



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNP) EM GENES DO  
INFLAMASSOMA E COMPONENTES RELACIONADOS EM PACIENTES COM  
TUBERCULOSE

MARIANA BRASIL DE ANDRADE FIGUEIRA

MANAUS

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

MARIANA BRASIL DE ANDRADE FIGUEIRA

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNP) EM GENES DO  
INFLAMASSOMA E COMPONENTES RELACIONADOS EM PACIENTES COM  
TUBERCULOSE

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aya Sadahiro

Coorientador: Prof Dr. Mauricio Morishi Ogusku

MANAUS

2019

## Ficha Catalográfica

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

F475a Figueira, Mariana Brasil de Andrade  
Avaliação de polimorfismos de base única (SNP) em genes do inflamassoma e componentes relacionados em pacientes com tuberculose / Mariana Brasil de Andrade Figueira. 2019  
116 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Tuberculose. 2. inflamassomas. 3. polimorfismos. 4. il. I.  
Sadahiro, Aya II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais Otávio e Inês, pelo amor incondicional e alicerce em todos os momentos da minha vida.*

*À minha querida orientadora, amiga e mãe científica Aya Sadahiro por todo o apoio, excelente orientação e por desejar o melhor para mim.*

*Muito Obrigada!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu maior mestre, por ter me proporcionado o dom da vida, sabedoria, discernimento, inteligência, perseverança, ter ouvido minhas orações e a força para superar e não fraquejar em meio às dificuldades.

Aos meus pais amados, Francisco Otávio e Inês Maria, meus incentivadores e apoiadores em tudo que almejo, pelo amor incondicional, carinho, cuidado, alicerce, amparo, encorajamento e por me ajudarem a concretizar meus sonhos. Sou grata eternamente por tudo que fazem por mim. Amo vocês!

Aos meus irmãos Aluízio e Otávio e ao meu namorado Thamerson pelo amor, paciência, compreensão, incentivo e ajuda em todos os momentos da minha vida.

Aos meus tios e padrinhos Nonato e Rita pela acolhida nos momentos que mais precisei, principalmente nas etapas finais do mestrado.

À minha querida mãe científica, amiga e orientadora professora Dra. Aya Sadahiro pelo qual tenho uma grande admiração, afeto, carinho e respeito. Agradeço imensamente pela oportunidade de me aceitar, por acreditar na minha capacidade, pelo incentivo, paciência, conselhos, ensinamentos, dedicação, empenho em me direcionar e conduzir da melhor maneira para a realização desse trabalho e contribuir na minha formação profissional e pessoal. És um exemplo para mim como pessoa, profissional e pesquisadora. Muito obrigada por toda a ajuda concedida, inclusive durante seu período de férias.

Ao meu coorientador professor Dr. Mauricio Ogusku pela amizade, acolhida, generosidade, ensinamentos e suporte nas técnicas de biologia molecular. Também és um exemplo para mim como pessoa, profissional e pesquisador. Muito obrigada por tudo!

À professora Dra. Alessandra Pontillo pelo carinho, amizade, orientação, suporte em todos os momentos e ensinamentos sobre genética molecular. És uma pessoa incrível que por onde passa nos contagia com sua alegria, sorriso e inteligência admirável. Tive a honra de conhecer e aprender bastante com a nossa querida Rainha do inflamassoma.

Aos meus queridos amigos do laboratório que tive a honra de conviver e compartilhar momentos inigualáveis: Thaís, Milton, Luana, Ariane, Dhêmerson, Vanessa e Andreza pela amizade, acolhida, ajuda, apoio e auxílio na coleta e processamento das amostras.

Aos técnicos e amigos do Laboratório de Micobacteriologia do INPA João Raimundo, Maisa Porto, Ray por todo o suporte e auxílio laboratorial.

Aos Professores Dra. Luciana Fujimoto, Dra. Marlucia Garrido e Dr. Rajendranath Ramasawmy pelas sugestões e correções no exame de qualificação.

Aos pacientes pela participação voluntária mesmo diante das dificuldades físicas.

Aos funcionários da Policlínica Cardoso Fonte, em especial a Dra. Irineide e Dra. Joyce Matsuda pela receptividade, acolhida e dedicação exemplar aos pacientes com tuberculose.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e apoio financeiro para a concretização deste trabalho.

Ao LIM (Laboratório de Imunologia Molecular) e ao INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), lugares em que me sinto feliz, amo e passei maior parte do meu tempo estudando e realizando este trabalho.

À UFAM, Coordenação e Secretaria do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, especialmente ao Edson e Ana Paula, pela amizade, ajuda e suporte necessário.

Aos todos os professores do PPGIBA pelos ensinamentos e exemplo de docentes que nos direcionam para sermos imunologistas de excelência.

Aos meus colegas de turma do mestrado pela amizade, horas de estudo e que vivenciaram e venceram juntamente comigo momentos de dificuldades nessa jornada do mestrado.

Às minhas amigas de graduação e profissão Rayssa Cantisani e Mayra Brasil por cada palavra de apoio prestada.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização dessa dissertação bem como minha formação pessoal, o meu sincero muito obrigada!

## RESUMO

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelas bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, considerada a primeira e principal causa de morte por único agente infeccioso de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Em 2017, cerca de 1,3 milhões de óbitos e 10 milhões de casos novos ocorreram no mundo devido à TB. Neste mesmo ano, a taxa de incidência no Estado do Amazonas foi de 74,1 casos/100 mil habitantes, a mais elevada do país. Este cenário retrata que a TB continua sendo um preocupante problema de saúde pública. Aproximadamente 10% dos indivíduos infectados desenvolvem a TB ativa. Diante desse fato, fatores genéticos do hospedeiro podem contribuir e desencadear diferentes respostas imunológicas ao agente infeccioso. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra diversos micro-organismos, inclusive para micobactérias. Durante a infecção, complexos proteicos intracelulares conhecidos como inflamassomas são ativados, sendo essenciais no controle do crescimento bacteriano, através da ativação e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e IL-18. Neste contexto, polimorfismos em genes de inflamassomas podem resultar em diferentes respostas à infecção. Além disso, os estudos imunogenéticos em pacientes com TB residentes da região Norte do Brasil ainda são considerados raros, principalmente, no Amazonas, estado com alto coeficiente de incidência da TB. Por esta razão, o presente trabalho avaliou os polimorfismos de base única (SNP) em genes dos inflamassomas *NLRP1* (rs35865013), *NLRP3* (rs3806265) e *AIM2* (rs1103577) e componentes relacionados *CARD8* (rs2009373) e *CTSB* (rs1692816), em pacientes com TB. Foram incluídas amostras de 434 pacientes com TB pulmonar (TBP), 143 pacientes com TB extrapulmonar (TBE) e 549 controles (contatos) recrutados na Policlínica Cardoso Fontes na cidade de Manaus. A determinação das concentrações de IL-1 $\beta$  foi realizada, por ELISA, em amostras de pacientes TBP (n=30), TBE (n=20) e em controles (n=30). A maioria dos SNP tiveram frequência superior a 10,0% na população deste estudo. Verificou-se associação estatisticamente significativa do genótipo AC do SNP rs1692816 no gene *CTSB* para proteção em pacientes com TBP ( $p=0,027$ ; OR=0,53). Além disso, foi verificada uma tendência do genótipo TT do SNP rs1103577 no gene *AIM2* para proteção no sexo masculino em pacientes com TBP ( $p=0,027$  e OR=0,69;  $p_{ajust}=0,051$  e OR<sub>ajust</sub>=0,68). Houve diferença significativa na concentração de IL-1 $\beta$  no genótipo AA do gene *CTSB* rs1692816, sugerindo que indivíduos com esse genótipo apresentam uma melhor resposta da imunidade inata contra o bacilo da TB. Os resultados deste estudo reforçam cada vez mais a importância dos inflamassomas na TB, contribuindo para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro e, assim, elucidando os fatores associados a proteção e risco para TB que justifiquem coeficientes tão elevados da doença no Amazonas.

Palavras-chave: Tuberculose; inflamassoma; polimorfismos; IL-1 $\beta$ ; *NLRP1*; *NLRP3*; *AIM2*; *CARD8*; *CTSB*

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis* complex and it is considered the first and leading to cause of death by single infectious agent according to the World Health Organization. In 2017, about 1.3 million deaths and 10 million of new cases occurred worldwide causing TB. In the same year, the incidence rate in the state of Amazonas was 74.1/100 thousand inhabitants, the highest in the country. This scenario confirms TB remains a public health problem. Among infected individuals 10% develop active TB. In view of this fact, genetic factors of the host can contribute and trigger different immune responses to bacilli. The innate immune response is the first line of defense against several microorganisms, including mycobacteria. During infection, intracellular protein complexes known as inflammasome are activated and they are essential for controlling bacterial growth through the activation and secretion of proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-18. In this context, polymorphisms in genes of inflammasome may result in different responses to infection. In addition, immunogenic studies in inflammasomes in the northern region are still considered rare. Therefore, the present study evaluated single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in inflammatory genes *NLRP1* (rs35865013), *NLRP3* (rs3806265) and *AIM2* (rs1103577) and related components *CARD8* (rs2009373) and *CTSB* (rs1692816) in patients with TB. In this study, were included 434 patients with pulmonary TB (TB), 143 patients with extrapulmonary TB (TB) and 549 controls (contacts) recruited from Reference Center for Sanitary Pneumology “Policlínica Cardoso Fontes”, Manaus-AM, Brazil. The determination of IL-1 $\beta$  concentrations was performed by ELISA in samples of TBP (n=30), TBE (n=20) and controls (n=30). SNP *CTSB* rs1692816 was associated with protective of ETB vs PTB (p: 0.027, OR: 0.53) and after that adjusted for sex and age (p: 0.02; OR: 0.50; 95% CI: 0.27-0.94). SNPs had a frequency greater than 10.0% in the study population. The rs1103577 SNP TT genotype in the *AIM2* gene was observed for male protection in patients with TBP (p=0.027 and OR=0.69,  $p_{\text{adjust}} = 0.051$  and OR = 0.68). There was a significant difference in the concentration of IL-1 $\beta$  in the AA genotype of the *CTSB* gene rs1692816, suggesting that individuals with this genotype present a better response of the innate immunity against the TB bacillus. The results of this study increasingly reinforce the importance of inflammasomes in TB, contributing to a better understanding of the mechanisms involved in the immune response of the host and thus elucidating the factors associated with protection and risk for TB that justify such high coefficients of the disease in the Amazonas.

Keywords: Tuberculosis; inflammasome; polymorphisms; IL-1 $\beta$ ; *NLRP1*; *NLRP3*; *AIM2*; *CARD8*; *CTSB*



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aids	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> - Síndrome da imunodeficiência adquirida
AIM2	<i>Absent in melanoma 2</i>
APC	Células apresentadoras de antígeno
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
BAAR	Bacilos Álcool-ácido Resistentes
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domain</i> - Domínio C terminal recrutador e ativador de caspase
CARD8	<i>Caspase recruitment domain family member 8</i>
CARDINAL	<i>CARD inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B-activating ligands</i>
CCL3	Quimiocinas com duas cisteínas próximas (CC) ligantes 3
CFP-10	<i>10-kDa Culture Filtrate Protein</i>
CLR	Receptores de lectina tipo C
CR	Receptores do complemento
CTSB	<i>Lysosomal cysteine protease cathepsin B</i>
DAMP	Padrões moleculares associados ao dano
DL	Desiquilíbrio de Ligação
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin</i>
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ESAT-6	<i>Early Secreted Antigenic Target</i> - Antígeno Alvo de Secreção Primária
FcyR	Receptores Fcy
FIIND	Domínio com função para encontrar
HIN200	<i>Hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-18	Interleucina-18
IFN $\gamma$	Interferon gama
IFNGR1	Cadeia 1 do receptor do interferon gama
LAM	Lipoarabinomanana
LM	Lipomanana

LRR	<i>Leucine-rich repeat</i> - Domínio rico em repetições de leucina
MAF	Frequência do alelo menor
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NACHT	Domínio de ligação a nucleotídeos central
NBD	<i>Nucleotide-binding domain</i> – Domínio de ligação a nucleotídeo
NF-κB	<i>Nuclear factor Kappa B</i> - Fator de transcrição nuclear Kappa B
NLR	<i>NOD like receptor</i> - Receptores semelhantes a NOD
NLRP/NALP	<i>NLR-NOD-like receptors, pyrin-domain-containing proteins</i> - Receptores semelhantes a NOD com domínio pirina
NOD	Domínio de oligomerização de nucleotídeos
NTM	Micobactérias não causadoras de tuberculose
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>p</i> -EHW	Valor de <i>p</i> do Equilíbrio de Hardy-Weinberg
PYHIN	<i>PYD-like and HIN domain-containing proteins</i>
PIM	<i>Phosphatidylinositol mannosides</i> - Fosfatidil inositol-manosídeo
PRR	Receptores de reconhecimento de padrão
P2X7R	Receptor purinérgico
PYD	Domínio de pyrin
qPCR	PCR Quantitativa em Tempo Real
ROS	Espécies reativas do oxigênio
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> - Polimorfismo de Base Única
SR	Receptores de scavenger
TB	Tuberculose
TBP	Tuberculose Pulmonar
TBE	Tuberculose Extrapulmonar
TCD8+	Linfócitos T citotóxicos
TCR	Receptor de célula T
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
T <sub>H</sub> 1	Linfócitos T helper tipo 1

T <sub>H</sub> 2	Linfócitos T helper tipo 2
T <sub>H</sub> 17	Linfócitos T helper tipo 17
THP-1	Linhagem celular monocítica
TLR	Toll-like receptor - Receptores semelhantes a toll
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> - Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRIM	<i>Tripartite motif proteins</i>
TUCAN	<i>Tumor-up-regulated CARD-containing antagonist of caspase nine</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa do número de casos de incidência de TB no mundo.....	27
Figura 2 - Famílias de inflamassomas, classes e seus domínios estruturais.....	38
Figura 3 - Estímulos e mecanismos de ativação do inflamassoma mais caracterizado NLRP3.....	39
Figura 4 - Fluxograma das atividades que foram realizadas durante o projeto.....	53
Figura 5 - Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs35865013 no gene <i>NLRP1</i> .....	65
Figura 6 - Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs3806265 no gene <i>NLRP3</i>	66
Figura 7 - Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs1103577 no gene <i>AIM2</i> ...	67
Figura 8 - Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs2009373 do gene <i>CARD8</i>	68
Figura 9 - Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs1692816 no gene <i>CTSB</i> ...	69
Figura 10 - Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo nos genes <i>NLRP1</i> , <i>AIM2</i> , <i>CARD8</i> e <i>CTSB</i> .....	70
Figura 11 - Concentração de IL-1 $\beta$ nos grupos estudados.....	89
Figura 12 - Concentração da citocina IL-1 $\beta$ entre os genótipos do gene <i>CTSB</i> .....	90

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos de polimorfismos em genes envolvidos na resposta imune a TB.....	36
Quadro 2 - Condições de reação de qPCR usadas para as sondas <i>NLRP1</i> , <i>NLRP3</i> , <i>AIM2</i> , <i>CARD8</i> e <i>CTSB</i> .....	55
Quadro 3 - Características das sondas utilizadas no experimento.....	56
Quadro 4 - Sondas e condições de termociclagem utilizadas no experimento.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais da população estudada: controles, pacientes com TB pulmonar (TBP) e extrapulmonar (TBE).....	61
Tabela 2 - Características gerais da população estudada: controles, pacientes com TB pulmonar (TBP) e extrapulmonar (TBE) quanto às variáveis vacinação BCG, tabagismo e alcoolismo.....	63
Tabela 3 - Frequência dos alelos menores (MAF) dos SNP, com as respectivas avaliações do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (p-EHW) obtidas nos grupos de casos e controles, bem como na população em geral.....	74
Tabela 4 - Resultado da análise de associação dos SNP em genes de inflamassomas <i>NLRP1</i> , <i>NLRP3</i> e <i>AIM2</i> nos grupos estudados.....	79
Tabela 5 - Resultado da análise de associação do SNP no gene <i>AIM2</i> rs1103577 nos grupo TBP vs. Controles com o fator de correção para sexo e idade.....	81
Tabela 6 - Resultado da análise de associação dos SNP nos componentes relacionados ao inflamassoma, <i>CARD8</i> e <i>CTSB</i> nos grupos estudados.....	83
Tabela 7 - Resultado da análise de associação do SNP no gene <i>CARD8</i> rs2009373 nos grupo TBP vs. TBE com o fator de correção sexo e idade.....	84
Tabela 8 - Resultado da análise de associação do SNP no gene <i>CTSB</i> rs1692816 nos grupo TBP vs. TBE com o fator de correção sexo e idade.....	86
Tabela 9 - Haplótipos dos genes <i>NLRP3</i> (rs38062651) e <i>AIM2</i> (rs1103577) em pacientes com TBT (TBP+TBE) e controles.....	87
Tabela 10 - Análise de interação entre os genes <i>NLRP3</i> (rs38062651) e <i>AIM2</i> (rs1103577) em pacientes com TB (TBP+TBE).....	88

