

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Polimorfismos genéticos e associação com a produção de  
Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) em pacientes com Tuberculose pulmonar**

**Cláudia Maria de Melo Silva**

**MANAUS**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Cláudia Maria de Melo Silva**

**Polimorfismos genéticos e associação com a produção de Interferon gama  
(IFN- $\gamma$ ) em pacientes com Tuberculose pulmonar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador: Profa. Dra. Aya Sadahiro**

**Coorientador: Prof. Dr. Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes**

**MANAUS**

**2014**

Ficha catalográfica

(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

	Silva, Cláudia Maria de Melo
S586p	Polimorfismos genéticos e associação com a produção de Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) em pacientes com tuberculose pulmonar / Cláudia Maria de Melo Silva. - Manaus, 2014. 114f. il. color. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas. Orientador: Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Aya Sadahiro Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes 1. Tuberculose 2. Tratamento farmacológico 3. Interferon I. Aya Sadahiro (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título
	CDU 1997 616.24-002.5(043.3)

**CLÁUDIA MARIA DE MELO SILVA**

**Polimorfismos genéticos e associação com a produção de Interferon gama  
(IFN- $\gamma$ ) em pacientes com Tuberculose pulmonar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Aprovado em 28 de abril de 2014**

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Aya Sadahiro  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Júlio Henrique Rosa Croda  
Universidade Federal da Grande Dourados

Dedico esse trabalho a minha família, em especial à Leonor, Eliane, Leonardo, Alvino e Thiago pelo amor incondicional, incentivo e companheirismo em todos os momentos. Obrigada por tudo.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Aya Sadahiro, pela oportunidade de realizar esse trabalho sob sua orientação. Muito obrigada pelo incentivo, paciência e dedicação a mim e principalmente por confiar na minha capacidade.

Ao Dr. Antônio Boechat pela paciência e dedicação ao ensinar as análises necessárias para este trabalho.

Ao Dr. Mauricio Morishi Ogusku pela acolhida no laboratório, generosidade e ensinamentos em todas as fases laboratoriais deste projeto.

Aos pacientes e funcionários da policlínica Cardoso Fontes, por sua participação voluntária nesse trabalho e sem os quais a realização deste seria impossível.

À Dra. Irineide Assumpção Antunes pela recepção e atenção prestadas para realização deste trabalho no Cardoso Fontes.

À Dra. Joycenéa da Silva Matsuda por toda ajuda oferecida nas inclusões dos pacientes no Cardoso Fontes.

A todos os profissionais de saúde que cederam seu tempo e sangue para contribuir com este trabalho.

À Vanessa Alves e Raphaela Naveca pelo auxílio na coleta e processamento das amostras.

Aos colegas de laboratório Renata Freitas, Dhemerson Lima e Maisa Porto por toda ajuda e apoio que recebi.

Aos técnicos do laboratório de Micobacteriologia do INPA: Raimundo, Francisco e Rosalvo pela ajuda e carinho prestados.

Ao Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto, pelas sugestões na qualificação, que foram muito importantes para este trabalho.

À Nayara Sousa Castro pelo suporte técnico na leitura do sequenciamento e ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do INPA pelo apoio financeiro.

Ao George Silva e Vitor Souza pelo suporte técnico na leitura do sequenciamento e à Fiocruz.

À Alita Realini e Marcia Alves por todas as palavras de conforto e todo carinho.

À nova família que sempre me incentivou e apoiou: Socorro Ibiapina, Cristovão Alves e Irene Ibiapina.

À fundação hospital Adriano Jorge, hospital Getúlio Vargas, UBS Geraldo Magela e policlínica Dr. Antônio Comte Telles por permitirem as coletas de sangue dos profissionais de saúde.

À UFAM e o programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, especialmente à Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

À FAPEAM, pelo apoio financeiro.

E a todos que, seja através de orações ou palavras de apoio, estiveram comigo nessa jornada.

Muito obrigada.

O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.

Claude Lévi-Strauss

## RESUMO

A Tuberculose (TB) é uma infecção crônica causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* sendo um importante problema de saúde pública mundial, levando a aproximadamente 1,45 milhões de mortes a cada ano. O estado do Amazonas possui uma alta incidência desta doença, atingindo 68,3 casos por 100 mil habitantes em 2012. Dos indivíduos infectados pelo bacilo, cerca de 5 a 10% desenvolvem a Tuberculose ativa, sugerindo que há fatores associados ao hospedeiro que determinam o destino da resposta imune ao patógeno. Neste contexto, diversos estudos em imunogenética têm demonstrado genes associados à TB, mas na região norte ainda são raras as pesquisas nesta área, fato que motivou a investigação da frequência dos polimorfismos nos genes *IFNG*, *IL12B*, *CD80* e *CD86*, que codificam para proteínas fundamentais na resposta imune celular. Além disso, foi verificado se a concentração de IFN- $\gamma$  está relacionada com o genótipo encontrado. Foram incluídas amostras de 177 pacientes e 224 controles (159 contatos e 65 não contatos) e realizado sequenciamento de DNA para os genes *IFNG* (SNP +874A/T e microsatélite +875), *IL12B* (SNPs +1030C/T, +1188A/C e +1254T/G), *CD80* (SNPs -454 C/A, -387 T/C, -232 G/A, -79 C/G, -7T/C e +5C/A e um polimorfismo indel -557\_-561insCATGA) e *CD86* (SNPs +1057G/A e +1079G/A). A determinação das concentrações de IFN- $\gamma$  foi realizada através de ensaio imunoenzimático. Foi verificada uma associação do gene *IFNG*, entre a presença do alelo +874A e 15 repetições CA, como fator de risco para TB pulmonar assim como a presença do alelo +874T e 12 repetições CA como fatores de proteção contra TB pulmonar. Também foi encontrada uma associação do genótipo CC, do SNP +1188A/C no gene *IL12B*, como fator de risco ao desenvolvimento da TB pulmonar. Houve diferença significativa na concentração de IFN- $\gamma$  entre os genótipos do SNP +1188A/C no gene *IL12B* e o microsatélite no gene *IFNG*, com menor produção no genótipo CC e 15 repetições CA respectivamente. Estes resultados contribuem para o melhor entendimento da regulação na resposta imune à TB e auxilia na determinação do perfil genético da população da região Amazônica. Estudos futuros são necessários para uma melhor compreensão do papel de outros genes envolvidos na resposta imunológica a *M. tuberculosis* e influência nos níveis de produção de citocinas como IFN- $\gamma$ .

**Palavras-chave:** Tuberculose, Polimorfismos, Citocinas, *IFNG*, *IL12B*, *CD80*, *CD86*.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a chronic infection caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex and remains a major worldwide public health problem, leading to almost 1.45 million deaths annually. The state of Amazonas has a high rate incidence of TB, about 68.3/100,000 inhabitants in 2012. Only 5 to 10% of infected individuals develop active TB. It has been suggested that host factors determine the immune response to pathogen. Thus, many immunogenetic researches have demonstrated TB associated genes, but in the north region, research in this field is still rare. This fact motivated the investigation of polymorphisms for *IFNG*, *IL12B*, *CD80* and *CD86* genes, which codify proteins for cellular immune response. Furthermore, IFN- $\gamma$  concentration and its relation with genotypes found have been verified. A total of 177 patients and 224 controls (159 contacts and 65 non-contacts) were included in this study and DNA sequencing was performed for genes *IFNG* (SNP +874A/T and microsatellite +875), *IL12B* (SNPs +1030C/T, +1188A/C and +1254T/G), *CD80* (SNPs -454 C/A, -387 T/C, -232 G/A, -79 C/G, -7T/C, +5C/A and an indel polymorphism -557\_-561insCATGA) and *CD86* (SNPs +1057G/A and +1079G/A). The IFN- $\gamma$  concentration was determined by enzyme-linked immunoassay. At *IFNG*, the presence of the allele +874A and the allele with 15 CA repeats were associated with susceptibility to pulmonary TB, while the allele +874T and the allele with 12 CA repeats were associated with protection from pulmonary TB. In addition, an association between genotype CC (SNP +1188A/C at *IL12B*) and increased risk of pulmonary TB was found. Furthermore, a significant difference between IFN- $\gamma$  concentration and genotypes of SNP +1188A/C at *IL12B* and microsatellite at *IFNG* was observed, with decrease of IFN- $\gamma$  at genotype CC and 15 CA repeats respectively. These outcomes lead to a better understanding of the immune response regulation for TB and help to determine the genetic profile of the Amazon population. Future researches are still needed for a better understanding of the role of other genes involved in the immune response to *M. tuberculosis* and their influence at the production of cytokines like IFN- $\gamma$ .

**Keywords:** Tuberculosis, Polymorphisms, Cytokines, *IFNG*, *IL12B*, *CD80* and *CD86*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Modelo esquemático da parede celular da micobactéria.....	24
<b>Figura 2:</b>	Modelo esquemático do gene Interferon gama.....	28
<b>Figura 3:</b>	Modelo esquemático do gene <i>IL12B</i> .....	32
<b>Figura 4:</b>	Modelo esquemático do gene <i>CD80</i> .....	34
<b>Figura 5:</b>	Modelo esquemático do gene <i>CD86</i> .....	34
<b>Figura 6:</b>	Fluxograma de trabalho.....	46
<b>Figura 7:</b>	Percentual das amostras coletadas de pacientes de TB e controles (Contatos e não contatos) .....	47
<b>Figura 8:</b>	Produção de IFN- $\gamma$ induzida por mitógenos. Comparação da densidade ótica de IFN- $\gamma$ entre pacientes e controles.....	65
<b>Figura 9:</b>	Produção de IFN- $\gamma$ induzida por mitógenos. Comparação da densidade ótica de IFN- $\gamma$ entre pacientes, contatos e não contatos.....	66
<b>Figura 10:</b>	Comparação entre produção de IFN- $\gamma$ e frequência genotípica do SNP +874A/T do gene <i>IFNG</i> .....	67
<b>Figura 11:</b>	Comparação entre produção de IFN- $\gamma$ e frequência genotípica do microssatélite para 12 repetições de CA do gene <i>IFNG</i> .....	68
<b>Figura 12:</b>	Comparação entre produção de IFN- $\gamma$ (em densidade ótica) e frequência genotípica do microssatélite para 15 repetições de CA do gene <i>IFNG</i> .....	69
<b>Figura 13:</b>	Comparação entre produção de IFN- $\gamma$ (em densidade ótica) e frequência genotípica do SNP +1188A/C do gene <i>IL12B</i> .....	70
<b>Figura 14:</b>	Comparação entre produção de IFN- $\gamma$ (em densidade ótica) e frequência genotípica do SNP -387T/C do gene <i>CD80</i> .....	71
<b>Figura 15:</b>	Comparação entre produção de IFN- $\gamma$ (em densidade ótica) e frequência genotípica do SNP -232G/A do gene <i>CD80</i> .....	72
<b>Figura 16:</b>	Comparação entre produção de IFN- $\gamma$ (em densidade ótica) e frequência genotípica do SNP -79C/G do gene <i>CD80</i> .....	73
<b>Figura 17:</b>	Comparação entre produção de IFN- $\gamma$ (em densidade ótica) e frequência genotípica do SNP -7T/C do gene <i>CD80</i> .....	74
<b>Figura 18:</b>	Comparação entre produção de IFN- $\gamma$ (em densidade ótica) e frequência genotípica do SNP 1057G/A do gene <i>CD86</i> .....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes <i>IFNG</i> , <i>IL12B</i> , <i>CD80</i> e <i>CD86</i> .....	42
<b>Tabela 2:</b> Características gerais da população estudada.....	48
<b>Tabela 3:</b> Distribuição da frequência genotípica e alélica do SNP +874A/T do gene <i>IFNG</i> .....	49
<b>Tabela 4:</b> Estudos de associação para o SNP+874A/T do gene <i>IFNG</i> na Tuberculose em diferentes populações.....	50
<b>Tabela 5:</b> Distribuição da frequência genotípica do Microsatélite +875.....	51
<b>Tabela 6:</b> Distribuição da frequência alélica do Microsatélite +875.....	52
<b>Tabela 7:</b> Distribuição da frequência genotípica do Microsatélite +875 para 12 repetições CA...	54
<b>Tabela 8:</b> Distribuição da frequência genotípica do Microsatélite +875 para 15 repetições CA...	54
<b>Tabela 9:</b> Distribuição da frequência genotípica e alélica dos SNPs +1030C/T e +1188A/C do gene <i>IL12B</i> .....	56
<b>Tabela 10:</b> Distribuição da frequência genotípica e alélica do SNP +1254T/G do gene <i>IL12B</i> .....	57
<b>Tabela 11:</b> Distribuição da frequência genotípica e alélica do indel -557_-561ins e SNP -454 C/A do gene <i>CD80</i> .....	59
<b>Tabela 12:</b> Distribuição da frequência genotípica e alélica dos SNPs -387 T/C e -232 G/A do gene <i>CD80</i> .....	60
<b>Tabela 13:</b> Distribuição da frequência genotípica e alélica dos SNPs -79 C/G e -7T/C do gene <i>CD80</i> .....	61
<b>Tabela 14:</b> Distribuição da frequência genotípica e alélica do SNP +5C/A do gene <i>CD80</i> .....	62
<b>Tabela 15:</b> Distribuição da frequência genotípica e alélica dos SNPs 1057G/A e 1079G/A do gene <i>CD86</i> .....	64
<b>Tabela 16:</b> Análise de regressão logística múltipla para fatores intrínsecos, sociais e clínicos.....	79
<b>Tabela 17:</b> Efeito do genótipo CA <sub>12</sub> /CA <sub>12</sub> do microsatélite +875 no gene <i>IFNG</i> na Tuberculose.....	80
<b>Tabela 18:</b> Efeito do genótipo C/C do SNP 1188A/C no gene <i>IL12B</i> na Tuberculose.....	80
<b>Tabela 19:</b> Efeitos dos genótipos C/C do SNP +1188A/C no gene <i>IL12B</i> e CA <sub>12</sub> /CA <sub>12</sub> do microsatélite +875 no gene <i>IFNG</i> na Tuberculose.....	80
<b>Tabela 20:</b> Distribuição da frequência de haplótipos dos polimorfismos observados na região do íntron 1 do gene <i>IFNG</i> .....	81

## ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>3'UTR</b>	Região 3' não-traduzida
<b>Ala</b>	Alanina
<b>AG</b>	Arabino-Galactina
<b>APC</b>	Células apresentadoras de Antígeno
<b>BCG</b>	Bacilo Calmette-Guérin
<b>CTLA-4</b>	Antígeno 4 do Linfócito T Citotóxico
<b>DC-SIGN</b>	molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular 3 e específica das células dendríticas
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
<b>ELISA</b>	Ensaio Imuno-Enzimático
<b>HMGAl</b>	Grupo de Alta Mobilidade A1
<b>IFNG</b>	Gene Interferon Gama
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Citocina Interferon Gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL12B</b>	Gene da Interleucina 12, Subunidade p40
<b>LM</b>	Lipomananas
<b>Man-LAM</b>	Lipoarabinomanana-Manose
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>MNT</b>	Micobactérias não Causadoras de Tuberculose
<b>NFAT</b>	Fator Nuclear de Células T ativadas
<b>NF-kB</b>	Fator Nuclear Kappa B
<b>NK</b>	Células Natural Killer

<b>NKT</b>	Células Natural Killer T
<b>NOD</b>	Domínio de Oligomerização Nucleotídica
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PAMP</b>	Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PIM</b>	Fosfatidil-Mio-Inositol-Manosídeo
<b>POP</b>	Procedimento Operacional Padrão
<b>PPD</b>	Derivado Purificado da Proteína Tuberculina
<b>PRR</b>	Receptores de Reconhecimento de Padrões
<b>Ser</b>	Serina
<b>SNPs</b>	Polimorfismos Nucleotídicos individuais
<b>STAT4</b>	Transdutor e Ativador de Sinal de Transcrição
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de Transformação do Crescimento beta
<b>Th</b>	Linfócitos T Helper
<b>Thr</b>	Treonina
<b>TLR</b>	Receptor Toll-Like
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral alfa
<b>UNICEF</b>	Fundo das Nações Unidas para a Infância

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1 Tuberculose .....	18
2.1.1 Aspectos Gerais .....	18
2.1.1.1 Histórico .....	18
2.1.1.2 Epidemiologia.....	20
2.1.1.3 Etiologia, Morfologia e Transmissão .....	22
2.1.2 Aspectos Imunológicos.....	23
2.2 Interferon Gama .....	27
2.2.1 O gene e o polimorfismo genético .....	27
2.2.2 Proteína e seu papel biológico .....	31
2.3 Gene <i>IL12B</i> e seu Polimorfismo .....	32
2. 4 Genes <i>CD80</i> e <i>CD86</i> e seus polimorfismos .....	33
3. OBJETIVOS .....	37
3.1 Geral.....	37
3.2 Específicos .....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4.1 Tipo de Estudo .....	38
4.2 População de Estudo .....	38
4.2.1 Pacientes .....	38
4.2.2 Controles.....	38
4.2.2.1 Contatos.....	39
4.2.2.2 Não contatos .....	39
4.5 Considerações Éticas.....	39
4.6 Métodos.....	40
4.6.1 Coleta de escarro e sangue.....	40
4.6.2 Processamento do escarro .....	40
4.6.3 Processamento do sangue .....	41
4.6.3.1 Quantificação de Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) .....	41
4.6.3.2 Extração e Quantificação de DNA .....	41
4.6.3.3 Análise molecular de <i>IFNG</i> , <i>IL12B</i> , <i>CD80</i> e <i>CD86</i> .....	42
4.6.3.3.1 Ensaio de amplificação de DNA .....	42
4.6.3.3.2 Purificação e quantificação do produto da PCR.....	43
4.6.3.3.3 Sequenciamento do fragmento de amplificação.....	43
4.6.3.3.4 Purificação da reação de sequenciamento .....	44

4.6.3.3.5 Eletroforese Capilar.....	44
4.7 Análise Estatística .....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	47
5.1 Análise geral.....	47
5.2 Análises dos polimorfismos .....	48
5.2.1 Gene <i>IFNG</i> .....	48
5.2.2 Gene <i>IL12B</i> .....	55
5.2.3 Gene <i>CD80</i> .....	58
5.2.4 Gene <i>CD86</i> .....	63
5.3 Análise da citocina IFN- $\gamma$ .....	65
5.4 Análise de regressão.....	79
5.5 Análises de haplótipos.....	81
6. CONCLUSÃO .....	82
REFERÊNCIAS .....	84
RECURSOS FINANCEIROS .....	98
EQUIPE CIENTÍFICA.....	99
APÊNDICES .....	100
ANEXOS.....	111

## 1. INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (BRASIL, 2008). A doença geralmente afeta os pulmões (TB pulmonar), e também pode afetar outros órgãos e tecidos (TB extrapulmonar). A TB é transmitida pelo ar, através da tosse produzida por pessoas infectadas que apresentam a forma clínica multibacilar (WHO, 2011). Aproximadamente um terço da população mundial pode estar infectada pelo bacilo, e o Brasil está na lista dos 22 países que apresentam 80% dos casos de TB. Dos indivíduos infectados, entre 5% a 10% desenvolvem a TB, indicando que devem existir fatores no hospedeiro regulando a progressão à doença (KIM *et al.*, 2005; SHALER *et al.*, 2012). Por este aspecto, o perfil imunogenético pode ser considerado um importante fator a ser determinado (ARENTZ e HAWN, 2007).

A defesa imune contra *M. tuberculosis* é complexa e envolve a interação entre células do sistema imune inato e adaptativo, junto com a produção de citocinas, tais como: o interferon gama (IFN- $\gamma$ ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a Interleucina 12 (IL12). O IFN- $\gamma$  é uma das mais importantes citocinas envolvidas na ativação dos macrófagos, estimulando atividades antimicrobianas, assim como a indução da síntese e expressão de MHC de classe II (RAJA *et al.*, 2004; STENGER, *et al.*, 1999).

A citocina IFN- $\gamma$  é codificada pelo gene *IFNG*. Vários estudos sugerem o envolvimento de polimorfismos desse gene em diversas doenças inflamatórias e infecciosas (AN *et al.*, 2003; BEN SELMA *et al.*, 2011; CHONG *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2012). Além disso, um grande número de estudos tem investigado a possível associação entre o polimorfismo desse gene e o risco ao desenvolvimento da TB (LÓPEZ-MADERUELO *et al.*, 2003; SAHIRATMADJA *et al.*, 2007; TIAN *et al.*, 2011; VALLINOTO *et al.*, 2010).

Na resposta imune contra *M. tuberculosis*, os linfócitos Th1 são cruciais, pois contribuem para formação do granuloma e eliminação da infecção. Estas células produzem o IFN- $\gamma$ , que por sua vez estimula células para que estas exerçam a função de internalizar e eliminar o patógeno. Além do IFN- $\gamma$ , a IL12 está envolvida na eliminação do patógeno, pois atua induzindo a diferenciação de linfócitos T em Th1 (JURADO *et al.*, 2012).

A IL12 é também um importante estimulador da produção de IFN- $\gamma$  pelas células T e Natural Killer (NK), sendo estas duas citocinas cruciais na resposta natural contra bactérias intracelulares (ABBAS *et al.*, 2012). Estudos sugerem que existam mutações nos genes que codificam a IL12 que possam estar associadas à suscetibilidade a doenças infecciosas e autoimunes (PICARD *et al.*, 2002; SEEGERS *et al.*, 2002; VAN VEEN *et al.*, 2001).

Moléculas coestimulatórias, como CD80 e CD86, também possuem participação fundamental na indução de resposta imune, ajudando a promover a ativação e diferenciação de células T (MIGLIORI, 2010). Estas moléculas proporcionam um sinal coestimulador para as células T, necessário para completa ativação das células T (REEVES *et al.*, 1997).

Estudos de polimorfismos nos genes que codificam as moléculas CD80 e CD86 ainda são pouco investigados em doenças infecciosas. Entretanto, existem estudos de polimorfismos nesses genes em doenças inflamatórias e autoimunes (HANDA *et al.*, 2005; LIAO *et al.*, 2011; MATSUSHITA *et al.*, 2000).

Neste contexto, o presente estudo investigou a associação entre os polimorfismos nos genes que codificam as citocinas IFN- $\gamma$ , IL12p40 e as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 e os níveis de produção da citocina IFN- $\gamma$  em pacientes com TB pulmonar. Associações foram observadas para os genes *IFNG*, SNP +874A/T e microssatélite +875, além do SNP +1188A/C do gene *IL12B*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Tuberculose

#### 2.1.1 Aspectos Gerais

##### 2.1.1.1 Histórico

A Tuberculose (TB) é considerada uma das doenças infectocontagiosas mais antigas do mundo, afetando a humanidade desde a pré-história. O primeiro vestígio dessa doença no homem data de cerca de 5 mil anos a.C. quando foram encontrados esqueletos com lesões ósseas compatíveis com a TB no Egito. Há evidências, de acordo com os achados arqueológicos, dessa doença em várias regiões do mundo na antiguidade (revisado por MACIEL *et al.*, 2012).

O primeiro diagnóstico bacteriológico que comprovou a existência da TB na América foi em uma múmia encontrada no Peru, na qual se identificou bacilos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* através das técnicas de biologia molecular, com datação aproximada de 1.100 a.C. (ROSEMBERG, 1999).

Na idade média, há evidências de que a TB estava difundida em praticamente toda Europa, embora os registros sobre essa doença sejam escassos (ROBERTS e BUIKSTRA, 2003). Com o renascimento, surgiram novos conhecimentos sobre a TB, como por exemplo; a elucidação de sua patogenia, além do conceito de TB pulmonar e extrapulmonar (DANIEL, 2004; DUFFIN, 1998).

A disseminação dessa enfermidade pelo mundo se deu principalmente pela expansão colonial seguida da revolução industrial, quando a população se concentrou em cidades que, por sua vez, apresentavam péssimas condições sanitárias (ROSEMBERG, 1999).

No Brasil, assim como na Europa, a epidemia dessa doença se tornou comum nas maiores cidades, onde os serviços de saúde, higiene e urbanização eram precários (CAMPOS e PIANTA, 2001).

Somente no ano de 1865, através dos estudos de Jean-Antoine Villemin, descobriu-se a transmissibilidade do bacilo, sugerindo que a TB é disseminada de pessoas doentes a pessoas saudáveis (SMITH, 2003). Em 1882, Robert Koch estabelece o agente etiológico da TB, que ficou conhecido como bacilo de Koch (CAMBAL e DRANCOURT, 2014; SAKULA, 1982).

Em 1909, Clemens Freiherr Von Pirquet estabeleceu o termo TB Latente a partir de observações com reações de tuberculina intracutânea (KHAN, 2013) e em 1930, Florence Seibert desenvolveu um derivado purificado da proteína tuberculina (PPD) (PALMER e BATES, 1952 *Apud* DANIEL, 2006) que ainda é utilizado como auxílio diagnóstico de infecção latente por *M. tuberculosis*.

Do início a meados do século XIX, as taxas de mortalidade começaram a diminuir na Europa e norte da América. Acredita-se que esse decréscimo foi devido à melhoria das condições sociais e a seleção natural de uma população mais resistente geneticamente (DAVIES *et al.*, 1999).

Em 1921, Albert Calmette e Camille Guérin desenvolveram uma vacina contra a TB, utilizando *M. bovis* atenuado. A BCG (Bacilo Calmette-Guérin) foi prontamente aceita em grande parte da Europa, imunizando mais de 100.000 crianças (BLACKADER *et al.*, 1929; CALMETTE, 1930). A vacina chegou ao Brasil por volta de 1926, sendo utilizada nos recém-nascidos (BERTOLLI-FILHO, 2001).

Em 1926 um acidente na Alemanha, no qual 30% dos bebês que foram vacinados com a BCG morreram, demonstrou que há uma variação na imunidade inata contra o bacilo, indicando que os bebês morreram provavelmente por apresentarem menor resistência ao

bacilo. Essa evidencia trouxe à tona a importância da genética do hospedeiro na suscetibilidade à TB (BELLAMY, 2005).

Após a segunda guerra mundial, iniciou-se uma campanha pela UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância) para controlar a TB (BRIMNES, 2008). Essa campanha foi realizada através de testes com tuberculina seguido de vacinação com BCG de pessoas não reatoras (WHO, 1974).

Apesar dessas descobertas, os índices de mortalidade e morbidade diminuíram significativamente somente com a descoberta e utilização da antibióticoterapia, a partir da década de 1940, com a utilização da estreptomicina e do para-amino-salicílico (DUCATI *et al.*, 2008) e posteriormente dos medicamentos micobactericidas Isoniazida (1952) e Rifampicina (1957) (revisado por DANIEL, 2006).

Iniciou-se então, uma nova era no tratamento da TB, com medidas de saúde pública realmente eficazes. (DANIEL, 2006).

Entretanto, na década de 80, com a epidemia de HIV/Aids, a incidência de TB voltou a aumentar, principalmente nos países subdesenvolvidos. Somado a isso, surgiram cepas multirresistentes aos antibióticos usados no tratamento da TB, acarretando um grande desafio ao controle da doença (BRASIL, 2011).

Atualmente, apesar da existência de recursos tecnológicos para diagnóstico, tratamento e controle da TB, essa enfermidade ainda necessita de atenção dos profissionais de saúde e da sociedade (DE MELO *et al.*, 2003; RUFFINO-NETTO e DE SOUZA, 2001).

### **2.1.1.2 Epidemiologia**

A Tuberculose (TB) ainda é um grave problema de saúde pública, sendo a segunda principal causa de morte por um único agente infeccioso (WHO, 2013). É considerada uma

doença endêmica mundial, embora apresente características peculiares em cada país e até mesmo em cada região, como ocorre no Brasil. Sua magnitude está relacionada ao nível de desenvolvimento social, à qualidade do controle da doença e as condições de acesso aos serviços de saúde (BRASIL, 2012a).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1993, declarou a TB como uma emergência de saúde pública mundial. Os esforços para melhorar o atendimento e controle da TB foram intensificados em nível nacional e internacional (BRASIL, 2003; PILLER, 2012).

Segundo estimativas da OMS, cerca de um terço da população mundial está infectada pelo bacilo da TB, com o risco de desenvolver a doença. Anualmente, são estimados 9,2 milhões de novos casos e 1,4 milhões de mortes no mundo. Além disso, estima-se que já existam cerca de 5 milhões de casos de multidroga resistência em todo mundo (BRASIL, 2012b).

Embora haja uma alta prevalência da TB em diversos países, a sua incidência mundial vem diminuindo nos últimos anos, sendo que a taxa de queda entre 2010 e 2011 foi de 2,2% (WHO, 2012). Em 2012, houve 8,6 milhões de novos casos de TB em todo mundo. Destes, 1,1 milhão apresentaram coinfeção com HIV e houve 1,3 milhão de mortes por TB. Além de uma estimativa de 450.000 casos novos de multidroga resistência (WHO, 2013).

O Brasil está na lista dos 22 países que apresentam 82% dos casos de TB, ocupando a 17ª posição segundo dados do Ministério da Saúde, no ano de 2012 o Brasil apresentou uma taxa de incidência de 36,1 casos de TB por 100.000 habitantes (BRASIL, 2013).

No estado do Amazonas, em 2012 foram notificados, 2.399 casos novos de TB de todas as formas, sendo 1.298 casos com baciloscopia positiva. A cidade de Manaus apresentou uma taxa de incidência de TB de todas as formas de 94,3 casos por 100 mil habitantes (SINAN-AM, 2013), quase três vezes a taxa nacional.

### 2.1.1.3 Etiologia, Morfologia e Transmissão

Os agentes etiológicos que causam a Tuberculose (TB) são micobactérias que pertencem à classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium* (EUZÉBY, 2014; NCBI, 2013a).

As espécies de micobactérias podem ser classificadas em 2 grupos: complexo *Mycobacterium tuberculosis* (agentes causadores da TB) e micobactérias não causadoras de Tuberculose (MNT) ou também podem ser classificadas de acordo com a patogenicidade em patogênicas, potencialmente patogênicas e raramente patogênicas (BRASIL, 2008).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (micobactérias patogênicas) engloba as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* –BCG; *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* (BRASIL, 2008; RAVIGLIONE e O'BRIEN, 2008), *M. canettii* (GUTIERREZ *et al.*, 2005), *M. mungi* (ALEXANDER *et al.*, 2010) e *M. orygis* (INGEN *et al.*, 2012). E são os agentes etiológicos da Tuberculose.

