaliados para as duas variantes do gene *TNFA*.



Legenda: As duas variantes analisadas localizam-se na parte superior da figura dispostas verticalmente. A: Diagrama do desequilíbrio de ligação com o bloco gerado. B: Frequências do bloco de haplótipos (Block 1).

Desta forma, esse estudo colabora com a importância da avaliação de fatotes imunogenéticos relacionados a Tb, com ênfase nos alelos *HLA-ABDR* e variantes do gene *TNFA*, para entendimento da complexa resposta imune diante da infecção por *M. tuberculosis*. É importante ressaltar que estudos da frequência de HLA na população amazonense são limitados, especialmente no que refere aos alelos de classe I, sendo essencial o aprofundamento na análise dos alelos mais frequentes da região e sua associação com doenças. Além disso, os resultados apontam também para a necessidade das investigações de associação dos SNVs de *TNFA* com a Tb, como o rs1800610, no qual os estudos ainda são escassos.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que:

- Os alelos *HLA-A* mais frequentes (>10%) no grupo dos indivíduos com Tb foram: *HLA-A*02*, *HLA-A*24* e *HLA-A*29*. No grupo dos controles os alelos mais frequentes foram: *HLA-A*02* e *HLA-A*31*. O *HLA-A*02* apresentou frequência elevada na população geral deste estudo (>20%).
- O alelo *HLA-A*29* apresentou associação para suscetibilidade à Tb, enquanto os alelos *HLA-A*31* e *HLA-A*68* foram associados para proteção a Tb.
- Dentre os alelos *HLA-B* foram mais frequentes: *HLA-B*15*, *HLA-B*35* no grupo Tb e *HLA-B*15*, *HLA-B*35* e *HLA-B*44* no grupo controle.
- Não foi observada associação dos alelos *HLA-B* com a Tb.
- Dentre os alelos *HLA-DRB1* foram mais frequentes os alelos: *HLA-DRB1*04*, *HLA-DRB1*08* e *HLA-DRB1*13* entre os indivíduos com Tb. Nos controles os alelos mais frequentes foram: *HLA-DRB1*04*, *HLA-DRB1*07*, *HLA-DRB1*08*, *HLA-DRB1*11* e *HLA-DRB1*13*. Destes, o alelo *HLA-DRB1*04* apresentou frequência elevada (>20%) entre os indivíduos com Tb.
- O alelo *HLA-DRB1*14* foi associado para proteção a Tb.
- O SNV rs1799964 de *TNFA* não apresentou associação com a tuberculose (Tb)
- O SNV de *TNFA* rs1800610 foi associado com a Tb para risco nos modelos genéticos dominante, overdominante e Log-Additive, quando analisados sem os ajustes para sexo e idade.
- Não houve associação dos haplótipos (TG, CG e TA), rs1799964 e rs1800610 do gene *TNFA* com a Tb.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com esse estudo, foi possível avaliar a frequência alélica dos genes de *HLA-A*, *-B* e *-DR*, as frequências alélicas e genotípicas de dois SNVs do gene *TNFA*, e as possíveis associações com suscetibilidade ou proteção para Tb na população amazonense. Os achados reforçam a necessidade dos estudos imunogenéticos mais detalhados para compreensão de doenças tão complexas como Tb e das particularidades da população do Amazonas.

Orçamento e cronograma

8. ORÇAMENTO E FONTE DE FINANCIAMENTO

Item	Material de Consumo	Quantidade	Valor U\$ (unitário)	Valor U\$	Valor R\$
1	Sonda TaqMan (rs1799964)	1	349,27	-	2.058,13
1	Sonda TaqMan (rs1800610)	1	349,27	-	2.058,13

Observação: Cotação do Dólar comercial valor R\$5,89 reais.

9. CRONOGRAMA

Atividades	Meses do ano 2023											Meses do ano 2024		
	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12		01	02	03
Cumprimento dos créditos obrigatórios e optativos do curso de mestrado.	R	R	R	R	R	R	R	R	R					
Aceite do Projeto no Comitê de Ética da UFAM (CEP/UFAM).					R									
Seleção de indivíduos e controles.					R	R	R	R	R				R	R
Coleta, transporte e processamento das amostras clínicas (exames bacteriológicos e extração de DNA).					R	R	R	R	R				R	R
Seleção dos SNVs.							R	R						
Tipagem de HLA classe I e II (ABDR).							R	R	R	R	R			
Elaboração e organização da planilha e inserção de dados epidemiológicos, clínicos e genéticos.					R	R	R	R	R	R	R			
Aquisição dos materiais e insumos.		R										R	R	
Análise parcial dos dados.										R	R			
Revisão bibliográfica					R	R	R	R	R	R				
Elaboração do manuscrito para qualificação.									R	R	R			
Exame de Qualificação.														R

R = Realizado.