## **LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1 – Número de casos das formas clínicas da TB extrapulmonar neste estudo..... 64

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>23</b>
2.1 Aspectos gerais da tuberculose .....	23
2.2 Aspectos epidemiológicos da tuberculose.....	26
2.2.1 Panorama epidemiológico das formas clínicas da TB.....	28
2.3 Imunopatogenia ao complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	29
2.3.1 Resposta imune inata.....	29
2.3.2 Resposta imune adaptativa .....	31
2.4 Polimorfismos em genes da resposta imune à tuberculose .....	34
2.5 Inflamassoma: estrutura, ativação e regulação.....	36
2.6 Polimorfismos em genes de inflamassomas nas infecções micobacterianas.....	44
<b>3.OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
3.1 Objetivo geral.....	47
3.2 Objetivos específicos.....	47
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>49</b>
4.1 Tipo de estudo .....	49
4.2 População de estudo .....	49
4.3 Grupos estudados e critérios de inclusão .....	49
<b>4.3.1 Critérios de inclusão.....</b>	<b>49</b>
4.3.1.1 Grupo 1: Pacientes com TB pulmonar .....	50
4.3.1.2 Grupo 2: Pacientes com TB extrapulmonar .....	50
4.3.1.3 Grupo 3: Contatos de pacientes com TB .....	51
4.4 Critérios de exclusão .....	51
4.5 Recrutamento e coleta dos dados dos pacientes e controles.....	51
4.6 Cálculo amostral.....	52
4.7 Amostras biológicas .....	52
4.8 Exames micobacteriológicos nas amostras de escarro .....	54
4.9 Extração de DNA das amostras de sangue.....	54
4.10 Genotipagem por PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) – Ensaio TaqMan.....	54
4.11 Quantificação da citocina IL-1 $\beta$ por ELISA ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> ) .....	56
4.13 Aspectos éticos.....	57
4.14 Apoio Financeiro.....	57
4.15 Análise Estatística .....	57



<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
5.1 Descrição da população recrutada.....	60
5.2 Características gerais da população estudada.....	60
5.3 Análise dos polimorfismos nos genes <i>NLRP1</i> , <i>NLRP3</i> , <i>AIM2</i> , <i>CARD8</i> e <i>CTSB</i> .....	65
<b>5.3.1. Frequência do alelo menor</b> .....	71
5.3.2 Análise de associação para os polimorfismos .....	75
<b>5.3.2.1 Análise de associação para o gene <i>NLRP1</i></b> .....	76
<b>5.3.2.2 Análise de associação para o gene <i>NLRP3</i></b> .....	77
<b>5.3.2.3 Análise de associação para o gene <i>AIM2</i></b> .....	80
<b>5.3.2.4 Análise de associação para o gene <i>CARD8</i></b> .....	82
<b>5.3.2.5 Análise de associação para o gene <i>CTSB</i></b> .....	84
<b>5.3.2.6 Análise de haplótipos</b> .....	86
<b>5.3.2.7 Análise de interação gênica</b> .....	87
5.4 Análise da quantificação de IL-1 $\beta$ para o gene <i>CTSB</i> .....	88
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>92</b>
<b>EQUIPE DE PESQUISA .....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>116</b>

*Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) ainda é considerada um grave problema de saúde pública, apesar de terem passado 136 anos após a descoberta por Robert Koch, em 1882, pois mantem-se com elevada morbidade e mortalidade (O’GARRA et al., 2013). Mundialmente, a TB enquadra-se como a primeira e principal causa de morte proporcionada por único agente infeccioso, a qual vem afetando a humanidade durante milênios (WHO, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de um terço da população mundial está infectada com o bacilo causador da TB (WHO, 2016) e, somente no ano de 2016, aproximadamente 1,3 milhões de indivíduos morreram com TB e, estima-se que, houve cerca de 10,4 milhões de casos novos da doença (WHO, 2017). Em 2017, cerca de 1,3 milhões de óbitos e 10 milhões de casos novos ocorreram no mundo devido a TB (WHO, 2018). Recentemente, o Ministério da Saúde divulgou que no Brasil foram notificados 69.569 casos novos da doença com coeficiente de incidência de 33,5 casos/100 mil habitantes no ano de 2017 (BRASIL, 2018a).

O elevado número de casos novos de TB tem sido associado a diversos fatores, principalmente devido ao comprometimento do sistema imune. Fatores como alta incidência de infecção pelo HIV/Aids, desnutrição, diabetes, tabagismo e o aumento das micobactérias resistentes aos medicamentos disponíveis, estão associados ao maior risco no desenvolvimento da TB (WARNER et al., 2015).

A TB é uma doença infectocontagiosa causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) (GALAGAN, 2014) associada a fatores sociais, ambientais e genéticos (MEYER; THYE, 2014). A imunopatogenia das micobactérias continua sendo um mecanismo complexo, heterogêneo, multifatorial e não completamente compreendido, principalmente no que diz respeito aos fatores relacionados ao hospedeiro, as quais contribuem para as diferentes respostas pelos indivíduos, bem como o envolvimento da resposta imune no combate a esse micro-organismo invasor (CADENA; FORTUNE; FLYNN, 2017; O’GARRA et al., 2013).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra a infecção microbiana (FRANCHI; MUÑOZ-PLANILLO; NÚÑEZ, 2012). Durante a infecção por micobactérias, os macrófagos e as células dendríticas atuam formando inflamassomas, que são sensores intracelulares, envolvidos na secreção de citocinas, principalmente da IL-1 $\beta$ , e conseqüentemente promovem a resposta inflamatória contra o patógeno, controlando o

crescimento bacteriano e auxiliando na sua eliminação (BRIKEN; AHLBRAND; SHAH, 2013).

Diante dos fatos, estudos vêm sendo realizados e mostram evidências sobre a participação dos inflamassomas na resposta imune contra infecções micobacterianas, visto que algumas pesquisas *in vivo* observaram os inflamassomas AIM2 e NLRP3, desempenhando papéis importantes na infecção a *M. tuberculosis*. Em estudo realizado com modelo experimental, Saiga et al. (2012) verificaram que camundongos com deficiência em AIM2, que reconhece o DNA bacteriano presente no citosol, apresentaram maior suscetibilidade à infecção a *M. tuberculosis*, devido a resposta T<sub>H</sub>1 e produção defeituosa de IL-1 e IL-18. No estudo *in vitro*, utilizando macrófagos, realizado por Mishra et al. (2010), os autores relataram que o fator de virulência ESAT-6, secretado por *M. tuberculosis*, ativa NLRP3 e estimula a caspase-1, promovendo a secreção de IL-1 $\beta$ , que é regulada por várias proteínas NLR/CARD.

Desta forma, verifica-se que a IL-1 $\beta$  é um importante mediador envolvido na resistência e defesa bem-sucedida contra micobactérias, como demonstrado no estudo *in vivo*, ao constatarem que camundongos *knockout* para IL-1 $\beta$  foram mais suscetíveis à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, quando comparados ao grupo controle (MAYER-BARBER et al., 2011).

Segundo Gagneux (2012) e Behar et al. (2014) um dos fatos mais intrigantes a respeito da TB é o motivo de aproximadamente 10% dos indivíduos infectados desenvolverem a doença ativa e os demais, em torno de 90%, permanecerem assintomáticos. Levando em consideração que o estado do Amazonas (74,1 casos de TB/100 mil habitantes) e a capital Manaus (104,7 casos de TB/100 mil habitantes) registraram os maiores coeficientes de incidência de TB do país (BRASIL, 2018a), esses dados são preocupantes e chamam atenção para investigar os motivos de índices tão elevados da TB na região, bem como compreender os mecanismos relacionados a doença.

Sabe-se que a complexidade de uma doença pode ser influenciada e relacionada a diversos fatores e entre eles, tem-se os aspectos genéticos do hospedeiro. Estudos sobre o perfil genético dos pacientes de TB tem contribuído de forma significativa para a variabilidade na resposta à infecção a *M. tuberculosis* (PARAMEL; SIRSIÖ; FRANSÉN, 2015). Neste contexto, os polimorfismos genéticos em inflamassomas podem modificar a sua função fisiológica e contribuir para suscetibilidade, gravidade e resultado da doença (SOUZA DE LIMA et al., 2016).

Atualmente, a comunidade científica tem voltado sua atenção para os estudos moleculares, pois os mesmos podem colaborar para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro. Além disso, poderão colaborar nas perspectivas de estratégias imunoterapêuticas no futuro. Adicionalmente, auxiliarão na descoberta dos fatores de riscos imunogenéticos associados a TB (COOKE; HILL, 2001; COSCOLLA; GAGNEUX, 2014).

Diante do exposto, avaliou-se os polimorfismos de base única (SNP), em genes que codificam inflamassomas *NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2* e os genes de componentes relacionados aos inflamassomas *CARD8* e *CTSB*, em pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar, visto que os inflamassomas são importantes componentes envolvidos na resposta inicial contra o bacilo da TB.

# *Revisão Bibliográfica*

---

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos gerais da tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) (GALAGAN, 2014). De acordo com a classificação taxonômica, as micobactérias causadoras da TB pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae*, subordem *Corynebacteriaceae* e da ordem *Actinomycetales* (EUZÉBY, 2014).

O gênero *Mycobacterium* compreende o único da família *Mycobacteriaceae* no qual estão agrupadas diferentes espécies de patógenos causadores de doenças, tanto em humanos como em animais. Além das espécies pertencentes ao MTBC, este gênero abrange *M. leprae* e as NTM (Micobactérias não causadores de tuberculose). Algumas das espécies pertencentes aos membros do MTBC e a *M. leprae* constituem importantes espécies do gênero *Mycobacterium* devido ao seu potencial patogênico em humanos (GOOD, 1985).

De modo geral, as micobactérias apresentam algumas características em comum sendo assim bactérias aeróbias, intracelulares facultativas (CHINTA et al., 2016), imóveis, não formadoras de esporos e apresentam propriedades de álcool-ácido resistência, sendo denominados bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR), demonstrada pela coloração de Ziehl-Neelsen. Morfologicamente, podem apresentar-se na forma de bacilos levemente curvos ou retos, de diâmetro em torno de 0,2 a 0,6  $\mu\text{m}$  e comprimento de 1 a 10  $\mu\text{m}$ . As colônias das micobactérias dispõem de uma morfologia diversificada podendo ser lisas a rugosas ou pigmentadas ou não (com tempo de divisão de 16-20 horas) (ROGALL et al., 1990).

Estruturalmente, as micobactérias possuem membrana plasmática cercada por uma parede celular complexa, constituída de carboidratos (peptidoglicano, arabinogalactanas) ligada a lipídeos e um espaço periplasmático situado entre a membrana plasmática e o peptidoglicano (DAFFÉ, 2015).

A parede celular apresenta propriedades hidrofóbicas e é composta de peptidoglicano, arabinogalactanas e alto conteúdo lipídico, principalmente de ácidos micólicos. Os ácidos micólicos são estruturas características da parede celular das micobactérias, os quais promovem resistência à degradação por enzimas presentes nos lisossomos, conferindo uma camada bastante espessa em comparação com outras bactérias. O peptidoglicano é ligado covalentemente às arabinogalactanas e é constituído de N-acetilglicosamina e ácido N-glicolilmurânico (KLEINNIJENHUIS et al., 2011).

Diferentes espécies de micobactérias como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* possuem na membrana plasmática glicolípídeos: fosfatidil inositol-manosídeo (PIM-*Phosphatidylinositol mannosides*), lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM), que se estendem até o exterior da parede celular e funcionam como fatores de virulência (ABDALLA et al., 2012; CHATTERJEE; KHOO, 1998).

Devido as suas diferentes propriedades, as micobactérias podem ser classificadas quanto as suas características de crescimento em rápido ou lento; quanto ao grau de patogenicidade (estritos, potencialmente e raramente patogênica) e quanto sua capacidade de produzir pigmento (pequena, nenhuma quantidade) em meio de cultura (Classificação proposta por Runyon). Além disso, podem ser agrupadas em dois grupos que incluem as micobactérias não causadoras de tuberculose (NTM) e o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) (BRASIL, 2008).

As NTM são agentes patogênicos oportunistas isolados de fontes ambientais como águas, solos, poeiras e vegetais, que acometem tanto humanos quanto animais (JOHNSON; ODELL, 2014), sendo constituídos por mais de 200 espécies (DSMZ, 2019). O MTBC é classificado, de acordo com as características bioquímicas e sua homologia de sequência genômica, em espécies filogeneticamente e com espectros de hospedeiros distintos que incluem: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis (BCG)*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae*, *M. mungi* e *M. orygis* (COSCOLLA; GAGNEUX, 2014; FORRELLAD et al., 2013; TIENTCHEU; KOCH; NDENGANE, 2017).

Em humanos a TB é causada, principalmente, por *M. tuberculosis* e *M. africanum*, (esta última espécie, limitada à África Ocidental) que apresentam sobrevivência restrita fora do corpo humano e sem reservatórios conhecidos em outros animais. No entanto, algumas espécies do MTBC podem acometer e causar doenças em uma variedade de animais, por exemplo, *M. bovis* (bovinos), *M. microti* (roedores), *M. caprae* (ovinos e caprinos), *M. pinnipedii* (focas e os leões marinhos), *M. suricattae* (suricatos), *M. mungi* (mangustos), *M. orygis* (antílopes) (GAGNEUX, 2012).

Dependendo do curso da infecção, esta pode resultar em diferentes cenários. Em alguns indivíduos a infecção pode ser eliminada pelo sistema imune do hospedeiro, outros casos continuar na forma progressiva no pulmão, apresentando quadros sintomáticos (TB pulmonar ativa) e mantendo a cadeia de transmissão da doença (BRASIL, 2011). Ou tornar-se estacionária cujo quadro é clinicamente assintomático e a reativação acontecer meses ou anos depois dependendo da imunidade do indivíduo (TB pulmonar latente). Ou ainda resultar na



disseminação hematogênica e assim atingir outros órgãos (TB extrapulmonar) (AGUILAR-AYALA et al., 2016).

Estudos informam que das diferentes formas clínicas da TB, a TB pulmonar é a mais frequente e estima-se que 25% dos casos apresentam a TB extrapulmonar. Há estimativa que da população exposta a *M. tuberculosis*, 30% tornam-se infectados, e destes indivíduos infectados 90% evoluem para a TB pulmonar latente, conseguindo controlar a infecção, sem apresentar sinais e sintomas da doença, e cerca de 5 a 10% poderão desenvolver a TB pulmonar ativa (SHALER et al., 2012).

Em relação a TB extrapulmonar, pode ser resultado da reativação da infecção latente, e o bacilo poderá acometer diversos órgãos e tecidos, como os linfonodos, a pleura, o trato gastrointestinal, o tecido ósseo, o sistema nervoso central, o sistema genitourinário, as meninges e o tecido cutâneo. Os casos de TB extrapulmonar refletem um cenário de difícil diagnóstico (ANGELA HOUSTON, 2014; RUAN et al., 2012).

A OMS aprovou em 2014 a nova estratégia global para o enfrentamento da TB, com a meta de tornar o mundo livre da TB até 2035. Para isso, é importante continuar assegurando o diagnóstico e tratamento de qualidade e, assim, alcançar o controle global da TB (BRASIL, 2017a).

O diagnóstico da TB pode ser realizado considerando as manifestações clínicas, os exames radiológicos e laboratoriais. Os exames laboratoriais são feitos a partir de amostras de escarro, no caso de TB pulmonar, e de biópsias do tecido acometido e/ou de outras amostras biológicas, para TB extrapulmonar, empregando-se as técnicas de baciloscopia direta e exames de cultura em meios específicos (BRASIL, 2008).

A baciloscopia direta é baseada na pesquisa de BAAR, identificando cerca de 60% a 80% dos casos de TB pulmonar. A cultura aumenta em até 30% o diagnóstico bacteriológico, quando há resultado de baciloscopia negativa (BRASIL, 2011). Associado a essas técnicas, em 2013 foi implantado no Sistema Único de Saúde (SUS) o teste rápido molecular (TRM) conhecido como GeneXpert MTB/RIF, ferramenta que auxilia nos exames de baciloscopia e cultura, que tem contribuído para o aumento da detecção dos casos de TB (WHO, 2017). O TRM identifica em poucas horas a presença do material genético do MTBC, ao mesmo tempo em que informa, de forma precoce, casos de resistência ao medicamento rifampicina (LIMA et al., 2013).

O esquema básico de tratamento da TB preconizado pela OMS consiste, na ingestão diária de medicamentos por via oral, com duração mínima de seis meses, divididos em duas fases. A primeira fase é a intensiva ou dose de ataque, com duração de dois meses, em que o

paciente recebe quatro antibióticos combinados, denominados comprimidos em dose fixa combinada. Este é composto de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. A segunda fase é a de manutenção, com duração de quatro meses, com dois medicamentos (rifampicina e isoniazida). Dependendo da evolução do quadro clínico do paciente e o órgão afetado no caso de TB extrapulmonar, há particularidades quanto à duração ou a utilização de corticoterapia de modo que pode-se prolongar a segunda fase de tratamento (BRASIL, 2011).