O bacilo da TB é um bastonete delgado com diâmetro de 0,3 µm a 0,6 µm e comprimento de 1,0 µm a 4,0 µm. É uma bactéria aeróbia que não forma esporos, nem possui flagelos, apresentando crescimento lento, com divisões a cada 16 ou 20 horas (RAVIGLIONE e O'BRIEN, 2008).

Na sua parede celular, apresentam uma variedade de lipídios, como o ácido micólico, o qual, junto com outros lipídios, gera complexos com o corante fucsina, tornando-se resistentes às descolorações com soluções álcool-ácidas. Sendo então, denominado Bacilo Álcool-Ácido Resistente – BAAR (BRASIL, 2008; DUCATI *et al.*, 2008).

Na Tuberculose (TB), a infecção ocorre, geralmente, pela transmissão de gotículas contendo o bacilo dispersas pelo ar através da tosse, espirro ou fala de um indivíduo com TB pulmonar ou laríngea para outras pessoas (BRASIL, 2011; CDC, 2005; PANDOLFI *et al.*, 2007; RAVIGLIONE e O'BRIEN, 2008).

Os principais fatores de risco para infecção são a quantidade de bacilos nas gotículas expelidas por uma pessoa com TB multibacilar e o tempo de exposição de um indivíduo (sem a doença) ao bacilo, sendo que este pode permanecer em suspensão por algumas horas (DUCATI *et al.*, 2008).

### **2.1.2 Aspectos Imunológicos**

A infecção é iniciada quando *M. tuberculosis* é fagocitado por células apresentadoras de antígenos (macrófagos alveolares e células dendríticas) no pulmão. O reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP) pelos receptores específicos de reconhecimento de padrões (PRRs) das células apresentadoras de antígenos é fundamental para o início e orientação da resposta imune inata no hospedeiro (AKIRA *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2012; TAKEUCHI e AKIRA, 2010).

Os principais PAMPs de *M. tuberculosis* são os ácidos micólicos, peptidoglicanos, Fosfatidil-mio-inositol-manosídeo (PIM), Arabino-galactina (AG), Lipomananas (LM), lipoarabinomanana-manose (Man-LAM) (QUESNIAUX *et al.*, 2004) e os principais PRRs presentes nas células apresentadoras de antígeno humana são os receptores Toll-like (TLRs), receptores NOD (domínio de oligomerização nucleotídica) e Lectinas tipo C, principalmente DC-SIGN (FRANCHI *et al.*, 2008; JO *et al.*, 2007; JO, 2008; QUESNIAUX *et al.*, 2004; SCHIERLOH *et al.*, 2007; TAILLEUX *et al.*, 2002).

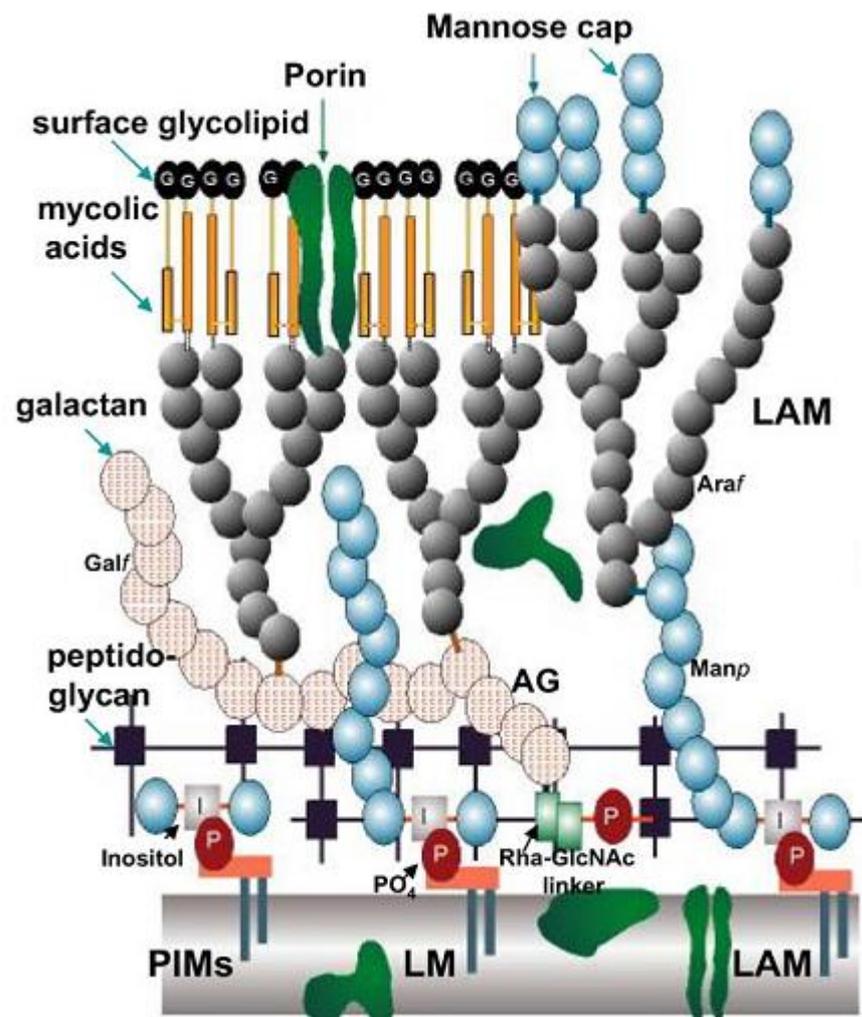


Figura 1: Modelo esquemático da parede celular da micobactéria. (Fonte: QUESNIAUX *et al.* 2004).

A interação dos PAMPs com PRRs inicia uma cascata de sinalização intracelular, na qual leva à ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), e estes irão induzir à expressão de genes cujos produtos estão relacionados a uma resposta pró-inflamatória que irá beneficiar o hospedeiro. Os principais produtos são o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , interleucinas (IL-1 e IL-12) e quimiocinas (DHEDA *et al.*, 2010; JO *et al.*, 2007; LIU e MODLIN, 2008).

Além das citocinas, que servem como um sinal para a infecção, no interior do macrófago ocorre a junção do fagossomo com o lisossomo, gerando o fagolisossomo. Esse evento leva à acidificação do fagolisossomo, através da presença de bombas de H<sup>+</sup>-ATPase

vesiculares e enzimas proteolíticas (hidrolases lisossomais). Além disso, há a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, as quais apresentam potentes propriedades microbicidas, conseguindo destruir *M. tuberculosis* e deter a infecção, em uma resposta eficaz (AHMAD, 2011; POIRIER e AV-GAY, 2012).

Em resposta às citocinas secretadas, monócitos, neutrófilos e linfócitos migram para o local da infecção, iniciando suas respectivas ações (LOWE *et al.*, 2012; TORRADO *et al.*, 2011).

Durante esta resposta, os bacilos resistentes aos mecanismos bactericidas do macrófago impedem a fusão do fagossomo com o lisossomo, multiplicam-se no fagossomo e provocam a morte do macrófago. Os bacilos lançados se multiplicam extracelularmente, são fagocitados por outros macrófagos que também não conseguem controlar o crescimento de *M. tuberculosis*, mantendo desta forma os bacilos viáveis (CHEN *et al.*, 2006; FLYNN e CHAN, 2003; MORTAZ *et al.*, 2012; ROHDE *et al.*, 2007).

Enquanto isso, as células dendríticas com bacilos internalizados, migram para o linfonodo regional mais próximo, onde ocorre apresentação dos antígenos do bacilo aos linfócitos T naive, estes se tornam ativados, entram em expansão clonal e os linfócitos T efetores migram para o foco da infecção, guiados pelas quimiocinas produzidas pelas células infectadas (HUMPHREYS *et al.*, 2006; MARTINO *et al.*, 2006).

Após ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> pela apresentação do antígeno, estes podem desenvolver diferentes respostas efetoras, dependendo dos estímulos recebidos. A presença de IL12 produzida por células dendríticas induz a diferenciação de linfócitos Th naive para Th1, que irá produzir IFN- $\gamma$ . Este, por sua vez, age aumentando a capacidade do macrófago em destruir *M. tuberculosis*. Estímulos de IL4 e IL33 geram linfócitos T com resposta Th2, produzindo IL4, IL5 e IL13 e, esta resposta irá inibir a ativação clássica dos macrófagos mediada por IFN- $\gamma$ . Estímulos com TGF- $\beta$ , IL6 e IL23, levam a diferenciação de linfócitos

Th17, que secretam IL17, que atua recrutando neutrófilos e monócitos para o sítio de infecção, ajudando na formação do granuloma (ARENTZ e HAWN, 2007; DWIVEDI *et al.*, 2012; SERGEJEVA *et al.*, 2005; TORRADO e COOPER, 2010).

Os linfócitos T CD8+ também participam da resposta contra o bacilo. Estas células, após ativação por células apresentadoras de antígeno, geram grânulos citoplasmáticos ligados a membrana contendo perforinas e granzimas, que possuem propriedade de destruir células infectadas. Além disso, esses linfócitos também são capazes de secretar IFN- $\gamma$ , que colaboram na ativação de fagócitos (ABBAS *et al.*, 2012; GROTZKE e LEWINSOHN, 2005; JOSHI e KAECH, 2008; WOODWORTH e BEHAR, 2006).

O acúmulo de macrófagos, linfócitos T, e outras células tais como: células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais, e células do estroma, conduzem à formação de granulomas no local da infecção (RAJA, 2004; SALGAME, 2005).

A formação de granulomas limita a disseminação bacteriana para outros tecidos e órgãos, fornecendo um microambiente para interações entre macrófagos e outras células do sistema imunológico, além da liberação de citocinas produzidas por estas células (ZUNIGA *et al.*, 2012), por conseguinte, a progressão da infecção é interrompida. No entanto, alguns bacilos resistentes são capazes de sobreviver no interior das células e entram em um estado de latência, evitando a eliminação completa pelo sistema imune (FLYNN e CHAN, 2005; RUSSELL, 2013).

## 2.2 Interferon Gama

### 2.2.1 O gene e o polimorfismo genético

O gene *IFNG* codifica a proteína interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que exerce um papel importante na resposta imune Th1. Bureau *et al.* (1995) realizaram o mapeamento do gene *IFNG*, definindo sua localização no cromossomo 12q15. Este gene possui 4 éxons e 3 íntrons, com uma estrutura genômica altamente conservada (GRAY e GOEDDEL, 1982; NAYLOR *et al.*, 1983; TAYA *et al.*, 1982).

A ativação do *IFNG* leva a geração de um mRNA, de 1,2kb, que por sua vez é traduzido em um polipeptídeo com 143 aminoácidos, a citocina IFN- $\gamma$  (FARRAR e SCHREIBER, 1993).

A regulação da expressão do gene *IFNG* ocorre através de indução ou inibição de fatores de transcrição, como T-bet, NF- $\kappa$ B, NFAT e STAT4 (BALASUBRAMANI *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2007; SAVAN *et al.*, 2009), e tanto a região promotora como a região intrônica atuam como sítios de regulação gênica (BALASUBRAMANI *et al.*, 2014; JASKULA *et al.*, 2009; PRAVICA *et al.*, 1999; SAVAN *et al.*, 2009).

Elementos como grupo de alta mobilidade A1(HMGA1) (CHAU *et al.*, 2005) e éster de forbol (CICCARONE *et al.*, 1990) induzem a transcrição de *IFNG* nas regiões regulatórias, já a ciclosporina A (SICA *et al.*, 1997), TGF $\beta$ 1 (PARK *et al.*, 2007), DNA metiltransferase (DNMT) (SUN *et al.*, 2013; WHITE *et al.*, 2002) têm capacidade de inibir essa expressão em regiões proximais e distais promotoras.

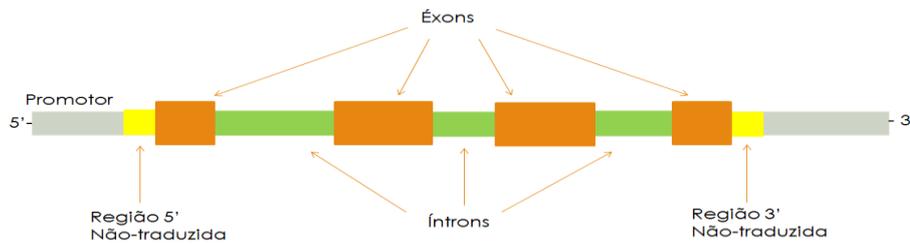


Figura 2: Modelo esquemático do gene *IFNG* (adaptado de TAYA *et al.*, 1982).

O gene *IFNG* possui no primeiro íntron uma região polimórfica de microssatélite formado por 2 nucleotídeos CA (Citosina e Adenina) que se repetem em *tandem* curta. Esse polimorfismo, na posição +875 do primeiro íntron, foi descrito por Ruiz-Linares (1993) e até o presente momento, têm sido descritas repetições CA em números de 10 a 20 (SAHIRATMADJA *et al.*, 2007; TSO *et al.*, 2005).

Estudos de Pravica *et al.* (1999) demonstraram que a frequência alélica observada desse microssatélite está relacionada a variações na produção de IFN- $\gamma$ . Sendo que, a presença de 12 repetições CA está correlacionada a maiores concentrações de IFN- $\gamma$ .

Adjacente à região microssatélite de repetição CA, está localizado um SNP, na posição +874A/T descrito por Pociot *et al.* (1997). Esse polimorfismo se encontra no suposto sítio de ligação para o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (HEINEMEYER *et al.*, 1998; SICA *et al.*, 1992). Pravica *et al.* (2000) mostraram uma ligação preferencial do NF- $\kappa$ B com a sequência de DNA contendo o alelo T.

A partir do pressuposto de que este fator de transcrição induz a expressão do gene *IFNG*, os alelos T e A provavelmente estão correlacionados, respectivamente, com alta e baixa produção de IFN- $\gamma$ .

O polimorfismo +874A/T tem sido estudado em diversas condições e patologias como doenças infecciosas, incluindo a TB, além de doenças autoimunes e neoplasias.

Foram descritas associações deste SNP em Câncer de mama (KAMALI-SARVESTANI *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2011), Hemoglobínúria Paroxística noturna (WANG, S., *et al.*, 2012), Doença Celíaca (LIO, 2005) e Anemia Aplásica (CHANG, 2010), indicando o alelo +874T como fator de risco ao desenvolvimento dessas doenças. Já na Doença de Chagas, na Síndrome Respiratória Aguda Grave (CHONG *et al.*, 2006), na Neuropatia Periférica em pacientes com Diabetes tipo II (KOLLA *et al.*, 2009) e na Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (HASHEMI *et al.*, 2011a) o alelo +874A foi associado ao desenvolvimento da doença.

O microssatélite +875 também tem sido estudado em diversas doenças, sendo que a presença de 12 repetições CA foi associada ao risco de desenvolvimento de Anemia Aplásica (DUFOUR *et al.*, 2004) e Fibrose de enxerto em receptores de transplante de pulmão (AWAD *et al.*, 1999). Além disso, está relacionada ao aumento de sobrevida em pacientes com carcinoma pancreático avançado (HALMA *et al.*, 2004).

A presença de 13 repetições CA foi associada ao risco de desenvolvimento de endometriose (BHANOTHU *et al.*, 2013), assim como ao risco à Artrite reumatoide e 11 repetições CA foi associada à proteção contra Artrite reumatoide (KHANI-HANJANI *et al.*, 2000). Já a presença de 15 a 17 repetições CA foi associada ao risco à Hanseníase (REYNARD *et al.*, 2003).

Para TB, há diversos estudos em diferentes populações, como a tunisiana, espanhola, egípcia, turca, chinesa e brasileira, que associaram o alelo A do SNP +874A/T com o aumento da suscetibilidade de desenvolver a TB pulmonar e extrapulmonar (BEN SELMA *et al.*, 2011; LÓPEZ-MADERUELO *et al.*, 2003; MOSAAD *et al.*, 2010; SALLAKCI *et al.*, 2007; TSO *et al.*, 2005; VALLINOTO *et al.*, 2010). Assim como, alguns destes estudos demonstraram que as concentrações de IFN- $\gamma$  são mais baixas em indivíduos que apresentam o alelo A (LÓPEZ-MADERUELO *et al.*, 2003; SALLAKCI *et al.*, 2007; VALLINOTO *et al.*, 2010).

Vallinoto *et al.* (2010) também demonstraram que a presença do alelo A e menor concentração de IFN- $\gamma$  estão associadas ao desenvolvimento de formas mais graves da doença, como a TB pleural.

Resultado diferente foi observado no estudo realizado por Henao *et al.* (2006), na população colombiana, que apresentou associação do alelo T à TB pleural e miliar (formas graves da doença), e o alelo A foi mais frequente em pacientes com TB pulmonar.

Tso *et al.* (2005) também verificaram, que a presença de 12 repetições CA está absolutamente ligada ao alelo T. Confirmando estudo prévio de Pravica *et al.* (2000), o qual determinou que o polimorfismo +874A/T está correlacionado ao microssatélite CA (+875) e estes influenciam nos níveis de produção da proteína IFN- $\gamma$ .

Em um estudo na população japonesa, Shibasaki *et al.* (2009) verificaram que pacientes de TB com genótipo AA, do polimorfismo +874A/T no *IFNG*, apresentaram uma taxa de conversão do exame de cultura significativamente menor que os pacientes com genótipo AT ou TT. Indicando a importância de fatores genéticos envolvidos na transmissão da doença, mesmo após iniciada a antibioticoterapia.

Diversos estudos de associação do SNP +874A/T na TB têm sido publicados, fato que motivou Pacheco *et al.* (2008), Tian *et al.* (2011) e De Albuquerque *et al.* (2012) a realizarem estudos de meta-análise para avaliar o risco genético desse polimorfismo em diferentes populações. As meta-análises indicaram que o genótipo TT revelou um efeito protetor significativo, enquanto o genótipo AA pode estar associado com o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de TB. Estes resultados demonstram o papel fundamental do IFN- $\gamma$  na defesa do hospedeiro contra o desenvolvimento da TB.

### 2.2.2 Proteína e seu papel biológico

O Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) ou interferon (IFN) tipo II é uma proteína solúvel que possui 143 aminoácidos (citocina madura) e aproximadamente 19,4Da (NCBI, 2013b).

O IFN- $\gamma$  é produzido por células natural killer (NK), natural killer T (NKT) e por linfócitos T CD4+ e CD8+. A secreção de IFN- $\gamma$  por NK e NKT é importante na defesa inicial do hospedeiro contra infecção (imunidade inata), enquanto os linfócitos T se tornam a principal fonte de IFN- $\gamma$  na resposta imune adaptativa (ABBAS *et al.*, 2012; CARNAUD *et al.*, 1999; GIACOMINI *et al.*, 2001; SCHOENBORN e WILSON, 2007).

A produção de IFN- $\gamma$  é controlada por outras citocinas secretadas por células apresentadoras de antígeno (APCs), mais notavelmente a interleucina 12 (IL12), a qual tem importante papel como mediadora na diferenciação de linfócitos Th1 e produção de IFN- $\gamma$  na resposta imune inata e adaptativa (ABBAS *et al.*, 2012; LIM *et al.*, 2013; YOUNG e HARDY, 1995).

O IFN- $\gamma$  é essencial na resposta imune contra diversos patógenos, pois possui propriedades imunoregulatórias tais como: ativação de macrófagos para destruição de microrganismos fagocitados (GUIO *et al.*, 2011), estimulação de mudança de subclasse nas células B (ABBAS *et al.*, 2012), mediação da diferenciação de células Th0 para Th1 (YATES *et al.*, 2004), indução da expressão de MHC de classe II (GIROUX *et al.*, 2003) e moléculas coestimuladoras de superfície de APCs, como CD80 e CD86 (IGLESIAS *et al.*, 1997).

Estes dados confirmam a importância dos fatores imunogenéticos do hospedeiro no desenvolvimento da TB.

### 2.3 Gene *IL12B* e seu Polimorfismo

*IL12B* é um gene que codifica a subunidade p40 da IL12 (IL12p40). Essa proteína forma um heterodímero com a subunidade IL12p35 gerando a proteína IL12. Assim como, pode juntar-se com a subunidade IL23p19, gerando a citocina IL23. Além disso, pode formar um homodímero IL12p80 (GEE *et al.*, 2009; GUNSTEN *et al.*, 2008).

O gene *IL12B* possui 8 éxons e 7 íntrons e está localizado no cromossomo 5q31-q33 (HUANG *et al.*, 2000; YOKOUCHI *et al.*, 2000).

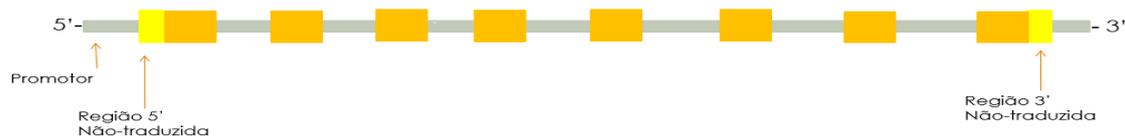


Figura 3: Modelo esquemático do gene *IL12B* (Adaptado de HUANG *et al.*, 2000).

A IL12 é produzida por macrófagos, monócitos, células dendríticas e células B em resposta ao reconhecimento do patógeno (GEE *et al.*, 2009; QIDWAI *et al.*, 2012; SCHRODER *et al.*, 2004) e possui como principal função a indução da produção de IFN- $\gamma$  por células NK e células T, além de indução da diferenciação de células T naive em células Th1 efetoras. Apresentando, portanto, um papel importante no desenvolvimento da imunidade mediada por célula (LIM *et al.*, 2013; PICARD *et al.*, 2002).

Alterações na sequência dos genes que codificam essa proteína podem estar relacionadas ao desenvolvimento de doenças. Vários polimorfismos na região promotora, intrônica e região 3' UTR no gene *IL12B* tem sido estudados para associação com TB em várias populações, embora alguns resultados não sejam significativos (MORRIS *et al.*, 2011; SAHIRATMADJA *et al.*, 2007; SELVARAJ *et al.*, 2008; TSO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2010).

O polimorfismo no gene *IL12B*, na região 3'UTR, posição +1188A/C está associado à suscetibilidade ao desenvolvimento de Gota (LIU *et al.*, 2013), Psoríase (NAIR *et al.*, 2008), Câncer Cervical (CHEN *et al.*, 2009), Diabetes Tipo I (MORAHAN *et al.*, 2009), Asma (CHEN *et al.*, 2011), variações na resposta humoral específica ao Sarampo (HARALAMBIEVA *et al.*, 2011), desenvolvimento e gravidade da Espondilite Anquilosante (WONG *et al.*, 2012), suscetibilidade e gravidade na infertilidade induzida por *Chlamydia trachomatis* (ÖHMAN *et al.*, 2012), proteção para Câncer de mama (KAARVATN *et al.*, 2012) e suscetibilidade a Hanseníase (ALVARADO-NAVARRO *et al.*, 2008).

Além disso, estudos de Peresi *et al.* (2013) verificaram que nesse polimorfismo +1188A/C, o alelo C está associado a altos níveis plasmáticos de IL12p40, tanto em indivíduos saudáveis como em pacientes com TB pulmonar. Assim como, Yilmaz *et al.* (2005) demonstraram que o genótipo CC está associado a altos níveis de produção de IL12p40 *in vitro* após estímulos com PPD.

Visto que, a IL12 tem um importante papel na resposta imune contra a TB, baixos níveis dessa citocina poderiam dificultar os mecanismos de defesa do hospedeiro.

Pode-se perceber, portanto, o importante papel do estudo do gene *IL12B*, uma vez que o mesmo está intimamente relacionado a mecanismos de suscetibilidade ou resistência em diversas patologias e seu produto tem um papel crucial na resposta imunológica.

## **2. 4 Genes *CD80* e *CD86* e seus polimorfismos**

Os genes *CD80* e *CD86* estão localizados no cromossomo 3q13.3-q21 (FREEMAN *et al.*, 1992). O gene *CD80* possui 6 éxons, sendo que o 1º éxon não é traduzido (SELVAKUMAR *et al.*, 1992). O gene *CD86* é composto por oito éxons (JELLIS *et al.*, 1995; NCBI, 2013c).

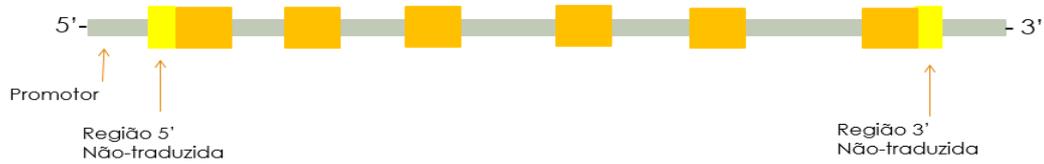


Figura 4: Modelo esquemático do gene *CD80*. (Adaptado de SELVAKUMAR *et al.*, 1992).

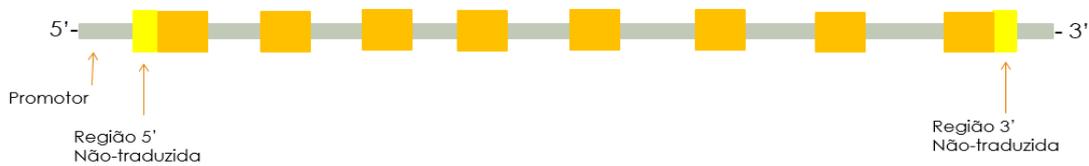


Figura 5: Modelo esquemático do gene *CD86*. (Adaptado de JELLIS *et al.*, 1995).

Esses genes são expressos em células dendríticas ativadas, células B ativadas e macrófagos, e codificam duas glicoproteínas de membrana denominadas CD80 ou B7-1 e CD86 ou B7-2, da superfamília de imunoglobulinas, que ao ligar-se a moléculas CD28, presentes na superfície de células T virgens, juntamente com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e receptores de célula T (TCR), promovem a ativação e proliferação de linfócitos T (ABBAS *et al.*, 2012; HANDA *et al.*, 2005; LENSCHOW *et al.*, 1996; MANZOTTI *et al.*, 2006; REEVES *et al.*, 1997; SELVAKUMAR *et al.*, 1992). Essas glicoproteínas também se ligam ao CTLA-4 (antígeno 4 do linfócito T citotóxico ou CD152) que leva à inibição da resposta de células T, contribuindo para o equilíbrio da resposta imune (AHMED *et al.*, 2001; GREENWALD *et al.*, 2005).

A indução da expressão do gene *CD80* se dá por diversos estímulos, como produtos de microrganismos que se ligam a receptores semelhantes a Toll e citocinas como IFN- $\gamma$  e moléculas de superfície de membrana como CD40 (ABBAS *et al.*, 2012).

Apesar das moléculas CD80 e CD86 desempenharem um papel crucial no sistema imune, os polimorfismos dos seus genes foram pouco investigados no desenvolvimento de doenças.

Matsushita *et al.* (2000) identificaram polimorfismos nos genes *CD80* e *CD86*, na região promotora e éxon 8, respectivamente, e Beltrame *et al.* (2012) investigaram a diversidade genética e microevolução desses genes, nessas regiões, em diferentes grupos étnicos no Brasil, como descendentes europeus, japoneses, africanos e indígenas.

Estudos dos polimorfismos nos genes *CD80* e *CD86* foram realizados em algumas doenças como Sarcoidose (HANDA *et al.*, 2005) Artrite reumatoide e Lúpus eritematoso sistêmico (MATSUSHITA *et al.*, 2000). Entretanto os resultados não foram significativos para desenvolvimento ou proteção dessas enfermidades.

No estudo do polimorfismo de *CD86*, no éxon 8, posição +1057G/A, Marín *et al.* (2005) sugeriram que o genótipo AA poderia estar envolvido na aceitação do transplante de fígado, dado que a presença desse genótipo foi relacionada com a diminuição da frequência de rejeição aguda e ao aumento de sobrevida do enxerto. Outros estudos mostraram que o alelo A do SNP +1057G/A foi considerado como um fator de risco para suscetibilidade a Câncer pancreático (XIANG *et al.*, 2012), Sarcoma de Ewing (WANG, J., *et al.*, 2012), Osteosarcoma (WANG *et al.*, 2011) Câncer colorretal (PAN *et al.*, 2010) e Doença pulmonar obstrutiva crônica (LIU *et al.*, 2010).

Os fatores imunogenéticos podem estar relacionados a risco ou proteção às diversas patologias. Portanto o estudo dos polimorfismos nos genes *IFNG*, *IL12B*, *CD80* e *CD86*, que codificam proteínas com papéis cruciais na resposta imune ao bacilo da TB, podem fornecer contribuições relevantes para o melhor entendimento do desenvolvimento e progressão da TB.

Além de levar à descoberta de novos marcadores imunogenéticos que possam ajudar a compreender os mecanismos envolvidos na suscetibilidade ou resistência a TB, assim como,

encontrar fatores que justifiquem o número tão expressivo de casos dessa doença na região amazônica. Além disso, esses dados são essenciais para ajudar a determinar o perfil imunogenético dos pacientes de TB diagnosticados na cidade de Manaus.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Investigar polimorfismos nos genes *IFNG*, *IL12B*, *CD80* e *CD86* associados à produção da citocina IFN- $\gamma$  em pacientes com TB pulmonar e controles.

#### **3.2 Específicos**

Determinar a frequência dos polimorfismos nos genes *IFNG*, *IL12B*, *CD80* e *CD86* em pacientes com TB pulmonar e grupo controle.

Verificar a existência de associação dos polimorfismos genéticos encontrados com a suscetibilidade ou resistência a TB pulmonar.

Correlacionar as concentrações da citocina IFN- $\gamma$  nos pacientes com TB pulmonar e grupo controle com os genótipos encontrados para *IFNG*, *IL12B*, *CD80* e *CD86*.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de Estudo**

Estudo analítico observacional, do tipo caso-controle associando os genes *IFNG*, *IL12B*, *CD80* e *CD86* com a produção da citocina IFN- $\gamma$  em pacientes com TB pulmonar. O período de coleta das amostras se deu entre dezembro de 2012 e dezembro de 2013.