Atividades	Meses do ano 2024											Meses do ano 2025		
	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12		01	02	03
Cumprimento dos créditos optativos do curso de mestrado.	R	R	R	R										
Seleção de indivíduos e controles.	R	R	R	R	R	R	R	R	R					
Coleta, transporte e processamento das amostras clínicas (exames bacteriológicos e extração de DNA).	R	R	R	R	R	R	R	R	R					
Tipagem de HLA classe I e II (ABDR).	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R				
Testes de Genotipagem por qPCR		R	R	R					R	R	R			
Elaboração e organização da planilha e inserção de dados epidemiológicos, clínicos e genéticos.	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R			
Aquisição dos materiais e insumos.				R					R					
Análise final dos dados.									R	R	R			
Revisão bibliográfica					R	R	R	R	R	R	R			
Elaboração do manuscrito para defesa.								R	R	R	R	R		
Exame de Defesa.														R

R = Realizado.

Equipe do projeto

10. EQUIPE DO PROJETO

Nome	Título	Instituição	Contribuição
Alliny Almeida Queiroz	Mestranda	PPGIBA/UFAM	Mestranda, executou o projeto
Aya Sadahiro	Doutor	PPGIBA/UFAM	Orientadora
Maurício Morishi Ogusku	Doutor	Laboratório de Micologia do INPA	Co-orientador
Mariana Brasil de Andrade Figueira	Doutor	LIM/UFAM	Co-orientadora
Joycenea da Silva Matsuda	Mestre	Policlínica Cardoso Fonte/ SES-AM	Colaboração para avaliar os dados clínicos dos pacientes com tuberculose
Elenilda Rodrigues Ramos	Técnica de Enfermagem	Policlínica Cardoso Fonte/ SES-AM	Colaboração na coleta de amostras.
Irineide Assumpção Antunes	Médica	Policlínica Cardoso Fonte/ SES-AM	Colaboração para avaliar os dados clínicos dos pacientes com tuberculose
Greicy Kelly Chem Nepomuceno	Enfermeira	Policlínica Cardoso Fonte/ SES-AM	Colaboração para avaliar os dados clínicos dos pacientes com tuberculose
Nadieli Honorato Sawada	Biomédica	Policlínica Cardoso Fonte/ SES-AM	Colaboração para avaliar os resultados dos exames de laboratório.
Marcos Henrique Gurgel Rodrigues	Doutorando	PPGIBA/UFAM	Auxílio no registro de amostras e extração de DNA
Gilberto Bazé	Mestrando	PPGIBA/UFAM	Auxílio no registro de amostras e extração de DNA
Laianne Lopes	Doutoranda	PPGIBA/UFAM	Auxílio no registro de amostras
Renata Gualberto	Doutoranda	PPGIBA/UFAM	Auxílio na organização e registro de amostras

Referências

11. REFERÊNCIAS

- AHMAD, Tariq et al. Haplotype-specific linkage disequilibrium patterns define the genetic topography of the human MHC. **Human molecular genetics**, v. 12, n. 6, p. 647-656, 2003.
- ALCÂNTARA, Cid Carlos Soares de *et al.* Fatores associados à tuberculose pulmonar em pacientes que procuraram serviços de saúde de referência para tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, p. 622-629, 2012.
- ALI, Shafat et al. Association of variants in BAT1-LTA-TNF-BTNL2 genes within 6p21. 3 region show graded risk to leprosy in unrelated cohorts of Indian population. **Human genetics**, v. 131, p. 703-716, 2012.
- ALLEN, Michael *et al.* Mechanisms of control of Mycobacterium tuberculosis by NK cells: role of glutathione. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 151729, 2015.
- ALVES, Crésio *et al.* Immunogenetics and infectious diseases: special reference to the mayor histocompatibility complex. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, p. 122-131, 2006.
- AL-ARIF, Lamya I. *et al.* HLA-Bw15 and tuberculosis in a North American black population. **American Review of Respiratory Disease**, v. 120, n. 6, p. 1275-1278, 1979.
- AHN, Stephen; CHOI, Hee-Back; KIM, Tai-Gyu. HLA and disease associations in Koreans. **Immune network**, v. 11, n. 6, p. 324-335, 2011.
- BECKMANN, Jacques S.; ESTIVILL, Xavier; ANTONARAKIS, Stylianos E. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 8, p. 639-646, 2007.
- BELLAMY, R. Genetics and pulmonar medicine bullet 3: Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations. **Thorax**, v. 53, n. 7, p. 588-593, 1998.
- BETANCOURTH-ARTEAGA, Isabella *et al.* Variación en un solo nucleótido en genes de citocinas como marcadores de enfermedades. **Acta Médica Costarricense**, v. 64, n. 1, p. 20-33, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da saúde, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Número especial, março 2023a.