Outro aspecto importante é que a TB está relacionada a fatores socioeconômicos, tais como: pobreza, marginalização, exclusão social, desemprego, pouco acesso aos serviços de saúde, condições de moradia e vida precárias. Além disso, o risco no desenvolvimento da TB pode estar associado a fatores que prejudicam o sistema imunológico do hospedeiro, a citar: desnutrição, tabagismo, diabetes, alcoolismo e uso de imunoreguladores (LÖNNROTH et al., 2009; HARLING et al., 2014).

Ainda sobre os fatores de risco para TB, uma atenção especial tem sido dada aos fatores imunogenéticos do hospedeiro, visto que estes podem influenciar na resposta imunológica, resultando em curso de infecção diferente (SOUZA DE LIMA et al., 2016).

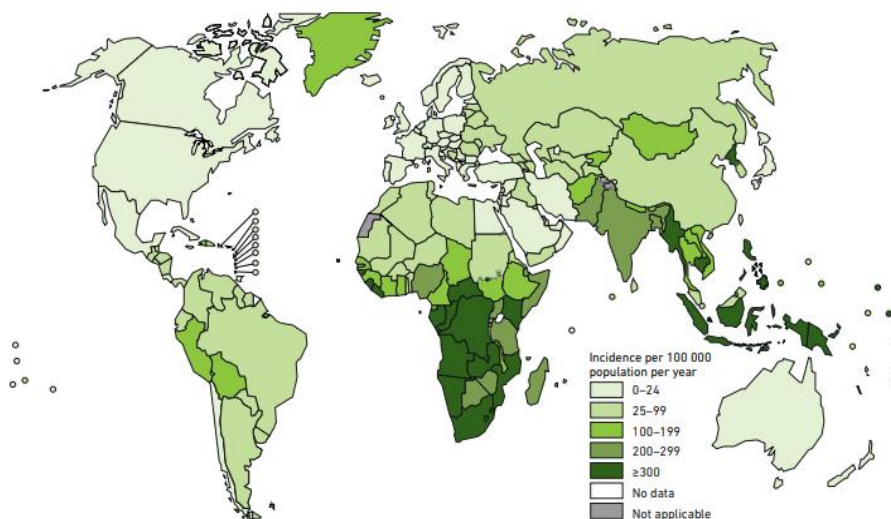
## **2.2 Aspectos epidemiológicos da tuberculose**

De acordo com dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a TB encontra-se como uma das dez principais doenças que ocasionam o maior número de óbitos no mundo (WHO, 2018). Apesar da implementação de programas, campanhas e esforços preventivos, diagnóstico e tratamento universalizado com o intuito de minimizar e controlar a propagação da doença, estima-se que cerca de um terço da população mundial está infectada com o bacilo da TB, causando milhares de óbitos ao ano (BRASIL, 2017a). Mesmo diante de um cenário, no qual, nos anos de 2007 a 2016, houve um declínio nos coeficientes de incidência e mortalidade da TB de 37,9/100 mil habitantes para 32,4/100 mil habitantes e 2,6/100 mil habitantes para 2,2/100 mil habitantes, respectivamente, a TB ainda representa um grave problema de saúde pública (BRASIL, 2017b).

Segundo o boletim epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2017b) no ano de 2015, a doença infecciosa que resultou no maior número de mortes no mundo foi a TB. Neste mesmo ano, houve aproximadamente 10,4 milhões de novos casos de TB, sendo mais comum a ocorrência em homens (56%), seguido das mulheres (34%) e crianças (10% sendo distribuído: 6,4% meninos e 3,6% meninas) (WHO, 2016). Dados

recentes foram publicados no ano de 2017, com registros de aproximadamente 10 milhões de casos novos e 1,3 milhões de óbitos, ocorridos no mundo devido a TB (WHO, 2018).

Estimated TB incidence rates, 2017



**Figura 1-** Estimativa do número de casos de incidência de TB no mundo  
 FONTE: WHO, 2018.

Em relação ao panorama epidemiológico da TB, o Brasil apresenta destaque no que diz respeito aos países com altas taxas de casos de TB, ocupando a 20<sup>a</sup> posição no ranking dos 30 países com maior índice de casos de TB e a 19<sup>a</sup> posição dentre os 30 países com altos índices de coinfeção TB e HIV (WHO, 2016; BRASIL, 2018b), com aproximadamente 69 mil casos novos e 4.500 óbitos a cada ano. Em 2016 foram registrados cerca de 66.796 casos novos, 12.809 casos necessitando de retratamento e 4.426 de óbitos devido a TB (BRASIL, 2017b). Em 2017, foram notificados 69.569 casos novos de TB com coeficiente de incidência de 33,5 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2018a).

No contexto das regiões do Brasil, em 2016 a região Norte foi a que apresentou o maior coeficiente de incidência de TB, sendo de 41,8/100 mil habitantes, seguido da região sudeste com 35,7/100 mil habitantes e nordeste com 30,6/100 mil habitantes. A região sul (27,4/100 mil habitantes) e centro-oeste (19,4/100 mil habitantes) apresentaram os menores índices em comparação com as demais regiões (BRASIL, 2017b). Recentemente, o Ministério da Saúde divulgou um boletim epidemiológico, no qual informou que a região Norte continua sendo a primeira no que diz respeito a coeficiente de incidência de TB (42,7 casos/100 mil habitantes) (BRASIL, 2018a).

O estado do Amazonas ocupou o maior coeficiente de incidência de TB no ano de 2016 (67,2/100 mil habitantes), ultrapassando as taxas de incidência do Rio de Janeiro

(61,2/100 mil habitantes), que ocupou a segunda posição (BRASIL, 2017b). No ano de 2017, o estado do Amazonas permaneceu na primeira posição, com coeficientes de incidência de TB (74,1/100 mil habitantes) mais elevados que os registrados no ano anterior (BRASIL, 2018a).

Da mesma forma, no contexto das capitais do Brasil, Manaus atingiu o maior coeficiente no ano de 2016 com 93,2 casos de TB/100 mil habitantes (BRASIL, 2017b), e também no ano de 2017, com 104,7/100 mil habitantes (BRASIL, 2018a).

Em relação ao coeficiente de mortalidade por TB, em 2016, os estados do Brasil que apresentaram os maiores índices foram Rio de Janeiro, Pernambuco, Amazonas e Pará. O Amazonas foi o terceiro estado com maior coeficiente de mortalidade (3,2/100 mil habitantes) (BRASIL, 2017b). Dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde indicaram que as capitais Recife (6,4/100 mil habitantes), Belém (5,3/100 mil habitantes) e Manaus (4,7/100 mil habitantes) apresentaram os maiores coeficientes de mortalidade no ano de 2017 (BRASIL, 2018a).

### 2.2.1 Panorama epidemiológico das formas clínicas da TB

Recentemente o Ministério da Saúde publicou o “Panorama da Tuberculose no Brasil: diagnóstico situacional a partir de indicadores epidemiológicos e operacionais”, no qual estão informados os dados relacionados às formas clínicas da TB. De acordo com as informações descritas nesta publicação, o Brasil apresentou um coeficiente de incidência de 29,1/100 mil habitantes de TB pulmonar e 4,6/100 mil habitantes de TB extrapulmonar no ano de 2016. Neste mesmo ano foram notificados 60.055 (86,4%) casos novos de TB pulmonar e 9.413 (13,5%) casos de TB extrapulmonar (BRASIL, 2018b).

Na região Norte, o Amazonas registrou um coeficiente de incidência de 58,2/100 mil habitantes para TB pulmonar e 10,0/100 mil habitantes para TB extrapulmonar, sendo notificados 2.329 (85,2%) casos novos para TB pulmonar e 400 (14,6%) casos para TB extrapulmonar. Em Manaus, o coeficiente de incidência foi de 93,5/100 mil habitantes (77,9/100 mil habitantes para TB pulmonar e 15,7/100 mil habitantes para TB extrapulmonar) (BRASIL, 2018b).

Quanto às formas clínicas da TB extrapulmonar, as informações epidemiológicas ainda são escassas. Algumas informações foram disponibilizadas pelo Ministério da Saúde quanto ao coeficiente de mortalidade por TB. Por exemplo, no Brasil (65,7%), no Amazonas (66,7%) e em Manaus (64,7%), o maior número de óbitos da forma clínica de TB

extrapulmonar foi a TB respiratória extrapulmonar (TB da laringe, da traquéia, dos brônquios, pleura e outros) e a menor foi a TB do sistema nervoso (BRASIL, 2018b).

Diante do exposto, este cenário reflete uma realidade que chama atenção e ir a busca de esclarecimentos dos possíveis motivos relacionados às altas taxas de incidência da TB no Amazonas em comparação com os demais estados do Brasil. Neste aspecto, a variabilidade imunogenética em humanos poderá, certamente, contribuir para as diferentes respostas ao bacilo da TB pelo hospedeiro (SOUZA DE LIMA et al., 2016).

### **2.3 Imunopatogenia ao complexo *Mycobacterium tuberculosis***

A infecção pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* envolve uma rede de interações do patógeno ao sistema imunológico do hospedeiro, bem como as estratégias de evasão do sistema imune desencadeadas pelos bacilos (ZAHRT, 2003).

#### **2.3.1 Resposta imune inata**

A infecção inicia quando o indivíduo doente, bacilífero (expelindo micobactérias), ao tossir, falar, espirrar e cantar dispersa gotículas e aerossóis contendo bacilos viáveis no ambiente. Esses bacilos são partículas infectantes que podem permanecer no ar por longos períodos e, ao serem inaladas por um novo hospedeiro, através das vias áreas respiratórias, atingem os alvéolos pulmonares e se estabelecem preferencialmente no pulmão (AMARAL; LASUNSKAIA; D'IMPÉRIO-LIMA, 2016). É importante ressaltar que a inalação de uma pequena quantidade de gotículas (em torno de 1-10 bacilos), que entram no alvéolo pulmonar humano, pode ser suficiente para estabelecer a infecção, dependendo do sistema imunológico do hospedeiro (BOOM et al., 2003; SUNDARAMURTHY; PIETERS, 2007).

Quando os bacilos alcançarem o parênquima pulmonar, são fagocitados por macrófagos alveolares residentes, por células dendríticas e neutrófilos (BEHAR et al., 2014), que foram recrutados para o local da infecção. Esses eventos caracterizam a primeira linha de defesa do hospedeiro, conhecida como resposta imune inata, e, esta, pode ser capaz de eliminar e conter a infecção (KLEINNIJENHUIS et al., 2011), dependendo da exposição, duração do contato, carga bacilar e fatores ambientais, bem como, fatores relacionados a imunidade do hospedeiro (COSCOLLA; GAGNEUX, 2014).

O processo de reconhecimento e internalização das micobactérias pelas células fagocíticas ocorre por meio de receptores de reconhecimento de padrão (PRR). Estes

receptores podem estar presentes nas células imunes ou livres nos líquidos orgânicos do hospedeiro, e que reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), presentes na parede celular da micobactéria, como o complexo lipídico constituído de ácidos micólicos, arabinogalactana e peptidoglicano; glicolípídeos Lipoarabinomanana (LAM), Lipomananas (LM), Fosfatidil inositol-manosídeo (PIM) (KLEINNIJENHUIS et al., 2011), bem como, fatores de virulência secretados pela micobactéria como ESAT-6 (*Early Secreted Antigenic Target*) (AMARAL; LASUNSKAIA; D'IMPÉRIO-LIMA, 2016) e CFP-10 (*10-kDa Culture Filtrate Protein*) (BOOM et al., 2003).

Entre os PRR envolvidos na endocitose de micobactérias estão os receptores semelhantes a toll (TLR), como TLR1 (MORTAZ et al., 2015), TLR2, TLR4, TLR8 (AMARAL; LASUNSKAIA; D'IMPÉRIO-LIMA, 2016) e TLR9 (MORTAZ et al., 2015; O'GARRA et al., 2013). Dentre estes, o TLR2, tem sido descrito como um dos principais PRR envolvidos na detecção de lipoproteínas micobacterianas. Outros PRR que participam, são os receptores de manose, dectina-1 e molécula ligada à adesão intercelular tipo 3 grambina não-integrina de células dendríticas (DC-SIGN - *Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*) (EHLERS, 2010) pertencentes a família dos receptores de lectina tipo C (CLR), bem como receptores Fcγ (FcγR), receptores do complemento (CR), como CR-1, CR-3 e CR-4, receptores de *scavenger* (SR) e receptores semelhantes a NOD (NLR) (DEY; BISHAI, 2014).

A interação entre PAMP e PRR ativa cascatas de sinalização intracelular, como a ativação do NF-κB (*Nuclear factor Kappa B*) para a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, ativação do inflamassoma e autofagia (DEY; BISHAI, 2014). Adicionalmente, essa interação desencadeia o recrutamento de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos em direção à área de intensa resposta inflamatória, causada pelo patógeno, e expressão de moléculas de adesão, produção de quimiocinas e citocinas. Alguns exemplos de citocinas envolvidas nessa resposta são TNF-α, IL-1β, IL-18, IL-12 e IFNγ. Esses mecanismos constituem defesas importantes do hospedeiro contra o bacilo (MORTAZ et al., 2015).

Após a internalização dos bacilos pelas células fagocíticas, as etapas subsequentes são a formação de um fagossomo, em torno do bacilo, e a fusão com o lisossomo resultando no fagolisossomo. O fagolisossomo, por sua vez, contém enzimas líticas que atuam na eliminação do bacilo. No entanto, alguns bacilos viáveis conseguem sobreviver no espaço intracelular do macrófago, através do bloqueio da fusão fagolisossômica e, assim, multiplicar no fagossomo. Outros mecanismos de evasão do sistema imune incluem neutralização de

moléculas antimicrobianas de macrófagos, como produção de óxido nítrico e nitrogênio reativo tóxico (FLYNN; CHAN, 2003).

As micobactérias estabelecidas no interior da célula proliferam de forma logarítmica, resultando num intenso processo inflamatório, devido ao acúmulo de macrófagos e o recrutamento de outras células em direção ao pulmão (KLEINNIJENHUIS et al., 2011). Além disso, as bactérias intracelulares podem ser reconhecidas por PRR citosólicos da família dos receptores NLR, de modo que, a detecção de PAMPs bacterianos pode induzir a formação do complexo inflamassoma que, por sua vez, recruta e ativa caspases e estas atuam ativando e secretando citocinas pró-inflamatórias. Os inflamassomas atuam como componentes chaves, induzindo respostas imunes inatas, logo após a infecção, contra uma ampla variedade de agentes patogênicos (OSAWA; WILLIAMS; SINGH, 2011).

### 2.3.2 Resposta imune adaptativa

Assim como os macrófagos, as células dendríticas também são afetadas pelos mecanismos de defesa do patógeno, de modo que a bactéria consegue sobreviver e se propagar nesse ambiente intracelular (MORTAZ et al., 2015). As micobactérias possuem mecanismos de evasão do sistema imunológico, através da liberação de fatores de virulência e replicação do bacilo nas células. Diante dos diversos mecanismos de evasão, os macrófagos não conseguem promover a eliminação do bacilo e números crescentes do patógeno são expostos ao sistema imune, desencadeando a resposta imune adaptativa (DEY; BISHAI, 2014).

Em torno de duas a três semanas após a infecção, desenvolve-se a imunidade adaptativa por meio da migração de APC (Células apresentadoras de antígeno), como as células dendríticas, que internalizaram o bacilo e migraram para os linfonodos regionais próximos (MORTAZ et al., 2015). Previamente a isso, no interior da APC, ocorre o processamento das proteínas em peptídeos antigênicos micobacterianos. Na TB ocorre uma demora em iniciar a ativação dos linfócitos T e isso contribui para formação do nicho intracelular, durante esse período com intensa multiplicação e disseminação de micobactérias (COOPER; TORRADO, 2012).

Nos linfonodos, as APC interagem com os linfócitos T helper *naive* e para que ocorra ativação do linfócito T são necessários classicamente dois sinais: As APC apresentam peptídeos antigênicos micobacterianos expressos em moléculas MHC de classe II (Complexo

principal de histocompatibilidade), que serão reconhecidos pelo TCR (Receptor de célula T) presentes nos linfócitos T helper. Essa interação trata-se do primeiro sinal de ativação de linfócito T. O segundo sinal envolve a interação de moléculas coestimuladoras, de modo que a molécula CD28 presente na superfície celular do linfócito T ligue-se com a CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2) presente na APC. O segundo sinal promove ativação de vias que atuam de modo sinérgico ao primeiro sinal, bem como sobrevivência, proliferação e produção de IL-2 pelos linfócitos T. Finalmente, o linfócito T será ativado seguido da expansão clonal e diferenciação celular, dependendo do microambiente de citocinas (BEHAR et al., 2014).