### **4.2 População de Estudo**

#### **4.2.1 Pacientes**

Os indivíduos que constituem o grupo de pacientes deste estudo foram abordados na Policlínica em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes, após o atendimento no setor de Aprazamento I, local onde os pacientes diagnosticados para TB recebem pela primeira vez a orientação para iniciar o tratamento. Foram incluídos no estudo, pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial para TB pulmonar casos novos (baciloscopia e cultivo com tipificação para *M. tuberculosis* ou por técnicas de biologia molecular), sem coinfeção, de ambos os gêneros, com idade de 18 a 65 anos, nascidos nos estados da Amazônia brasileira. Foram excluídos da pesquisa pacientes que apresentavam co-infecção com HIV, pacientes com doenças crônicas, como Diabetes e doenças autoimunes além de pacientes grávidas.

#### **4.2.2 Controles**

Os indivíduos considerados como grupo controle foram aqueles que não apresentavam a TB ativa, sendo que este grupo foi subdividido em dois grupos: contatos e não contatos.

Foram excluídos da pesquisa indivíduos que apresentavam os sintomas da Tuberculose, indivíduos com doenças autoimunes, indivíduos com Diabetes e ainda, indivíduos com HIV.

#### **4.2.2.1 Contatos**

Os indivíduos considerados como grupo de contato foram aqueles que convivem com os pacientes de TB pulmonar, na residência (comunicantes) ou no trabalho (profissionais de saúde), de ambos os gêneros, com idade de 18 a 65 anos, nascidos nos estados da Amazônia brasileira. Os contatos não apresentavam sintomatologia da doença, também não possuíam histórico pessoal de TB e nem consanguinidade com os pacientes de TB. Os contatos dos pacientes também foram abordados na Policlínica Cardoso Fontes. Além disso, foram incluídos profissionais de saúde que tem contato com pacientes de TB pulmonar em hospitais, UBS e policlínicas da cidade de Manaus (Fundação Hospital Adriano Jorge, Hospital Universitário Getúlio Vargas, UBS Geraldo Magela e policlínica Dr. Antônio Comte Telles).

#### **4.2.2.2 Não contatos**

Os indivíduos considerados como não contatos foram aqueles que relataram não ter convivido com pacientes com TB e que não apresentavam sintomatologia da doença, também não possuíam histórico pessoal de TB, nem consanguinidade com pacientes de TB. Os não contatos foram de ambos os gêneros, com idade entre 18 a 65 anos, nascidos nos estados da Amazônia brasileira. Esse grupo foi recrutado na cidade de Manaus.

### **4.5 Considerações Éticas**

As inclusões dos pacientes, contatos e do grupo controle foram realizadas após o preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (apêndice A), de acordo com a Resolução No. CNS Nº 466, de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da

Saúde e complementares e preenchimento do formulário para coleta de informações pessoais e quadro clínico (Anexo A)

Este projeto foi aprovado pelo Comitê De Ética em Pesquisa – UFAM, parecer CAAE: 07301212.2.0000.5020 (Anexo B), em 14 de dezembro de 2012.

## 4.6 Métodos

### 4.6.1 Coleta de escarro e sangue

- **Escarro:** A coleta escarro foi feita de acordo com a descrição do procedimento operacional padrão (POP-01 - Apêndice B).
- **Sangue:** Foi coletado aproximadamente 5 mL de sangue distribuídos da seguinte forma: 3mL destinados a quantificação do IFN- $\gamma$ , utilizando o Kit de Quantiferon TB Gold (in tube method) (Cellestis In USA) e 2mL para Extração do DNA e determinação dos polimorfismos nos genes *IFNG*, *IL12B*, *CD80* e *CD86*. O procedimento da coleta foi realizado de acordo com descrições do POP-02 (Apêndice C).

### 4.6.2 Processamento do escarro

A partir da amostra de escarro, foi realizada a baciloscopia direta e concentrada, e na sequência o cultivo. As técnicas foram realizadas de acordo com o padronizado por Salem *et al.* (2007).

A partir de colônia da cultura, foi realizada a tipificação para identificação do *M. tuberculosis*, por amplificação de DNA, utilizando os iniciadores específicos para sequência

de inserção IS6110 de *M. tuberculosis*, de acordo com Hermans *et al.* (1990), atualizado por Van Embden *et al.* (1993). O fragmento esperado apresenta 245 pares de base (pb).

### **4.6.3 Processamento do sangue**

#### **4.6.3.1 Quantificação de Interferon gama (IFN- $\gamma$ )**

Para a detecção e quantificação do IFN- $\gamma$  nas amostras dos pacientes com TB, contatos e do grupo controle, foi utilizado o kit comercial Quantiferon-TB Gold (Cellestis Inc. USA). O princípio deste teste é baseado na detecção quantitativa de IFN- $\gamma$ , por ensaio de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Foram usados 3 tubos para coletar sangue por punção venosa (1mL em cada tubo): tubo Nil (controle negativo, sem estímulos), tubo com os antígenos ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 de *M. tuberculosis* (tubo teste) e tubo com mitógenos, que serviram para avaliar a capacidade funcional das células T (controle positivo).

Após coleta, os tubos foram incubados por 24 horas, tempo necessário para estimular os linfócitos T a produzirem IFN- $\gamma$ . Posteriormente, foi realizada a quantificação do IFN- $\gamma$  por ELISA (resultados em IU/mL), de acordo com protocolo do apêndice D.

#### **4.6.3.2 Extração e Quantificação de DNA**

A Extração do DNA a partir de sangue, foi realizada pelo sistema automatizado QIAcube (QIAGEN), utilizando-se o kit recomendado QIAamp DNA Blood (QIAGEN), seguindo-se as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado em

espectrofotômetro de microvolume, em comprimentos de onda de 260 e 280 nm (ATCGene, ASP-3700).

### 4.6.3.3 Análise molecular de *IFNG*, *IL12B*, *CD80* e *CD86*

#### 4.6.3.3.1 Ensaio de amplificação de DNA

O ensaio de amplificação foi realizado através de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) utilizando iniciadores específicos para cada região dos genes em estudo (*IFNG*, *IL12B*, *CD80* e *CD86*). Nas PCRs foram utilizados Taq DNA Polimerase (5U/ $\mu$ L) (Biolabs Inc.), Tampão 10X (Biolabs Inc.), MgCl<sub>2</sub> (50 mM) (Cenbiot-Enzimas), dNTP Mix (10 mM) (Invitrogen, Brasil), oligonucleotídeos iniciadores (10  $\mu$ M) (Invitrogen, Brasil) e amostra de DNA em uma concentração para reação contendo aproximadamente de 50 a 100 nanogramas. Os oligonucleotídeos iniciadores de cada gene estão descritos na tabela 1.

Gene	Sequência (5' -3')	Tamanho do produto de PCR (Pares de base)	Referência
<i>IL12B</i>	ACTGATGTA CTGTTACAATGTCACCCAC	473pb	Este estudo
<i>IFNG</i>	TCGTTGCTCACTGGGATTTTG GCTGATACTCCAAAGGTCCC	460pb	SILVA <i>et al.</i> , 2012 Reverso adaptado
<i>CD80</i>	AAGTACACTGGTCCAGCATG CTTCAGAGAGGCGACATTTTC	690-695pb	MATSUSHITA <i>et al.</i> , 2000
<i>CD86</i>	ATGGTCTGGAAGAGCCTGCA AGGCTATTCCACTTAGAGGG	518pb	Este estudo

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes *IL12B*, *IFNG*, *CD80* e *CD86*.

Para o gene *IFNG*, foram analisados, no primeiro íntron, um microssatélite de repetições CA, na posição +875 (rs2234688) e um SNP, na posição +874A/T (rs2430561).

Pra o gene *IL12B* (IL12p40), foram analisados 3 SNPs na região 3'UTR; +1030C/T (rs3213120), +1188A/C (rs3212227) e +1254T/G (rs3213113).

Para o gene *CD80* foram analisados seis SNPs localizados na região promotora, nas posições -454 C/A (rs68180496), -387 T/C (rs1880661), -232 G/A (rs41271393), -79 C/G (rs16829984), -7T/C (rs16829980) e +5C/A (rs41271391) e um polimorfismo de deleção/inserção (-557-561 CATGA).

E para o gene *CD86*, dois SNPs no éxon 8, posição +1057G/A (rs1129055) que leva a uma substituição não sinônima (Ala304Thr) e +1079G/A (rs267599573) que leva a uma substituição sinônima (Ser317Ser) na molécula CD86.

#### **4.6.3.3.2 Purificação e quantificação do produto da PCR**

Após a reação de amplificação, os produtos foram purificados para a remoção dos nucleotídeos não incorporados e demais reagentes em excesso que poderiam interferir na subsequente reação de sequenciamento. A purificação foi realizada através de precipitação dos produtos de PCR com Polietilenoglicol (PEG) conforme Apêndice E. Após a purificação, os produtos da PCR serão quantificados em espectrofotômetro.

#### **4.6.3.3.3 Sequenciamento do fragmento de amplificação**

A reação de sequenciamento foi realizada de acordo com o descrito por Sanger *et al.* (1977). Na reação foi utilizado o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) com utilização dos mesmos iniciadores utilizados na PCR.

#### **4.6.3.3.4 Purificação da reação de sequenciamento**

Após as reações de sequenciamento, os produtos foram purificados utilizando o método de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio (Anexo C). Essa etapa foi necessária para eliminar resíduos que poderiam interferir na leitura das sequências genotípicas por eletroforese capilar.

#### **4.6.3.3.5 Eletroforese Capilar**

A leitura dos fragmentos de DNA sequenciados foi realizada através do sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas utilizando o software Sequencing Analysis (Applied Biosystems, v5.3.1).

### **4.7 Análise Estatística**

Para análise de associação dos polimorfismos genéticos à suscetibilidade ou resistência, foi realizado o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, dependendo da natureza dos dados. Também foi realizada a análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os genes investigados.

Para as comparações das concentrações de IFN- $\gamma$  entre dois grupos (Pacientes e controles) foi utilizado o teste Mann Whitney, para as comparações entre três grupos (Pacientes, Contatos e não contatos) foi utilizado o teste de Kruskal Wallis.

A associação entre as frequências dos haplótipos observados de cada gene na suscetibilidade ou resistência à TB pulmonar foi feita pelo software Haploview versão 4.2. E

ainda, a análise do desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos observados, obedecendo aos parâmetros (LOD;  $D'$  e  $r^2$ ).

Também foi realizada análise de regressão logística para verificar a associação entre a Tuberculose pulmonar (variável resposta) e as características intrínsecas (idade, gênero, polimorfismo genético e naturalidade) sociais (tabagismo e etilismo) e clínicas (BCG) dos grupos.

Os programas utilizados foram o BioEstat versão 5.3 (AYRES *et al.*, 2007), GraphPad Prism versão 6.01 e Minitab versão 17.

O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 5\%$ , com intervalo de confiança de 95%.

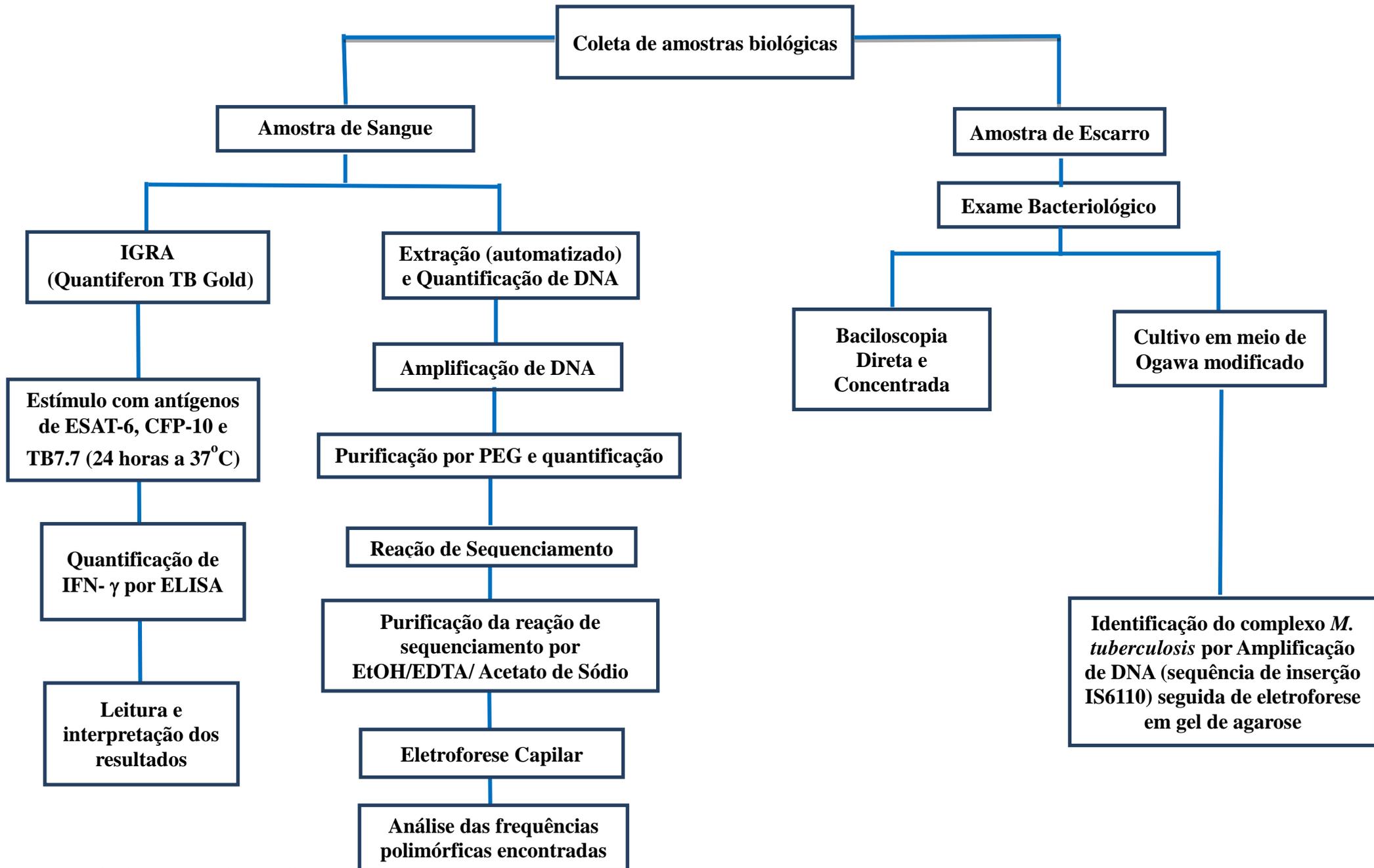


Figura 6: Fluxograma de trabalho

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Análise geral

Foram coletadas 232 amostras de pacientes diagnosticados como Tuberculose (TB) pulmonar na Policlínica Cardoso Fontes, sendo que 55 amostras foram excluídas devido ao exame de cultivo para *M. tuberculosis* apresentar resultado negativo (45), assim como, foram excluídas aquelas amostras cuja tipificação revelou micobactérias não causadoras de TB (MNT) (3) e ainda amostras nas quais o paciente apresentava doenças associadas (7) (figura 7).

Foram coletadas 245 amostras de controles (Contatos e Não contatos), entretanto 21 amostras foram excluídas da pesquisa, pois não obedeciam aos critérios de inclusão propostos (8 indivíduos nascidos em outras regiões diferentes da região norte, 6 com casos de TB na família, 3 indivíduos que apresentavam sintomatologia e 1 que possuía parentesco com outros controles participando da pesquisa, 3 com doenças associadas).

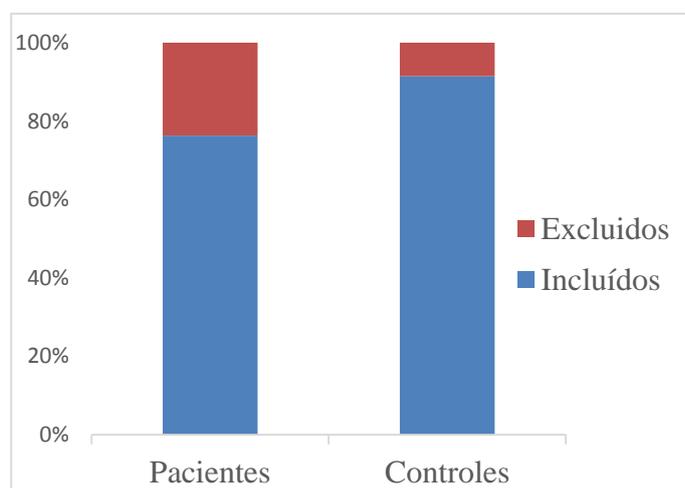


Figura 7: Percentual das amostras coletadas de pacientes de TB e controles (Contatos e não contatos).

Amostras de 177 pacientes e 224 controles (sendo 159 contatos e 65 não contatos) foram utilizadas para determinar a frequência dos polimorfismos nos genes de *IFNG*, *IL12B*, *CD80* e *CD86*.

Verificou-se que a maioria dos pacientes incluídos no estudo pertence ao gênero masculino, confirmando a característica da população com TB, que é mais frequente em homens. Em todos os grupos, mais da metade da população estudada nasceu na cidade de Manaus (tabela 2).

Característica	Pacientes (N=177)	Controles (N=224)	$p^a$	Contatos (N=159)	Não contatos (N=65)	$p^b$
<b>Idade</b> (anos) (Média e Desvio padrão)	32 ± 11	33 ± 11	0,437	37 ± 11	26 ± 9	< 0,001
<b>Gênero</b>	n(%)	n(%)	< 0,001	n(%)	n(%)	< 0,001
Masculino	111(62,7)	78(34,8)		59(37,1)	19(29,2)	
Feminino	66(37,3)	146(65,2)		100(62,9)	46(70,8)	
<b>Naturalidade</b>			0,016			0,006
Manaus-Amazonas (AM)	93(52,5)	133(59,4)		95(59,8)	38(58,5)	
Outros municípios do AM	64(36,2)	53(23,7)		32(20,1)	21(32,3)	
Outros Estados da região norte	20(11,3)	38(16,9)		32(20,1)	6(9,2)	

Tabela 2: Características gerais da população estudada. **a**: valor de  $p$  para os fatores entre pacientes e controles. **b**: valor de  $p$  para os fatores entre pacientes, contatos e não contatos.

## 5.2 Análises dos polimorfismos

### 5.2.1 Gene *IFNG*

A análise das frequências genotípicas para o SNP +874A/T entre os pacientes com TB pulmonar e o grupo controle mostrou uma associação estatisticamente significativa, sendo o genótipo +874TT mais frequente em controles. Além disso, embora o genótipo AA não tenha alcançado valor estatisticamente significativo, há forte tendência para associação com suscetibilidade, conforme observado na análise (tabela 3). As frequências genotípicas do SNP +874 A/T estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos analisados (tabela 3).

<i>IFNG</i>	TB pulmonar (N = 176)	Grupo Controle (N = 223)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>	Contatos (N = 158)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>+874A/T</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
AA	99(56,3)	106(47,5)	2,992	1,419 (0,954-2,111)	0,084	74(46,9)	2,956	1,459 (0,948-2,248)	0,086
TA	71(40,3)	93(41,7)	0,076	0,945 (0,632-1,413)	0,755	68(43,0)	0,249	0,895 (0,579-1,384)	0,618
TT	6(3,4)	24(10,8)	7,649	0,293 (0,117-0,733)	<b>0,006</b>	16(10,1)	6,106	0,313 (0,119-0,822)	<b>0,014</b>
<b><i>p</i>-HW</b>	0,113	0,548				0,948			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
A	269(76,4)	305(68,4)	6,29	1,498 (1,091-2,057)	<b>0,012</b>	216(68,4)	5,447	1,5 (1,066-2,112)	<b>0,0196</b>
T	83(23,6)	141(31,6)		0,667 (0,486-0,916)		100(31,6)		0,667 (0,474-0,938)	

Tabela 3: Distribuição da frequência genotípica e alélica do SNP +874A/T do gene *IFNG* entre os grupos de pacientes e controles (contatos + não contatos), assim como entre pacientes e contatos. Análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01. OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança, n = número absoluto de indivíduos analisado, n\* = número de cromossomos, *p*-HW = valor de *p* para equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foi possível realizar sequenciamento em 2 amostras (1 de paciente e 1 de controle).

Neste estudo, verificamos que o alelo A é mais frequente em pacientes que no grupo controle. Isso indica que indivíduos que apresentam esse alelo tem um risco maior de desenvolver TB pulmonar na população estudada. Logo a presença desse alelo está associada a suscetibilidade à TB pulmonar. Assim como o alelo T, mais frequente no grupo controle, está associado à proteção contra TB pulmonar.

Estes resultados condizem com resultados de outros estudos em diferentes populações, como demonstrado na tabela 4.

<b>População</b>	<b>OR</b>	<b>IC</b>	<b>p</b>	<b>Autores</b>
Espanhola	3,750	2,26–6,23	0,0017	LÓPEZ-MADERUELO <i>et al.</i> , 2003
Sul-africanos	1,462	1,12-1,91	0,0051	ROSSOUW <i>et al.</i> , 2003
Chinesa	2,240	1,70–2,96	< 0,001	TSO <i>et al.</i> , 2005
Turca	1,413	1,043-1,92	0,0252	SALLAKCI <i>et al.</i> , 2007
Chinesa	1,510	1,16–1,96	0,0023	DING <i>et al.</i> , 2008
Egípcias (crianças)	1,799	1,22-2,65	0,0030	MOSAAD <i>et al.</i> , 2010
Brasileira	2,190	1,530-3,13	< 0,001	VALLINOTO <i>et al.</i> , 2010
Iraniana	1,561	1,13-2,48	0,0070	HASHEMI <i>et al.</i> , 2011b
Tunisian	1,413	1,03-1,95	0,0340	BEM SELMA <i>et al.</i> , 2011
Brasileira	1,498	1,091-2,057	0,0120	Este estudo

Tabela 4: Estudos de associação para o SNP+874A/T do gene *IFNG* na Tuberculose em diferentes populações, onde o alelo A foi associado à suscetibilidade à TB. OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança.

Na análise de associação genotípica e alélica entre pacientes e contatos, ou seja, excluindo os não contatos, os resultados foram semelhantes aos obtidos entre pacientes e controles (tabela 3).

Nas análises do microssatélite +875 foram observados 18 genótipos e 7 alelos (de 11 a 17 repetições CA) na população deste estudo (tabelas 5 e 6). Os genótipos CA<sub>12</sub>/CA<sub>13</sub> e CA<sub>13</sub>/CA<sub>15</sub> foram os mais frequentes nos dois grupos estudados e os alelos CA<sub>15</sub>, CA<sub>13</sub> e CA<sub>12</sub> foram os mais frequentes na população estudada. Comparando as frequências genotípicas entre pacientes e grupo controle, observou-se uma diferença estatística nos genótipos

CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> (mais frequente em controles) e genótipo CA<sub>14</sub>/CA<sub>15</sub> (encontrado somente em pacientes). Assim como, na comparação das frequências alélicas, a presença de 12 repetições de CA (CA<sub>12</sub>) e 15 repetições de CA (CA<sub>15</sub>) apresentaram diferença estatística significativa, sendo CA<sub>12</sub> mais comum em indivíduos do grupo controle e CA<sub>15</sub> em pacientes (tabela 6).

<i>IFNG</i>	TB pulmonar (N=176)	Grupo controle (N=223)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>Microssatélite +875</b>					
<b>Genótipos (Nº de repetições CA)</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>			
CA <sub>11</sub> /CA <sub>12</sub>	3(1,7)	2(0,9)	*	1,908 (0,315-11,550)	0,659
CA <sub>11</sub> /CA <sub>13</sub>	0(0,0)	1(0,4)	NA		
CA <sub>11</sub> /CA <sub>14</sub>	0(0,0)	1(0,4)	NA		
CA <sub>11</sub> /CA <sub>15</sub>	3(1,7)	0(0,0)	*	8,977 (0,460-175,100)	0,086
CA <sub>12</sub> /CA <sub>12</sub>	6(3,4)	22(9,9)	6,343	0,321 (0,127-0,810)	<b>0,012</b>
CA <sub>12</sub> /CA <sub>13</sub>	39(22,2)	47(21,1)	0,068	1,066 (0,660-1,722)	0,794
CA <sub>12</sub> /CA <sub>14</sub>	2(1,1)	6(2,7)	*	0,624 (0,154-2,533)	0,737
CA <sub>12</sub> /CA <sub>15</sub>	28(15,9)	33(14,8)	0,094	1,089 (0,630-1,884)	0,760
CA <sub>12</sub> /CA <sub>16</sub>	2(1,1)	5(2,2)	*	0,499 (0,096-2,604)	0,471
CA <sub>13</sub> /CA <sub>13</sub>	18(10,2)	25(11,2)	0,109	0,898 (0,473-1,704)	0,741
CA <sub>13</sub> /CA <sub>14</sub>	5(2,8)	10(4,5)	0,749	0,620 (0,208-1,848)	0,387
CA <sub>13</sub> /CA <sub>15</sub>	36(20,5)	45(20,2)	0,002	1,011 (0,619-1,653)	0,964
CA <sub>13</sub> /CA <sub>16</sub>	0(0,0)	1(0,4)	NA		
CA <sub>13</sub> /CA <sub>17</sub>	0(0,0)	2(0,9)	NA		
CA <sub>14</sub> /CA <sub>15</sub>	7(4,0)	0(0,0)	*	19,690 (1,116-347,400)	<b>0,003</b>
CA <sub>14</sub> /CA <sub>16</sub>	0(0,0)	1(0,4)	NA		
CA <sub>15</sub> /CA <sub>15</sub>	26(14,8)	20(9,0)	3,190	1,751 (0,942-3,255)	0,074
CA <sub>15</sub> /CA <sub>17</sub>	1(0,6)	2(0,9)	*	0,629 (0,057-6,993)	1,000

Tabela 5: Distribuição da frequência genotípica do Microssatélite +875 entre os grupos deste estudo (pacientes e controles). Análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01. Os números 11 a 17 correspondem ao número de repetição de CA. OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança, n = número absoluto de indivíduos analisado, \* Feito teste exato de Fisher. NA = não analisado Não foi possível realizar sequenciamento em 2 amostras (1 de paciente e 1 de controle).

<i>IFNG</i>	TB pulmonar (N=176)	Grupo controle (N=223)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>Microsatélite +875</b>					
<b>Alelos</b> (N° de repetições CA)	<b>(n*)</b>	<b>(n*)</b>			
<b>CA<sub>11</sub></b>	6(1,7)	4(0,9)	*	1,916 (0,536-6,846)	0,350
<b>CA<sub>12</sub></b>	86(24,4)	137(30,7)	3,860	0,729 (0,532-0,999)	<b>0,049</b>
<b>CA<sub>13</sub></b>	116(32,9)	156(35,0)	0,358	0,914 (0,680-1,228)	0,549
<b>CA<sub>14</sub></b>	14(4,0)	18(4,0)	0,002	0,985 (0,483-2,009)	0,966
<b>CA<sub>15</sub></b>	127(36,1)	120(26,9)	7,747	1,533 (1,134-2,074)	<b>0,005</b>
<b>CA<sub>16</sub></b>	2(0,6)	7(1,6)	*	0,3584 (0,074-1,737)	0,312
<b>CA<sub>17</sub></b>	1(0,3)	4(0,9)	*	0,3148 (0,035-2,831)	0,391

Tabela 6: Distribuição da frequência alélica do Microsatélite +875 entre os grupos deste estudo (paciente e controles). Análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01. OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança, n\* = número de cromossomos. \* Feito teste exato de Fisher. Não foi possível realizar sequenciamento em 2 amostras (1 de paciente e 1 de controle).

Portanto, tanto a homozigose de 12 repetições de CA (CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub>) como a presença do alelo CA<sub>12</sub> podem ser considerados como um fator de proteção à TB pulmonar. Enquanto a presença do alelo CA<sub>15</sub> está associada ao risco de desenvolvimento da TB pulmonar.

Os resultados das frequências alélicas deste estudo corroboram com estudo de Tso *et al.*, (2005) no qual também foram observados os alelos CA<sub>15</sub>, CA<sub>13</sub> e CA<sub>12</sub> como mais frequentes na população Chinesa (Hong Kong) e foi encontrada uma associação significativa para a presença do alelo CA<sub>15</sub> e o risco à TB pulmonar e extrapulmonar (OR = 1,736; IC95% = 1,408-2,140;  $p < 0,0001$ ). Assim como, o alelo CA<sub>12</sub> foi associado como fator de proteção à TB (OR = 0,444; IC95% = 0,350-0,563;  $p < 0,0001$ ).

Sahiratmadja *et al.* (2007) estudaram o microsatélite +875 na população da Indonesia e também observaram que os alelos CA<sub>12</sub> e CA<sub>15</sub> foram mais frequentes tanto em pacientes

como em controles. Entretanto não foi observada associação entre esse microssatélite e TB pulmonar.

Ding *et al.* (2008) estudaram o microssatélite +875 em pacientes com TB (pulmonar e pleural) na população chinesa (região sudeste). Observaram uma maior frequência do alelo CA<sub>13</sub> em pacientes (OR = 1,39, IC95% = 1,096-1,763,  $p = 0,007$ ) seguido do alelo CA<sub>15</sub>, que apresentou frequência semelhante entre os grupos de pacientes e controles (OR = 0,883; IC95% = 0,696-1,120;  $p = 0,303$ ). O alelo CA<sub>12</sub> foi mais frequente no grupo controle (OR = 0,664; IC95% = 0,511-0,863;  $p = 0,002$ ). Os resultados de Ding *et al.* (2008) corroboram com os encontrados neste estudo (região amazônica) em relação ao alelo CA<sub>12</sub>, associado a proteção. Entretanto, o alelo associado ao risco de desenvolvimento da doença foi diferente entre os dois estudos. Essa diferença poderia ser devido a forma clínica da TB, visto que em nosso estudo foi analisado somente pacientes com a forma pulmonar e no estudo de Ding *et al.* (2008) foram incluídos pacientes com TB pulmonar e pleural.