BRASIL. **Série histórica da incidência e mortalidade por tuberculose**. Brasil, Regiões e Unidades da Federação de residência, por ano de diagnóstico (1990 a 2022). 2023b.

BRITES, Daniela; GAGNEUX, Sébastien. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. **Immunological reviews**, v. 264, n. 1, pág. 6-24, 2015.

BOECHAT, Antonio Luiz *et al.* Association between the PTPN22 1858C/T gene polymorphism and tuberculosis resistance. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 310-313, 2013.

BONDINAS, George P.; MOUSTAKAS, Antonis K.; PAPADOPOULOS, George K. The spectrum of HLA-DQ and HLA-DR alleles, 2006: a listing correlating sequence and structure with function. **Immunogenetics**, v. 59, n. 7, p. 539-553, 2007.

BONI, Funmilayo Grâce *et al.* Cytokine storm in tuberculosis and IL-6 involvement. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 97, p. 105166, 2022.

CAVALCANTI, Yone Vila Nova, *et al.* Role of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-10 in the development of pulmonary tuberculosis. **Pulmonary medicine**. 2012.

CARABALÍ-ISAJAR, Mary Lilián *et al.* Clinical manifestations and immune response to tuberculosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 206, 2023.

CRUX, Nicole B.; ELAHI, Shokrollah. Human leukocyte antigen (HLA) and immune regulation: how do classical and non-classical HLA alleles modulate immune response to human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections? **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 832, 2017.

COX, Rebecca A. *et al.* HLA phenotypes in Mexican Americans with tuberculosis. **American Review of Respiratory Disease**, v. 126, n. 4, p. 653-655, 1982.

DALLENGA, Tobias; SCHAIBLE, Ulrich E. Neutrophils in tuberculosis - first line of defence or booster of disease and targets for host-directed therapy?. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 74, n. 3, pág. ftw012, 2016.

DARTOIS, Véronique A.; RUBIN, Eric J. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 11, p. 685-701, 2022.

DAWKINS, Bryan A. et al. Novel HLA associations with outcomes of Mycobacterium tuberculosis exposure and sarcoidosis in individuals of African ancestry using nearest-neighbor feature selection. **Genetic epidemiology**, v. 46, n. 7, p. 463-474, 2022.

DE LIMA, Dhêmerison Souza *et al.* Inflammasome genetics contributes to the development and control of active pulmonary tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 41, p. 240-244, 2016.

DE MARTINO, Maurizio *et al.* Immune response to Mycobacterium tuberculosis: a narrative review. **Frontiers in pediatrics**, v. 7, p. 350, 2019.

DE SIQUEIRA, Helio R. Enfoque clínico da tuberculose pulmonar. **Pulmão RJ**, v. 21, n. 1, p. 15-18, 2012.

DE OLIVEIRA, Roberta Lima et al. Relatos de uso de tabaco, álcool e drogas ilícitas entre pacientes em tratamento para tuberculose. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 5, p. 14866-14877, 2020.

DHEENADHAYALAN, V. et al. Association of interleukin-10 cytokine expression status with HLA non-DRB1* 02 and Mycobacterium bovis BCG scar-negative status in south Indian pulmonary tuberculosis patients. **Infection and immunity**, v. 69, n. 9, p. 5635-5642, 2001.

DUBANIEWICZ, Anna; MOSZKOWSKA, Grażyna; SZCZERKOWSKA, Zofia. Frequency of DRB1–DQB1 two-locus haplotypes in tuberculosis: Preliminary report. **Tuberculosis**, v. 85, n. 4, p. 259-267, 2005.

DULBERGER, Charles L. *et al.* The mycobacterial cell envelope - a moving target. **Nature reviews. Microbiology** vol. 18,1. 2020.