Os linfócitos T helper *naive* ativados se diferenciam predominantemente em células efetoras  $T_H1$ , devido à produção de IL-12 pelas células dendríticas. Os linfócitos  $T_H1$  direcionam-se ao local da infecção, proliferam nesta lesão primária e secretam TNF- $\alpha$  e principalmente IFN $\gamma$ . O IFN $\gamma$  potencializa a ação de macrófagos para eliminar e impedir o crescimento bacteriano, amplificando ainda mais a resposta  $T_H1$  e aumentando a expressão de MHC de classe II, para melhorar a resposta contra as micobactérias (KLEINNIJENHUIS et al., 2011).

Os linfócitos T efetores específicos para o antígeno migram da circulação sanguínea para o tecido pulmonar infectado, com o intuito de controlar a infecção local. No tecido pulmonar, ocorre diretamente interação MHC-peptídeo em macrófagos infectados com o patógeno. Embora a resposta predominante seja  $T_H1$ , alguns linfócitos T *naive* se diferenciam em  $T_H2$  (CARDONA, 2017b) e  $T_H17$  (TORRADO; COOPER, 2010).

Outro mecanismo de evasão do sistema imune pelo patógeno é durante a comunicação entre a resposta imune inata e adaptativa, pois as micobactérias alteram o processamento e apresentação de antígenos nos macrófagos e, desta forma, impedem o reconhecimento pelos linfócitos T. O patógeno pode induzir macrófagos a produzirem citocinas inibitórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ . O excesso destas citocinas inibe a função das células T (BOOM et al., 2003; FLYNN; CHAN, 2003).

Os linfócitos T citotóxicos ( $TCD8^+$ ) reconhecem os peptídeos citosólicos micobacterianos, através de moléculas MHC de classe I. Esses peptídeos foram previamente clivados por proteassomas, ligados a MHC-I e transportados para membrana plasmática. Uma vez ativados pelas micobactérias, os  $TCD8^+$  utilizam mecanismos como exocitose de componentes citotóxicos, expressam Fas/FasL (CD95/CD95L) e secretam TNF, de modo que, essas vias culminam na apoptose para eliminar as células alvos infectadas com micobactérias. Logo após a apoptose, macrófagos não infectados fagocitam corpúsculos apoptóticos



infectadas (eferocitose). As micobactérias aprisionadas nesses corpúsculos apoptóticos (eferossoma) são direcionadas ao lisossomo para eliminação (BOOM et al., 2003).

No decorrer da infecção, ocorre a formação do granuloma no tecido pulmonar. O granuloma é um agregado formado por diferentes células imunes, em resposta a estímulos persistentes. A arquitetura do granuloma é constituída de tecido necrótico acelular caseoso central, característico na TB humana, rodeado de populações de macrófagos em diversos estágios de ativação (macrófagos epitelioides, ativados, células gigantes de Langhans entre outros). Ao redor dessas células, têm-se os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, linfócitos B, bem como, podem apresentar neutrófilos, células dendríticas e fibroblastos responsáveis pela formação da cápsula fibrótica periférica (CADENA; FORTUNE; FLYNN, 2017). As citocinas envolvidas na formação do granuloma são: TNF, IFN- $\gamma$  e quimiocinas como a CCL3, envolvidas nesse recrutamento celular (MONIN; KHADER, 2014).

A formação do granuloma é considerada bastante dinâmica e tem sido alvo de discussão por alguns autores. Ao mesmo tempo em que alguns pesquisadores o consideram somente como protetor ou estático devido ser um mecanismo para controlar a replicação e disseminação dos bacilos, outros já o consideram como responsável pela reinfecção pulmonar em consequência do movimento constante de células que ocorrem no granuloma (CARDONA, 2017a).

Durante esse processo, alguns bacilos conseguem sobreviver no interior da massa necrótica, formada devido a morte de macrófagos. Esses macrófagos envelhecidos, contendo restos celulares da necrose intragranulomatosa bem como bacilos dormentes, se transformam em macrófagos espumosos, chegando ao esôfago e atingindo o sistema gastrintestinal onde alguns são finalmente expelidos do corpo e outros alcançam a faringe. Quando os macrófagos espumosos direcionam-se a faringe, alguns são destruídos, liberando os bacilos que se tornam parte dos aerossóis. Diante disso, ocorre a reinfecção pulmonar e assim contribui para a reativação da doença em casos de TB latente (CADENA; FORTUNE; FLYNN, 2017). O intenso processo inflamatório gerado ocasiona a destruição do parênquima pulmonar, comprometendo a funcionalidade dos pulmões, resultando em insuficiência respiratória e óbito do paciente (AMARAL; LASUNSKAIA; D'IMPÉRIO-LIMA, 2016).

Diante do exposto, dentre os diversos patógenos infecciosos existentes, *M. tuberculosis* é com certeza um dos mais bem sucedidos da história, visto que ao longo do tempo adquiriu capacidade de se adaptar e desencadear mudanças na resposta imune do hospedeiro. Assim, tornando-se um grande obstáculo para o controle e erradicação da doença (GALAGAN, 2014).

## 2.4 Polimorfismos em genes da resposta imune à tuberculose

Os estudos genéticos contribuem para esclarecer as relações filogenéticas e a diversidade interindividual da patogênese ao complexo de MTBC. Sabe-se que, tanto os fatores genéticos do hospedeiro como fatores ambientais, exercem influências sobre uma variedade de doenças. Nesse contexto, estudos com polimorfismos têm sido alvos de pesquisa, pelos quais podemos compreender a grande variabilidade genética existente entre indivíduos e tentar esclarecer os motivos de determinados grupos populacionais serem mais suscetíveis ou resistentes a determinadas doenças (STUCKI; GAGNEUX, 2013).

Os polimorfismos constituem variações na sequência de DNA. Essas variações podem ser de trocas, inserções, deleções ou repetições de um ou mais nucleotídeos. Quando ocorrem modificações de um único nucleotídeo (A, T, C, G), em um local específico do genoma, tem-se a variante conhecida como Polimorfismo de Base Única (SNP- *single nucleotide polymorphism*) (BROOKES, 1999). Os SNP podem estar presentes em qualquer região do genoma humano, constituído aproximadamente de 3,2 bilhões de pares de bases. Estes SNP podem estar situados em regiões promotoras, éxons, íntrons entre outras. No geral, as regiões onde a maioria dos SNP estão localizados são as não-codificantes do genoma (KIM; MISRA, 2007).

Os SNP em regiões codificadores podem ser classificados em sinônimos e não-sinônimos. SNP não-sinônimos (ou não-silenciosos) resultam em uma substituição na sequência de aminoácidos, resultando em modificações na estrutura da proteína (BOOPATHI, 2013). De acordo com as características dos aminoácidos implicados na troca, essa substituição pode ser conservativa ou não-conservativa. Os SNP sinônimos (ou silenciosos) ocorrem quando a alteração em um nucleotídeo da molécula não modifica o seguimento proteico, entretanto alteram tanto a conformação como estabilidade do RNA mensageiro, influenciando a concentração da proteína sintetizada (GRIFFITHS et al., 2009).

Além disso, podem ser classificados em SNP de transição e transversão. SNP de transição é quando ocorre a troca entre bases nitrogenadas de naturezas estruturais iguais, como a troca entre duas bases purínicas (A/G ou G/A) ou entre duas bases pirimidínicas (C/T ou T/C). O SNP de transversão ocorre quando há substituição entre bases nitrogenadas de naturezas estruturais distintas como a troca de uma base nitrogenada purínica por pirimidínica e vice-versa (C/A ou C/G ou A/T) (BROOKES, 1999).

Os SNP são encontrados em mais de 1% da população, constituindo a variação genética mais abundante no genoma e, dependendo da sua localização em diferentes regiões

do genoma, podem ter impacto funcional e fisiológico na formação de uma determinada proteína. SNP na região promotora pode influenciar na expressão gênica e assim ocasionar a expressão anormal do produto final; codificadoras (éxons) alteram a região a ser transcrita, afetando a estrutura e estabilidade na formação de uma proteína (KRAWCZAK et al, 1992; GRIFFITH, 2009) e na região intrônica pode influenciar a atividade transcricional ou a eficiência de *splicing* do RNAm (COOPER, 2010).

Os estudos com SNP são importantes para elucidar as bases moleculares de diversas doenças comuns, autoinflamatórias (MANTHIRAM et al., 2017) e infecciosas como HIV (PONTILLO et al., 2012). Assim como ajudar na compreensão da complexidade e função da fisiologia humana, das origens e ascendência das populações (DARVASI et al., 2017), além de atuar como promissores biomarcadores para o diagnóstico ou prognóstico de doenças. No entanto, o conhecimento sobre frequência, natureza, distribuição e identificação de associação entre as formas alélicas no gene ainda são consideradas limitadas, principalmente, em genes envolvidos na resposta imune a TB (SHEN et al., 2015).

Em relação a TB, os estudos com SNP vêm sendo realizados para verificar se existe associação entre os polimorfismos estudados e o desenvolvimento da doença, visto que essas alterações na sequência do DNA, de componentes envolvidos na resposta imune a TB, são conhecidas por influenciar na suscetibilidade ou na resistência a infecção (PONTILLO et al., 2012; SOUZA DE LIMA et al., 2016). Da mesma forma, SNP em genes que codificam inflamassomas e seus componentes relacionados, têm sido associados à patogênese da TB e, portanto, sendo objeto de estudo por parte da comunidade científica. Alguns estudos de polimorfismos em genes envolvidos na resposta imune a TB estão descritos no **Quadro 1**.

**Quadro 1** - Estudos de polimorfismos em genes envolvidos na resposta imune a TB

Gene	Polimorfismo	População	Tipo de TB	Resultados	Referência
<i>IL-10</i>	-1082G/A -819C/T -592A/C	Turca	Pulmonar Extrapulmonar	Risco	ORAL et al. 2006
<i>IL-17A</i>	-152G/A	Caucasiana	Pulmonar	Risco	OCEJO-VINYALS et al. 2013
<i>IFNGR1</i>	+189T/G +95C/T	Iraniana	Pulmonar	Proteção	NADERI et al. 2015
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	+2109C/T +874A/T + 3234C/T	Taiwanesa Chinesa	Pulmonar	Risco	LEE et al. 2015 LI et al. 2017
<i>IL-18</i>	-137G/C	Chinesa	Pulmonar	Risco	ZHOU et al. 2015
<i>TLR1</i>	-248C/T +1805T/G	Indiana Amazonense	Pulmonar Pulmonar e Pleural	Proteção Risco	DITTRICH et al. 2015 BARLETTA-NAVECA et al. 2018
<i>TLR4</i>	896 A/G 1196C/T	Indiana	Pulmonar	Risco	GENE; SINGH et al. 2018
<i>TLR7</i> <i>TLR8</i>	IVS2-151G/A -129G/C	Chinesa	Pulmonar	Risco	LAI et al. 2016
<i>NLRP3</i>	+37562G/C	Brasileira-amazônica	Pulmonar	Protetor	SOUZA DE LIMA et al. 2016
<i>CARD8</i>	+21058T/C	Brasileira-Recifense	Pulmonar	Risco	PONTILLO et al. 2013
<i>P2X7</i>	+1096C/G -762C/T 489C/T	Brasileira-amazônica Chinesa	Pulmonar Extrapulmonar Espinhal	Risco Risco	SOUZA DE LIMA et al. 2016 ZHOU et al. 2018

## 2.5 Inflamassoma: estrutura, ativação e regulação

Os inflamassomas foram caracterizados por Martinon et al. (2002) e compreendem complexos moleculares multiproteicos, de alto peso molecular, formados no citosol da célula. Esse complexo é responsável pelo recrutamento e ativação de caspases e indução da célula infectada a piroptose (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009).

As caspases são zimogênios inativos pertencentes à família cisteína-aspartato-proteases, que desempenham papéis importantes na apoptose e no processamento e maturação de citocinas pró-inflamatórias. Dentre as caspases inflamatórias humanas, que incluem as caspases - 1, 4, 5 e 12, a caspase-1 é a mais bem caracterizada (STROWIG et al., 2012). Por sua vez, as caspases clivam formas precursoras de citocinas, como pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18, em suas formas maturadas IL-1 $\beta$  e IL-18, respectivamente. A IL-1 $\beta$  e IL-18 são potentes

citocinas inflamatórias liberadas no ambiente extracelular (NADIRI; WOLINSKI; SALEH, 2006).

De maneira geral, membros de famílias de proteínas podem funcionar como sensores inatos capazes de formar inflamassomas. Desta forma, os inflamassomas podem pertencer as seguintes famílias: receptor NOD (NLR) (*NOD-like receptor (NLR) Family*), PYHIN (*PYD-like and HIN domain-containing proteins*) e TRIM (*Tripartite motif proteins*). Dentre os tipos de inflamassomas descritos na literatura tem-se o NLRP1 (conhecido também como NALP1), NLRP2, NLRP3 (ou NALP3), NLRP6, NLRC4 (ou IPAF), AIM2, IFI16 e PYRIN. Os inflamassomas NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRC4 pertencem à família NLR, enquanto o AIM2 e o IFI16 pertencem a família PYHIN. O PYRIN pertence a família TRIM (YU et al., 2017).

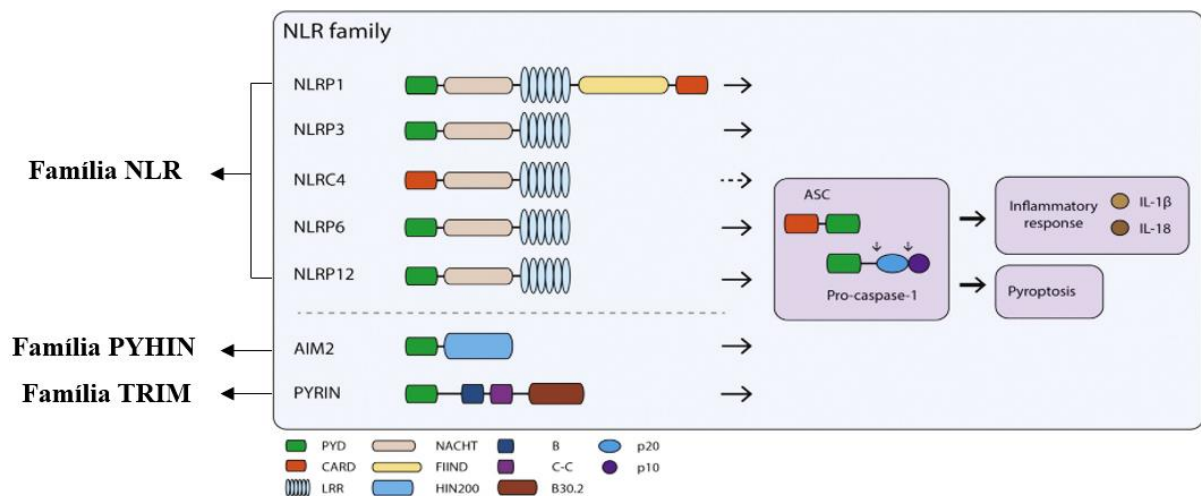
A família NLR é composta por 22 membros de receptores expressos em humanos, classificadas em cinco subfamílias de acordo com a natureza do domínio efetor N-terminal em NLRA (CIITA), NLRB (*NAIP-neuronal apoptosis inhibitory protein*), NLRC (NOD1, NOD2, NLRC3, NLRC4 e NLRC5), NLRP (NLRP1-14) e NLRX (NLRX1). A subfamília NLRA apresenta um domínio de transativação ácida (AD); NLRB, composta do domínio BIRs (*Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*); NLRC constituído do domínio CARD; NLRP caracterizado pela presença de um domínio de pirina (PYD) e NLRX contém o domínio NLRX1, proteína que contém uma sequência de direcionamento mitocondrial (AWAD et al., 2018).

A estrutura molecular dos inflamassomas pertencentes à família NLR é constituída de três domínios principais: LRR (Domínio rico em repetições de leucina) C-terminal, envolvido no reconhecimento do antígeno; domínio central NACHT o qual está presente em todos os membros da família NLR, sendo responsável pela oligomerização NLR, dependente de ATP, e um domínio efetor de interação proteína-proteína que pode ser PYD (Domínio de pyrin) ou/e CARD (Domínio C terminal recrutador e ativador de caspase) que medeiam as interações homotípicas entre as proteínas (**Figura 2**) (BARBÉ; DOUGLAS; SALEH, 2014).

O primeiro PRR descrito da subfamília NLRP capaz de formar o complexo inflamassoma foi o NLRP1 codificada por um gene *NLRP1*, único localizado no cromossomo 17p13.2 com 18 éxons. Em contraste com outros membros da subfamília NLRP, em humanos é constituído por cinco domínios, sendo três comuns da família NLR (LRR, NACHT contendo o domínio efetor CARD na região C-terminal) (YU et al., 2017). Além desses, é composto de um domínio FIIND e domínio PYD na região N-terminal (autoinibitório).

Embora tenha sido o primeiro inflamassoma descrito, trata-se de um complexo pouco caracterizado (PLACE; KANNEGANTI, 2018).