Foi realizada uma análise quanto a presença de 12 repetições de CA, em homozigose (CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub>) e heterozigose (CA<sub>12</sub>/CA<sub>X</sub>), assim como repetições diferentes de 12 (CA<sub>X</sub>/CA<sub>X</sub>), como descrito na tabela 7. Observou-se então que, a presença de CA<sub>12</sub>/CA<sub>X</sub> foi semelhante entre os grupos e repetições diferentes de 12 (CA<sub>X</sub>/CA<sub>X</sub>) foi mais frequente em pacientes, porém não houve diferença estatística significativa entre os grupos. CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> foi mais frequente em indivíduos do grupo controle (como já demonstrado).

A mesma análise foi realizada para 15 repetições de CA (tabela 8) e foi observado que repetições diferentes de 15 (CA<sub>X</sub>/CA<sub>X</sub>) apresentaram diferença estatística entre os grupos, sendo mais frequente em indivíduos do grupo controle. A presença de heterozigose para 15 repetições de CA (CA<sub>15</sub>/CA<sub>X</sub>) foi mais frequente em pacientes, mas não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

<i>IFNG</i>	TB pulmonar (N=176)	Grupo controle (N=223)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>	Contatos (N = 158)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>Microssatélite +875</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
CA <sub>x</sub> /CA <sub>x</sub>	96(54,6)	108(48,4)	1,472	1,278 (0,860-1,899)	0,225	77(48,7)	1,126	1,262 (0,821-1,942)	0,289
CA <sub>12</sub> /CA <sub>x</sub>	74(42,0)	93(41,7)	0,005	1,014 (0,679-1,514)	0,945	66(41,8)	0,003	1,011 (0,654-1,563)	0,960
CA <sub>12</sub> /CA <sub>12</sub>	6(3,4)	22(9,9)	6,284	0,323 (0,128-0,814)	<b>0,012</b>	15(9,5)	5,231	0,337 (0,127-0,890)	<b>0,022</b>
<i>p</i> -HW	0,066	0,763				0,875			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
CA <sub>x</sub>	266(75,6)	309(69,3)	3,860	1,37 (1,000-1,880)	<b>0,049</b>	220(69,6)	2,972	1,350 (0,959-1,899)	0,085
CA <sub>12</sub>	86(24,4)	137(30,7)		0,729 (0,532-0,999)		96(30,4)		0,741 (0,527-1,043)	

Tabela 7: Distribuição da frequência genotípica e alélica do Microssatélite +875 para 12 repetições CA entre pacientes e controles (contatos + não contatos) e entre pacientes e contatos. Análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01. OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança, n = número absoluto de indivíduos analisado, n\* = número de cromossomos, x = repetições de CA diferentes de 12, *p*-HW = valor de *p* para equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foi possível realizar sequenciamento em 2 amostras (1 de paciente e 1 de controle).

<i>IFNG</i>	TB pulmonar (N=176)	Grupo controle (N=223)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>	Contatos (N = 158)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>Microssatélite +875</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
CA <sub>x</sub> /CA <sub>x</sub>	75(42,6)	123(55,2)	6,191	0,604 (0,405-0,900)	<b>0,013</b>	83	3,285	0,671 (0,435-1,034)	0,070
CA <sub>15</sub> /CA <sub>x</sub>	75(42,6)	80(35,9)	1,881	1,327 (0,885-1,991)	0,170	60	0,744	1,213 (0,782-1,881)	0,388
CA <sub>15</sub> /CA <sub>15</sub>	26(14,8)	20(9,0)	3,249	1,759 (0,946-3,271)	0,072	15	2,155	1,652 (0,841-3,248)	0,142
<i>p</i> -HW	0,313	0,189				0,394			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
CA <sub>x</sub>	225(63,9)	326(73,1)	7,747	0,652 (0,482-0,882)	<b>0,005</b>	226	4,384	0,706 (0,509-0,979)	<b>0,036</b>
CA <sub>15</sub>	127(36,1)	120(26,9)		1,533 (1,134-2,074)		90		1,417 (1,022-1,966)	

Tabela 8: Distribuição da frequência genotípica e alélica do Microssatélite +875 para 15 repetições de CA entre pacientes e controles (contatos + não contatos) e entre pacientes e contatos. Análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01. OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança, n = número absoluto de indivíduos analisado, n\* = número de cromossomos, x = repetições de CA diferentes de 15, *p*-HW = valor de *p* para equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foi possível realizar sequenciamento em 2 amostras (1 de paciente e 1 de controle).

Embora nas análises entre pacientes e contatos, alguns resultados não tenham dado significativos, provavelmente devido ao número amostral, estes apresentaram uma tendência de associação com a TB pulmonar (valores próximos a  $p = 0,05$ ).

### 5.2.2 Gene *IL12B*

Foram observados três SNPs (+1030C/T, +1188A/C e +1254T/G, todos na região 3'UTR do gene *IL12B*). As frequências genotípicas dos polimorfismos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto a frequência do SNP +1030C/T em pacientes (tabelas 9 e 10).

Para os SNPs +1030C/T e +1254T/G não houve diferença estatística significativa nas frequências genotípicas e alélicas observadas entre os pacientes com TB pulmonar e grupo controle e tampouco entre pacientes com TB pulmonar e contatos.

No entanto, para o SNP +1188A/C, o genótipo CC apresentou maior frequência nos pacientes com TB pulmonar (tabela 9) em comparação ao grupo controle. E o alelo C foi mais frequente em pacientes com TB, quando comparado ao grupo de contatos. Este resultado sugere que o genótipo CC está associado à suscetibilidade à TB pulmonar.

Liu *et al.* (2014) realizaram um estudo de meta-análise para TB no qual demonstrou que, até então, não há evidência de uma associação significativa do SNP +1188A/C e o risco à TB (pulmonar e extrapulmonar). Entretanto há uma heterogeneidade significativa quando se compara por grupos étnicos, e o alelo A pode atuar como um fator de proteção em caucasianos.

<i>IL12B</i>	TB pulmonar (N = 176)	Grupo controle (N = 223)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>	Contatos (N = 158)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>+1030C/T</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
CC	170(96,6)	210(94,2)	1,271	1,754 (0,653-4,713)	0,260	148(93,7)	1,556	1,914 (0,679-5,395)	0,212
CT	5(2,8)	13(5,8)	2,040	0,472 (0,165-1,351)	0,153	10(6,3)	2,362	0,433 (0,145-1,295)	0,124
TT	1(0,6)	0(0,0)	*	3,821 (0,155-94,430)	0,441	0(0,0)	*	2,709 (0,110-67,04)	1,000
<b><i>p</i> - HW</b>	<b>0,0003</b>	0,654				0,681			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
C	345(98,0)	433(97,1)	*	1,480 (0,584-3,750)	0,497	306(96,8)	*	1,611 (0,606-4,284)	0,335
T	7(2,0)	13(2,9)		0,676 (0,267-1,713)		10(3,2)		0,621 (0,233-1,651)	
<b>+1188A/C</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>							
AA	64(36,4)	91(40,8)	0,818	0,829 (0,552-1,245)	0,366	70(44,3)	2,185	0,718 (0,463-1,115)	0,139
AC	78(44,3)	106(47,5)	0,410	0,879 (0,591-1,307)	0,522	69(43,7)	0,014	1,027 (0,666-1,583)	0,905
CC	34(19,3)	26(11,7)	<b>4,516</b>	1,814 (1,042-3,159)	<b>0,034</b>	19(12,0)	3,317	1,752 (0,953-3,218)	0,069
<b><i>p</i> - HW</b>	0,248	0,561				0,753			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>							
A	206(58,5)	288(64,6)	3,055	0,774 (0,581-1,032)	0,081	209(66,1)	4,105	0,722 (0,527-0,990)	<b>0,043</b>
C	146(41,5)	158(35,4)		1,292 (0,969-1,722)		107(33,9)		1,384 (1,010-1,897)	

Tabela 9: Distribuição da frequência genotípica e alélica dos SNPs +1030C/T e +1188A/C do gene *IL12B* entre os grupos de paciente e controles (contatos + não contatos), assim como entre pacientes e contatos. Análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01. OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança, n = número absoluto de indivíduos analisado, n\* = número de cromossomos, *p*-HW = valor de *p* para equilíbrio de Hardy-Weinberg. \* Feito teste exato de Fisher. Não foi possível realizar sequenciamento em 2 amostras (1 de paciente e 1 de controle).

<i>IL12B</i>	TB pulmonar (N = 176)	Grupo controle (N = 223)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>	Contatos (N = 158)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>+1254T/G</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
TT	172(97,7)	218(97,8)	*	0,986 (0,261-3,730)	1,000	153(96,8)	*	1,405 (0,371-5,329)	0,740
TG	4(2,3)	5(2,2)	*	1,014 (0,268-3,835)	1,000	5(3,2)	*	0,712 (0,188-2,699)	0,740
GG	0(0,0)	0(0,0)	NA			0(0,0)	NA		
<b><i>p</i> - HW</b>	0,879	0,866				0,840			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
T	348(98,9)	441(98,9)	*	0,986 (0,263-3,702)	1,000	311(98,4)	*	1,399 (0,372-5,257)	0,742
G	4(1,1)	5(1,1)		1,014 (0,270-3,805)		5(1,6)		0,715 (0,190-2,687)	

Tabela 10: Distribuição da frequência genotípica e alélica do SNP +1254T/G gene *IL12B* entre os grupos de paciente e controles (contatos + não contatos), assim como entre pacientes e contatos. Análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01. OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança, n = número absoluto de indivíduos analisado, n\* = número de cromossomos, *p*-HW = valor de *p* para equilíbrio de Hardy-Weinberg. \* Feito teste exato de Fisher. NA = não analisado. Não foi possível realizar sequenciamento em 2 amostras (1 de paciente e 1 de controle).

### 5.2.3 Gene *CD80*

Para este gene, foram analisados 6 SNPs na região promotora, nas posições -454 C/A, -387 T/C, -232 G/A, -79 C/G, -7T/C e +5C/A e 1 polimorfismo indel (-557\_-561insCATGA).

Os polimorfismos -557\_-561insCATGA, -454 C/A, -232 G/A, +5C/A apresentaram as mesmas frequências genotípicas e alélicas.

As frequências genotípicas dos polimorfismos estudados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto a frequência do SNP -79 C/G no grupo controle (tabela 13).

Não foi encontrada associação desses polimorfismos com a TB pulmonar neste estudo. Além disso, não há outros estudos de associação entre estes polimorfismos e a TB pulmonar.

<i>CD80</i>	TB pulmonar (N = 175)	Grupo controle (N = 224)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>	Contatos (N = 159)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>-557_-561ins</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
del/del	133(76,0)	165(73,7)	0,284	1,132 (0,717-1,788)	0,594	114(71,7)	0,800	1,250 (0,766-2,039)	0,371
del/ins	40(22,9)	55(24,5)	0,156	0,910 (0,571-1,451)	0,693	42(26,4)	0,569	0,825 (0,501-1,359)	0,451
ins/ins	2(1,1)	4(1,8)	*	0,636 (0,115-3,514)	0,699	3(1,9)	*	0,601 (0,099-3,647)	0,672
<b><i>p</i> - HW</b>	0,598	0,812				0,700			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
del	306(87,4)	385(85,9)	0,376	1,138 (0,753-1,721)	0,540	270(84,9)	0,893	1,236 (0,796-1,921)	0,345
ins	44(12,6)	63(14,1)		0,879 (0,581-1,329)		48(15,1)		0,809(0,521-1,257)	
<b>-454 C/A</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
CC	133(76,0)	165(73,7)	0,284	1,132 (0,717-1,788)	0,594	114(71,7)	0,800	1,250 (0,766-2,039)	0,371
CA	40(22,9)	55(24,5)	0,156	0,910 (0,571-1,451)	0,693	42(26,4)	0,569	0,825 (0,501-1,359)	0,451
AA	2(1,1)	4(1,8)	*	0,636 (0,115-3,514)	0,699	3(1,9)	*	0,601 (0,099-3,647)	0,672
<b><i>p</i> - HW</b>	0,598	0,812				0,700			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
C	306(87,4)	385(85,9)	0,376	1,138 (0,753-1,721)	0,540	270(84,9)	0,893	1,236 (0,796-1,921)	0,345
A	44(12,6)	63(14,1)		0,879 (0,581-1,329)		48(15,1)		0,809(0,521-1,257)	

Tabela 11: Distribuição da frequência genotípica e alélica do indel -557\_-561ins e SNP -454 C/A do gene *CD80* entre os grupos de paciente e controles (contatos + não contatos), assim como entre pacientes e contatos. Análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01. OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança, n = número absoluto de indivíduos analisado, n\* = número de cromossomos, *p*-HW = valor de *p* para equilíbrio de Hardy-Weinberg. \* Feito teste exato de Fisher. Não foi possível realizar sequenciamento em 2 amostras de pacientes.

<i>CD80</i>	TB pulmonar (N = 175)	Grupo controle (N = 224)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>	Contatos (N = 159)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>-387 T/C</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
TT	23(13,1)	45(20,1)	3,353	0,602 (0,348-1,040)	0,067	33(20,8)	3,459	0,578 (0,323-1,035)	0,063
TC	92(52,6)	105(46,9)	1,275	1,256 (0,845-1,867)	0,259	78(49,0)	0,412	1,151 (0,749-1,769)	0,521
CC	60(34,3)	74(33,0)	0,069	1,058 (0,696-1,607)	0,793	48(30,2)	0,639	1,207 (0,761-1,912)	0,424
<b><i>p</i> - HW</b>	0,183	0,486				0,899			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
T	138(39,4)	195(43,5)	1,357	0,845 (0,635-1,122)	0,244	144(45,3)	2,341	0,787 (0,578-1,070)	0,126
C	212(60,6)	253(56,5)		1,184 (0,891-1,574)		174(54,7)		1,271 (0,934-1,730)	
<b>-232 G/A</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
GG	133(76,0)	165(73,7)	0,284	1,132 (0,717-1,788)	0,594	114(71,7)	0,800	1,250 (0,766-2,039)	0,371
GA	40(22,9)	55(24,5)	0,156	0,910 (0,571-1,451)	0,693	42(26,4)	0,569	0,825 (0,501-1,359)	0,451
AA	2(1,1)	4(1,8)	*	0,636 (0,115-3,514)	0,699	3(1,9)	*	0,601 (0,099-3,647)	0,672
<b><i>p</i> - HW</b>	0,598	0,812				0,700			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
G	306(87,4)	385(85,9)	0,376	1,138 (0,753-1,721)	0,540	270(84,9)	0,893	1,236 (0,796-1,921)	0,345
A	44(12,6)	63(14,1)		0,879 (0,581-1,329)		48(15,1)		0,809(0,521-1,257)	

Tabela 12: Distribuição da frequência genotípica e alélica dos SNPs -387 T/C -232 G/A do gene *CD80* entre os grupos de paciente e controles (contatos + não contatos), assim como entre pacientes e contatos. Análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01. OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança, n = número absoluto de indivíduos analisado, n\* = número de cromossomos, *p*-HW = valor de *p* para equilíbrio de Hardy-Weinberg. \* Feito teste exato de Fisher. Não foi possível realizar sequenciamento em 2 amostras de pacientes.

<i>CD80</i>	TB pulmonar (N = 175)	Grupo controle (N = 224)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>	Contatos (N = 159)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>-79 C/G</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
CC	149(85,1)	194(86,6)	0,175	0,886 (0,503-1,562)	0,676	140(88,1)	0,604	0,778 (0,412-1,468)	0,437
CG	25(14,3)	26(11,6)	0,632	1,269 (0,704-2,287)	0,427	18(11,3)	0,653	1,306 (0,683-2,496)	0,419
GG	1(0,6)	4(1,8)	*	0,316 (0,035-2,855)	0,391	1(0,6)	*	0,908 (0,056-14,65)	1,000
<b><i>p</i> - HW</b>	0,965	<b>0,0098</b>				0,618			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
C	323(92,3)	414(92,4)	0,004	0,983 (0,581-1,662)	0,947	298(93,7)	0,517	0,803 (0,441-1,462)	0,472
G	27(7,7)	34(7,6)		1,018 (0,602-1,722)		20(6,3)		1,246 (0,684-2,268)	
<b>-7T/C</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
TT	130(74,3)	164(73,2)	0,058	1,057 (0,674-1,657)	0,809	113(71,1)	0,322	1,150 (0,709-1,867)	0,570
TC	43(24,6)	56(25,0)	0,010	0,977 (0,618-1,545)	0,922	43(27,0)	0,266	0,879 (0,538-1,436)	0,606
CC	2(1,1)	4(1,8)	*	0,636 (0,115-3,514)	0,699	3(1,9)	*	0,601 (0,099-3,647)	0,672
<b><i>p</i> - HW</b>	0,452	0,755				0,637			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
T	303(86,6)	384(85,7)	0,121	1,074 (0,716-1,612)	0,728	269(84,6)	0,531	1,174 (0,762-1,810)	0,466
C	47(13,4)	64(14,3)		0,931 (0,620-1,396)		49(15,4)		0,852 (0,553-1,313)	

Tabela 13: Distribuição da frequência genotípica e alélica dos SNPs -79 C/G e -7T/C do gene *CD80* entre os grupos de paciente e controles (contatos + não contatos), assim como entre pacientes e contatos. Análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01. OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança, n = número absoluto de indivíduos analisado, n\* = número de cromossomos, *p*-HW = valor de *p* para equilíbrio de Hardy-Weinberg. \* Feito teste exato de Fisher. Não foi possível realizar sequenciamento em 2 amostras de pacientes.

<i>CD80</i>	TB pulmonar (N = 175)	Grupo controle (N = 224)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>	Contatos (N = 159)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>+5C/A</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
CC	133(76,0)	165(73,7)	0,284	1,132 (0,717-1,788)	0,594	114(71,7)	0,800	1,250 (0,766-2,039)	0,371
CA	40(22,9)	55(24,5)	0,156	0,910 (0,571-1,451)	0,693	42(26,4)	0,569	0,825 (0,501-1,359)	0,451
AA	2(1,1)	4(1,8)	*	0,636 (0,115-3,514)	0,699	3(1,9)	*	0,601 (0,099-3,647)	0,672
<b><i>p</i> - HW</b>	0,598	0,812				0,700			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
C	306(87,4)	385(85,9)	0,376	1,138 (0,753-1,721)	0,540	270(84,9)	0,893	1,236 (0,796-1,921)	0,345
A	44(12,6)	63(14,1)		0,879 (0,581-1,329)		48(15,1)		0,809(0,521-1,257)	

Tabela 14: Distribuição da frequência genotípica e alélica do SNP +5C/A do gene *CD80* entre os grupos de paciente e controles (contatos + não contatos), assim como entre pacientes e contatos. Análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01. OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança, n = número absoluto de indivíduos analisado, n\* = número de cromossomos, *p*-HW = valor de *p* para equilíbrio de Hardy-Weinberg. \* Feito teste exato de Fisher. Não foi possível realizar sequenciamento em 2 amostras de pacientes.

#### **5.2.4 Gene CD86**

As frequências genóticas e alélicas dos dois SNPs (+1057G/A e +1079G/A) observados neste estudo não apresentaram associação com TB pulmonar, sendo que o SNP 1079G/A é monomórfico (tabela 15).

O SNP +1057G/A tem sido associado a outras doenças, como Câncer. Entretanto, ainda não há estudos desse polimorfismo para TB pulmonar.

<i>CD86</i>	TB pulmonar (N = 177)	Grupo controle (N = 223)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>	Contatos (N = 158)	$\chi^2$	OR (IC 95%)	<i>p</i>
<b>1057G/A</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
GG	119(67,2)	151(67,7)	0,010	0,978 (0,642-1,491)	0,919	106(67,1)	0,001	1,007 (0,637-1,589)	0,978
GA	51(28,8)	67(30,1)	0,072	0,942 (0,611-1,454)	0,788	48(30,4)	0,098	0,928 (0,580-1,484)	0,754
AA	7(4,0)	5(2,2)	*	1,795 (0,560-5,757)	0,383	4(2,5)	*	1,585 (0,455-5,522)	0,550
<b><i>p</i> - HW</b>	0,605	0,440				0,599			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
G	289(81,6)	369(82,7)	0,163	0,928 (0,645-1,336)	0,687	260(82,3)	0,046	0,958 (0,645-1,421)	0,830
A	65(18,4)	77(17,3)		1,078 (0,749-1,552)		56(17,7)		1,044 (0,704-1,550)	
<b>1079G/A</b>									
<b>Genótipos</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>				<b>n(%)</b>			
GG	177(100)	223(100)	NA			158(100)	NA		
GA	0(0,0)	0(0,0)				0(0,0)			
AA	0(0,0)	0(0,0)				0(0,0)			
<b><i>p</i> - HW</b>	1,000	1,000				1,000			
<b>Alelos</b>	<b>n*(%)</b>	<b>n*(%)</b>				<b>n*(%)</b>			
G	354(100)	446(100)	NA			316(100)	NA		
A	0(0,0)	0(0,0)				0(0,0)			

Tabela 15: Distribuição da frequência genotípica e alélica dos SNPs 1057G/A e 1079G/A do gene *CD86* entre os grupos de paciente e controles (contatos + não contatos), assim como entre pacientes e contatos. Análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01. OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança, n = número absoluto de indivíduos analisado, n\* = número de cromossomos, *p*-HW = valor de *p* para equilíbrio de Hardy-Weinberg. \*Feito teste exato de Fisher. Não foi possível realizar sequenciamento em 1 amostra do grupo controle.

### 5.3 Análise da citocina IFN- $\gamma$

Para a determinação da produção de IFN- $\gamma$ , foi realizado ensaio de ELISA em amostras de 93 pacientes com TB pulmonar e 119 indivíduos do grupo controle (sendo 82 contatos e 37 não contatos).

A análise da produção da citocina IFN- $\gamma$  entre os grupos de pacientes e indivíduos do grupo controle revelou uma diferença significativa, com uma maior produção dessa proteína na população sem a doença. Demonstrando que o IFN- $\gamma$  é uma citocina importante na resposta contra o bacilo da TB. No entanto, alguns pacientes com TB apresentaram concentrações elevadas de IFN- $\gamma$ , que não foram suficientes para controlar a infecção, sugerindo que há outras citocinas ou outros componentes necessários, além do IFN- $\gamma$  para o controle efetivo na infecção contra *M. tuberculosis*.

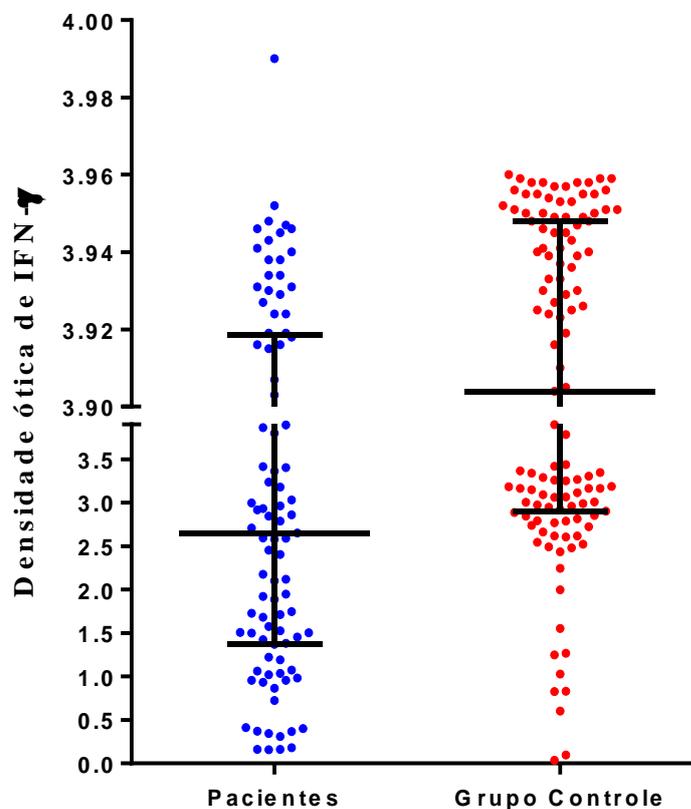


Figura 8: Produção de IFN- $\gamma$  induzida por mitógenos. Comparação da densidade ótica de IFN- $\gamma$  entre pacientes (mediana = 2,65) e controles (mediana = 3,90). Teste Mann Whitney  $p < 0,0001$ .

Quando comparado os três grupos (pacientes, contatos e não contatos), uma diferença significativa também foi verificada na produção da citocina (figura 9). Não houve diferença nos níveis de produção de IFN- $\gamma$  entre contatos e controles.

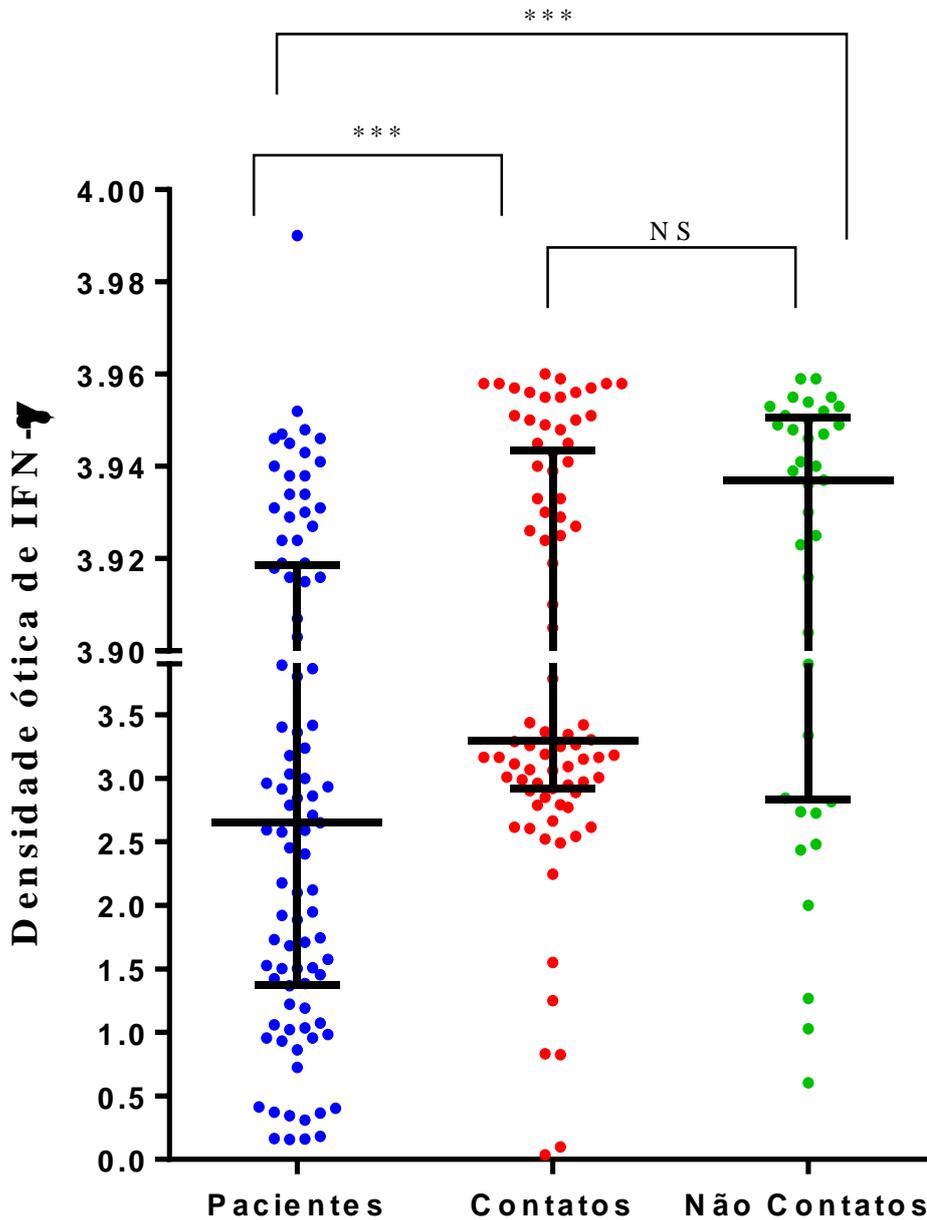


Figura 9: Produção de IFN- $\gamma$  induzida por mitógenos. Comparação da densidade óptica de IFN- $\gamma$  entre pacientes (mediana = 2,65), contatos (mediana = 3,30) e não contatos (mediana = 3,94). Teste Kruskal-Wallis  $p < 0.0001$ ; NS = não significativo; \*\*\* alto nível de significância.

Também foi realizada análises para verificar se há associação entre as frequências genóticas dos genes deste estudo e a produção de IFN- $\gamma$ .