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

- FIGUEIRA, Mariana Brasil de Andrade *et al.* Single-nucleotide variants in the AIM2–absent in melanoma 2 gene (rs1103577) associated with protection for tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 604975, 2021.
- FIGUEIREDO, José Fernando de Castro *et al.* Perfil HLA em pacientes com AIDS e tuberculose. **Revista Brasileira de Infectologia**, v. 12, p. 278-280, 2008.
- GOLDFELD, Anne E. Genetic susceptibility to pulmonar tuberculosis in Cambodia. **Tuberculosis**, v. 84, n. 1-2, p. 76-81, 2004.
- GUERRINI, Valentina *et al.* Storage lipid studies in tuberculosis reveal that foam cell biogenesis is disease-specific. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 8, p. e1007223, 2018.
- GUSTINCICH, Stefano *et al.* A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. **Biotechniques**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 302, 1991.
- HILL, Adrian VS. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 2, n. 1, p. 373-400, 2001.
- HILL, Adrian VS. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. **Annu. Rev. Genet.**, v. 40, p. 469-486, 2006.
- JACOBS, Muazzam *et al.* Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection. **Microbes and infection**, v. 9, n. 5, p. 623-628, 2007.
- JAGANNATHAN, Latha *et al.* HLA-B* 57 and Gender Influence the Occurrence of Tuberculosis in HIV Infected People of South India. **Journal of Immunology Research**, v. 2011, n. 1, p. 549023, 2011.
- JEFFERY, K. J.; BANGHAM, C. R. Do infectious diseases drive MHC diversity? **Microbes and infection**, 2(11), pp.1335-1341, 2000.
- KUMAR, Vinay *et al.* Robbins & Cotran: bases patológicas das doenças. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 2023.
- LEE, Seung Heon. Tuberculosis infection and latent tuberculosis. **Tuberculosis and respiratory diseases**, v. 79, n. 4, p. 201, 2016.

LEE, Yong-Hun *et al.* Comprehensive analysis of *Mycobacterium tuberculosis* antigen-specific CD4⁺ T cell responses restricted by single HLA class II allotype in an individual. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 897781, 2022.

LI, C. P. *et al.* Relationship of HLA-DRB1 gene polymorphism with susceptibility to pulmonary tuberculosis: updated meta-analysis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 19, n. 7, p. 841-849, 2015.

LI, Qifeng *et al.* The single nucleotide polymorphisms in TNF- α promoter are associated with susceptibility and clinical features of pulmonary tuberculosis in Chinese Uygurs. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 10, p. 11596-11605, 2017.

LIANG, Hong-Jin *et al.* Tumor Necrosis Factor-Alpha (+ 489 G/A) Polymorphism Can Predict the Response to Adalimumab in Chinese Han Patients With Ankylosing Spondylitis. **Cureus**, v. 15, n. 7, 2023.

LIMA, Taiza Maschio de *et al.* Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 2, p. 65-76, 2017.

LIU, Cui Hua; LIU, Haiying; GE, Baoxue. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. **Cellular & molecular immunology**, v. 14, n. 12, p. 963-975, 2017.

LOBO, Niyati *et al.* 100 years of Bacillus Calmette–Guérin immunotherapy: from cattle to COVID-19. **Nature Reviews Urology**, v. 18, n. 10, p. 611-622, 2021.

LOBUE, P. A.; ENARSON, D. A.; THOEN, T. C. Tuberculosis in humans and its epidemiology, diagnosis and treatment in the United States. **The International journal of tuberculosis and lung disease**, v. 14, n. 10, p. 1226-1232, 2010.

LOMBARD, Zane *et al.* Association of HLA-DR,-DQ, and vitamin D receptor alleles and haplotypes with tuberculosis in the Venda of South Africa. **Human immunology**, v. 67, n. 8, p. 643-654, 2006.

LORENTE, L. *et al.* HLA genetic polymorphisms and prognosis of patients with COVID-19. **Medicina intensiva**, v. 45, n. 2, p. 96-103, 2021.

MCCAFFREY, Erin F. *et al.* The immunoregulatory landscape of human tuberculosis granulomas. **Nature immunology**, v. 23, n. 2, p. 318-329, 2022.