Dentre os inflamassomas descritos, o NLRP3 é, até o momento, o mais bem caracterizado e estudado em comparação com os demais (JO et al., 2016). O NLRP3 é codificado pelo gene *NLRP3* com 10 éxons localizados no cromossomo 1q44. Estruturalmente, é constituído por três domínios comuns da família NLR (LRR, NACHT contendo o domínio efetor PYD) e é ativado pelos mais variados e diferentes estímulos através de uma via canônica ou não-canônica (AWAD et al., 2018).

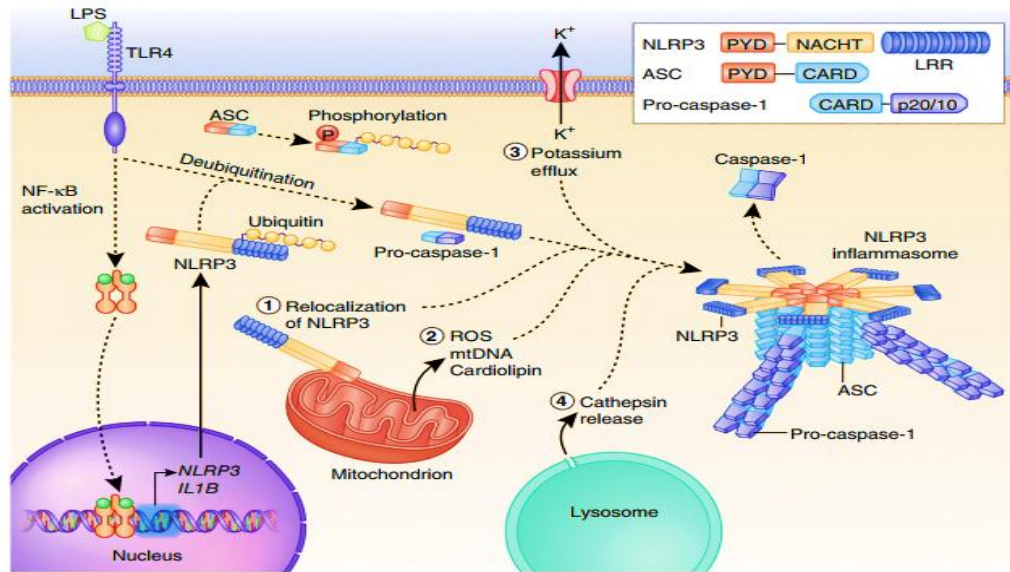


**Figura 2** - Famílias de inflamassomas, classes e seus domínios estruturais

Os inflamassomas podem pertencer a três principais famílias: NLR, PYHIN e TRIM. Os NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6 e NLRP12 pertencem a família NLR, sendo a maioria constituída de domínio LRR, NACHT e domínio efetor PYD ou CARD (este último no caso do NLRC4). Diferentemente dos demais, o NLRP1 apresenta domínio N-terminal PYD e um segundo domínio efetor C-terminal CARD mais um domínio interno FIIND. AIM2 e o IFI16 pertencem a família PYHIN e PYRIN pertencente à família TRIM. A figura também mostra a proteína adaptadora ASC formada por domínios CARD e PYD e a pró-caspase-1 com seus domínios PYD e caspase com subunidade p20 e p10. LRR: Domínio rico em repetições de leucina; NACHT: Domínio de ligação a nucleotídeos central; PYD: Domínio de pyrin; CARD (Domínio C terminal recrutador e ativador de caspase); FIIND: Domínio com função para encontrar; HIN200: *hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens* com 200 aminoácidos.

FONTE: Adaptado de Yu et al., 2017.

Modelos foram propostos para explicar o mecanismo de ativação desse complexo de modo que, dependendo do estímulo envolvido, poderá ativar diferentes inflamassomas. O processo de ativação do inflamassoma pode ser iniciado em macrófagos, logo após o reconhecimento de diversos estímulos. Esse processo difere, quanto aos mecanismos para o reconhecimento dos ligantes, e pode ocorrer tanto em respostas a sinais endógenos, como exógenos. A ativação do inflamassoma NLRP3, por exemplo, inicia a partir de dois sinais (**Figura 3**) (LAMKANFI; DIXIT, 2014).



**Figura 3-** Estímulos e mecanismos de ativação do inflamassoma mais caracterizado NLRP3. O inflamassoma NLRP3 pode ser ativado através de dois sinais. O primeiro sinal envolve o reconhecimento de PAMP, DAMP ou moléculas endógenas por PRR. O segundo sinal é através de ativação direta de diferentes estímulos como moléculas liberadas pela mitocôndria (ROS, DNA, cardiolipina); efluxo de íons  $K^+$ ; catepsina B. PRR: Receptores de reconhecimento padrão; ROS: Espécies reativas de oxigênio. FONTE: Adaptado de GUO et al., 2015.

O primeiro sinal é comum aos demais inflamassomas e envolve o reconhecimento de PAMP, DAMP ou moléculas endógenas, por PRR presentes na superfície celular do hospedeiro. Essa interação ativa a via de transdução de sinais do NF- $\kappa$ B que transcreve as formas precursoras das citocinas (pró-IL1 $\beta$ , pró-IL18 e pró-caspase-1), regulando o aumento da expressão e ativação do NLRP3. O segundo sinal envolve uma ativação direta denominada como a via canônica, através de diversos estímulos como algumas moléculas liberadas pela mitocôndria (ROS, DNA e cardiolipina), efluxo de íons intracelulares de potássio pela ligação de ATP extracelular de patógenos microbianos com P2X7R (Receptor purinérgico), proteases lisossômicas liberadas após desestabilização da membrana como catepsina B no citoplasma celular, devido à fagocitose de partículas extracelulares, presença de patógenos e/ou toxinas bacterianas (FRANCHI; MUÑOZ-PLANILLO; NÚÑEZ, 2012; GUO; CALLAWAY; TING, 2015).

Dentre esses diversos estímulos citados anteriormente tem-se a catepsina B, codificada pelo gene *CTSB* (*Lysosomal cysteine protease cathepsin B*) com 16 éxons e localizado no cromossomo 8p23.1 (YANG et al., 2016). Este gene está envolvido em codificar um membro da família C1 de peptidases. Geralmente, membros dessa família atuam como endopeptidases, no entanto algumas delas podem atuar como exopeptidases também (DICKINSON, 2002).

Durante o processo de *splicing* alternativo do gene *CTSB* pode codificar produtos proteicos como a catepsina B. A catepsina B é uma enzima presente nos lisossomas das células pertencentes a família C1 e subfamília C1A da classe de enzimas cisteíno-proteases, por apresentar na região do sítio catalítico resíduos de cisteína e histidina. Estas enzimas podem atuar intracelularmente na degradação ou no processamento de proteínas lisossomais e, também, na matriz extracelular (CYGLER et al., 1996) ativando inflamassomas (GUO; CALLAWAY; TING, 2015; LI et al., 2013).

Esses estímulos desencadeiam a ativação dos sensores NLRs monoméricos que fisiologicamente se encontram na sua forma inativada, devido a conformação do domínio LRR. Uma vez ativados inicia o processo de oligomerização, com a transdução de sinal propagada através dos domínios efetores (Domínios CARD ou PYD), dando início a montagem do inflamassoma. A montagem do inflamassoma ocorre através da associação entre NLR e a proteína adaptadora ASC (composta de um domínio CARD-PYD) que recruta pró-caspase-1, através do domínio CARD. Nos processos finais, a pró-caspase-1, anexada ao complexo, ativa caspase-1 e matura as formas precursoras das citocinas (**Figura 3**) (VLADIMER et al., 2013).

Adicionalmente, a caspase-1 ativada cliva gasdermina-D, liberando o domínio efetor N-terminal do domínio inibidor C-terminal. A porção N-terminal da proteína se liga a componentes lipídicos na membrana celular, formando um poro de 10-16 nm de diâmetro pelo qual substratos de menor diâmetro, como IL-1 $\beta$  e IL-18 são secretados. Clivagens da gasdermina-D resultam em diversos poros da membrana ocasionando à ruptura da membrana e indução da piroptose, de forma a liberar todo o conteúdo celular. O intuito da piroptose é eliminar o nicho de replicação de patógenos intracelulares para favorecer fagocitose (FENG; FOX; MAN, 2018).

Pesquisas recentes identificaram uma via alternativa de ativação do inflamassoma NLRP3 denominado via não-canônica, dependente da caspase-11 presente em camundongos, caspases ortólogas em humanos são as caspases-4 e caspases-5) (EMMA; BROUGH; MORTELLARO, 2015). Essas caspases são ativadas ao ligarem-se diretamente ao LPS das bactérias Gram-negativas independente do TLR4, resultando no processamento da IL-1 $\beta$  de forma dependente ou independentemente da caspase-1 (NARDO; PELLEGRINI, 2017).

No que se refere a ativação do receptor NLRP1, este apresenta uma característica específica que o difere dos outros receptores que formam os inflamassomas, visto que para ocorrer a sua ativação, é necessário uma autoclivagem no domínio FIIND (Yu et al., 2017). A oligomerização do receptor para formar o inflamassoma NLRP1 ocorre através do domínio



CARD que é o domínio efetor. Apesar de apresentar o domínio PYD, este é autoinibitório. O domínio efetor CARD da proteína NLRP1 pode interagir recrutando a proteína ASC ou pela associação direta com a pró-caspase-1 através dos domínios CARD, respectivamente. Quando ocorre interação com a proteína ASC é necessária mais uma molécula ASC para recrutar pró-caspase-1. Uma vez esta interação estabelecida, ocorrem às etapas subsequentes comuns ao inflamassoma NLRP3 (KESAVARDHANA; KANNEGANTI, 2017). Algumas moléculas foram descritas para ativar o inflamassoma NLRP1, como o MDP (Dipetídeo de muramil), fragmento de peptidoglicano bacteriano (CHAVARR; VANCE; VANCE, 2015)

Outro inflamassoma pertencente à família NLR que merece ser mencionado é o NAIP/NLRC4. O NAIP localizado na região do cromossomo 5q13 com 19 exons e o NLRC4 no cromossomo 2p22.3 e com 11 exons. Estruturalmente, o receptor NAIP é formado pelos domínios BIR, NACHT e LRR e o NLRC4 é constituído pelos domínios LRR, NACHT e o domínio efetor CARD (GONG; JIANG; ZHOU, 2018). Antigamente, estudos direcionavam somente o NLRC4 como o receptor que reconhecia diretamente a flagelina dos microorganismos. Atualmente, sabe-se que o receptor da família NLR que realmente se liga a flagelina é o NAIP. Assim, este inflamassoma se destaca por necessitar de dois NLR para ocorrer a oligomerização (VANCE, 2015).

Em humanos, o inflamassoma NAIP é ativado por componentes bacterianos relacionadas da T3SS (Sistema de secreção do tipo 3) e flagelina de bactérias (KESAVARDHANA; KANNEGANTI, 2017). O processo de ativação deste inflamassoma ocorre após o NAIP ser ativado pela flagelina. Uma vez ativado, este interage com NLRC4. A ativação do NLRC4 pode ou não recrutar a proteína ASC para ativar a caspase-1 (VANCE, 2015).

A família PYHIN é constituída pelos inflamassomas AIM2 (*Absent in melanoma 2*) e o IFI16 (*Interferon-inducible protein 16*). O AIM2 foi o primeiro receptor não pertencente à família NLR caracterizado por formar inflamassoma. É codificado pelo gene *AIM2* localizado no cromossomo 1q23.1-q23.2 com 11 exons. Estruturalmente, o AIM2 é formado pelo domínio PYD N-terminal e uma proteína denominada HIN200 (*Hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens* com 200 aminoácidos) C-terminal (KESAVARDHANA; KANNEGANTI, 2017). O domínio HIN200 se liga ao dsDNA, tanto de bactéria quanto de vírus, e o domínio PYD recruta o ASC para montar o complexo inflamassoma (WANG; YIN, 2017). O IFI16 é codificado pelo gene *IFI16* localizado no cromossomo 1q23.1 com 14 exons. Semelhante ao AIM2, o IFI16 contém os domínios PYD e HIN200. A diferença consiste na quantidade do domínio HIN200 visto que no caso do receptor IFI16, este apresenta dois

domínios HIN200 (JAKOBSEN et al., 2014). O AIM2 se liga preferencialmente a dsDNA e IFI16 ss e dsDNA (JIN et al., 2012).

A família TRIM é composta por inflamassoma PYRIN, codificado pelo gene *MEFV* localizado no cromossomo 16p13.3 com 10 exons. A proteína pirina contém cinco domínios: PYD N-terminal, b-ZIP (*Basic leucine zipper domain*) e B-box, que interagem com moléculas-alvo, domínio *coiled-coil* e um domínio B30.2 C-terminal (AWAD et al., 2018).

O modelo proposto para ativação da proteína e, por sua vez, formar o inflamassoma envolve algumas vias bioquímicas. A pirina humana se mantém inativada devido a interação entre os resíduos de serinas fosforilados por quinases PKN1 e PKN2, efetoras de RhoA, com as proteínas 14-3-3. As serinas envolvidas são Ser208, Ser209 e Ser242 agrupadas, sendo esta última a principal determinante para esta interação. Toxinas bacterianas, como as toxinas A e B do *Clostridium difficile*, ativam a pirina por desfosforilação. O resultado disto é que impede a ligação com as proteínas 14-3-3, inativando o gene RhoA e as quinases. Desta forma, sem a fosforilação dos resíduos de serina, as proteínas 14-3-3 não conseguem interagir com a pirina, resultando na sua ativação. Em consequência disto, a pirina é ativada, recruta a proteína ASC e pró-caspase-1, formando assim o complexo inflamassoma (XU et al., 2014).

Os inflamassomas mais bem caracterizados em demonstrar envolvimento no reconhecimento de bactérias foram: NLRC4, NLRP3 e AIM2. No entanto, as pesquisas têm direcionado o envolvimento dos inflamassomas NLRP1, NLRP6, NLRP7 e NLRP12 (VLADIMER et al., 2013).

Os inflamassomas necessitam ser regulados rigorosamente por diferentes moléculas endógenas, presentes no hospedeiro, com o intuito de evitar danos indesejáveis, por exemplo, os ocasionados através de uma ativação exacerbada. Deste modo, a regulação de forma inibitória da ativação do inflamassoma é necessária, para permitir o equilíbrio e a duração adequada de sua função, e para o controle de respostas inflamatórias excessivas. Assim, diferentes moléculas estão envolvidas na regulação negativa da atividade do inflamassoma como a proteína CARD8 (JO et al., 2016).

As proteínas que contém o domínio de recrutamento de caspases (CARD) são moléculas adaptadoras encontradas em diversas proteínas como helicases, quinases, proteínas mitocondriais, caspases, como também em fatores citoplasmáticos. Diferentes funções são atribuídas a essas proteínas, principalmente, nas respostas inflamatórias como também apoptóticas (PATHAN et al., 2001). Estas podem interagir com outro domínio CARD (interação CARD-CARD) e ativar caspases, na montagem de proteínas contendo CARD na regulação da apoptose, na regulação da expressão gênica relacionadas a permanência celular e

nas respostas imunológicas pela sinalização via NF- $\kappa$ B. As proteínas contendo CARD são classificadas em dois grandes grupos, um baseado na regulação de caspases e outro na ativação do NF- $\kappa$ B (HONG; JUNG, 2002).

Dentre as proteínas envolvidas na regulação de caspases tem-se CARD8, também conhecida como TUCAN (*Tumor-up-regulated CARD-containing antagonist of caspase nine*) por ser bastante expressa no câncer (PATHAN et al., 2001) ou CARDINAL (*CARD inhibitor of NF- $\kappa$ B-activating ligands*) (HONG; JUNG, 2002). A proteína CARD8 pertence a família de domínio do recrutamento da caspase membro 8, codificada pelos 13 éxons no gene *CARD8*, localizada no cromossomo 19q13.33 (MCGOVERN et al., 2006).

A CARD8, proteína de 48 kDa, é composta de uma região N-terminal (domínio FIIND) e domínio C-terminal CARD. Através de análises de RT-PCR foi identificado que o gene *CARD8* é expresso no intestino (MCGOVERN et al., 2006), placenta, baço, linfonodos e tecidos da medula óssea e na linhagem celular monocítica (THP-1) (RAZMARA et al., 2002). Outro estudo realizado, nessa mesma linhagem celular monocítica, demonstrou que o inflamassoma NLRP1 forma complexo com a proteína CARD8, ASC, caspase-5 e caspase-1 (VLADIMER et al., 2013). Da mesma forma, o NLRP3 parece se associar às proteínas adaptadoras ASC e CARD8, através da interação entre o domínio FIIND do CARD8 e o domínio NOD do NLRP3 para formar o inflamassoma (AGOSTINI et al., 2004; JO et al., 2016; VERMA et al., 2008).

A proteína CARD8 regula de forma inibitória a apoptose e múltiplos caminhos da ativação sinalização do NF- $\kappa$ B (BOUCHIER-HAYES et al., 2001). Esta proteína regula a secreção de IL-1 $\beta$ , através de interação inibitória com caspase-1 do NLRP3 (ITO; HARA; KUBOTA, 2014) e/ou atuando através de mecanismos inibitórios na formação de pró-IL-1 $\beta$  pela via NF- $\kappa$ B (EKLUND et al., 2014; RAZMARA et al., 2002). Além da caspase-1, CARD8 interage também com caspase-9. Essa interação entre CARD8 e caspases ocorre através das interações homotípicas CARD-CARD (PATHAN et al., 2001).