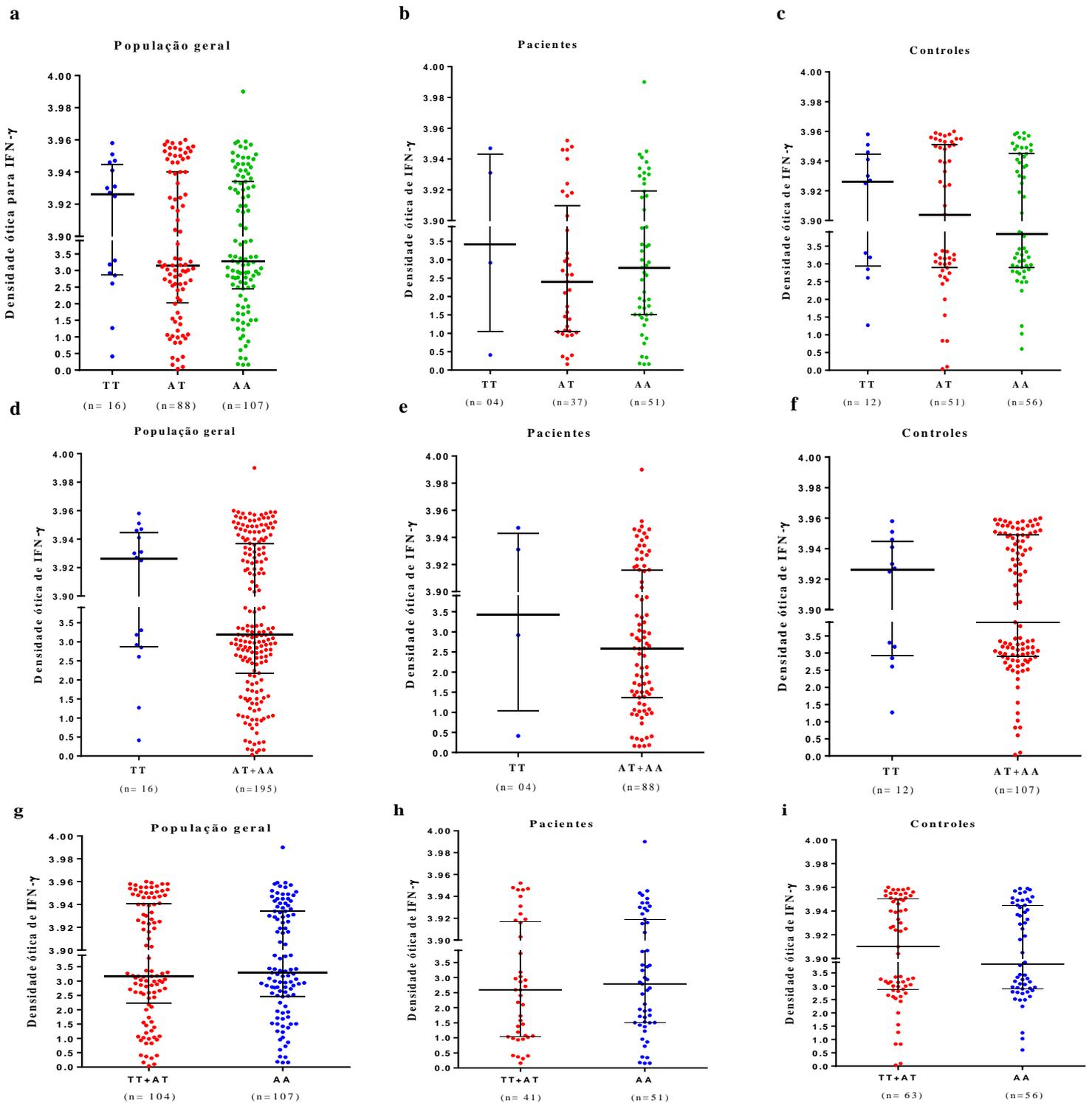


Figura 10: Comparação entre produção de IFN- $\gamma$  (em densidade ótica) e frequência genotípica do SNP +874A/T do gene *IFNG* na população geral, em pacientes e em controles. Feito Kruskal-Wallis para **a** (Medianas: TT = 3,926; AT = 3,158; AA = 3,291. Valor de  $p = 0,494$ ), **b** (Medianas: TT = 3,425; AT = 2,405; AA = 2,787. Valor de  $p = 0,522$ ), **c** (Medianas: TT = 3,926; AT = 3,904; AA = 3,842;  $p = 0,925$ ) e teste Mann Whitney para **d** (Medianas: TT = 3,926; AT+AA = 3,188. Valor de  $p = 0,2401$ ), **e** (Medianas: TT = 3,425; AT+AA = 2,593. Valor de  $p = 0,4218$ ), **f** (Medianas: TT = 3,926; AT+AA = 3,899. Valor de  $p = 0,8497$ ), **g** (Medianas: TT+AT = 3,181; AA = 3,291. Valor de  $p = 0,819$ ), **h** (Medianas: TT+AT = 2,592; AA = 2,787. Valor de  $p = 0,580$ ) e **i** (Medianas: TT+AT = 3,910; AA = 3,842. Valor de  $p = 0,700$ ).

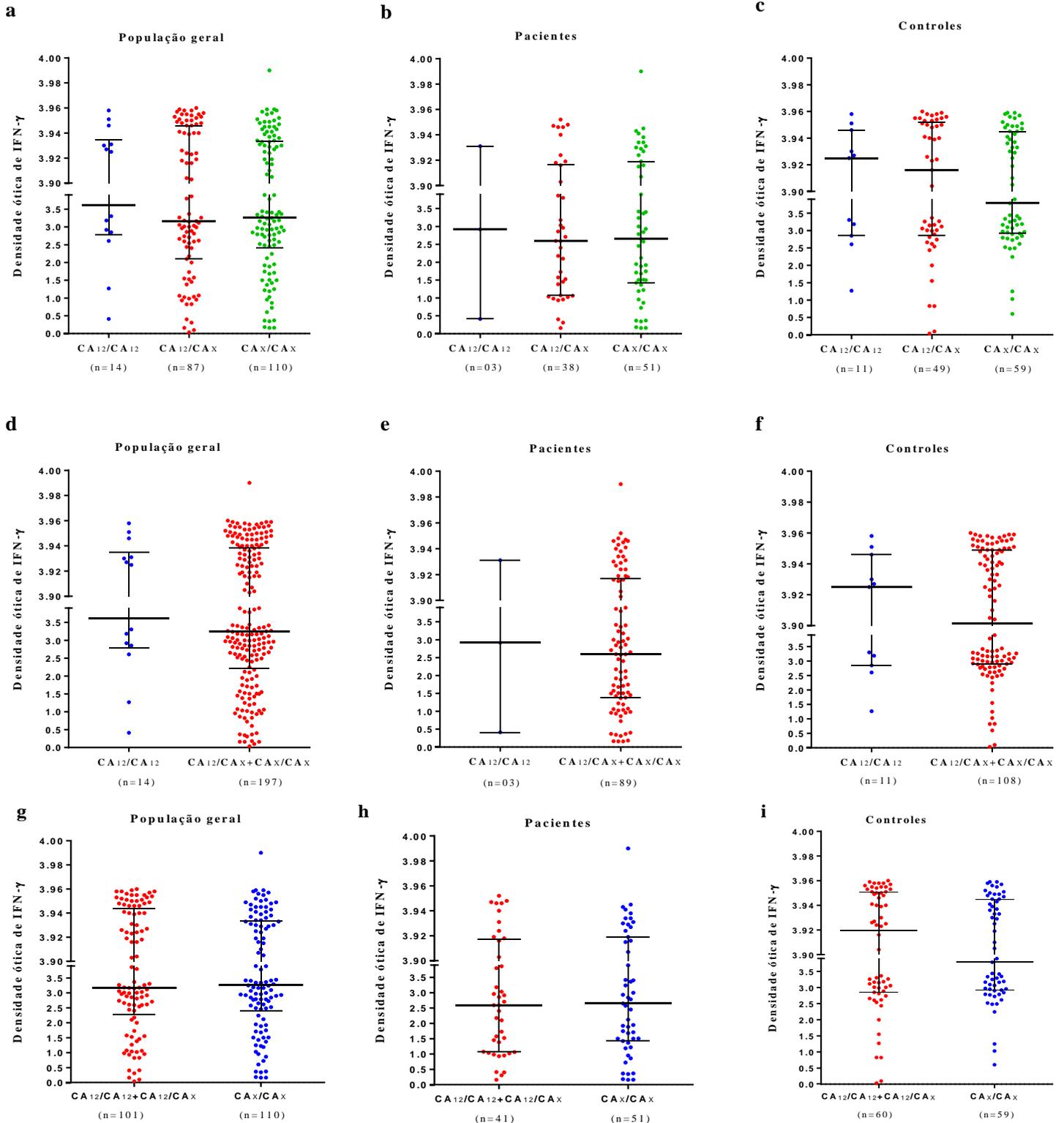


Figura 11: Comparação entre produção de IFN- $\gamma$  (em densidade ótica) e frequência genotípica do microssatélite para 12 repetições de CA do gene *IFNG* na população geral, em pacientes e em controles. Feito teste Kruskal-Wallis para **a** (Medianas: CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> = 3,615; CA<sub>12</sub>/CA<sub>x</sub> = 3,165; CA<sub>x</sub>/CA<sub>x</sub> = 3,271. Valor de  $p$  = 0,781), **b** (Medianas: CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> = 2,918; CA<sub>12</sub>/CA<sub>x</sub> = 2,593; CA<sub>x</sub>/CA<sub>x</sub> = 2,651. Valor de  $p$  = 0,998), **c** (Medianas: CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> = 3,925; CA<sub>12</sub>/CA<sub>x</sub> = 3,916; CA<sub>x</sub>/CA<sub>x</sub> = 3,785. Valor de  $p$  = 0,903) e teste Mann Whitney para **d** (Medianas: CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> = 3,615; CA<sub>12</sub>/CA<sub>x</sub> + CA<sub>x</sub>/CA<sub>x</sub> = 3,271. Valor de  $p$  = 0,510), **e** (Medianas: CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> = 2,918; CA<sub>12</sub>/CA<sub>x</sub> + CA<sub>x</sub>/CA<sub>x</sub> = 2,594. Valor de  $p$  = 0,987) e **f** (Medianas: CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> = 3,925; CA<sub>12</sub>/CA<sub>x</sub> + CA<sub>x</sub>/CA<sub>x</sub> = 3,902. Valor de  $p$  = 0,998), **g** (Medianas: CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> + CA<sub>12</sub>/CA<sub>x</sub> = 3,183; CA<sub>x</sub>/CA<sub>x</sub> = 3,271. Valor de  $p$  = 0,688), **h** (Medianas: CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> + CA<sub>12</sub>/CA<sub>x</sub> = 2,594; CA<sub>x</sub>/CA<sub>x</sub> = 2,651. Valor de  $p$  = 0,958), **i** (Medianas: CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> + CA<sub>12</sub>/CA<sub>x</sub> = 3,920; CA<sub>x</sub>/CA<sub>x</sub> = 3,785. Valor de  $p$  = 0,670); “x” representa números de repetições de CA diferentes de 12.

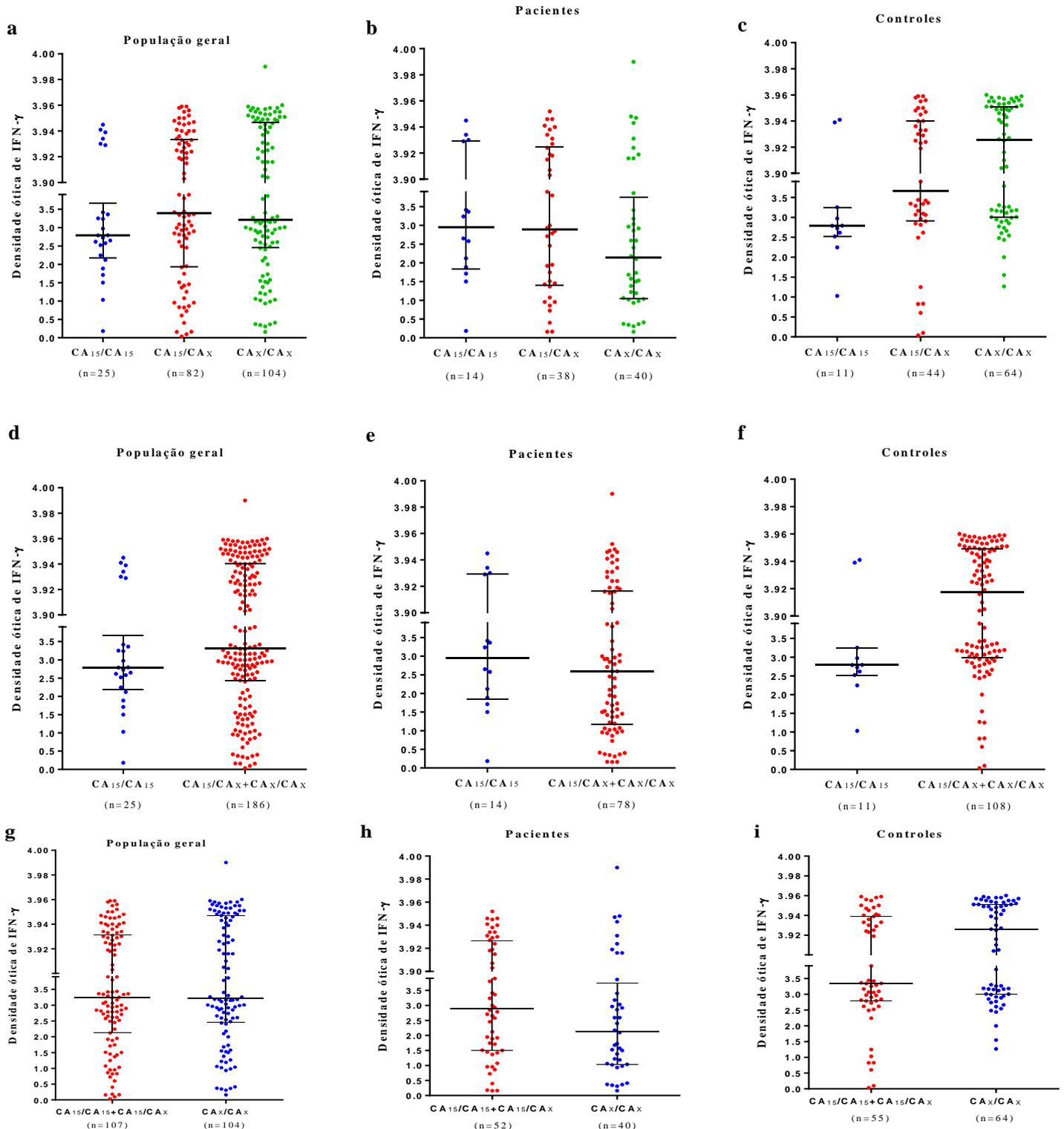


Figura 12: Comparação entre produção de IFN- $\gamma$  (em densidade ótica) e frequência genotípica do microssatélite para 15 repetições de CA do gene *IFNG* na população geral, em pacientes e em controles. Feito teste Kruskal-Wallis para **a** (Medianas: CA<sub>15</sub>/CA<sub>15</sub> = 2,788; CA<sub>15</sub>/CA<sub>X</sub> = 3,393; CA<sub>X</sub>/CA<sub>X</sub> = 3,224. Valor de  $p = 0,218$ ), **b** (Medianas: CA<sub>15</sub>/CA<sub>15</sub> = 2,944; CA<sub>15</sub>/CA<sub>X</sub> = 2,888; CA<sub>X</sub>/CA<sub>X</sub> = 2,138. Valor de  $p = 0,296$ ), **c** (Medianas: CA<sub>15</sub>/CA<sub>15</sub> = 2,788; CA<sub>15</sub>/CA<sub>X</sub> = 3,669; CA<sub>X</sub>/CA<sub>X</sub> = 3,926. Valor de  $p = 0,0099$ ) e teste Mann Whitney para **d** (Medianas: CA<sub>15</sub>/CA<sub>15</sub> = 2,788; CA<sub>15</sub>/CA<sub>X</sub> + CA<sub>X</sub>/CA<sub>X</sub> = 3,322. Valor de  $p = 0,112$ ), **e** (Medianas: CA<sub>15</sub>/CA<sub>15</sub> = 2,944; CA<sub>15</sub>/CA<sub>X</sub> + CA<sub>X</sub>/CA<sub>X</sub> = 2,593. Valor de  $p = 0,405$ ) e **f** (Medianas: CA<sub>15</sub>/CA<sub>15</sub> = 2,788; CA<sub>15</sub>/CA<sub>X</sub> + CA<sub>X</sub>/CA<sub>X</sub> = 3,918. Valor de  $p = 0,005$ ), **g** (Medianas: CA<sub>15</sub>/CA<sub>15</sub> + CA<sub>15</sub>/CA<sub>X</sub> = 3,251; CA<sub>X</sub>/CA<sub>X</sub> = 3,224. Valor de  $p = 0,214$ ), **h** (Medianas: CA<sub>15</sub>/CA<sub>15</sub> + CA<sub>15</sub>/CA<sub>X</sub> = 2,288; CA<sub>X</sub>/CA<sub>X</sub> = 2,138. Valor de  $p = 0,126$ ), **i** (Medianas: CA<sub>15</sub>/CA<sub>15</sub> + CA<sub>15</sub>/CA<sub>X</sub> = 3,346; CA<sub>X</sub>/CA<sub>X</sub> = 3,926. Valor de  $p = 0,028$ ); “x” representa números de repetições de CA diferentes de 15.

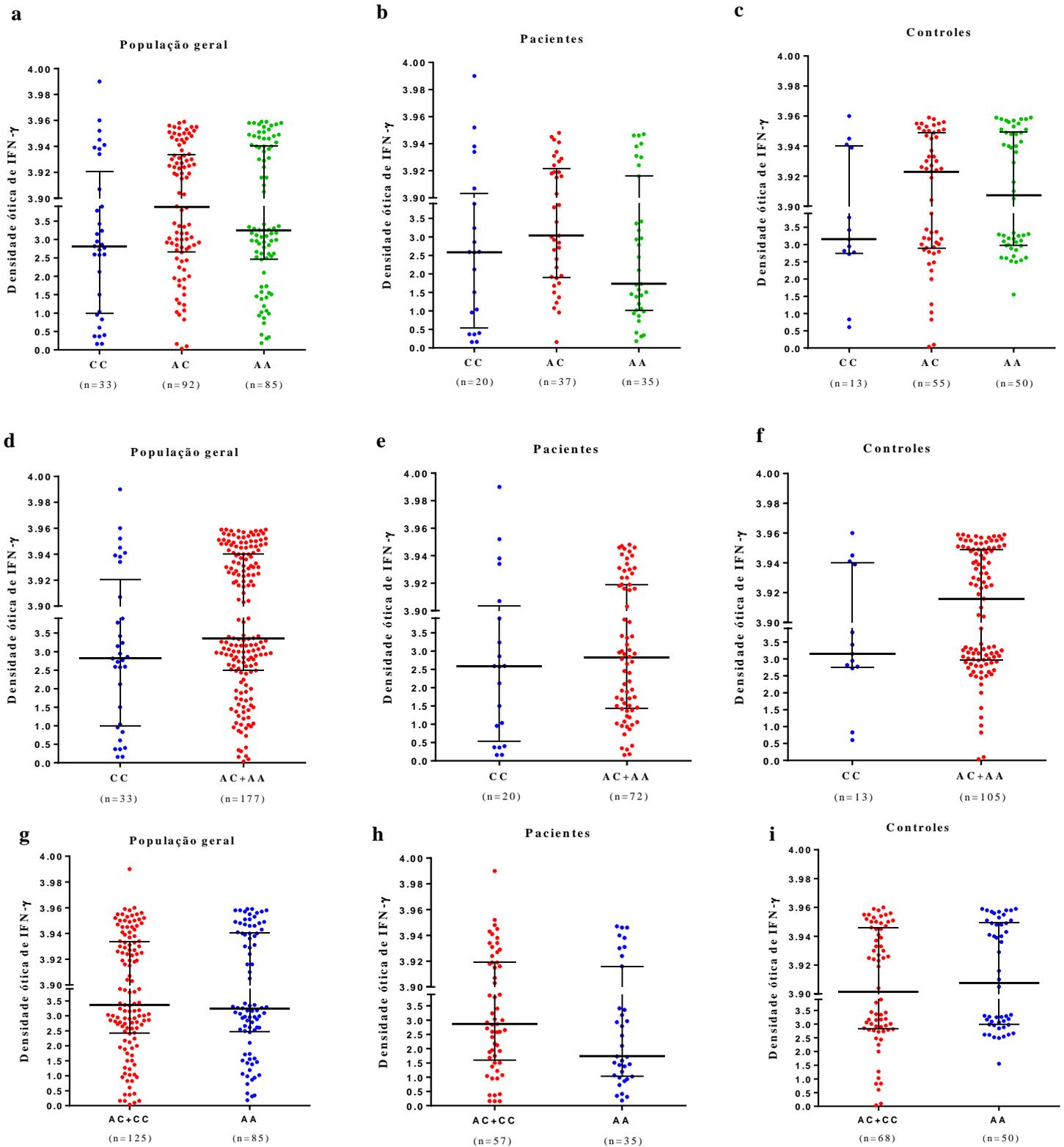


Figura 13: Comparação entre produção de IFN- $\gamma$  (em densidade óptica) e frequência genotípica do SNP +118A/C do gene *IL12B* na população geral, em pacientes e em controles. Feito teste Kruskal-Wallis para **a** (Mediana: CC = 2,815; AC = 3,881; AA = 3,251. Valor de  $p = 0,112$ ), **b** (Mediana: CC = 2,585; AC = 3,033; AA = 1,729. Valor de  $p = 0,125$ ), **c** (Mediana: CC = 3,150; AC = 3,923; AA = 3,908. Valor de  $p = 0,346$ ) e teste Mann-Whitney para **d** (Mediana: CC = 2,815; AC + AA = 3,346. Valor de  $p = 0,042$ ), **e** (Mediana: CC = 2,585; AC + AA = 2,816. Valor de  $p = 0,396$ ), **f** (Mediana: CC = 3,150; AC + AA = 3,916. Valor de  $p = 0,192$ ), **g** (Mediana: AC + CC = 3,365; AA = 3,251. Valor de  $p = 0,802$ ), **h** (Mediana: AC + CC = 2,860; AA = 1,719. Valor de  $p = 0,185$ ), **i** (Mediana: AC + CC = 3,920; AA = 3,908. Valor de  $p = 0,321$ ).

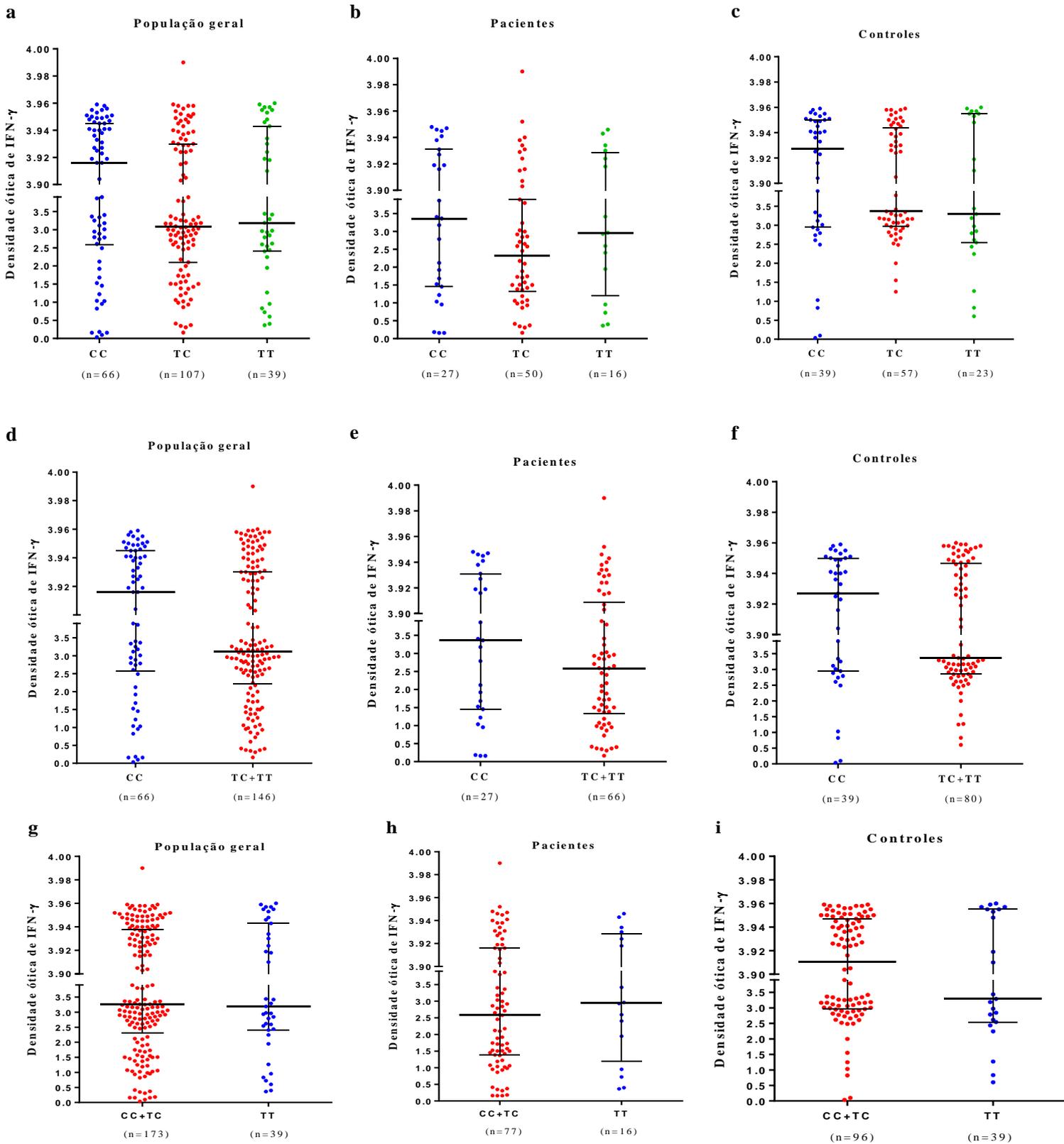


Figura 14: Comparação entre produção de IFN- $\gamma$  (em densidade ótica) e frequência genotípica do SNP -387T/C do gene *CD80* na população geral, em pacientes e em controles. Feito teste Kruskal-Wallis para **a** (Mediana: CC = 3,916; TC = 3,092; TT = 3,188. Valor de  $p = 0,251$ ), **b** (Mediana: CC = 3,362; TC = 2,315; TT = 2,947. Valor de  $p = 0,325$ ), **c** (Mediana: CC = 3,927; TC = 3,365; TT = 3,291. Valor de  $p = 0,646$ ) e teste Mann Whitney para **d** (Mediana: CC = 3,916; TC + TT = 3,121. Valor de  $p = 0,112$ ), **e** (Mediana: CC = 3,362; TC + TT = 2,585. Valor de  $p = 0,258$ ), **f** (Mediana: CC = 3,927; TC + TT = 3,356. Valor de  $p = 0,864$ ), **g** (Mediana: CC +TC = 3,260; TT = 3,188. Valor de  $p = 0,964$ ), **h** (Mediana: CC +TC = 2,592; TT = 2,947. Valor de  $p = 0,553$ ) e **i** (Mediana: CC +TC = 3,911; TT = 3,291. Valor de  $p = 0,589$ ).

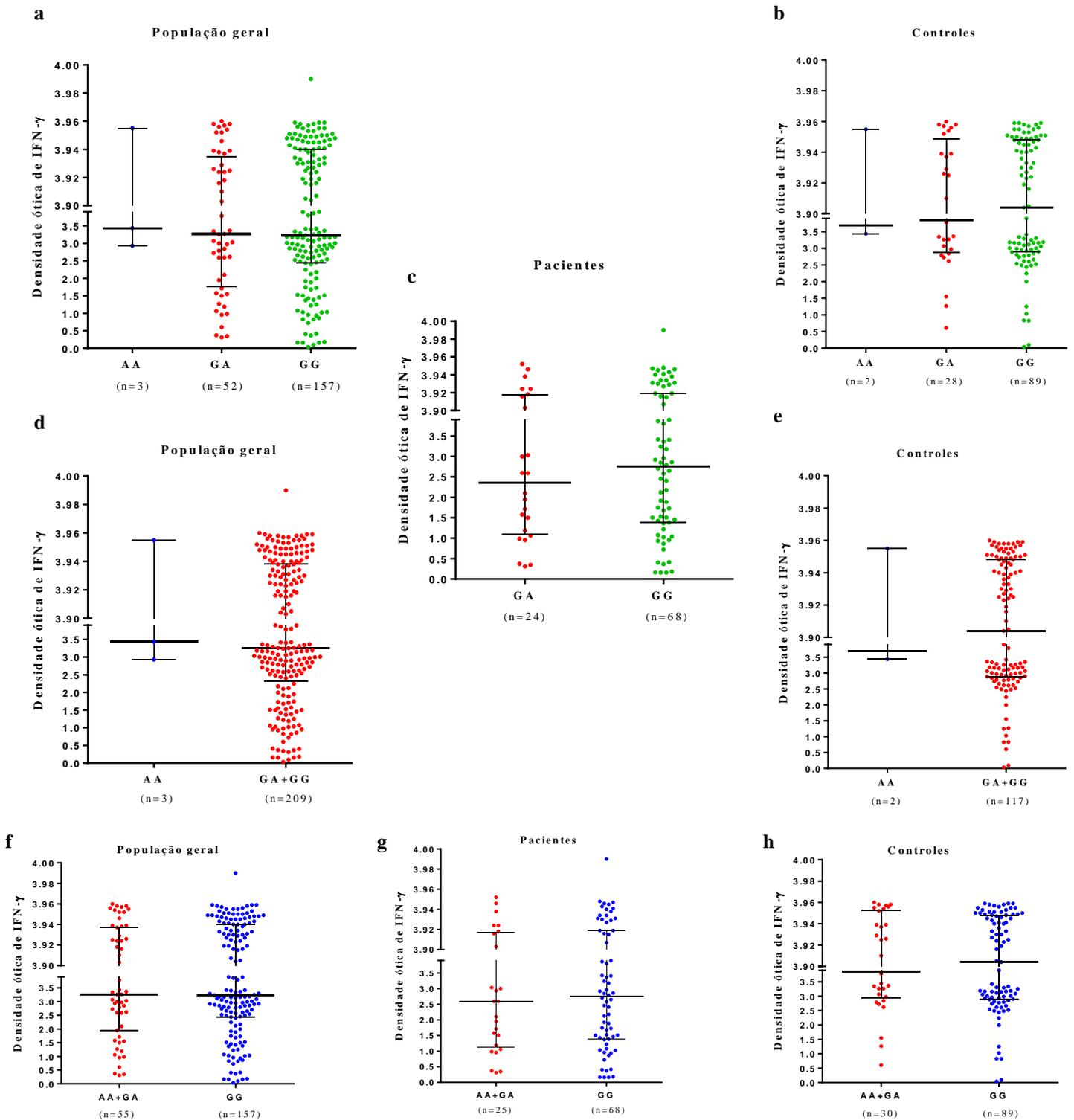


Figura 15: Comparação entre produção de IFN- $\gamma$  (em densidade ótica) e frequência genotípica do SNP -232G/A do gene *CD80* na população geral, em pacientes e em controles. Feito teste Kruskal-Wallis para **a** (Mediana: AA = 3,439; GA = 3,264; GG = 3,237. Valor de  $p = 0,798$ ), **b** (Mediana: AA = 3,697; GA = 3,848; GG = 3,904. Valor de  $p = 0,646$ ) e teste Mann Whitney para **c** (Mediana: GA = 2,346; GG = 2,748. Valor de  $p = 0,641$ ), **d** (Mediana: AA = 3,439; GA + GG = 3,251. Valor de  $p = 0,469$ ), **e** (Mediana: AA = 3,697; GA + GG = 3,904. Valor de  $p = 0,396$ ), **f** (Mediana: AA + GA = 3,267; GG = 3,237. Valor de  $p = 0,858$ ), **g** (Mediana: AA + GA = 2,592; GG = 2,748. Valor de  $p = 0,675$ ), **h** (Mediana: AA + GA = 3,848; GG = 3,904. Valor de  $p = 0,614$ ). Esta análise é equivalente para os SNPs -454 C/A, +5C/A e indel -557\_-561ins.