- MANCZINGER, Máté *et al.* Pathogen diversity drives the evolution of generalist MHC-II alleles in human populations. **PLoS biology**, v. 17, n. 1, p. e3000131, 2019.
- MANGTANI, Punam *et al.* Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. **Clinical infectious diseases**, v. 58, n. 4, p. 470-480, 2014.
- MANHAL, Falah S. Allelic distribution of human leukocyte antigen in patients with pulmonary tuberculosis in Baghdad city." *Iraqi postgraduate Medical Journal* 8. 2009.
- MARSH, S. G. E *et al.* Nomenclature for factors of the HLA system. **Tissue Antigens**, 2010.
- MEDHASI, Sadeep; CHANTRATITA, Narisara. Human leukocyte antigen (HLA) system: genetics and association with bacterial and viral infections. **Journal of Immunology Research**, v. 2022, 2022.
- MORTAZ, Esmaeil *et al.* Interaction of pattern recognition receptors with Mycobacterium tuberculosis. **Journal of clinical immunology**, v. 35, p. 1-10, 2015.
- NGUYEN, Quang Huy *et al.* Insights into the processes that drive the evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Evolutionary applications**, v. 11, n. 9, p. 1498-1511, 2018.
- OLIVEIRA-CORTEZ, A. *et al.* Do HLA class II genes protect against pulmonary tuberculosis? A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 10, p. 1567-1580, 2016.
- PAHAL, Parul; POLLARD, Elizabeth J.; SHARMA, Sandeep. PPD Skin Test. **StatPearls [Internet]**. [Atualizado em 23 de abril de 2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556037/>
- PAHO. Diagnosis of new TB cases in the Americas reduced by 15-20% during 2020 due to the pandemic. **Pan American Health Organization**. 2021. (Acessado em 05/01/2023). Disponível em: [https:// bit.ly/3pB22YM](https://bit.ly/3pB22YM).
- PRUGNOLLE, Franck *et al.* Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. **Current biology**, v. 15, n. 11, p. 1022-1027, 2005.

RAGHAVAN, S.; ALAGARASU, K.; SELVARAJ, P. Immunogenetics of HIV and HIV associated tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 92, n. 1, p. 18-30, 2012.

RAHLWES, Kathryn C. *et al.* Pathogenicity and virulence of Mycobacterium tuberculosis. **Virulence**, v. 14, n. 1, p. 2150449, 2023.

RIJNINK, Willemijn F.; OTTENHOFF, Tom HM; JOOSTEN, Simone A. B-cells and antibodies as contributors to effector immune responses in tuberculosis. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 640168, 2021.

ROBINSON, J. *et al.* IPD-IMGT/HLA Database. **Nucleic Acids Research**. 2020.

RODRIGUES, Tamara Silva *et al.* Interplay between alveolar epithelial and dendritic cells and Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 108, n. 4, p. 1139-1156, 2020.

RÖLTGEN, Katharina; PLUSCHKE, Gerd. Buruli ulcer: The efficacy of innate immune defense may be a key determinant for the outcome of infection with Mycobacterium ulcerans. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 1018, 2020.

RUHWALD, Morten *et al.* Introducing the ESAT-6 free IGRA, a companion diagnostic for TB vaccines based on ESAT-6. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 45969, 2017.

SABIN, Susanna *et al.* A seventeenth-century Mycobacterium tuberculosis genome supports a Neolithic emergence of the Mycobacterium tuberculosis complex. **Genome biology**, v. 21, n. 1, p. 1-24, 2020.

SALEM, Julia Ignez *et al.* Valor relativo do exame direto, após concentração e por cultivo de escarro no diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar no Amazonas. **J Pneumol**, v. 16, n. 3, p. 133-6, 1990.

SALEM, Julia Ignez *et al.* PKO: alternative method for isolating mycobacteria from sputum. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 3, p. 419-424, 2007.

SALVATO, Richard Steiner *et al.* Genomic-based surveillance reveals high ongoing transmission of multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Southern Brazil. **International journal of antimicrobial agents**, v. 58, n. 4, p. 106401, 2021.

SANCHEZ-MAZAS, Alicia. A review of HLA allele and SNP associations with highly prevalent infectious diseases in human populations. **Swiss medical weekly**, v. 150, n. 1516, p. w20214-w20214, 2020.

SANTOS, José Gilmar Costa *et al.* Tuberculose: aspectos gerais e desenvolvimento de novas vacinas. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 15, n. 3, p. 82-92, 2020.