Em relação à sinalização NF- $\kappa$ B, o CARD8 parece interagir com a subunidade IKK $\gamma$ , conhecida também como NEMO do complexo de quinases I $\kappa$ B (IKK). Desta forma, a proteína CARD8 inibe uma sinalização importante na inflamação, a via NF- $\kappa$ B (BOUCHIER-HAYES et al., 2001).

A patogênese de diferentes doenças inflamatórias, autoinflamatórias, autoimunes e doenças infecciosas, têm sido associadas à ativação irregular de inflamassomas. Nesse contexto, estudos têm demonstrado que polimorfismos nos genes de inflamassomas e componentes relacionados podem estar envolvidas nas doenças inflamatórias, bem como

infecciosas, devido esses polimorfismos ocasionarem alterações nas atividades ou funções destes genes (JO et al., 2016).

Portanto, polimorfismos associados a genes de inflamassomas como *NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2* e componentes relacionados como *CARD8* e *CTSB* podem alterar o equilíbrio da resposta imune inata, ativar ou inibir os respectivos e resultar em diferentes respostas na patogênica da doença. No entanto, nota-se que são raros os estudos de polimorfismos em genes de inflamassomas direcionados para doenças infecciosas (PARAMEL; SIRSIÖ; FRANSÉN, 2015).

## **2.6 Polimorfismos em genes de inflamassomas nas infecções micobacterianas**

Os estudos de polimorfismos em genes que codificam para as proteínas dos inflamassomas e componentes relacionados em humanos, infectados por micobactérias, ainda são considerados raros. Nesse contexto, poucos estudos foram realizados e, entre estes, tem-se o estudo realizado por Souza de Lima et al. (2016) que avaliaram os polimorfismos em diversos genes de inflamassomas (*NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2*, *CARD8*, *IL1B*, *IL18*, *IL1R1*, *P2X7* e *CTSB*) na população da região amazônica, e encontraram que o polimorfismo no gene *NLRP3* (rs10754558), o genótipo G/G foi o menos frequente no grupo de pacientes, sugerindo um papel protetor do alelo G no desenvolvimento da TB. Em relação ao gene *P2X7* (rs2230911), genótipo G/G, foi significativamente mais frequente no grupo dos pacientes, sugerindo que a presença deste SNP, aumenta o risco ao desenvolvimento TB pulmonar ativa.

Neste mesmo estudo, o gene *CTSB* (rs8898), que codifica para a catepsina B, o genótipo T/T, foi frequente no grupo controle, seguindo a mesma linha protetora para TB, o que é plausível, considerando que a catepsina B é um ativador do inflamassoma NLRP3.

No que se refere ao gene *CARD8*, pesquisadores analisaram que o polimorfismo no gene *CARD8* (rs2043211) substituiu um resíduo inicial por um códon de parada (C10X), ocasionando uma mutação *non-sense* em algumas isoformas do *CARD8*. Isto resultou na diminuição da expressão do gene *CARD8* e, conseqüente, perda da inibição mediada por essa proteína e, conseqüentemente, houve um aumento na expressão de IL-1 $\beta$  (KO et al., 2009).

Outro estudo, ao avaliar a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, em indivíduos que apresentavam o polimorfismo Q705K de NLRP3 (rs35829419), em combinação com esse mesmo polimorfismo C10X do gene *CARD8* (rs2043211) nos macrófagos, derivados de

monócitos humanos, constatou-se que houve maior controle da infecção, em comparação ao grupo controle, sugerindo que essa variação genética elevou os níveis de IL-1 $\beta$  (EKLUND et al., 2014). Um estudo anterior, realizado *in vitro*, mostrou que este mesmo polimorfismo Q705K em NLRP3 representa uma mutação com ganho de função, responsável por uma hiperatividade do inflamassoma NLRP3 (VERMA et al., 2012).

Pontillo et al. (2013) ao analisarem a contribuição do SNP no gene *CARD8* em pacientes HIV positivos, coinfectados com *Mycobacterium tuberculosis*, constataram que o polimorfismo no gene *CARD8* (rs6509365) foi associado a suscetibilidade a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, ressaltando que o polimorfismo genético do inflamassoma, principalmente neste gene, parece contribuir fortemente no desenvolvimento de doenças.

Em conjunto, os resultados destas pesquisas sugerem que polimorfismos em genes para inflamassomas, bem como em componentes relacionados, parecem contribuir na patogênese da TB e que outros estudos precisam ser realizados, envolvendo polimorfismos em regiões diferentes destes genes. A partir disto, analisar se outros polimorfismos podem estar associados à suscetibilidade ou proteção ao desenvolvimento da TB. Portanto, os estudos imunogenéticos sobre os inflamassomas na resposta imune a TB, podem ajudar a elucidar os mecanismos envolvidos e, possivelmente, explicar a grande ocorrência de casos de TB no Amazonas (ABEL et al., 2017).

*Objetivos*

---

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar polimorfismos de base única (SNP) em genes de inflamassomas *NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2* e componentes relacionados *CARD8* e *CTSB* em pacientes com TB.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos, em genes de inflamassomas e seus componentes relacionados, em pacientes com TB pulmonar e TB extrapulmonar.
- Avaliar se a combinação de haplótipos dos genes de inflamassomas *NLRP1* e *AIM2* podem estar associadas ao desenvolvimento de TB.
- Verificar se os polimorfismos no gene relacionado ao inflamassoma *CTSB* estão associados com a concentração de IL-1 $\beta$  no plasma sanguíneo.

*Metodologia*

---



## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Tipo de estudo**

O estudo é observacional prospectivo para avaliar os polimorfismos de base única (SNP), nos genes de inflamação e componentes relacionados, em pacientes com TB pulmonar, TB extrapulmonar e controles (saudáveis).

### **4.2 População de estudo**

A população de estudo foi constituída por indivíduos provenientes do Amazonas, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 anos, os quais foram recrutados na Policlínica Cardoso Fontes, referência em pneumologia no estado do Amazonas.

### **4.3 Grupos estudados e critérios de inclusão**

Os grupos estudados foram: os pacientes com TB pulmonar (Grupo 1), pacientes com TB extrapulmonar (Grupo 2) e indivíduos saudáveis que têm contato/convivência próxima com os pacientes de TB (Grupo 3).

#### **4.3.1 Critérios de inclusão**

Nos grupos estudados foram incluídos pacientes com diagnóstico clínico e/ou laboratorial de tuberculose pulmonar (com diagnóstico laboratorial positivo para TB pulmonar), TB extrapulmonar e os contatos dos pacientes de TB, que são os indivíduos que convivem com pacientes com TB, mas que não desenvolveram a doença. Os grupos incluídos no estudo foram: pacientes com TB pulmonar (Grupo 1), pacientes com TB extrapulmonar (Grupo 2) e contatos de pacientes com TB (Grupo 3). Os critérios de inclusão propriamente ditos foram os seguintes:

#### 4.3.1.1 Grupo 1: Pacientes com TB pulmonar

Os pacientes com TB pulmonar foram os sintomáticos respiratórios, que se encontram no início do tratamento, com resultados positivos “*Mycobacterium tuberculosis* detectável” para o Teste Rápido Molecular (TRM, GeneXpert MTB/RIF), ou pacientes que tiveram uma ou duas baciloscopias de escarro positivas e/ou cultivo do escarro com isolamento de *M. tuberculosis*, ou pacientes com baciloscopia e cultivo do escarro com resultados negativos, mas que iniciaram o tratamento para TB por possuírem imagem pulmonar compatível (raios-x ou tomografia).

#### 4.3.1.2 Grupo 2: Pacientes com TB extrapulmonar

Nesse grupo foram incluídos os pacientes diagnosticados para TB extrapulmonar em tratamento ou com o tratamento finalizado, de acordo com as seguintes características:

- Pacientes suspeitos clinicamente de TB extrapulmonar, de qualquer topografia, com diagnóstico de Tuberculose extrapulmonar baseado em resultado positivo de cultivo de amostra biológica para *Mycobacterium tuberculosis*, e/ou por exame molecular positivo para complexo *M. tuberculosis* ou para região gênica específica de *M. tuberculosis*, em tratamento ou já tratados para Tuberculose.

- Pacientes suspeitos clinicamente de Tuberculose extrapulmonar, de qualquer topografia, sem diagnóstico por método microbiológico ou molecular, mas com presença de achados histopatológicos sugestivos de Tuberculose, como presença de granulomas, com ou sem necrose caseosa e de células gigantes e de bacilos álcool-ácido resistentes, em tratamento ou já tratados para Tuberculose.

- Pacientes suspeitos clinicamente de Tuberculose extrapulmonar, de qualquer topografia, sem diagnóstico por método microbiológico, molecular e/ou histopatológico, mas que tenham sido submetidos à prova terapêutica por mais de três meses com drogas antituberculosas, tendo ou não já finalizado o esquema terapêutico.

#### 4.3.1.3 Grupo 3: Contatos de pacientes com TB

Os contatos são indivíduos que convivem com os pacientes com TB e estavam acompanhando os mesmos por ocasião do diagnóstico laboratorial ou tratamento na referida policlínica, bem como os profissionais de saúde que atenderam os pacientes de TB pulmonar.

### 4.4 Critérios de exclusão

Indivíduos com TB que apresentaram as seguintes comorbidades: câncer, diabetes, Aids, hepatites e doenças autoimunes bem como os indivíduos HIV positivos, gestantes, transplantados ou que estiveram fazendo uso de algum imunorregulador não foram incluídos no projeto.

Pacientes em que houve o isolamento e identificação de micobactérias não causadoras de TB (NTM).

Contatos que no decorrer do projeto apresentaram sintomas respiratórios e/ou resultados da baciloscopia e/ou cultivo positivo para *M. tuberculosis*.

### 4.5 Recrutamento e coleta dos dados dos pacientes e controles

O recrutamento dos pacientes e contatos foi realizado na Policlínica Cardoso Fontes. As coletas iniciaram em 2016 em função da realização do projeto intitulado “Polimorfismos de base única (SNP) em genes de inflamassomas associados a tuberculose extrapulmonar”. Rotineiramente, nesta policlínica ocorreu o primeiro atendimento no setor denominado “Aprazamento 1” por parte de um funcionário da policlínica, local onde são fornecidas as orientações sobre tratamento e as autorizações para liberação dos medicamentos.

O convite para participar do projeto, a explicação do projeto, a leitura e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndices I e II) foram realizadas no Aprazamento 1, assim como o preenchimento da ficha de cadastro com dados epidemiológicos (Apêndices III e IV).

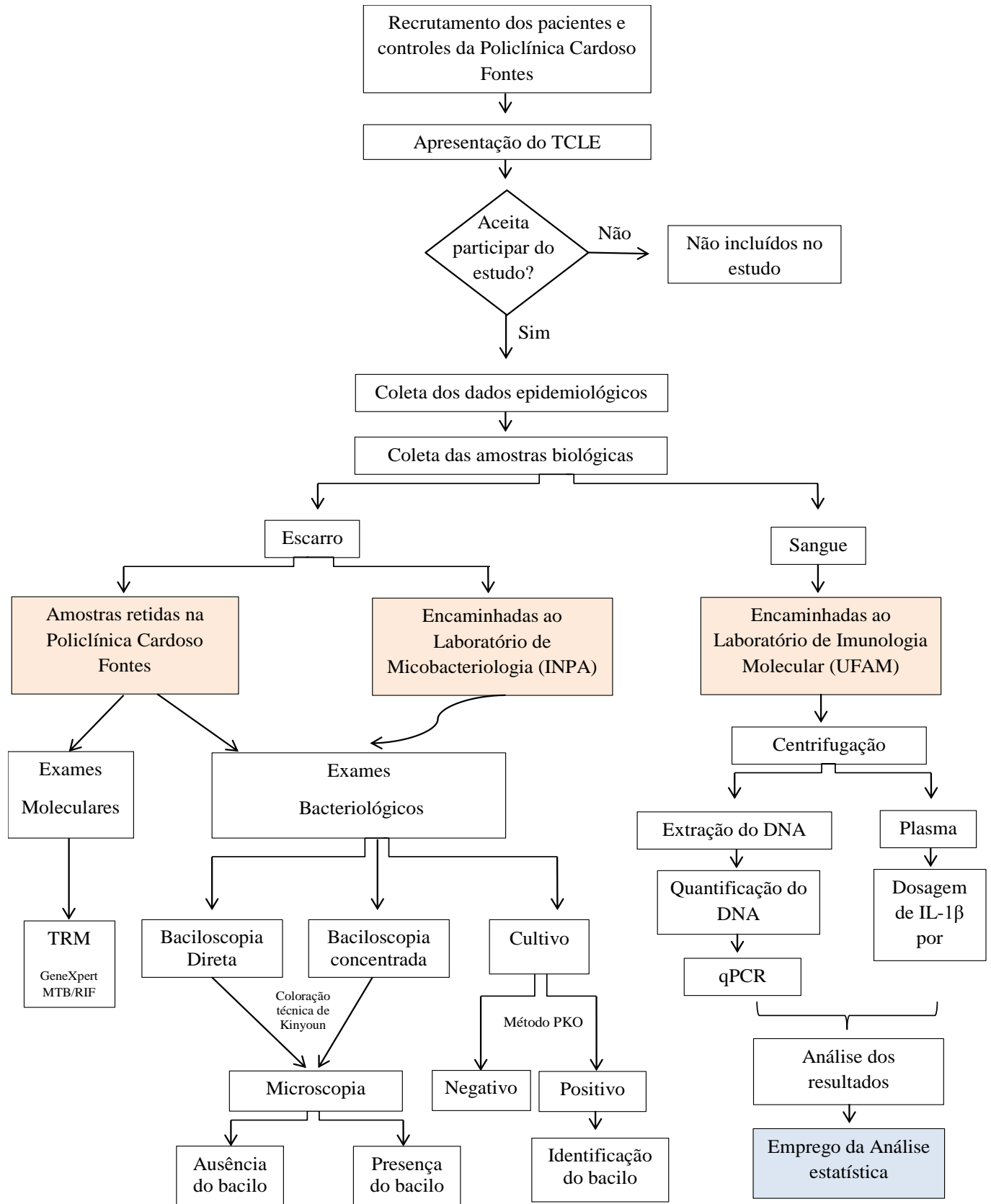
## 4.6 Cálculo amostral

Para definição do tamanho da amostra foi realizado um cálculo aproximado baseado no número de casos diagnosticados para TB na Policlínica Cardoso Fontes no ano de 2015.

Em 2015, 395 casos novos de TB pulmonar e 285 casos novos de TB extrapulmonar foram diagnosticados na Policlínica. O programa Gpower versão 3.1 foi utilizado e adotou-se o valor de  $\alpha = 0,05$  (5%),  $\beta = 0,1$  (10%), poder da amostra de 0,95 e o tamanho da população de 395 pacientes com TB pulmonar e 285 pacientes com TB extrapulmonar. O resultado do número amostral foi de 195 indivíduos com TB pulmonar e 164 indivíduos com TB extrapulmonar e 359 controles, que seriam os acompanhantes dos pacientes.

## 4.7 Amostras biológicas

As amostras biológicas dos pacientes e controles utilizadas nesse projeto foram escarro e sangue total, coletados em local ou sala apropriados para cada tipo de amostra clínica, respectivamente, da Policlínica Cardoso Fontes. Nesta policlínica, as amostras são analisadas por exames rotineiros como a Baciloscopia direta e/ou TRM (GeneXpert MTB/Rif). No entanto, para esta pesquisa foi solicitada também ao paciente a coleta de amostra de escarro, quando eles tinham condições físicas de realizar o procedimento de coleta após a assinatura do TCLE. As amostras de escarro foram encaminhadas ao laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e, as amostras de sangue, foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia Molecular (LIM), do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (**Figura 4**).



**Figura 4** - Fluxograma das atividades que foram realizadas durante o projeto

#### **4.8 Exames micobacteriológicos nas amostras de escarro**

No Laboratório de Micobacteriologia do INPA, as amostras de escarros foram registradas e identificadas com código numérico e data da coleta.

As amostras de escarros foram submetidas aos exames de microscopia e cultivo. Para a microscopia do escarro foi utilizada a técnica de baciloscopia direta (BRASIL, 2001; BRASIL, 2008) e baciloscopia pós-concentração (SALEM et al., 1990), com coloração da lâmina pela técnica de Kinyoun (KENT; KUBICA, 1985) e visualização em microscópio óptico em objetiva de imersão no aumento de 1000X. O cultivo foi realizado, segundo a metodologia de Salem et al. (2007), pelo método PKO (iniciais em homenagem a Petroff, Kudoh e Ogawa). As micobactérias que se desenvolvem no meio de cultivo foram identificadas como *M. tuberculosis* por PCR, utilizando primers específicos para o elemento de inserção IS6110 (HERMANS et al., 1990; VAN EMBDEN et al., 1993).