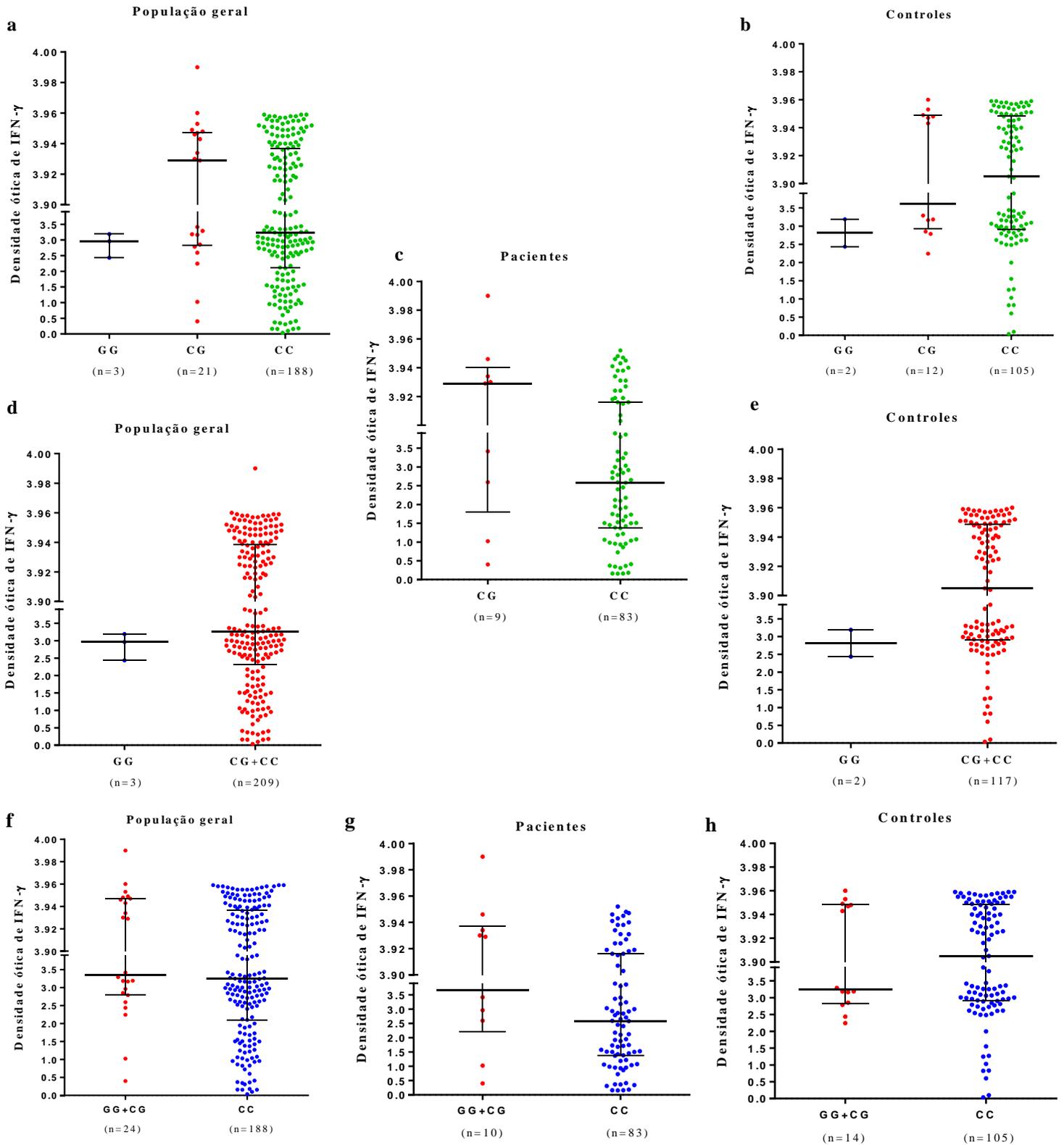


Figura 16: Comparação entre produção de IFN- $\gamma$  (em densidade ótica) e frequência genotípica do SNP -79C/G do gene *CD80* na população geral, em pacientes e em controles. Feito teste Kruskal-Wallis para **a** (Mediana: GG = 2,962; GC = 3,962; CC = 3,244. Valor de  $p = 0,205$ ), **b** (Mediana: GG = 2,812; GC = 3,617; CC = 3,905. Valor de  $p = 0,405$ ) e teste Mann Whitney para **c** (Mediana: GC = 3,929; CC = 2,578. Valor de  $p = 0,106$ ), **d** (Mediana: GG = 2,962; CG + CC = 3,267. Valor de  $p = 0,502$ ), **e** (Mediana: GG = 2,812; CG + CC = 3,905. Valor de  $p = 0,238$ ), **f** (Mediana: GG +CG = 3,354; CC = 3,244. Valor de  $p = 0,194$ ), **g** (Mediana: GG +CG = 3,673; CC = 2,578. Valor de  $p = 0,103$ ) e **h** (Mediana: GG +CG = 3,240; CC = 3,905. Valor de  $p = 0,988$ ).

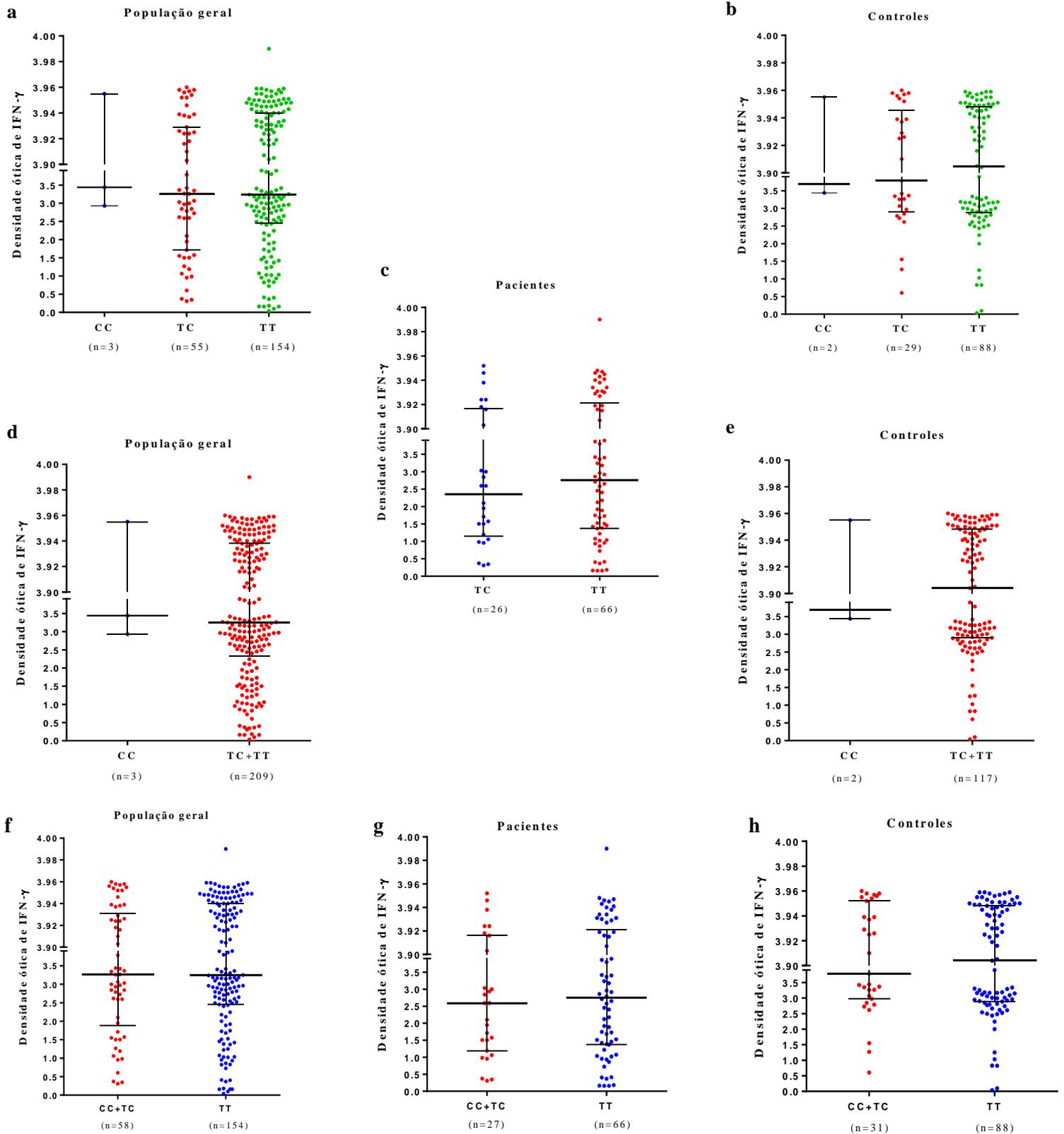


Figura 17: Comparação entre produção de IFN- $\gamma$  (em densidade ótica) e frequência genotípica do SNP -7T/C do gene *CD80* na população geral, em pacientes e em controles. Feito teste Kruskal-Wallis para **a** (Mediana: CC = 3,439; TC = 3,260; TT = 3,244. Valor de  $p = 0,641$ ), **b** (Mediana: CC = 3,697; TC = 3,785; TT = 3,905. Valor de  $p = 0,651$ ) e teste Mann Whitney para **c** (Mediana: TC = 2,346; TT = 2,748. Valor de  $p = 0,559$ ), **d** (Mediana: CC = 3,439; TC + TT = 3,251. Valor de  $p = 0,469$ ), **e** (Mediana: CC = 3,697; TC + TT = 3,904. Valor de  $p = 0,414$ ), **f** (Mediana: CC + TC = 3,264; TT = 3,244. Valor de  $p = 0,688$ ), **g** (Mediana: CC + TC = 3,264; TT = 3,244. Valor de  $p = 0,586$ ) e **h** (Mediana: CC + TC = 3,785; TT = 3,905. Valor de  $p = 0,635$ )

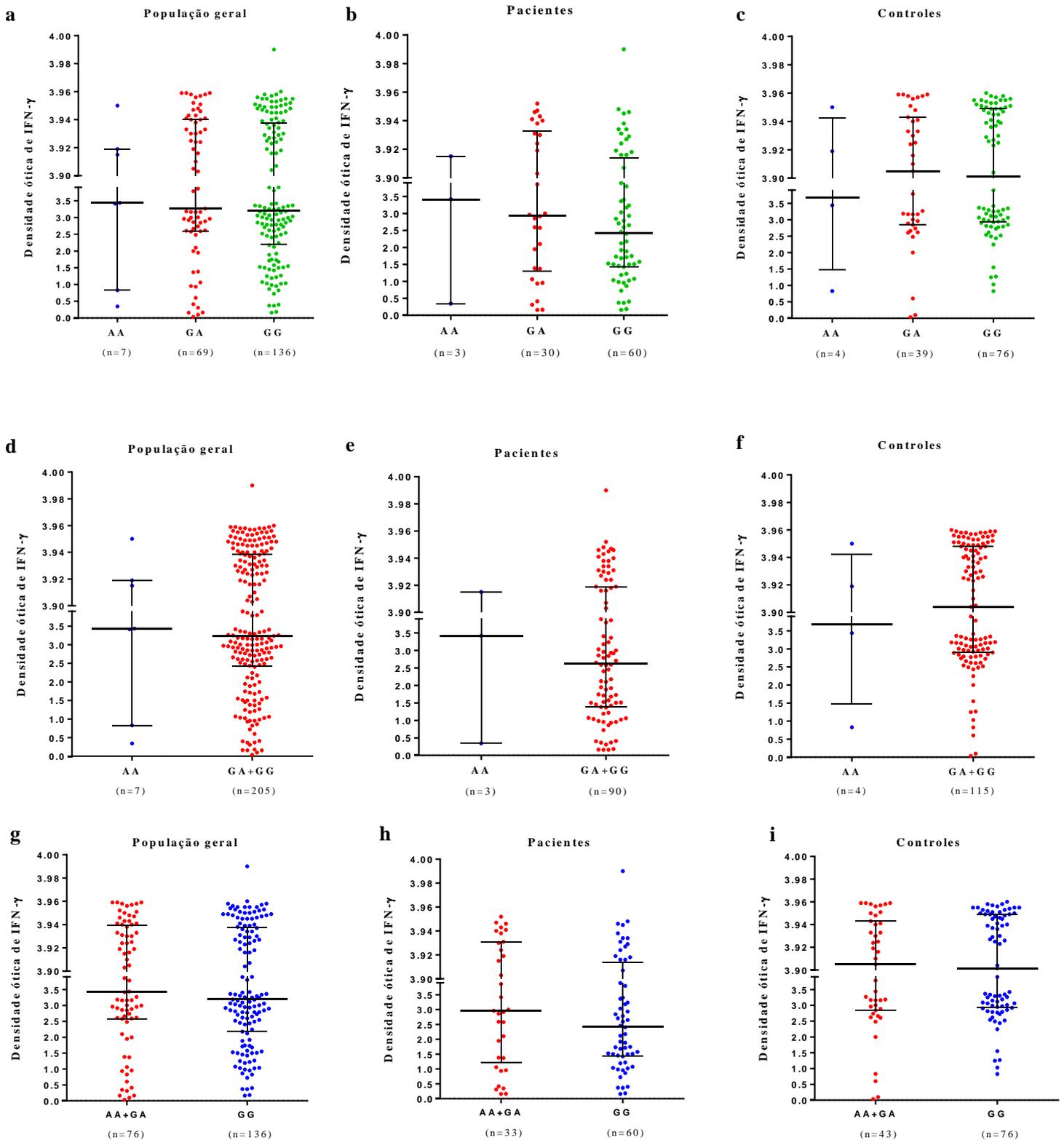


Figura 18: Comparação entre produção de IFN- $\gamma$  (em densidade ótica) e frequência genotípica do SNP 1057G/A do gene *CD86* na população geral, em pacientes e em controles. Feito teste Kruskal-Wallis para **a** (Mediana: AA = 3,439; GA = 3,267; GG = 3,213. Valor de  $p = 0,911$ ), **b** (Mediana: AA = 3,416; GA = 2,940; GG = 2,430. Valor de  $p = 0,629$ ), **c** (Mediana: AA = 3,679; GA = 3,905; GG = 3,902. Valor de  $p = 0,914$ ) e teste Mann Whitney para **d** (Mediana: AA = 3,439; GA + GG = 3,237. Valor de  $p = 0,819$ ), **e** (Mediana: AA = 3,416; GA + GG = 2,623. Valor de  $p = 0,891$ ) e **f** (Mediana: AA = 3,679; GA + GG = 3,904. Valor de  $p = 0,790$ ), **g** (Mediana: AA + GA = 3,428; GG = 3,213. Valor de  $p = 0,771$ ), **h** (Mediana: AA + GA = 262,9; GG = 2,430. Valor de  $p = 0,380$ ) e **i** (Mediana: AA + GA = 3,905; GG = 3,902. Valor de  $p = 0,707$ ).

Também foi comparada a produção de IFN- $\gamma$  com os alelos A e T do SNP +874A/T e os alelos do microssatélite. Entretanto não houve diferença significativa entre os alelos na população estudada (resultados não apresentados).

Também foi feita análise entre os SNPs +1030C/T e +1254T/G do gene *IL12B* e a produção de citocina em paciente e controles, sendo que não houve diferença na produção de IFN- $\gamma$  e os genótipos (resultados não apresentados).

Vallinoto *et al.* (2010) e Sallakci *et al.* (2007) encontraram uma associação significativa entre a produção de IFN- $\gamma$  e o SNP +874A/T do gene *IFNG*, com o genótipo TT associado a concentrações mais elevadas de IFN- $\gamma$  e o genótipo AA associado a concentrações mais baixas.

Neste estudo, apesar da diferença da concentração de IFN- $\gamma$  entre os genótipos não ter sido significativa, pode-se observar que há uma tendência para concentrações mais elevadas de IFN- $\gamma$  nos indivíduos com genótipo TT, independente do grupo (pacientes e controles).

É provável que o aumento do número amostral poderia levar a uma maior diferença estatística entre os genótipos e a concentração dessa citocina. Ademais há outros fatores combinados a esses genes ou a outras citocinas além do IFN- $\gamma$ , como IL17, que podem estar envolvidos e que merecem ser investigados com mais detalhes na resposta imune a TB.

Para os genótipos do microssatélite de *IFNG*, a produção de IFN- $\gamma$  entre os indivíduos que apresentam CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> foi mais elevada que CA<sub>12</sub>/CA<sub>X</sub> e CA<sub>X</sub>/CA<sub>X</sub>. Entretanto a diferença entre os genótipos não foi estatisticamente significativa.

Estudos de Pravica *et al.* (1999) demonstraram que CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> está associado a maiores concentrações de IFN- $\gamma$  e repetições diferentes de 12 estão associadas a menores concentrações desta citocina.

Neste estudo foi realizada análise para 15 repetições de CA do microssatélite do gene *IFNG*, na qual foi encontrada uma diferença significativa entre a produção de IFN- $\gamma$  e os

genótipos agrupados de acordo com a presença ou ausência de 15 repetições de CA, em indivíduos do grupo controle. A presença de CA<sub>15</sub>/CA<sub>15</sub> apresentou menores concentrações de IFN- $\gamma$ .

Na análise do SNP +1188A/C do gene *IL12B*, foi observada uma diferença significativa na produção de IFN- $\gamma$  entre o genótipo CC e os genótipos (CA + AA). Com maior produção da citocina para (CA + AA) em toda população (figura 13).

A proteína IL12p40 (codificada pelo gene *IL12B*) é necessária tanto para a formação da citocina IL12 (IL12p70 e IL12p80) como da citocina IL23. IL12 é importante na indução e manutenção da resposta Th1. Já IL23 é importante para a manutenção do perfil Th17 (COOPER *et al.*, 2007; O’GARRA *et al.*, 2013). Estudos de Selvaraj *et al.* (2008) observaram que a presença do genótipo AA está associada a menores concentrações da proteína IL12p40 em indivíduos saudáveis e o genótipo CC está associado a maiores concentrações de IL12p40 em pacientes.

Pode ser que menores concentrações de IL12p40 direcionem mais para formação de IL12, que é necessária para diferenciação e manutenção do perfil Th1, ideal para produção de IFN- $\gamma$ . Já altas concentrações de IL12p40 poderiam direcionar mais a indução e manutenção de perfil Th17 e provavelmente, levando a um desequilíbrio entre esses perfis e dificultando a eliminação do patógeno.

Há necessidade de estudos futuros nesta população para um melhor entendimento do perfil de produção de proteínas como IL12 e IL23 em resposta à TB pulmonar, além de outras proteínas envolvidas na resposta imunológica a essa doença.

Na análise para o SNP -387T/C do gene *CD80*, o genótipo CC apresentou maior produção de IFN- $\gamma$  tanto em pacientes como em controles. Porém, não houve diferença significativa.

A produção de IFN- $\gamma$  entre os genótipos do SNP-232G/A (que apresentou a mesma frequência genotípica que os SNPs -454 C/A, +5C/A e indel -557\_-561ins) do gene *CD80* apresentou valores similares entre os genótipos em todos os grupos analisados e não houve diferença significativa.

Na análise para o SNP -79C/G do gene *CD80*, o genótipo GG apresentou menor produção da citocina na população total e em controles, entretanto em pacientes a análise foi comprometida, pois o número de amostras foi pequeno. Também não houve diferença significativa.

Na análise para o SNP -7T/C do gene *CD80*, o genótipo CC apresentou produção diferente entre os grupos; com maior produção na população total e menor produção em controles.

Na análise para o SNP +1057G/A do gene *CD86*, o genótipo AA também apresentou perfil de produção diferente entre os grupos; com maior produção de IFN- $\gamma$  na população total e pacientes e menor produção em controles.

Em todas as análises o número de amostras para o genótipo raro foi pequeno comparado aos demais genótipos, dificultando a precisão dos resultados. Apesar disso, consegue-se identificar que há uma relação entre a produção da citocina IFN- $\gamma$  e os genótipos do gene *IFNG*, com maiores níveis da proteína em indivíduos que apresentam genótipos +874TT e homozigose para 12 repetições de CA no microsatélite +875 deste gene.

E ainda que indivíduos que apresentam genótipo +1188CC do gene *IL12B*, que está associado ao risco de TB pulmonar neste estudo, produzem menos IFN- $\gamma$  na população deste estudo.

## 5.4 Análise de regressão

Foi realizada análise de regressão para os fatores individuais (tabela 16) e os genótipos +874TT e 12 repetições de CA do gene *IFNG*, os quais estão associados a proteção contra TB. E ainda foi feita análise para o genótipo +1188CC do gene *IL12B*, associado ao risco à TB pulmonar.

Preditor	<i>p</i> -valor	Odds Ratio (OR)	IC 95%
<b>Tuberculose vs. SNP +874T/T<sup>1</sup> de <i>IFNG</i></b>			
Idade	0,017	0,97	0,95 – 1,00
Gênero	<0,001	2,91	1,80 – 4,71
Etilismo	0,005	2,86	1,35 – 6,09
BCG	<0,001	0,24	0,11 – 0,54
Naturalidade	0,178	1,60	0,80 – 3,20
Tabagismo	0,006	3,23	1,36 – 7,66
874T/T	0,026	0,35	0,13 – 0,94
<b>Tuberculose vs. Microsatélite CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub><sup>2</sup> de <i>IFNG</i></b>			
Idade	0,013	0,97	0,95 – 0,99
Gênero	<0,001	2,94	1,82 – 4,77
Etilismo	0,006	2,81	1,32 – 5,95
BCG	<0,001	0,24	0,11 – 0,54
Naturalidade	0,164	1,62	0,81 – 3,24
Tabagismo	0,005	3,36	1,41 – 8,01
CA <sub>12</sub> /CA <sub>12</sub>	0,018	0,31	0,11 – 0,88
<b>Tuberculose vs. SNP +1188C/C<sup>3</sup> de <i>IL12B</i></b>			
Idade	0,013	0,97	0,95 – 0,99
Gênero	<0,001	2,94	1,82 – 4,77
Etilismo	0,005	2,90	1,37 – 6,15
BCG	<0,001	0,22	0,10 – 0,49
Naturalidade	0,164	1,63	0,81 – 3,29
Tabagismo	0,005	3,36	1,39 – 8,15
+1188C/C	0,040	1,97	1,03 – 3,77

Tabela 16: Análise de regressão logística múltipla para fatores intrínsecos, sociais e clínicos na população estudada.<sup>1</sup>Hosmer-Lemeshow 8,362, *p* = 0,399; <sup>2</sup>Hosmer-Lemeshow 7,792, *p* = 0,454; <sup>3</sup>Hosmer-Lemeshow 7,580, *p* = 0,476. Análise realizada usando software Minitab versão 17.

Foi observado que os fatores analisados estão associados a TB pulmonar, com exceção da naturalidade que não apresentou diferença entre indivíduos nascidos do estado do Amazonas e aqueles que nasceram nos outros estados da Amazônia brasileira. Pode-se observar que indivíduos jovens, gênero masculino, consumo de bebida alcoólica, não vacinados para BCG e tabagismo apresentam um risco maior para desenvolvimento da TB pulmonar.

A tabela 17 demonstra a probabilidade de um indivíduo desenvolver TB de acordo com os fatores de risco ou proteção associados, indicando o efeito do genótipo CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> do microssatélite +875 de *IFNG* na proteção contra TB. Assim como a tabela 18 indica o efeito do genótipo CC do SNP +1188A/C de *IL12B* no risco à TB.

Quando analisados o genótipo CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> junto ao genótipo +1188CC, mas sem outros fatores, a presença do genótipo CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> do microssatélite +875 de *IFNG* (fator de proteção) se sobrepõe à presença do genótipo CC do SNP +1188A/C de *IL12B* (fator de risco), ou seja, o polimorfismo do gene *IFNG* tem maior influência na associação à TB que o polimorfismo +1188A/C do gene *IL12B*.

Indivíduo	Idade	Gênero	Etilismo	BCG	Tabagismo	CA <sub>12</sub> /CA <sub>12</sub>	Probabilidade
1	30 anos	Masculino	Não	Não	Não	Não	79,2%
2	30 anos	Masculino	Não	Não	Não	Sim	54,4%
3	30 anos	Masculino	Não	Sim	Não	Não	47,4%
4	30 anos	Masculino	Não	Sim	Não	Sim	21,9%

Tabela 17: Efeito do genótipo CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> do microssatélite +875 no gene *IFNG* na Tuberculose. Probabilidade calculada baseada no modelo de regressão para indivíduos hipotéticos.

Indivíduo	Idade	Gênero	Etilismo	BCG	Tabagismo	+1188C/C	Probabilidade
1	30 anos	Masculino	Não	Não	Não	Não	77,0%
2	30 anos	Masculino	Não	Não	Não	Sim	86,8%
3	30 anos	Masculino	Não	Sim	Não	Não	41,8%
4	30 anos	Masculino	Não	Sim	Não	Sim	58,6%

Tabela 18: Efeito do genótipo C/C do SNP 1188A/C no gene *IL12B* na Tuberculose. Probabilidade calculada baseada no modelo de regressão para indivíduos hipotéticos.

Indivíduo	+1188C/C	CA 12/12	Probabilidade
1	Não	Sim	21,4%
2	Sim	Sim	35,2%
3	Não	Não	42,3%
4	Sim	Não	59,4%

Tabela 19: Efeitos dos genótipos C/C do SNP +1188A/C no gene *IL12B* e CA<sub>12</sub>/CA<sub>12</sub> do microssatélite +875 no gene *IFNG* na Tuberculose. Probabilidade calculada baseada no modelo de regressão para indivíduos hipotéticos.

## 5.5 Análises de haplótipos

Foi realizada análise das frequências dos haplótipos observado para cada gene. Encontrou-se uma associação no gene *IFNG*, sendo o haplótipo com os alelos A-CA<sub>x</sub> associado ao risco de TB pulmonar, assim como o haplótipo contendo os alelos T-CA<sub>12</sub> associado à proteção contra TB pulmonar (tabela 20). Os polimorfismos observados no gene *IFNG* encontram-se em desequilíbrio de ligação significativo (LOD=115,1; D'=0,93; r<sup>2</sup>=0,86).

<i>IFNG</i>	TB pulmonar (N=176)	Grupo controle (N=223)	$\chi^2$	<i>p</i>
<b>Haplótipos</b>	%	%		
A-CA <sub>x</sub>	74,1	67,7	3,92	<b>0,0477</b>
T-CA <sub>12</sub>	22,1	30,0	6,27	<b>0,0123</b>
T-CA <sub>x</sub>	1,4	1,6	0,03	0,8636
A-CA <sub>12</sub>	2,3	0,7	3,64	0,0563

**Tabela 20:** Distribuição da frequência de haplótipos dos polimorfismos observados na região do íntron 1 do gene *IFNG*. Análise estatística realizada utilizando o software Haploview versão 4.2.

Para os genes *IL12B*, *CD80* e *CD86* não foi encontrada nenhuma associação entre as frequências dos haplótipos observadas em cada gene na suscetibilidade ou resistência à TB pulmonar (dados não mostrados).

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

a) No gene *IFNG*, o SNP +874A/T está associado à TB pulmonar, sendo que o alelo A pode ser considerado como um fator de risco e o alelo T está associado com a proteção contra a doença.

b) Assim como, o microssatélite, posição +875, no *IFNG* também apresentou associação à doença, com 12 repetições de CA associada à proteção e 15 repetições associada ao risco ao de desenvolvimento de TB pulmonar.

c) Para o gene *IL12B*, o genótipo CC do SNP +1188A/C foi associado ao risco de desenvolvimento da doença nessa população.

d) Nesse estudo, a citocina IFN- $\gamma$  apresentou maior produção em indivíduos sem a doença quando comparado com os pacientes.

e) O microssatélite apresentou níveis de produção diferentes entre os números de repetições de CA, como menores níveis quando há 15 repetições em homozigose.

f) O SNP +1188A/C no gene *IL12B* apresentou diferença estatística significativa na produção de IFN- $\gamma$  entre os genótipos, com o genótipo CC apresentando menores níveis de IFN- $\gamma$ .

g) Não foi encontrada nenhuma associação nos genes *CD80* e *CD86* para TB pulmonar, nem com a produção da citocina IFN- $\gamma$ . Embora não tenha sido encontrada nenhuma associação para os genes *CD80* e *CD86*.

Portanto, nesse estudo, conseguiu-se determinar a frequência polimórfica nos genes *IFNG*, *IL12B*, *CD80* e *CD86* e verificar a existência de associação dos polimorfismos observados com a produção de IFN- $\gamma$ . Esses resultados são importantes para auxiliar na determinação do perfil genético da população da região Amazônica além de determinar marcadores genéticos como fatores para proteção e risco a TB pulmonar.