SEEDAT, Faheem *et al.* Human leukocyte antigen associations with protection against tuberculosis infection and disease in human immunodeficiency virus-1 infected individuals, despite household tuberculosis exposure and immune suppression. **Tuberculosis**, v. 126, p. 102023, 2021.

SHARMA, Garima *et al.* Genome-wide non-CpG methylation of the host genome during M. tuberculosis infection. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 25006, 2016.

SHALER, Christopher R. *et al.* Understanding delayed T-cell priming, lung recruitment, and airway luminal T-cell responses in host defense against pulmonary tuberculosis. **Journal of Immunology Research**, v. 2012, 2012.

SCHLEINITZ, Dorit; DISTEFANO, Johanna K.; KOVACS, Peter. Targeted SNP genotyping using the TaqMan® assay. **Disease gene identification: Methods and protocols**, p. 77-87, 2011.

SHIINA, T.; INOKO, H. e KULSKI, J. K. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. **Tissue antigens**. p. 631-649. 2004

SILVA, George Allan Villarouco da *et al.* Associação de TNF– 1031 C/C como potencial marcador de proteção para o desenvolvimento de hanseníase em pacientes do estado do Amazonas, Brasil. **Human Immunology** , v. 76, n. 2-3, p. 137-141, 2015.

SILVA JR, Jarbas Barbosa da. Tuberculose: guia de vigilância epidemiológica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, p. S57-S86, 2004.

SOTO, María Elena, *et al.* Comparison distribution of HLA-B alleles in mexican patients with takayasu arteritis and tuberculosis. **Human immunology**. 68.5. 2007.

SOUZA, C. F. *et al.* HLA and MICA genes in patients with tuberculosis in Brazil. **Tissue antigens**, v. 79, n. 1, p. 58-63, 2012.

SOUZA DE LIMA, Dhêmerson *et al.* Alleles of HLA-DRB1* 04 associated with pulmonary tuberculosis in Amazon Brazilian population. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0147543, 2016.

SPIES, Thomas *et al.* Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 22, p. 8699-8702, 1986.

SPURGIN, Lewis G.; RICHARDSON, David S. How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 277, n. 1684, p. 979-988, 2010.

TEZERA, Liku B. *et al.* Anti-PD-1 immunotherapy leads to tuberculosis reactivation via dysregulation of TNF- α . **Elife**, v. 9, p. e52668, 2020.

TONG, Xiang *et al.* Polymorphisms in HLA-DRB1 gene and the risk of tuberculosis: a meta-analysis of 31 studies. **Lung**, v. 193, p. 309-318, 2015.

TORRES, Margareth Afonso; MORAES, Maria Elisa Hue. Nomenclatura dos fatores do sistema HLA. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, p. 249-251. 2011.

VELAYATI, Ali Akbar; FARNIA, Parissa. **Morphological characterization of Mycobacterium tuberculosis**. ISBN, 2012.

WAMALA, Dan *et al.* Association between human leukocyte antigen class II and pulmonary tuberculosis due to mycobacterium tuberculosis in Uganda. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2015.

WHO. Global Tuberculosis Report 2022. **World Health Organization**. Geneva. 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WHO. Global Tuberculosis Report 2023. **World Health Organization**. Geneva. 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WHO. Global tuberculosis report 2024. **World Health Organization**; Geneva. 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WU, Shouquan *et al.* Polymorphisms of cytokine genes and tuberculosis in two independent studies. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 2507, 2019.

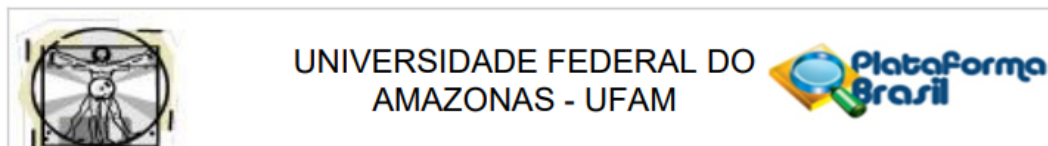
YU, S. et al. Correlation between TNF- α -308 and +489 Gene Polymorphism and Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Diseases. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1–8, 1 mar. 2021.

ZHANG, Shouyuan et al. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms increase susceptibility to adenovirus infection in children and are correlated with severity of adenovirus-associated pneumonia. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 24, n. 12, p. 761-770, 2020.

Anexos

12. ANEXOS

Anexo 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

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

Pesquisador: Aya Sadahiro

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 19021519.9.0000.5020

Instituição Proponente: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.178.672