#### **4.9 Extração de DNA das amostras de sangue**

A técnica de extração de DNA em amostras de sangue foi feita pela metodologia descrita por Gustincich et al. (1991) com modificações, baseada na precipitação do DNA por sais de brometo de tetrametilamônio (DTAB/CTAB). Após a retirada do sobrenadante (plasma) e coleta da camada de leucócitos (Buffy coat), o detergente catiônico DTAB (Brometo de dodecil-trimetil amônio) lisou as membranas celulares e nucleares. Com a adição de clorofórmio ocorreu a desproteíntização, de modo que o DNA ficasse na fase aquosa. A recuperação do DNA foi realizada por precipitação seletiva com o CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), seguida de lavagens para a purificação do DNA. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro de luz UV e armazenadas no freezer -20°C, devidamente codificados e datados até o momento do uso.

#### **4.10 Genotipagem por PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) – Ensaio TaqMan**

A identificação dos polimorfismos dos genes de inflamassoma e componentes relacionados foi realizada pela técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) em equipamento QuantStudio 3 Real-Time PCR da *Applied System*. Neste estudo foram utilizadas

sondas fluorescentes de hidrólise TaqMan com sequências alelo-específicas, as quais permitem a genotipagem de indivíduos para um SNP específico.

Para cada gene, as reações foram feitas em uma microplaca de 96 poços onde foram adicionados os seguintes reagentes: TaqMan Genotyping Master mix, sondas TaqMan específicas para cada variante estudada, DNA e água ultrapura suficiente para atingir um volume final de 11  $\mu\text{L}$  na concentração e quantidades fornecidas, conforme descrito no **Quadro 2**. O Master mix otimizado foi uma mistura composta de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), tampão, a enzima DNA polimerase e o ROX (Referência passiva). Este último é uma referência interna necessária para corrigir as variações de fluorescência, devido a mudanças de concentração ou volume (variação da pipetagem).

Para cada microplaca de reação foi incluída um controle negativo contendo todos os reagentes descritos anteriormente, com exceção do DNA, com a finalidade de garantir que não houvesse contaminação dos reagentes utilizados na reação com DNA. Além disso, 3 (três) controles positivos foram incluídos: um referente ao heterozigoto, um homozigoto para o alelo 1 e um homozigoto para o alelo 2, para aumentar a confiabilidade dos resultados.

**Quadro 2** - Condições de reação de qPCR usadas para as sondas *NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2*, *CARD8* e *CTSB*

Reagentes	Concentração utilizada	Quantidade utilizada para 1 reação ( $\mu\text{L}$ )
TaqMan Genotyping Master Mix 2X	1X	5
Sonda 20X	0,5X	0,5
DNA	50ng/ $\mu\text{L}$	1
H <sub>2</sub> O ultrapura	1X	4,5
Volume final	---	11,0

O valor do *Threshold* corresponde ao nível de detecção onde a fluorescência acumulada alcança a intensidade acima do ruído, de modo que o *Threshold* das amostras analisadas foi de 0,04. A *baseline* consiste no limiar mínimo de detecção na qual a fluorescência gerada pela amplificação não ultrapassou o ruído do meio do equipamento. As sondas alelos-específicas sintetizadas pela *Thermo Fisher Scientific* utilizadas para genotipagem (**Quadro 3**) e as condições de amplificação são apresentadas no **Quadro 4**.

**Quadro 3** – Características das sondas utilizadas no experimento

Gene	Polimorfismo	Cromossomo	Sequência da sonda 5'-[VIC/FAM]-3'	Alelo
<i>NLRP1</i>	rs35865013	17:5512596	GGTAAAGGAGATGGGTGGGTGGG GC[A/G]TGAAGGACCCGAAAGACA AGGCCAG	A - selvagem G - polimórfico
<i>NLRP3</i>	rs3806265	1:247423034	ATGCTTGGCAGGTGGACAGCAGA AG[C/T]TGTTTTGAAACTAGGAGT GCAGAAA	C - polimórfico T - selvagem
<i>AIM2</i>	rs1103577	1:159130525	TAAAAGGCACTTCCATTCACTCAT T[C/T]GCTCAAGCCAGAAAGCCGG GAATCA	C - polimórfico T - selvagem
<i>CARD8</i>	rs2009373	19:48216157	TGCTATCAAAAAAAAAAAAAAGCAT GA[C/T]TGTGACACCTGGAAAAAA TCTTTT	C - polimórfico T - selvagem
<i>CTSB</i>	rs1692816	8:11846948	ACACAGCCCTCTTCCCCAGCCCCT C[A/C]CCTGCCTGCCCAATCCAGCC CTATT	A - polimórfico C - selvagem

**Quadro 4** - Sondas e condições de termociclagem utilizadas no experimento

Gene		Termociclagem	
<i>NLRP1</i>	Pre-read stage	60°C – 00':30"	1 ciclo
<i>NLRP3</i>	Hold stage	95°C – 10':00"	1 ciclo
<i>AIM2</i>	PCR stage	95°C – 00':15"	50 ciclos
<i>CARD8</i>	PCR stage	60°C – 01':00"	
<i>CTSB</i>	Post-read stage	60°C – 00':30"	1 ciclo

A interpretação dos resultados foi feita com software (QuantStudio™ Design&Analysis Software v1.4.2) de discriminação alélica, de acordo com a curva de amplificação gerada, e assim, permitindo a identificação dos genótipos. O genótipo de determinada amostra é classificado em homocigoto para o alelo normal, homocigoto para o alelo polimórfico ou heterocigoto.

#### 4.11 Quantificação da citocina IL-1 $\beta$ por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

A quantificação da citocina IL-1 $\beta$  nas amostras de plasma foi realizada por ELISA, utilizou-se o kit comercial BioLegend's ELISA MAX™ Deluxe Sets. O ELISA foi realizado conforme as instruções do fabricante. A curva-padrão foi realizada nas seguintes concentrações: 125 pg/mL; 62,5 pg/mL; 31,3 pg/mL; 15,6 pg/mL; 7,8 pg/mL; 3,9 pg/mL; 2,0 pg/mL e o Branco. A leitura foi realizada no espectrofotômetro de placas da BioRad com filtro de 450 nm. Os resultados foram expressos em densidade ótica (DO) e, posteriormente, convertidos em pg/mL.



### **4.13 Aspectos éticos**

Este projeto está vinculado ao projeto maior, sob título “Polimorfismos de base única (SNP) em genes de inflamassomas associados a tuberculose extrapulmonar”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (via Plataforma-Brasil/CEP-UFAM), sob responsabilidade da professora Aya Sadahiro. O parecer consubstanciado foi emitido em 17 de agosto de 2016, sob o número do CAAE: 51291915.1.0000.5020 (Anexo I). Neste projeto, os pacientes com TB pulmonar e controles também foram previstos, embora o projeto aprovado pelo CEP tenha como foco principal a TB extrapulmonar.

### **4.14 Apoio Financeiro**

Este projeto teve apoio financeiro do Laboratório de Imunologia Molecular (LIM), Laboratório de Micobacteriologia do INPA (com apoio do projeto “Testes rápidos para avaliação da resistência de *Mycobacterium tuberculosis* à Isoniazida e Rifampicina, a partir de amostras de escarros multibacilares de pacientes com Tuberculose pulmonar”, Edital PPSUS, financiado pela FAPEAM) e do Laboratório de Imunogenética da USP.

### **4.15 Análise Estatística**

Para esta análise foi realizada a estatística descritiva dos dados obtidos nos grupos de TB pulmonar, TB extrapulmonar e controle. Os polimorfismos foram testados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg na população avaliada através do programa Haploview, assim como foi utilizado este mesmo programa para derivar os haplótipos (BARRETT et al., 2005). O software estatístico R, versão 3.4.3, ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) junto o pacote “SNPassoc”, versão 1.9-2, foi utilizado para realizar as análises de regressão múltipla (associação de genótipos). A análise de associação foi realizada para quatro modelos genéticos: Codominante (comparação da frequência homocigoto para o alelo polimórfico, heterocigoto e homocigoto para o alelo selvagem) no qual expressa simultaneamente ambos os alelos; Modelo dominante (comparação da frequência de homocigoto para o alelo selvagem versus de heterocigoto + homocigoto para o alelo polimórfico entre os grupos estudados); Modelo recessivo

(homozigoto para o alelo selvagem + heterozigoto versus homozigoto para o alelo polimórfico); Overdominate (Comparação das frequências homozigoto para o alelo selvagem + homozigoto para o alelo polimórfico versus heterozigoto) no qual avalia o genótipo heterozigoto. Para cada SNP foi apresentado o melhor modelo. Foi adotado um limiar significativo de  $p < 0,05$ .

Para a análise das concentrações de citocinas entre os diferentes grupos e versus genótipos foi utilizada o teste de ANOVA (Análise de variância não paramétrico). O programa GraphPadPrism® (versão 7.0) foi utilizado para estas análises dos resultados com citocinas. O nível de significância empregado foi de  $p < 0,05$ , com o intervalo de confiança de 95%.

*Resultados e discussão*

---

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Descrição da população recrutada

No presente estudo foram incluídos 1126 participantes, destes 434 foram pacientes de tuberculose pulmonar (TBP), 143 de tuberculose extrapulmonar (TBE) e 549 controles. A extração de DNA das amostras coletadas foi realizada com 100,0% de sucesso. As informações coletadas durante a entrevista dos participantes estão nas fichas apresentadas nos apêndices III (Pacientes) e IV (Contatos), sendo consideradas nesse estudo as seguintes variáveis: idade, sexo, naturalidade, vacinação por BCG, tabagismo e alcoolismo (**Tabela 1 e 2**).

Em relação as amostras testadas para a identificação dos polimorfismos dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2*, *CARD8* e *CTSB*, em 1091 amostras foi possível realizar a genotipagem. Trinta e cinco amostras (3,2%) sendo treze de TBP, nove de TBE e treze de controles foram excluídas do ensaio, pois não amplificaram nos ensaios de qPCR, provavelmente pela existência de algum inibidor na amostra. Por este motivo, para as análises de genotipagem foram consideradas o n=1091, destes 421 foram de pacientes TBP, 134 de TBE e 536 de controles (**Tabela 4 e 6**).

### 5.2 Características gerais da população estudada

Em relação às características da população estudada, nos grupos dos pacientes com TBP e TBE a maioria foi do sexo masculino com 61,3% e 57,3%, respectivamente (**Tabela 1**), confirmando que a TB acomete mais homens (BRASIL, 2016), dados comparáveis aos obtidos por Hill et al. (2006) em um estudo realizado na população africana, no que os autores descrevem a TB foi mais frequente em homens (65,0%) que em mulheres (35,0%). Acredita-se que essas diferenças sejam provenientes de fatores relacionados a cultura popular, visto que em algumas sociedades são os homens que trabalham fora do ambiente domiciliar, representando o alicerce financeiro familiar, expondo-os a grande número de contatos sociais e diferentes afecções. Adicionalmente, há também o fato das mulheres procurarem mais os serviços de saúde, principalmente na faixa etária entre 45 a 64 anos, e uma melhor adesão ao tratamento parece contribuir para uma menor ocorrência de TB em mulheres (EPHREM et al., 2015; RHINES, 2013).

Quanto à idade da população estudada, foi observada uma faixa de 18 a 60 anos, tanto para o grupo dos pacientes com TBP e TBE, quanto dos controles, com média de aproximadamente 38,0; 34,0 e 32,0 anos (**Tabela 1**), respectivamente. Da mesma forma, como apontam os estudos epidemiológicos, a TB acomete geralmente trabalhadores nessa faixa etária, a qual reflete período de grande produtividade no trabalho (BRASIL, 2016).

Em relação à naturalidade, a maioria dos pacientes e controles eram originários da cidade de Manaus. É necessário destacar que o estado do Amazonas representa há cinco anos, o estado brasileiro com o maior coeficiente de incidência para TB (BRASIL, 2018b), pois sabe-se que pessoas que vivem ou trabalham, em locais com alta carga da doença, correm maior risco de exposição ao agente causador da TB (CENTIS, 2018), no qual possivelmente poderia explicar as maiores ocorrências de TB na presente região.

**Tabela 1** - Características gerais da população estudada: controles, pacientes com TB pulmonar (TBP) e extrapulmonar (TBE)

Características gerais	CONTROLES n=549	TBP n=434	TBE n=143
<b>Sexo</b>			
Masculino, n (%)	282 (51,4%)	266 (61,3%)	82 (57,3%)
Feminino, n (%)	267 (48,6%)	168 (38,7%)	61 (42,7%)
Idade (anos), (M <sup>a</sup> e (SD <sup>b</sup> ))	32,9±12,5	38,1±13,7	34,6±14,1
<b>Naturalidade</b>			
Manaus (%)	69,3%	53,1%	56,9%
Outros municípios do AM (%)	18,0%	30,9%	28,5%
Outros Estados (%)	12,7%	16,0%	14,6%

Legenda: M<sup>a</sup> = Média; SD<sup>b</sup>=Standard deviation. AM=Amazonas.

As análises quanto às variáveis vacinação por BCG, tabagismo e alcoolismo são mostradas na **Tabela 2**. Dos 1126 pacientes e controles, foi possível analisar 830 quanto à vacinação por BCG, 746 para tabagismo e 589 para a variável alcoolismo.

A vacina BCG é considerada a mais antiga e amplamente utilizada, principalmente em países endêmicos para TB, com a finalidade de proteger contra formas disseminadas da doença, sendo administrada para todas as crianças entre o nascimento e o primeiro mês de vida (MARTIN; AGUILO; GONZALO-ASENSIO, 2018). A eficácia da BCG é altamente variável em crianças e adultos, visto que em crianças protege contra formas graves da doença e em adulto é parcialmente eficaz contra a TBP (MANGTANI et al., 2014). Apesar das limitações da BCG, a relação benefício-risco e controle da disseminação da doença, a

vacinação é considerada favorável, conferindo proteção por até 20 anos (KHOSHNOOD et al., 2018).

Quanto à variável vacinação por BCG, neste estudo, foi associada ao efeito protetor contra a TB pulmonar ( $p=0,0007$ ;  $OR=0,36$ ). No entanto, curiosamente observou-se que 85% dos pacientes com TBP e 82,6% com TBE foram vacinados, ou seja, a maioria dos pacientes não deveria ter desenvolvido a doença, se a BCG foi associada a proteção. Estes resultados demonstram que a BCG pode ser protetora, mas certamente a condição imunológica e os fatores imunogenéticos colaboram para o desfecho no desenvolvimento da doença, mesmo que o indivíduo tenha sido vacinado.

No estudo realizado por Barletta-Naveca et al. (2018) na população amazonense, demonstrou que a vacina BCG foi associada ao efeito protetor ao avaliarem pacientes com TB pulmonar. Contudo, na comparação entre os grupos TBP e TBE não houve associação estatisticamente significativa.

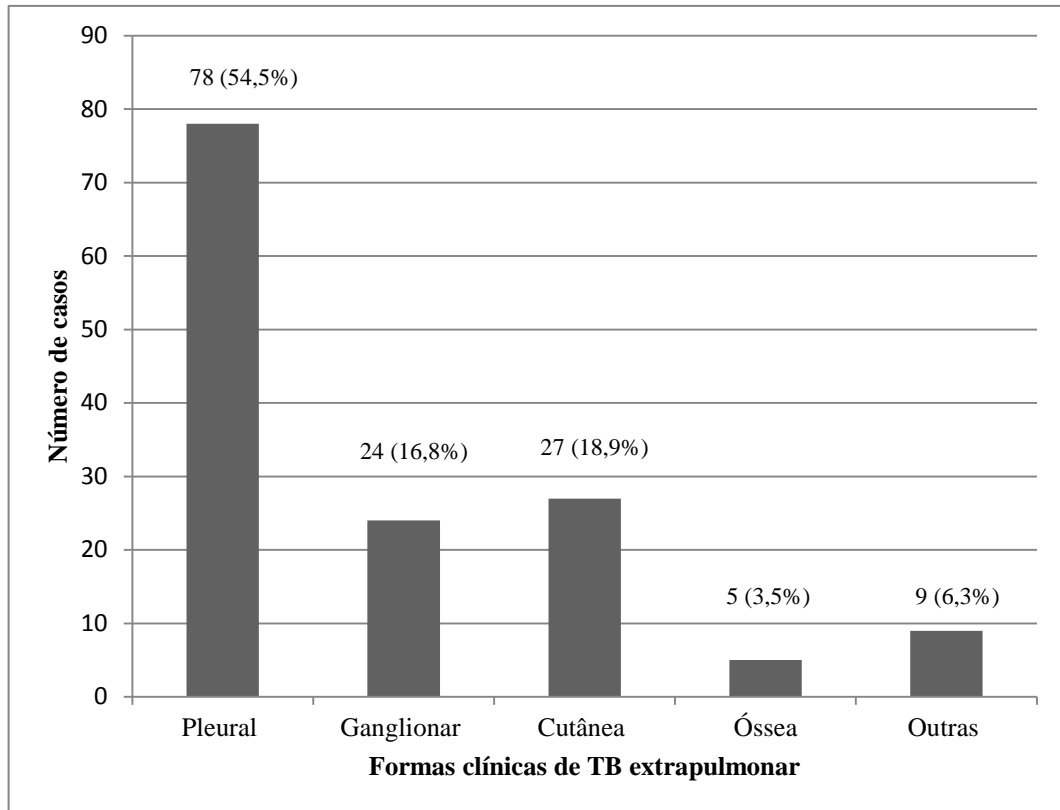
Na análise das variáveis tabagismo e alcoolismo, ambas foram associadas ao risco as formas clínicas de TBP e TBE ( $p=<0,0001$ ). Esses resultados confirmam o estabelecido, pela maioria das pesquisas, como dois fatores de risco para TB. Centis (2018) relata que o uso de tabaco influencia na progressão da infecção latente para doença ativa, no insucesso do tratamento e aumento do número de óbitos por TB. Além disso, no estudo realizado por Altet et al. (2017), o tabagismo foi caracterizado como o principal fator associado aos resultados falso-negativos do teste IGRA (*Interferon gamma release assay*), gravidade da doença e resultados negativos na cultura.