Estudos futuros são necessários para elucidar como outros genes podem regular a produção de citocinas, como IFN- $\gamma$ , IL12p40 e IL17. E ainda ajudar a entender melhor a imunogenética dessa doença e determinação de fatores do alto índice de TB na população da região Amazônica.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI S. Imunologia celular e molecular. 7ª. edição. Editora Elsevier Ltda. Rio de Janeiro-RJ, 2012. 592p.
- AHMAD, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2011, p. 814-943. 2011.
- AHMED, S., *et al.* Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *The British for Rheumatology*, v. 40, p. 662-667. 2001.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S. e TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 783-801. 2006.
- ALEXANDER, K.A., *et al.* Novel Mycobacterium tuberculosis Complex Pathogen, *M. mung.* *Emerging Infectious Diseases journal*, v. 16, n. 8, p. 1296-1299. 2010.
- ALVARADO-NAVARRO, A., *et al.* The 3'UTR 1188 A/C polymorphism in the interleukin-12p40 gene (IL-12B) is associated with lepromatous leprosy in the west of Mexico. *Immunology Letters*, v.118, n.2, p.148-151. 2008.
- AN, P., *et al.* A tumor necrosis factor-alpha-inducible promoter variant of interferon-gamma accelerates CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *The Journal of Infectious Diseases*, v.188, n.2, p.228-231. 2003.
- ARENTZ, M. e HAWN, T. R. Tuberculosis Infection: Insight from Immunogenomics. *Drug Discovery Today Disease Mechanisms*, v. 4, n. 4, p. 231-236. 2007.
- AWAD, M., *et al.* CA Repeat Allele Polymorphism in the First Intron of the Human Interferon-g Gene Is Associated with Lung Allograft Fibrosis. *Human Immunology*, v.60, p. 343-346. 1999.
- AYRES, M., *et al.* Bioestat: Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biomédicas. Programa BioEstat, versão 5.0, 2007.
- BALASUBRAMANI, A. Deletion of a Conserved cis-Element in the Ifng Locus Highlights the Role of Acute Histone Acetylation in Modulating Inducible Gene Transcription. *PLoS Genetics*, v. 10, n. 1, p. 1-13. 2014.
- BALASUBRAMANI, A., *et al.* Modular utilization of distal cis-regulatory elements controls *IFNG* gene expression in T cells activated by distinct stimuli. *Immunity*, v.33, n.1, p.35-47. 2010.
- BELLAMY, R. Genetic Susceptibility to Tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine*, v. 26, n. 2, p. 233-246. 2005.
- BELTRAME, M. H., *et al.* CD80 and CD86 polymorphisms in populations of various ancestries: 5 new CD80 promoter alleles. *Human Immunology*, v.73, n.1, p.111-117. 2012.

BEN SELMA, W., *et al.* Interferon gamma +874T/A polymorphism is associated with susceptibility to active pulmonary tuberculosis development in Tunisian patients. *DNA and Cell Biology*, v. 30, n. 6, p. 379-387. 2011.

BERTOLLI FILHO, C. História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950 [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2001. 248p.

BHANO THU, V.; ROZATI, R.; THEOPHILUS, J. Prevalence and Polymorphism in Interferon- $\gamma$  Gene (CA) Repeats with Different Stages of Endometriosis. *American Journal of Medical and Biological Research*, v. 1, n. 1, p. 1-5. 2013.

BLACKADER, A. D., *et al.* Topics of Current Interest: On preventive vaccination of the new-born against tuberculosis by B.C.G. *Canadian Medical Association Journal*, v. 20, n. 2, p. 203. 1929.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas. Tuberculose no mundo, no Brasil e no Amazonas. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico: A situação da tuberculose. n.12, 2012(b).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico Tuberculose. 2012(a).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. p. 265, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília. 2011. 288p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações: 30 anos. 2003. 212p.

BRIMNES, N. BCG vaccination and WHO's global strategy for tuberculosis control 1948–1983. *Social Science & Medicine*, v. 67, n. 5, p. 864-873. 2008.

BUREAU, J. F., *et al.* The gene coding for interferon-gamma is linked to the D12S335 and D12S313 microsatellites and to the MDM2 gene. *Genomics*, v. 28, n. 1, p. 109-112. 1995.

CALMETTE, A. Vaccination with B.C.G. *British Medical Journal*, v. 2, n. 3644, p. 797-798. 1930.

CAMBAL, E.; DRANCOURT, M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 3, p. 196-201. 2014.

CAMPOS, R; PIAN TA, C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul – Brasil. Boletim da saúde. v. 15, n. 1, p. 61-71. 2001.

CARNAUD, C. *et al.* Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells. *The Journal of Immunology*, v. 163, p. 4647-4650. 1999.

CDC: Centers For Disease Control And Prevention-U.S. Department of Health and Human Services. Guidelines for Preventing the Transmission of Mycobacterium tuberculosis in Health-Care Settings. v. 54, n. RR-17. 2005.

CHANG, H., *et al.* Association of the interferon-gamma single nucleotide polymorphism +874(T/A) with response to immunosuppressive therapy in patients with severe aplastic anemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 45, p. 313-316. 2010.

CHAU, K. Y., *et al.* IFN- $\gamma$  gene expression is controlled by the architectural transcription factor HMGA1. *International Immunology*, v.17, n.3, p.297-306. 2005.

CHEN, M.; GAN, H.; REMOLD, H.G. A Mechanism of Virulence: Virulent Mycobacterium tuberculosis Strain H37Rv, but Not Attenuated H37Ra, Causes Significant Mitochondrial Inner Membrane Disruption in Macrophages Leading to Necrosis. *The Journal of Immunology*, v. 176, p. 3707- 3716. 2006.

CHEN, T., *et al.* Association of single nucleotide polymorphisms in interleukin 12 (IL-12A and -B) with asthma in a Chinese population. *Human Immunology*, v.72, n. 7, p.603-606. 2011.

CHEN, X., *et al.* Interactions of IL-12A and IL-12B polymorphisms on the risk of cervical cancer in Chinese women. *Clinical Cancer Research*, v.15, n.1, p.400-405. 2009.

CHONG, W. P., *et al.* The interferon gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome. *BMC Infectious Diseases*, v. 6, p. 82. 2006.

CICCARONE, V. C., *et al.* Identification of enhancer-like elements in human IFN-gamma genomic DNA. *The Journal of Immunology*, v. 144, n. 2, p. 725-730. 1990.

COOPER, A.M.; SOLACHE, A.; KHADER, S. Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. *Current Opinion in Immunology*, v. 19, p. 441-447. 2007.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, v. 100, n. 11, p. 1862-1870. 2006.

DANIEL, T.M. René Théophile Hyacinthe Laennec and the founding of pulmonary medicine. *The International Journal of Tuberculosis Lung Disease*, v. 8, n. 5, p. 517–518. 2004.

DAVIES, R.P.O, *et al.* Historical declines in tuberculosis in England and Wales: improving social conditions or natural selection. *The International Journal of Tuberculosis Lung Disease*, v. 3, n. 12, p. 1051–1054. 1999.

DE ALBUQUERQUE, A. C., *et al.* Association of polymorphism +874 A/T of interferon-gamma and susceptibility to the development of tuberculosis: meta-analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v.31, n. 11, p.2887-2895. 2012.

- DE MELO, F. A., *et al.* Epidemiological features of multidrug-resistant tuberculosis in a reference service in Sao Paulo city. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 27-34. 2003.
- DHEDA, K., *et al.* The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. *Respirology*, v. 15, n. 3, p. 433-450. 2010.
- DING, S.; LI, L.; ZHU, XIUFANG. Polymorphism of the interferon- $\gamma$  gene and risk of tuberculosis in a southeastern Chinese population. *Human Immunology*, v. 69, p. 129-133. 2008.
- DUCATI, R. G., BASSO, I.A., SANTOS, D.S. Micobactérias. In: Trabulsi, I.R.; Alterthum F. Microbiologia. 5ª edição. São Paulo-SP. Editora Atheneu. 2008.
- DUFFIN J. To see with a better eye. A life of R.T.H. Laennec. 1ª Edição. Princeton-NJ. Editora Princeton University Press. 1998. 456p.
- DUFOUR, C., *et al.* Homozygosis for (12) CA repeats in the first intron of the human IFN- $\gamma$  gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population. *British Journal of Haematology*, v.126, n.5, p.682-685. 2004.
- DWIVEDI, V. P., *et al.* Mycobacterium tuberculosis directs T helper 2 cell differentiation by inducing interleukin-1beta production in dendritic cells. *Journal of Biological Chemistry*, v.287, n.40, p.33656-33663. 2012.
- EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/-classificationmr.html#Mycobacterium>. Acesso em 06/04/2014
- FARRAR, M.A.; SCHREIBER, R.D. The Molecular Cell Biology Of Interferon- $\gamma$  And Its Receptor. *Annual Review Immunology*, v. 11, p. 571-611. 1993.
- FLYNN, J. L. e CHAN, J. What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 98-102. 2005.
- FLYNN, J.L.; CHAN, J. Immune evasion by Mycobacterium tuberculosis: living with the enemy. *Current Opinion in Immunology*, v. 15, n. 4, p. 450-455. 2003.
- FRANCHI, L., *et al.* Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 1-8. 2008.
- FREEMAN, G. J., *et al.* The gene for B7, a costimulatory signal for T-cell activation, maps to chromosomal region 3q13.3-3q21. *Blood*, v.79, n. 2, p.489-494. 1992.
- GEE, K., *et al.* The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflammation & allergy-drug targets*, v.8, n.1, p.40-52. 2009.
- GIACOMINI, E. *et al.* Infection of Human Macrophages and Dendritic Cells with Mycobacterium tuberculosis Induces a Differential Cytokine Gene Expression That Modulates T Cell Response. *The Journal of Immunology*, v.166, n. 12, p. 7033-7041. 2001.

- GIROUX, M. *et al.* IFN- $\gamma$ -Induced MHC Class II Expression: Transactivation of Class II Transactivator Promoter IV by IFN Regulatory Factor-1 is Regulated by Protein Kinase C-  $\alpha$ . *The Journal of Immunology*, v. 171, p.4187-4194. 2003.
- GRAY, P. W., GOEDDEL, D. V. Structure of the human immune interferon gene. *Nature*. v. 298, p. 859-863. 1982.
- GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J. e SHARPE, A. H. The B7 family revisited. *Annual Review of Immunology*, v.23, p.515-548. 2005.
- GROTZKE, J.E.; LEWINSOHN, D.M. Role of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes and Infection*, v. 7, p. 776–788. 2005.
- GUIO, H.; VILAPLANA, C. e CARDONA, P. J. Immunodiagnóstico y biomarcadores en tuberculosis. *Medicina Clínica (Barcelona)*, v.137, n.9, p.408-413. 2011.
- GUNSTEN, S., *et al.* IL-12 p80-dependent macrophage recruitment primes the host for increased survival following a lethal respiratory viral infection. *Immunology*, v.126, n.4, p.500-513. 2009.
- GUPTA, A., *et al.* Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*, v. 217, n. 3, p. 363-374. 2012.
- GUTIERREZ, M.C., *et al.* Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathogens*, v. 1, n. 1, p. 55-61. 2005.
- HALMA, M. A., *et al.* Interferon-gamma polymorphisms correlate with duration of survival in pancreatic cancer. *Human Immunology*, v.65, n.11, p.1405-1408. 2004.
- HANDA, T., *et al.* Polymorphisms of B7 (*CD80* and *CD86*) genes do not affect disease susceptibility to sarcoidosis. *Respiration*, v. 72, n. 3, p. 243-248. 2005.
- HARALAMBIEVA, I. H., *et al.* Associations between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in cytokine and cytokine receptor genes and immunity to measles vaccination. *Vaccine*, v.29, n. 45, p.7883-7895. 2011.
- HASHEMI, M., *et al.* Association of interferon- $\gamma$  +874 T/A polymorphism with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in Zahedan, southeast of Iran. *Clinical Biochemistry*, v. 44, n. 13, p. S274. 2011a.
- HASHEMI, M., *et al.* Functional Polymorphism of Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) Gene +874T/A Polymorphism is Associated with Pulmonary Tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. *Prague Medical Report*, n. 112, n. 1, p. 38-43. 2011b.
- HEINEMEYER, T., *et al.* Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Research*, v. 26, n. 1, p. 362-367. 1998.
- HENAO, M. I., *et al.* Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, v.86, n.1, p.11-19. 2006.

- HERMANS, P.W.M., *et al.* Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, v. 28, n. 9, p. 2051-2058. 1990.
- HUANG, D.; CANCELLA M.R e MORAHAN, G. Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. *Genes and Immunity*, v. 1, p. 515–520. 2000.
- HUANG, Y., *et al.* A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 104, n. 3, p. 985-990. 2007.
- HUMPHREYS, I. R., *et al.* A role for dendritic cells in the dissemination of mycobacterial infection. *Microbes Infectant*, v. 8, n. 5, p.1339-1346. 2006.
- IGLESIAS, B. M., *et al.* Analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands in cultured mouse microglia: upregulation by interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide and downregulation by interleukin-10, prostaglandin E2 and cyclic AMP-elevating agents. *Journal of Neuroimmunology*, v.72, n.1, p.83-93. 1997.
- INGEN, J.V., *et al.* Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. *Emerging Infectious Diseases journal*, v. 18, n. 4, p. 653-655. 2012.
- JASKULA, E., *et al.* Interferon Gamma 13-CA-Repeat Homozygous Genotype and a Low Proportion of CD4+ Lymphocytes Are Independent Risk Factors for Cytomegalovirus Reactivation with a High Number of Copies in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v.15, n.10, p.1296-1305. 2009.
- JELLIS, C.L., *et al.* Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (*CD86*). *Immunogenetics*, v.42, n. 2, p. 85-89. 1995.
- JO, E. K. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.21, n. 3, p.279-286. 2008.
- JO, E. K., *et al.* Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cell Microbiology*, v.9, n. 5, p.1087-1098. 2007.
- JOSHI, N.S.; KAECH, S.M. Effector CD8 T Cell Development: A Balancing Act between Memory Cell Potential and Terminal Differentiation. *The Journal of Immunology*, v. 180, p. 1309-1315. 2008.
- JURADO, J. O., *et al.* IL-17 and IFN- $\gamma$  expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 91, n. 6, p. 991-1002. 2012.
- KAARVATN, M. H., *et al.* Single nucleotide polymorphism in the interleukin 12B gene is associated with risk for breast cancer development. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.76, n. 3, p.329-335. 2012.

- KAMALI-SARVESTANI, E.; MERAT, A. e TALEI, A. R. Polymorphism in the genes of alpha and beta tumor necrosis factors (TNF-alpha and TNF-beta) and gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) among Iranian women with breast cancer. *Cancer Letters*, v.223, n.1, p.113-119. 2005.
- KHAN, R. The Social Determinants of Multidrug Resistant Tuberculosis in the United States Between 2005 and 2009. *Georgia State University:Institute of Public Health*. 2013.
- KHANI-HANJANI, A., *et al.* Association between dinucleotide repeat in non-coding region of interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v.356, n.9232, p.820-825. 2000.
- KIM, H. S., *et al.* Association of HLA-DR and HLA-DQ genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Koreans: preliminary evidence of associations with drug resistance, disease severity, and disease recurrence. *Human Immunology*, v. 66, n. 10, p. 1074-1081. 2005.
- KOLLA, V. K., *et al.* Association of tumor necrosis factor alpha, interferon gamma and interleukin 10 gene polymorphisms with peripheral neuropathy in South Indian patients with type 2 diabetes. *Cytokine*, v.47, n.3, p.173-177. 2009.
- LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L. e BLUESTONE, J. A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual Review Immunology*, v.14, p.233-258. 1996.
- LIAO, W. L., *et al.* The Association between Polymorphisms of B7 Molecules (CD80 and CD86) and Graves' Ophthalmopathy in a Taiwanese Population. *The American Academy of Ophthalmology*, v. 118, n. 3, p. 553-557. 2011
- LIM, H. X., *et al.* Principal role of IL-12p40 in the decreased Th1 and Th17 responses driven by dendritic cells of mice lacking IL-12 and IL-18. *Cytokine*, v. 63, n. 2, p. 179-186. 2013.
- LIO, D., *et al.* TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-10 gene polymorphisms in a sample of Sicilian patients with coeliac disease. *Digestive and Liver Disease*, v. 37, p. 756-760. 2005.
- LIU, F., *et al.* IFN- $\gamma$  +874 A/T polymorphism and cancer risk: an updated analysis based on 32 case-control studies. *Cytokine*, v.56, n.2, p.200-207. 2011.
- LIU, G., *et al.* Association between IL12B polymorphisms and tuberculosis risk: A meta-analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 21, p. 401-40, 2014.
- LIU, P.T. e MODLIN, R.L. Human macrophage host defense against Mycobacterium tuberculosis. *Current Opinion in Immunology*, v. 20, n. 4, p. 371-376. 2008.
- LIU, S., *et al.* IL-8 -251T/A and IL-12B 1188A/C polymorphisms are associated with gout in a Chinese male population. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, v.42, n.2, p. 150-158. 2013.
- LIU, Y., *et al.* CTLA4 and CD86 gene polymorphisms and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Human Immunology*, v. 71, n. 11, p. 1141-1146, 2010.

- LÓPEZ-MADERUELO, D., *et al.* Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 167, n. 7, p. 970-975. 2003.
- LOWE, D. M., *et al.* Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends Immunology*, v. 33, n. 1, p. 14-25. 2012.
- MACIEL, M.S., *et al.* A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria. *Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, v. 10, n. 3, p. 226-230. 2012.
- MANZOTTI, C. N., *et al.* Integration of CD28 and CTLA-4 function results in differential responses of T cells to CD80 and CD86. *European Journal of Immunology*, v.36, n.6, p.1413-1422. 2006.
- MARIN, L. A., *et al.* Evaluation of *CD86* gene polymorphism at +1057 position in liver transplant recipients. *Transplant Immunology*, v.15, n.1, p.69-74. 2005.
- MARTINO, A., *et al.* Mycobacteria and dendritic cell differentiation: escape or control of immunity. *Immunology Letters*, v. 102, n. 1, p. 115-117. 2006.
- MATSUSHITA, M., *et al.* New polymorphisms of human *CD80* and *CD86*: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Genes & Immunity*, v. 1, n. 7, p. 428-434. 2000.
- MIGLIORI, I. K. Uso de RNA de interferência (siRNA) para modulação da expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 em células dendríticas *Biblioteca Digital – USP*, 2010.
- MORAHAN, G., *et al.* Evaluation of *IL12B* as a candidate type I diabetes susceptibility gene using data from the Type I Diabetes Genetics Consortium. *Genes & Immunity*, v. 10, n. 1, p. 64-68. 2009.
- MORRIS, G. A., *et al.* Interleukin 12B (IL12B) genetic variation and pulmonary tuberculosis: a study of cohorts from The Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina. *PLoS ONE*, v.6, n.2, p.e16656. 2011.
- MORTAZ, E., *et al.* New Aspects in Immunopathology of Mycobacterium tuberculosis. *International Scholarly Research Network: Immunology*. v. 2012, 2012.
- MOSAAD, Y. M., *et al.* Interferon-gamma +874 T/A and interleukin-10 -1082 A/G single nucleotide polymorphism in Egyptian children with tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.72, n. 4, p.358-364. 2010.
- NAIR, R. P., *et al.* Polymorphisms of the *IL12B* and *IL23R* genes are associated with psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, v.128, n.7, p.1653-1661. 2008.
- NAYLOR, S.L., *et al.* Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 27, p. 1020-1027. 1983.

NCBI. Gene *CD86*. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541777>. Acesso em 05.02.2013(c).

NCBI. *Mycobacterium tuberculosis*: taxonomy. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1773&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. Acesso em 05.02.2013(a).

NCBI: P01579 (*IFNG\_HUMAN*). UniProtKB/Swiss-Prot. Versão 155. Disponível em <http://www.uniprot.org/uniprot/P01579>. Acesso em 05.02.2013(b).

O'GARRA, A., *et al.* The Immune Response in Tuberculosis. *The Annual Review of Immunology*, v. 31, p. 475-527, 2013.

OHMAN, H., *et al.* Effect of *IL12A* and *IL12B* polymorphisms on the risk of *Chlamydia trachomatis*-induced tubal factor infertility and disease severity. *Human Reproduction*, v.27, n.7, p.2217-2223. 2012.

PACHECO, A. G.; CARDOSO, C. C. e MORAES, M. O. *IFNG* +874T/A, *IL10* -1082G/A and *TNF* -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Human Genetics*, v. 123, n. 5, p.477-484. 2008.

PALMER, C.E.; BATES, L.E. Tuberculin sensitivity of tuberculosis patients. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 7, p. 171-88. 1952.

PAN, X.M. *et al.* *CD86*+*1057* G/A Polymorphism and the Risk of Colorectal Cancer. *DNA and Cell Biology*, v. 29, n. 7, p. 381-386. 2010.

PANDOLFI, J.R. *et al.* Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n. 3, p. 251-257. 2007.

PARK, I. K.; LETTERIO, J. J. e GORHAM, J. D. TGF-beta 1 inhibition of IFN- $\gamma$ -induced signaling and Th1 gene expression in CD4+ T cells is Smad3 independent but MAP kinase dependent. *Molecular Immunology*, v.44, n.13, p.3283-3290. 2007.

PERESI, E. *et al.* Cytokine Polymorphisms, Their Influence and Levels in Brazilian Patients with Pulmonary Tuberculosis during Antituberculosis Treatment. *Tuberculosis Research and Treatment*, v. 2013, p. 1-13. 2013.

PICARD, C., *et al.* Inherited interleukin-12 deficiency: *IL12B* genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *The American Journal of Human Genetics*, v. 70, n. 2, p. 336-348. 2002.

PILLER, R.V.B. Epidemiologia da tuberculose. *Pulmão RJ*. v. 21, n. 1, p. 4-9. 2012.

POCIOT, F., *et al.* Analysis of an Interferon- $\gamma$  Gene (*IFNG*) Polymorphism in Danish and Finnish Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) Patients and Control Subjects. *Journal of interferon and cytokine research*, v. 17, p. 87-93, 1997.

POIRIER, V.; AV-GAY, Y. *Mycobacterium tuberculosis* modulators of the macrophage's cellular events. *Microbes and Infection*, v. 14, n. 13, p. 1211-1219. 2012.

- PRAVICA, V., *et al.* A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- $\gamma$  gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- $\gamma$  production. *Human Immunology*, v.61, n.9, p.863-866. 2000.
- PRAVICA, V., *et al.* In vitro production of IFN- $\gamma$  correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- $\gamma$  gene. *European Journal of Immunogenetics*, v.26, n. 1, p.1-3. 1999.
- QIDWAI, T.; JAMAL, F. e KHAN, M. Y. DNA sequence variation and regulation of genes involved in pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.75, n.6, p.568-587. 2012.
- QUESNIAUX, V., *et al.* Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infection*, v. 6, n. 10, p. 946-959. 2004.
- RAJA, A. Immunology of tuberculosis. *Indian Journal of Medical Research*, v. 120 p. 213–32. 2004.
- RAVIGLIONE, M.C.; O'BRIEN, R.J. Doenças Micobacterianas. In: Fauci, A.S.*et al.* Harrison Medicina Interna, 17ª edição, Rio de Janeiro-RJ, Editora McGraw-Hill Internacional do Brasil, 2008.
- REEVES, R. H., *et al.* The costimulatory genes *CD80* and *CD86* are linked on mouse chromosome 16 and human chromosome 3. *Mammalian Genome*, v. 8, n. 8, p. 581-582. 1997.
- REYNARD, M.P., *et al.* Allele frequencies for an interferon- $\gamma$  microsatellite in a population of Brazilian leprosy patients. *European Journal of Immunogenetics*, v. 30, p. 149-151. 2003.
- ROBERTS, C.A; BUIKSTRA, J.E. The bioarchaeology of tuberculosis. A global view on a reemerging disease. 1ª Edição. Gainesville- FL. Editora University of Florida Press. 2003. 368p.
- ROHDE, K. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunological Reviews*, v. 219, p.37–54. 2007.
- ROSEMBERG, J. Tuberculose - Aspectos Históricos, Realidades, seu Romantismo e Transculturização. *Boletim de pneumologia sanitária*, v. 7, n. 2, p.5-29, 1999.
- ROSSOUW, M., *et al.* Association between tuberculosis and a polymorphic NF $\kappa$ B binding site in the interferon  $\gamma$  gene. *The Lancet*, v.361, n.9372, p.1871-1872. 2003.
- RUFFINO-NETTO, A. e DE SOUZA, A. M. Evolution of the health sector and tuberculosis control in Brazil. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 9, n. 5, p. 306-310. 2001.
- RUIZ-LINARES, A. Dinucleotide repeat polymorphism in the interferon-gamma (IFNG) gene. *Human Molecular Genetics*, v. 2, n. 9, p. 1508. 1993.
- RUSSELL, D. G. The evolutionary pressures that have molded *Mycobacterium tuberculosis* into an infectious adjuvant. *Current Opinion in Microbiology*, v. 16, n.1, p.78-84. 2013.

- SAHIRATMADJA, E., *et al.* Association of polymorphisms in IL-12/IFN- $\gamma$  pathway genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Indonesia. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, v. 87, n. 4, p. 303-311. 2007.
- SAKULA, A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax*, v. 37, p. 246-251. 1982.
- SALEM, J. I.; CARVALHO, C. M.; OGUSKU, M. M.; *et al.* PKO – Alternative method for isolating mycobacterium from sputum. *Acta Amazônica*, v. 37, n. 3, p. 419-424. 2007.
- SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. *Current Opinion in Immunology*, v. 17, p. 374–380, 2005.
- SALLAKCI, N., *et al.* Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis*, v. 87, n. 3, p.225-230. 2007.
- SANGER, F., *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* v. 74, n. 12, p. 5463-7, 1977.
- SAVAN, R., *et al.* Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v.20, n. 2, p.115-124. 2009.
- SCHIERLOH, P., *et al.* Mycobacterium tuberculosis-induced gamma interferon production by natural killer cells requires cross talk with antigen-presenting cells involving Toll-like receptors 2 and 4 and the mannose receptor in tuberculous pleurisy. *Infection Immunity*, v. 75, n. 11, p. 5325-5337. 2007.
- SCHOENBORN, J.R. e WILSON, C.B. Regulation of Interferon- $\gamma$  During Innate and Adaptive Immune Responses. *Advances in Immunology*, v. 96, p. 41–101. 2007.
- SCHRODER, K., *et al.* Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, v.75, n. 2, p.163-189. 2004.
- SEEGERS, D., *et al.* A TaqI polymorphism in the 3'UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. *Genes & Immunity*, v. 3, n. 7, p. 419-423. 2002.
- SELVAKUMAR A. *et al.* Genomic organization and chromosomal location of the human gene encoding the B-lymphocyte activation antigen B7. *Immunogenetics*, v. 36, n. 3, p. 175-181. 1992.
- SELVARAJ, P., *et al.* Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Cytokine*, v.43, n. 1, p.26-33. 2008.
- SERGEJEVA, S., *et al.* Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 33, n. 3, p. 248-253. 2005.

- SHALER, C. R., *et al.* Understanding delayed T-cell priming, lung recruitment, and airway luminal T-cell responses in host defense against pulmonary tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2012, p. 628-293. 2012.
- SHIBASAKI, M., *et al.* An influence of Interferon-gamma gene polymorphisms on treatment response to tuberculosis in Japanese population. *The Journal of Infection*, v. 58, n. 6, p.467-469. 2009.
- SICA, A., *et al.* The c-rel protooncogene product c-Rel but not NF- $\kappa$ B binds to the intronic region of the human interferon- $\gamma$  gene at a site related to an interferon-stimulable response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. v. 89, p. 1740-1744. 1992.
- SICA, A., *et al.* Interaction of NF- $\kappa$ B and NFAT with the Interferon- $\gamma$  Promoter. *The Journal Of Biological Chemistry*, v. 272, n.48, p. 30412-30420. 1997.
- SILVA, G. A., *et al.* IFN- $\gamma$  +875 microsatellite polymorphism as a potential protection marker for leprosy patients from Amazonas state, Brazil. *Cytokine*, v. 60, n. 2, p. 493-497. 2012.
- SINAN-AM. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Policlínica Cardoso Fontes. Setor de Estatística. 03.06.2013.
- SMITH, J. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 3, p. 463-496, 2003.
- STENGER, S.; MODLIN, R.L. T cell mediated immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Current Opinion in Microbiology*, v. 2, p. 89-93. 1999.
- SUN, L., *et al.* The promoter region of interferon-gamma is hypermethylated in neonatal foals and its demethylation is associated with increased gene expression. *Developmental & Comparative Immunology*, v.39, n.3, p.273-278. 2013.
- TAILLEUX, L., *et al.* DC-SIGN Is the Major Mycobacterium tuberculosis Receptor on Human Dendritic Cells. *Journal of Experimental Medicine*, v. 197, n. 1, p. 121-127. 2002.
- TAKEUCHI, O. e AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 805-820. 2010.
- TAYA, Y., *et al.* Cloning and structure of the human immune interferon-gamma chromosomal gene. *The EMBO Journal*, v.1, n.8, p.953-958. 1982.
- TIAN, C., *et al.* The +874T/A polymorphism in the interferon-gamma gene and tuberculosis risk: an update by meta-analysis. *Human Immunology*, v.72, n.11, p.1137-1142. 2011.
- TORRADO, E. e COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Reviews*, v. 21, n. 6, p. 455-462. 2010.
- TORRADO, E.; ROBINSON, R. T. e COOPER, A. M. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends Immunology*, v. 32, n. 2, p. 66-72. 2011.

TSO, H.W., *et al.* Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. *Genes & Immunity*, v.6, n.4, p.358-363. 2005.

TSO, H.W., *et al.* Associations between *IL12B* Polymorphisms and Tuberculosis in the Hong Kong Chinese Population. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 190, p. 913–919. 2004.

VALLINOTO, A.C., *et al.* *IFNG* +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection and clinical manifestation of tuberculosis. *Human Immunology*, v. 71, n. 7, p. 692-696. 2010.

VAN EMBDEN, J.D.A., *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 406-409. 1993.

VAN VEEN, T., *et al.* Interleukin-12p40 Genotype Plays a Role in the Susceptibility to Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology*, v. 50, n. 2, p. 275. 2001

WANG, J., *et al.* CD86 +1057G/A Polymorphism and Susceptibility to Ewing's Sarcoma: A Case–Control Study. *DNA and cell biology*, v. 31, n. 4, p. 537-540. 2012.

WANG, J.; TANG, S.; SHEN, H. Association of genetic polymorphisms in the *IL12-IFNG* pathway with susceptibility to and prognosis of pulmonary tuberculosis in a Chinese population. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious*, v.29, n.10, p.1291-1295. 2010.

WANG, S. Y., *et al.* Association analysis of cytokine polymorphisms and plasma level in Northern Chinese Han patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Chinese Medical Journal (English Edition)*, v.125, n.9, p.1576-1580. 2012.

WANG, W., *et al.* CD86 +1057G/A Polymorphism and Susceptibility to Osteosarcoma. *DNA and cell biology*, v. 30, n. 11, p. 925–929. 2011.

WHITE, G.P., *et al.* Differential patterns of methylation of the IFN- $\gamma$  promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN- $\gamma$  gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells. *Journal of Immunology*, v. 168, n. 6, p. 2820-2827. 2002.

WHO REPORT 2011. Global Tuberculosis Control. disponível em:  
[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2011/gtbr11\\_full.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf) Acesso: 21 nov. 2011.

WHO REPORT 2013. Global Tuberculosis Control. Disponível em:  
[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/). Acesso em: 01/03/2014.

WHO. Expert Committee on Tuberculosis. Ninth Report. World Health Organization Technical Report Series n. 552, Geneva, 1974.

WHO. Global Tuberculosis Control 2012. disponível em:  
[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/gtbr12\\_main.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr12_main.pdf) Acesso em 09.02.2013.

WONG, R. H., *et al.* Association of IL-12B genetic polymorphism with the susceptibility and disease severity of ankylosing spondylitis. *The Journal of Rheumatology*, v.39, n.1, p.135-140. 2012.

WOODWORTH, J.S.M.; BEHAR, S.M. Mycobacterium tuberculosis specific CD8+ T cells and their role in immunity. *Critical Reviews in Immunology*, v. 26, n.4, p. 317-352. 2006.

XIANG, H., *et al.* CD86 gene variants and susceptibility to pancreatic cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v.138, n.12, p.2061-2067. 2012.

YATES, A.; CALLARD, R. e STARK, J. Combining cytokine signalling with T-bet and GATA-3 regulation in Th1 and Th2 differentiation: a model for cellular decision-making. *Journal of Theoretical Biology*, v. 231, n.2, p.181-196. 2004.

YILMAZ, V.; YENTUR, S.P.; SARUHAN-DIRESKENELI, G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine*, v. 30, n. 4, p. 188-194. 2005.

YOKOUCHI, Y., *et al.* Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in Japanese families. *Genomics*, v.66, n. 2, p.152-160. 2000.

YOUNG, H.A.; HARDY, K.J. Role of interleron- $\gamma$  in immune cell regulation. *Journal of Letikocyte Biology*, v. 58, p. 373-381. 1995.

ZUNIGA, J., *et al.* Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, v.2012, p.193-923. 2012.

## RECURSOS FINANCEIROS

Os recursos para o desenvolvimento desse projeto foram providos pelo projeto UNIVERSAL AMAZONAS/FAPEAM, sob título “Avaliação da influência dos polimorfismos dos genes *TLR* sobre o perfil da resposta imune nos pacientes com TB pulmonar”, coordenado pela profa. Dra. Aya Sadahiro.

<b>Identificação do orçamento</b>	<b>Valor</b>
Materiais para uso nos exames bacteriológicos	R\$ 3. 010,00
Materiais para uso nos ensaios genéticos	R\$ 10.215,00
Materiais para uso nos ensaios imunológicos	R\$ 5.500,00
Material para impressão	R\$ 440,00
<b>Total</b>	<b>R\$ 19.165,00</b>

## EQUIPE CIENTÍFICA

<b>Nome</b>	<b>Formação</b>	<b>Instituição</b>	<b>Função no Projeto</b>
Cláudia Maria de Melo Silva	Farmacêutica Mestranda do PPGCF	UFAM	Coordenar e executar o projeto
Aya Sadahiro	Farmacêutica Bioquímica e Doutora em Microbiologia	UFAM	Orientadora
Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes	Médico e Doutor em Biotecnologia	UFAM	Coorientador
Mauricio Morishi Ogusku	Farmacêutico e Doutor em Biotecnologia	INPA	Colaborador nos ensaios de Biologia Molecular
Irineide Assumpção Antunes	Médica e Mestre em Ciências da Saúde	Cardoso Fontes-SUSAM	Assessorar na seleção dos pacientes de TB e seus contatos
Raphaela Honorato Barletta Naveca	Bióloga e mestranda do GCBEv-INPA	INPA	Colaboradora na parte dos ensaios de imunogenotipagem
George Allan Villarouco da Silva	Biólogo e mestre em Imunologia	Fiocruz-AM ILMD	Colaborador na parte dos ensaios de genotipagem de <i>IFNG</i> e <i>IL12B</i>
Maísa Porto dos Santos	Bióloga e mestre em Imunologia	FUAM	Colaborador nos ensaios de genotipagem de <i>CD80</i> e <i>CD86</i>

UFAM: Universidade Federal do Amazonas

INPA: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

SUSAM – Secretaria de Estado da Saúde

Fiocruz-AM ILMD – Instituto Leônidas e Maria Deane

FUAM – Fundação Alfredo da Matta

## APÊNDICES

A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

B - Procedimento Operacional Padrão (POP) – Coleta de escarro.

C - Procedimento Operacional Padrão (POP) – Coleta de amostra de sangue.

D – Protocolo de quantificação de IFN- $\gamma$ .

E – Protocolo de purificação dos produtos de PCR.



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

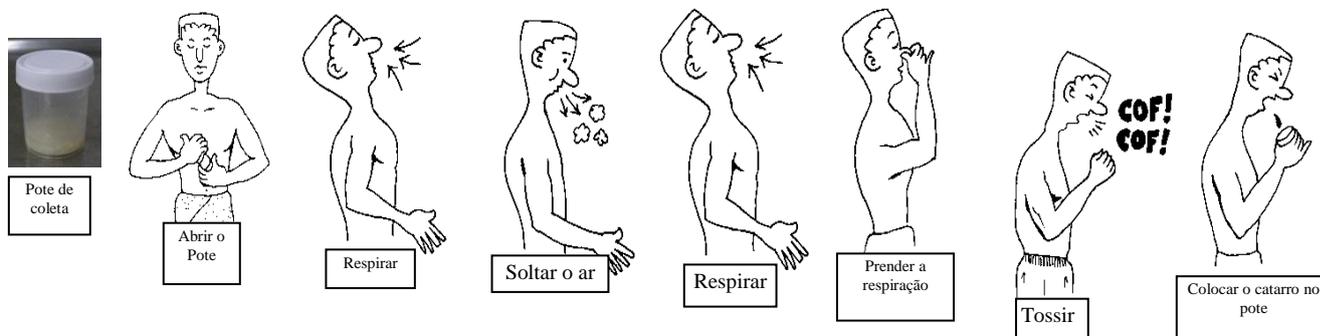


Termo de consentimento livre e esclarecido

Nº de registro: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado para participar como voluntário do projeto de pesquisa “Avaliação dos polimorfismos genéticos e associação com a produção da citocina IFN- $\gamma$ ”. Sua participação neste estudo é muito importante, pois poderá ajudar os médicos, e os demais profissionais da área de saúde, a conhecerem melhor o que acontece nas pessoas que estão com Tuberculose. A pesquisa do IFN- $\gamma$  será realizada em pacientes, pessoas que convivem com esses pacientes e também pessoas que não tem contato com esses pacientes. Será necessário fazer um teste de sangue e um de escarro:

1. **Sangue:** será verificado se a quantidade de IFN- $\gamma$  produzido é diferente nas pessoas que estão com a Tuberculose que nas pessoas que não estão com a doença. Um técnico irá coletar aproximadamente 5 ml do seu sangue em tubos para este exame. Durante a coleta de sangue, você poderá sentir um pouco de desconforto na hora que a agulha for colocada no seu braço, mas não trará risco a sua saúde, pois todos os materiais utilizados serão limpos e descartáveis, não apresentando qualquer risco de contaminação. No local onde foi coletado o sangue poderá ou não aparecer pequenas manchas vermelhas ou roxas, que sumirão em poucos dias.
2. **Escarro:** será verificado se você tem ou não o bacilo que causa a tuberculose. Você coletará um pouco do seu escarro (catarro) em um frasco, não dói e nem prejudica a saúde. Veja como fazer:



Após colocar o escarro no pote, você deverá fechá-lo bem. Neste escarro serão realizados os exames de Baciloscopia e Cultivo.

Você não receberá nenhum dinheiro ou ajuda financeira ao participar deste estudo. Você também poderá retirar o seu consentimento em qualquer fase desta pesquisa, independente do motivo, sem nenhum prejuízo. Os resultados desta pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Se você quiser saber mais detalhes e os resultados desta pesquisa basta se dirigir ao Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) que fica na Avenida André Araújo, 2936, bairro Aleixo, Manaus-AM ou telefonar para (92) 3643-3216. Ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM, na Rua Teresina, 495, Adrianópolis, Manaus-AM, telefone (92) 3305-5130. Solicitamos sua

autorização para que a sua amostra seja armazenada no nosso laboratório até o término deste estudo.

Pesquisador responsável: Cláudia Maria de Melo Silva

Pesquisadores participantes: Aya Sadahiro (Instituto de Ciências Biológicas -UFAM) e Maurício Ogusku (Laboratório de Micobacteriologia-INPA)

### Consentimento Pós-Informação

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, telefone: \_\_\_\_\_ fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

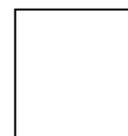
.....

Assinatura do participante

...../...../.....

Data

Impressão do polegar,  
caso o paciente não  
saiba escrever seu nome



\_\_\_\_\_  
Nome legível do profissional que conversou com o participante

Data: ...../...../.....

## APÊNDICE B

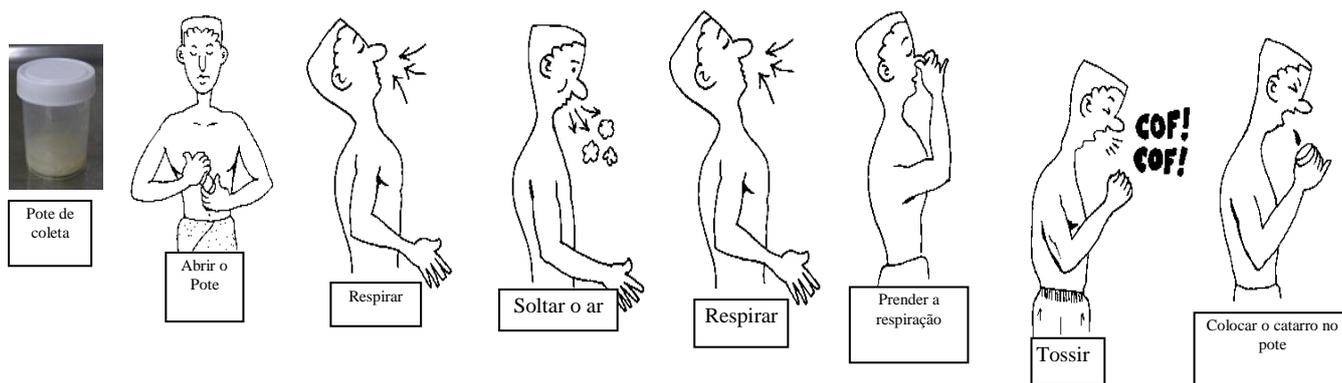
	<b>Laboratório de Micobacteriologia</b> <b>Policlínica Cardoso Fontes</b>	
	<b>Procedimento para coleta de escarro</b>	

### a) EQUIPAMENTOS/MATERIAIS

- Pote plástico descartável transparente com tampa de rosca e boca larga;
- Luvas de procedimento
- Caixa de isopor
- Saco plástico
- Caneta para identificação do pote
- Máscara de proteção contra *Mycobacterium sp.*

### b) ATIVIDADES

- Apresentar-se ao paciente e explicar sobre o projeto a ser estudado, mostrando-lhe o TCLE;
- Peça a colaboração do paciente para que forneça uma boa amostra de escarro, isto é, que contenha catarro que provém da árvore brônquica e não por aspiração de secreções nasais e nem tampouco a que contém somente saliva. Na impossibilidade de obter uma amostra adequada, não desprezar a saliva, e enviá-la para o laboratório;
- Identificar o pote com nome do paciente e a data da coleta;
- Orientar o paciente sobre como deve proceder para colher o escarro, mostrando-lhe o seguinte esquema:



- Pedir para que repita mais duas vezes esta ação no mesmo pote.
- Encaminhar o paciente para coleta.
- Entregar o pote ao paciente e indicar o local para coleta (local arejado onde não haja outras pessoas).
- Explicar que ao terminar a coleta, o paciente deve fechar o pote e limpá-lo com papel toalha.
- Pedir para o paciente lavar as mãos com água e sabão;

- Pedir para que o paciente coloque o pote no saco plástico e entregue a amostra.

**c) PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA**

- Usar os EPI's (Luvas, Jaleco, Óculos, Sapato Fechado)
- Tomar cuidado ao manusear as amostras, evitando o contato direto com as mesmas.

**d) REFERÊNCIAS**

- MOURA, R. A. Técnicas de Laboratório, 3ª Ed., Atheneu, 2008.
- Orientação sobre coleta de amostra de escarro - NOTA TÉCNICA CONJUNTA 04/08 - DIVE/LACEN

<b>ELABORADOR/EMISSOR</b>	<b>REVISOR</b>
<b>Nome:</b> Cláudia Maria de Melo Silva <b>Visto/Data:</b> 07.06.2012	<b>Nome:</b> <b>Visto/Data:</b>

## APÊNDICE C

 <b>UFAM</b>	<b>Laboratório de Micobacteriologia</b> <b>Policlínica Cardoso Fontes</b> <hr/> <b>Procedimento para coleta de sangue</b>	 <b>INPA</b> <small>INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA</small>
--	---	--

### a) EQUIPAMENTOS/MATERIAIS

- Seringa de 5 ml e Agulha;
- Solução de Álcool a 70%;
- Gaze ou Algodão;
- Garrote – liga elástica;
- Tubos coletores para Quantiferon e com EDTA;
- Lápis ou pincel para marcação dos tubos;
- Grades para tubos;
- Descarte de agulhas e seringas;
- Luvas de procedimento;
- Máscara de proteção contra *Mycobacterium sp.*

### b) ATIVIDADES

1. Cumprimentar o paciente e explicar o procedimento;
2. Preparar o paciente: sentá-lo em uma cadeira confortável e com apoio para os braços;
3. Identificar os tubos de coletas com o nome do paciente e nº da ficha;
4. Posicionar o braço de maneira que as veias fiquem mais acessíveis e o paciente o mais confortável possível. O cotovelo não deve estar dobrado e a palma da mão voltada para cima;
5. Garrotear e Analisar o melhor ponto de coleta. Retirar o garrote;
6. Colocar luvas;
7. Fazer antissepsia do local da punção; Primeiro, do centro do local de perfuração para fora, em sentido espiral e após, de baixo para cima, forçando uma vascularização local com gaze estéril (ou algodão) e Álcool a 70%;
8. Esperar secar;
9. Não tocar o local depois de limpo;
10. Garrotear novamente acima da Curva do Cotovelo;
11. Instruir o paciente a abrir e fechar várias vezes o punho (Não deixar o braço garroteado por mais de 2 minutos);
12. Puncionar a veia e com a seringa puxe o êmbolo lentamente, à medida que o sangue estiver preenchendo o espaço, aproximadamente 5 ml de sangue que devem ser coletados;
13. Soltar o garrote;
14. Retirar a agulha da veia;

15. Orientar ao paciente para Exercer pressão no local, por 1 a 2 minutos, evitando assim a formação de hematomas e sangramentos;
16. Descartar a agulha em recipiente para material perfurocortante;
17. Abrir a tampa do 1° tubo e deixar que o sangue escorra pela sua parede devagar para evitar hemólise;
18. Fechar o tubo e homogeneizar, invertendo-o suavemente de 5 a 10 vezes;
19. Abrir o 2° tubo e assim sucessivamente até o último tubo;
20. Deve-se seguir a seguinte ordem dos tubos de coleta: NIL, Antígeno, Mitógeno e tubo roxo com anticoagulante EDTA;
21. Ao final, descartar a seringa no recipiente para materiais perfurocortantes;
22. Colocar o *stopper* no paciente e informá-lo para **não dobrar o braço**
23. Guardar os tubos de coleta em local apropriado.

#### c) PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA

- Usar os EPI's (Luvas, Jaleco, Óculos, Sapato Fechado).
- Tomar cuidado ao manusear material perfurocortante.
- Tomar cuidado ao manusear as amostras, evitando o contato direto com as mesmas.

#### d) REFERÊNCIAS

- MOURA, R. A. Técnicas de Laboratório, 3ª Ed., Atheneu, 2008.
- Vacuette do Brasil. Guia prático para coleta de sangue, 2011

ELABORADOR/EMISSOR	REVISOR
<b>Nome:</b> Cláudia Maria de Melo Silva <b>Visto/Data:</b>	<b>Nome:</b> <b>Visto/Data:</b>

## APÊNDICE D

 <b>UFAM</b>	<b>Laboratório de Micobacteriologia</b> <b>Policlínica Cardoso Fontes</b> <b>Protocolo para quantificação de IFN-<math>\gamma</math></b>	 <b>INPA</b> <small>INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA</small>
--	--	--

1. Elaborar o espelho da placa de 96 poços, distribuindo as amostras no sentido vertical ou horizontal, na sequência Nil (sem estímulos), Ag (com estímulos) e M (com estímulo inespecífico). Separar as amostras sempre um dia antes do ensaio de ELISA. Para cada placa poderão ser testados 26 pacientes e/ou controles, sendo que cada indivíduo deverá ter 3 amostras (Nil, Ag e M) que ocuparão 78 poços e 16 poços deverão ser destinados para os padrões de IFN- $\gamma$ , 2 poços ficarão sem amostras.
2. Os padrões deverão ser diluídos de forma seriada e em duplicata. Os tubos deverão ser identificados de S1 a S8, sendo que o S8 é o branco.
3. Antes de iniciar o procedimento, limpar a bancada com álcool a 70% e organizar o material necessário.
4. Colocar as amostras de acordo com o espelho elaborado.
5. Pegar o kit QuantiFERON®-TB Gold e deixar a temperatura ambiente (22°C±5) por pelo menos 1 hora antes de iniciar o teste, com excessão do conjugado e padrão.

- **Preparo do padrão**

6. Separar 8 tubos de polipropileno de 1,5mL que deverão ser identificados de S1 a S8.
7. Adicionar no tubo S1 o volume de 300 $\mu$ L do padrão reconstituído, que corresponde a 8,0UI/mL de IFN- $\gamma$ .
8. Adicionar, a partir do S2, 150  $\mu$ L de diluente verde em cada tubo
9. Retirar do tubo S1, 150  $\mu$ L do padrão e passar para o tubo S2, realizando este procedimento até o tubo S7.
10. O S8 deve ser identificado como Branco.

- **Preparo do conjugado**

11. Em um tubo de polipropileno de 50 mL, adicionar 6mL de diluente verde e mais 60  $\mu$ L do conjugado.
12. Adicionar 50  $\mu$ L da amostra e dos padrões de acordo com espelho da placa
13. Colocar 6 mL do conjugado diluído na canaleta e com uma pipeta multicanal adicionar 50  $\mu$ L do conjugado em cada poço da placa de ELISA.
14. Homogeneizar em shaker de microplacas por 1 minuto a 500 rpm ou mistura cuidadosamente com leves batidas na lateral da placa.
15. Envolver a placa com papel alumínio e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.

- **Preparo do tampão de lavagem**

16. O tampão está concentrado 20x. E o volume necessário será de 250 mL. Em uma proveta graduada de vidro de 250 mL, colocar 12,5 mL do tampão 20x e completar com água destilada para 250 mL, cobrir com parafilme e homogeneizar cuidadosamente.

17. Após o período de incubação, iniciar o procedimento de lavagem.

- **Procedimento de lavagem**

18. Ligar a bomba a vácuo, posicionar a placa no sentido vertical nos poços correspondentes e aspirar as amostras.

19. Colocar o tampão de lavagem na canaleta de plástico e com uma pipeta multicanal adicionar 360  $\mu$ L do tampão de lavagem em cada poço e na sequência aspirar o tampão. Repetir esse procedimento 6 vezes.

20. Após o procedimento de lavagem, secar bem a placa, vertendo-a sobre um papel toalha, para retirar o máximo do tampão.

21. Colocar 11 mL da solução substrato ( $H_2O_2$ ) na canaleta de plástico e com uma pipeta multicanal adicionar em cada poço 100  $\mu$ L do substrato.

22. Agitar cuidadosamente dando leves batidas na lateral da placa, durante 1 minuto.

23. Cobrir a placa com papel alumínio e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.

24. Após incubação, colocar na canaleta de plástico 6 mL da solução stop e adicionar 50  $\mu$ L dessa solução, em cada poço da placa.

25. Agitar cuidadosamente dando leves batidas na lateral da placa durante 1 minuto. Depois deixar em repouso por 5 minutos.

26. Após o repouso, realizar a leitura no espectrofotômetro de microplacas, no comprimento de onda de 450nm.

- **Leitura da microplaca**

27. Ligar o computador e o equipamento em 110 volts. Entrar no programa MPM.6.exe.

28. Apertar o botão verde no espectrofotômetro de microplacas e aguardar até o aparelho soltar a senha.

29. Digitar a senha e clicar “enter”, acionar o botão “open/close”. Inserir a placa e depois apertar “open/close”.

30. Selecionar a pasta LeituraQuantiferon e selecionar o arquivo “template”. No programa, selecionar “read new plate” e ajustar o comprimento de onda para 450nm e selecionar “autosave”. Clicar no ícone “start read”.

31. Após a leitura da placa, imprimir os resultados. Após este procedimento, apertar o botão “open/close” para abrir e retirar a placa. Desligar o equipamento.

<b>ELABORADOR/EMISSOR</b>	<b>REVISOR</b>
<b>Nome:</b> Alessandra Rodrigues da Silva <b>Visto/Data:</b>	<b>Nome:</b> Cláudia Maria de Melo Silva <b>Visto/Data:</b>

## APÊNDICE E

 <b>UFAM</b>	<b>Laboratório de Micobacteriologia</b> <b>Policlínica Cardoso Fontes</b> <b>Protocolo para purificação dos produtos de PCR</b>	 <b>INPA</b> <small>INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA</small>
--	---	--

### Precipitação com Polietilenoglicol (PEG)

A precipitação com o Polietilenoglicol (PEG) atua como método de purificação da PCR com o objetivo de remoção de oligos e nucleotídeos não incorporados na PCR que poderiam interferir na reação na reação de sequenciamento. Apresenta um bom rendimento, podendo utilizar somente 0,5-1 $\mu$ L da amostra na reação de sequenciamento. O método não é recomendado para PCR com bandas inespecíficas ou com primer dimers.

#### Antes do procedimento:

- A- Armazene o etanol 80% a -20°C;
- B- Programe o banho-maria ou banho seco a 37°C.

#### Procedimento:

- 1- Transfira o volume da PCR para o tubo de 1,5mL e adicione PEG (20%);  
(Obs. O volume de PEG adicionado deve ser igual ao volume do produto da PCR).
- 2- Agite suavemente em vórtex por 10 segundos e incube a 37°C por 15 minutos;
- 3- Após a incubação, centrifugue a 2500 rcf por 15 minutos a temperatura ambiente;
- 4- Descarte o sobrenadante e adicione 125 $\mu$ L de etanol 80% gelado e em seguida centrifugue a 1450 rcf por 2 minutos;
- 5- Descarte o sobrenadante e deixe secando a 37°C por 15 minutos para remoção de resíduos de etanol;
- 6- Certifique a ausência de resíduos de etanol e adicione água livre de nuclease, sendo adicionado o mesmo volume inicial da PCR;
- 7- Agite em vórtex por 10 segundos e armazene amostra a -20°C;  
Obs. Antes de armazenar a amostra a -20°C, armazenar a 4-5°C por algumas horas para melhor eluição do DNA.
- 8- Faça a quantificação do DNA em espectrofotômetro.

#### Solução PEG (20% w/v PEG, 2,5M NaCl)

10g de Polietilenoglicol 8000  
 7,3 de NaCl  
 Adicione 35 mL de H<sub>2</sub>O destilada

Agite para solubilizar o PEG durante 20 minutos, ou até que o mesmo encontre-se solúvel. Após, complete o volume para 50 mL com H<sub>2</sub>O destilada.

## **ANEXOS**

A – Formulário para coleta de informações pessoais e quadro clínico (Cadastro de pacientes).

B – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – UFAM.

C – Protocolo de purificação do sequenciamento.



Ministério da  
Ciência e Tecnologia



**CPCS**  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA  
EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**LABORATÓRIO DE  
MICOBACTERIOLOGIA**

Nº Prontuário: \_\_\_\_\_

**CADASTRO DE PACIENTES**

Nº REGISTRO ESCARRO: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

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

Natureza da Amostra:

- Escarro       Liq. Ascítico       Genital       Ósteo-articular       Fezes  
 Liqueur       Lav. Gástrico       Pele       Ganglionar       Urina  
 Liq. Pleural       Lav. Brônquico       Outro: \_\_\_\_\_

Identificação do Paciente:

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo:  M  F

Endereço: \_\_\_\_\_

Fone: \_\_\_\_\_

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

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

Naturalidade(Pais): \_\_\_\_\_ Naturalidade(Avós): \_\_\_\_\_

Informações Clínicas:

- BCG:  Não      PPD:  Não      RX Tórax  Não  
            Sim Data: \_\_\_\_\_       Sim  Não reator       Sim  Normal  
            Não sabe informar       Reator \_\_\_\_\_ mm       Alterado

Antecedente de Tuberculose:

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

- Familiar:       Pai       Tios       Sogros       Vizinho  
 Não       Primos       Cônjuge       Namorado       Colegas de trabalho  
 Mãe       Filho       Cunhado       Agregados       Não sabe informar  
 Avós       Irmãos       Amigos       Outros: \_\_\_\_\_

Atualmente realizou pesquisa de BAAR em outros Laboratórios?

Não  Sim Onde? \_\_\_\_\_

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

Apresenta outras doenças?

- Alcoolismo       Câncer       Alergias cutâneas       Doenças Reumáticas  
 Tabagismo       doenças Autoimunes       Diabetes       Hanseníase  
 Cardiopatias       Malária       Dengue       Qual? \_\_\_\_\_

Quadro clínico atual:

- Tosse       Expectoração       Hemoptise       Dispnéia  
 Dor torácica       Dor de cabeça       Emagrecimento       Cansaço  
 Febre       Outros. Quais? \_\_\_\_\_

Duração da doença:

O Paciente:

Não recebeu nenhum tratamento antes da coleta da amostra clínica atual

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

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

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

## ANEXO B



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE  
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação dos polimorfismos genéticos e possível associação com a produção de Interferon gama (IFN-gama), em pacientes com Tuberculose pulmonar.

**Pesquisador:** Cláudia Maria de Melo Silva

**Área Temática:** Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

**Versão:** 3

**CAAE:** 07301212.2.0000.5020

**Instituição Proponente:** INSTITUTO DE NATUREZA E CULTURA

**DADOS DO PARECER**

**Número do parecer:**

173.772

**Data da Relatoria:**

12/12/2012

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

**FOLHA DE ROSTO:** Adequada. Assinada pela pesquisadora responsável, pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, como Instituição Proponente, e pela Profa. Dra. Aya Sadahiro (ICB/UFAM), como responsável pelo financiamento do projeto, visto que este está vinculado a seu projeto aprovado no PPSUS-FAPEAM.

**TERMO DE ANUÊNCIA:** foram apresentadas as anuências formais adequadamente assinadas: da Policlínica em Pneumologia Sanitária Cardoso Fonte, assinada pela Diretora Irineide Assumpção; e do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, assinada pelo Dr. José Alberto da Costa Machado, Coordenador da Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde do INPA, e pelo Dr. Maurício Ogusku, responsável pelo Laboratório de Micobacteriologia.

**TCLE:** A nova versão apresentada está adequada, e com as alterações solicitadas.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE  
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



O presente protocolo recebeu parecer pela pendência nas análises anteriores. A pesquisadora atendeu às solicitações deste Comitê, ajustando o protocolo ao que determina a Res. 196/96 e complementares. Considerando os termos da Res. CNS 340, de 08 de julho de 2004, sobretudo o item VI.5, o presente protocolo não requer análise ética da CONEP.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

MANAUS, 14 de Dezembro de 2012

---

**Assinador por:**  
**Pedro Rodolfo Fernandes da Silva**  
**(Coordenador)**

## ANEXO C

### Protocolo de purificação do sequenciamento EtOH/EDTA/ ACETATO DE SÓDIO – BULA BIGDYE V3.1 APLIED BIOSYSTEM

Para precipitar reações de 10µL em placas com 96 poços:

1. Remova a placa do termociclador e centrifugue 1 min a 2000 RCF;
2. Adicione 1µL de EDTA 125mM a cada um dos poços;

Nota: tenha certeza que o EDTA foi adicionado no fundo dos poços.

3. Adicione 1µL de acetato de sódio 3M (pH 5,2) a cada um dos poços;

Nota: tenha certeza que o acetato foi adicionado no fundo dos poços.

4. Adicionar 25µL de EtOH 100% gelado, a cada um dos poços;
5. Sele a placa com *strips* e misture por inversão (4x);
6. Incube por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz;
7. Centrifugue a 2.000 rcf por 45 minutos ou 3.000 rcf por 30 minutos;

Importante: o próximo passo deve ser feito imediatamente. Se isto não for possível, então faça um spin na placa por mais 2 minutos antes de recomeçar

8. Inverta a placa e faça um spin até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;

Obs: antes de inverter a placa, despreze o conteúdo da mesma na pia junto com uma leve batida na mesa. Após esta centrifugação, programa-lá para a temperatura 4°C ou 8°C.

9. Adicione 35µL de EtOH a 70% em cada um dos poços;
10. Centrifugue por 15 minutos, à 4°C e 1.650 rcf;

Obs. Caso tenha esquecido a programação para 4°C ou 8°C, acione o *FAST* temperatura.

11. Inverta a placa e faça um spin até 180 rcf por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;

Nota: comece a contar o tempo assim que o rotor começar a se mover.

12. Incube a placa a placa a 52°C por 15 minutos, cobrir com papel alumínio (termociclador-2-mastercycler);
13. Se não for colocar no seqüenciador imediatamente, congelar a placa seca ao abrigo da luz;
14. No momento de seqüenciar ressuspender com 10µL de formamida Hi-Di, lavando as paredes dos poços;
15. Aqueça a placa 95°C por 1 minuto, monte e coloque no seqüenciador.

Obs. Para o protocolo de purificação usar pipeta de purificação – não misturar para evitar contaminação.