Em relação ao alcoolismo, na meta-análise realizada por Imtiaz et al. (2017), o consumo de álcool foi associado a um risco aumentado para TB em todas os estudos analisados e um contribuinte principal à carga da TB da doença. Adicionalmente, tem sido associado como causa secundária de deficiência de micro e macro-nutrientes, prejudicando a imunidade do hospedeiro (RAVIGLIONE; YEW; MIGLIORI, 2011).

**Tabela 2** - Características gerais da população estudada: controles, pacientes com TB pulmonar (TBP) e extrapulmonar (TBE) quanto as variáveis vacinação BCG, tabagismo e alcoolismo

Características gerais	CONTROLES	TBP	TBE	TBP vs. CONTROLES			TBP vs. TBE		
				OR	IC95%	Valor-p	OR	IC95%	Valor-p
<b>Vacina BCG</b>	<b>n=339</b>	<b>n=359</b>	<b>n=132</b>	<b>OR</b>	<b>IC95%</b>	<b>Valor-p</b>	<b>OR</b>	<b>IC95%</b>	<b>Valor-p</b>
Sim, n (%)	317 (93,5%)	305 (85,0%)	109 (82,6%)	<b>0,36</b>	<b>0,20- 0,63</b>	<b>0,0007</b>	0,87	0,47-1,6	0,7893
Não, n (%)	17 (5,0%)	45 (12,5%)	14 (10,6%)						
Não sabe, n (%)	5 (1,5%)	9 (2,5%)	9 (6,8%)						
<b>Tabagismo</b>	<b>n=304</b>	<b>n=307</b>	<b>n=135</b>						
Sim, n (%)	29 (9,5%)	72 (23,5%)	30 (22,2%)	<b>2,90</b>	<b>1,80- 4,59</b>	<b>&lt;0,0001</b>	1,07	0,65-1,75	0,8727
Não, n (%)	275 (90,5%)	235 (76,5%)	105 (77,8%)						
<b>Alcoolismo</b>	<b>n=263</b>	<b>n=202</b>	<b>n=124</b>						
Sim, n (%)	32 (12,2%)	75 (37,1%)	29 (23,4%)	<b>4,26</b>	<b>2,69-6,70</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>1,93</b>	<b>1,16-3,16</b>	<b>0,0138</b>
Não, n (%)	231 (87,8%)	127 (62,9%)	95 (76,6%)						

**Legenda:** Para as análises de associação a BCG, tabagismo e alcoolismo foi aplicado o teste de  $\chi^2$  com correção de Yates. Controles, pacientes com TB pulmonar (TBP) e pacientes com TB extrapulmonar (TBE). NR: Não realizado. Valores  $p < 0,05$  foram considerados significativos, *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%).



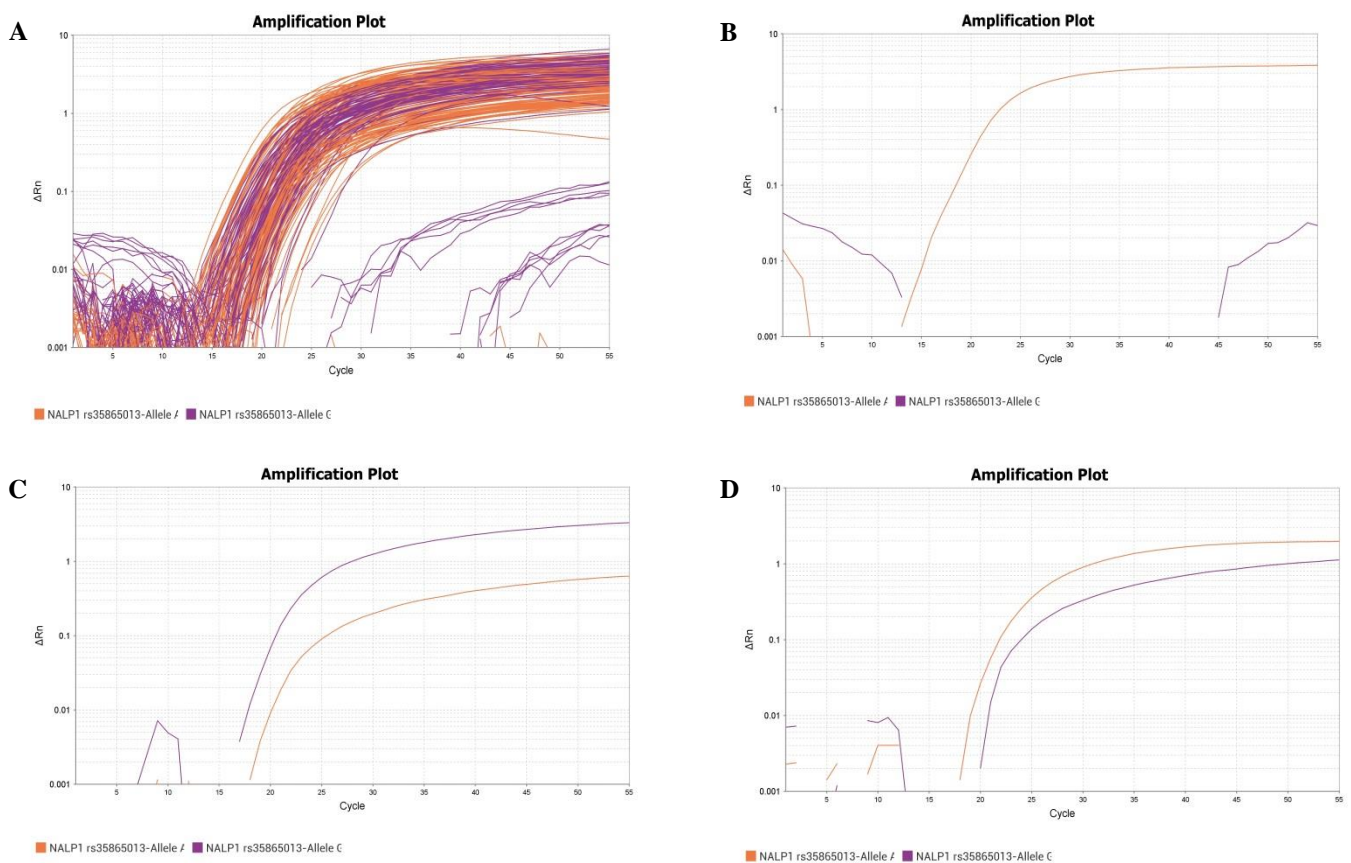
**Gráfico 1** - Número de casos das formas clínicas da TB extrapulmonar neste estudo.

Com relação às formas clínicas da TB, os pacientes incluídos apresentaram principalmente a forma pulmonar, TBP (75,2%). No que diz respeito às formas clínicas da TB extrapulmonar, TBE, neste estudo a forma pleural foi a mais frequente (54,5%), seguida da cutânea (18,9%) e ganglionar (16,8%) (**Gráfico 1**). As formas menos frequentes foram à óssea (3,5%) e outras (intestinal, perianal, ocular, anal e Miliar) (6,3%). Os resultados obtidos no presente estudo foi semelhante ao estudo epidemiológico realizado por Gomes et al. (2014) no Brasil, nos anos de 2007 a 2011, quanto a frequência da forma clínica pleural (42,0%), que também foi a mais frequente dentre as TBE, seguida pela forma ganglionar (21,0%). Outro estudo realizado no estado do Texas (EUA) por Qian et al. (2018), a forma linfática (32,3%) foi a mais frequente, seguida da pleural (15,7%), óssea (12,2%) e meníngea (7,5%).



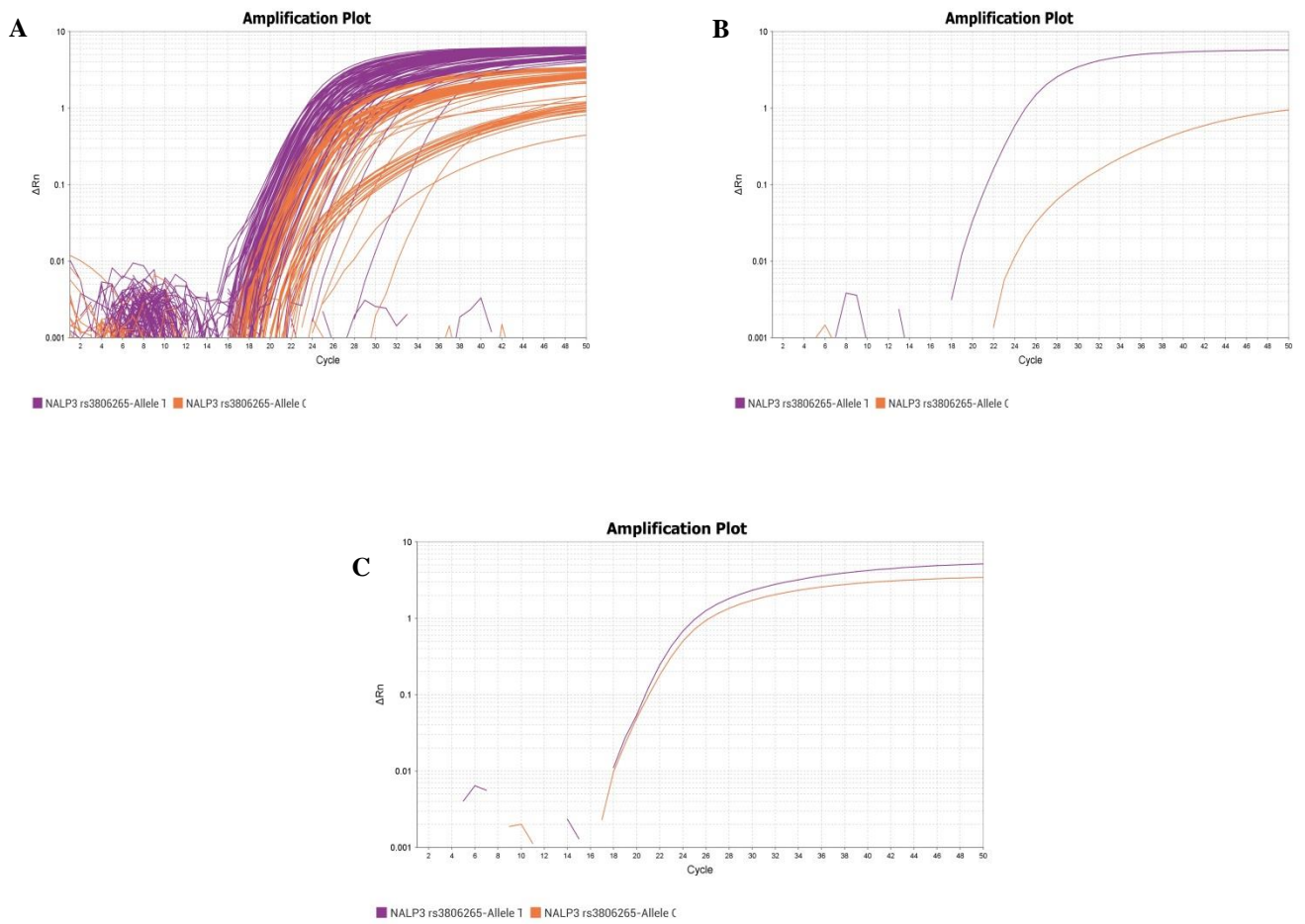
### 5.3 Análise dos polimorfismos nos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2*, *CARD8* e *CTSB*

Conforme referido anteriormente, das 1126 amostras de DNA testadas, trinta e cinco amostras (3,2%) foram excluídas da análise de polimorfismos, pela ausência de amplificação no ensaio da qPCR. Deste modo, em 1091 amostras foi possível realizar a genotipagem. Essas amostras foram analisadas para os seguintes polimorfismos *NLRP1* (rs35865013), *NLRP3* (rs3806265), *AIM2* (rs1103577), *CARD8* (rs2009373) e *CTSB* (rs1692816). As curvas de amplificação geradas, de alguns ensaios da qPCR, podem ser visualizadas nas **figuras 5, 6, 7, 8 e 9**. O gráfico de discriminação alélica dos SNP nos genes estudados são apresentados na **figura 10**.

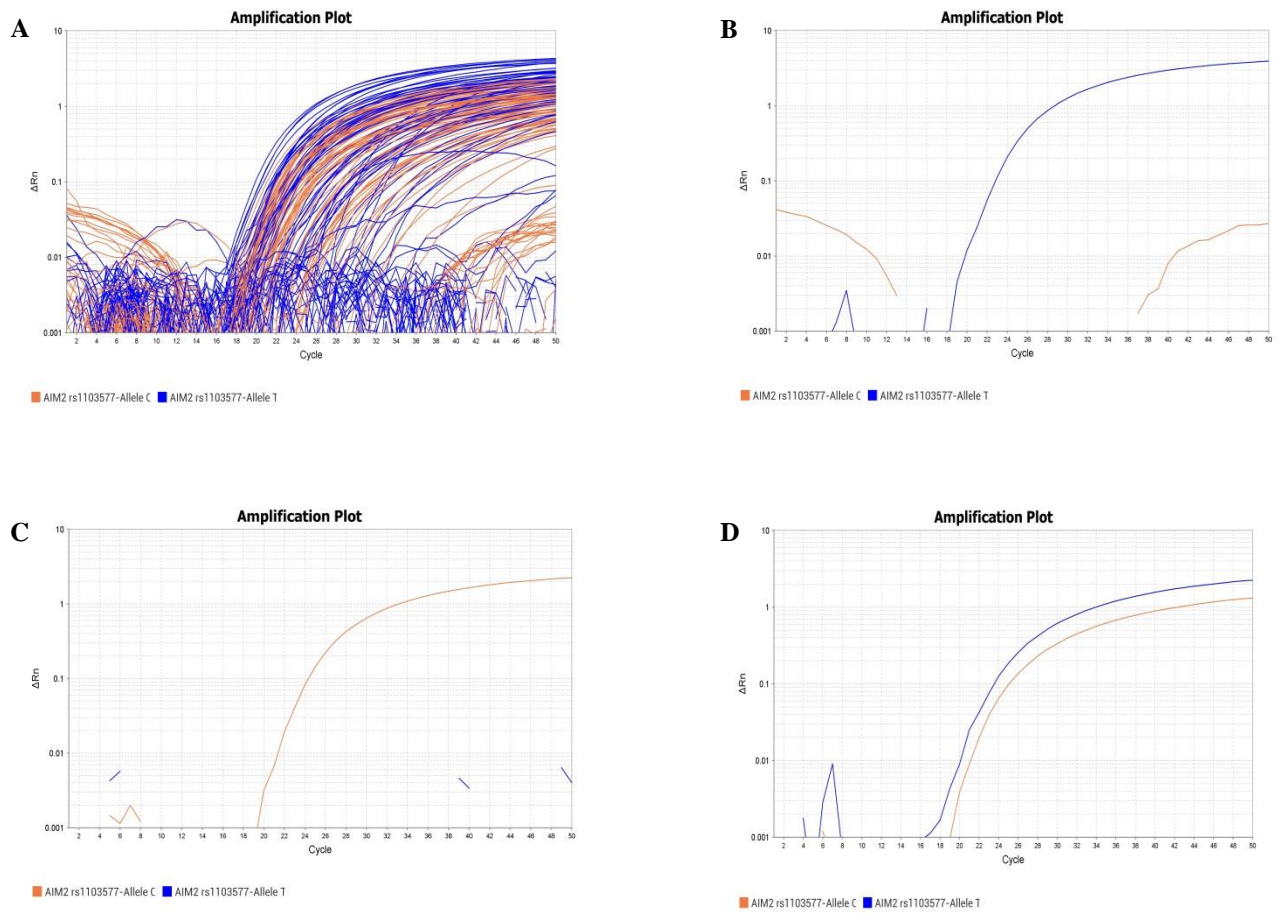


**Figura 5** - Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs35865013 no gene *NLRP1*

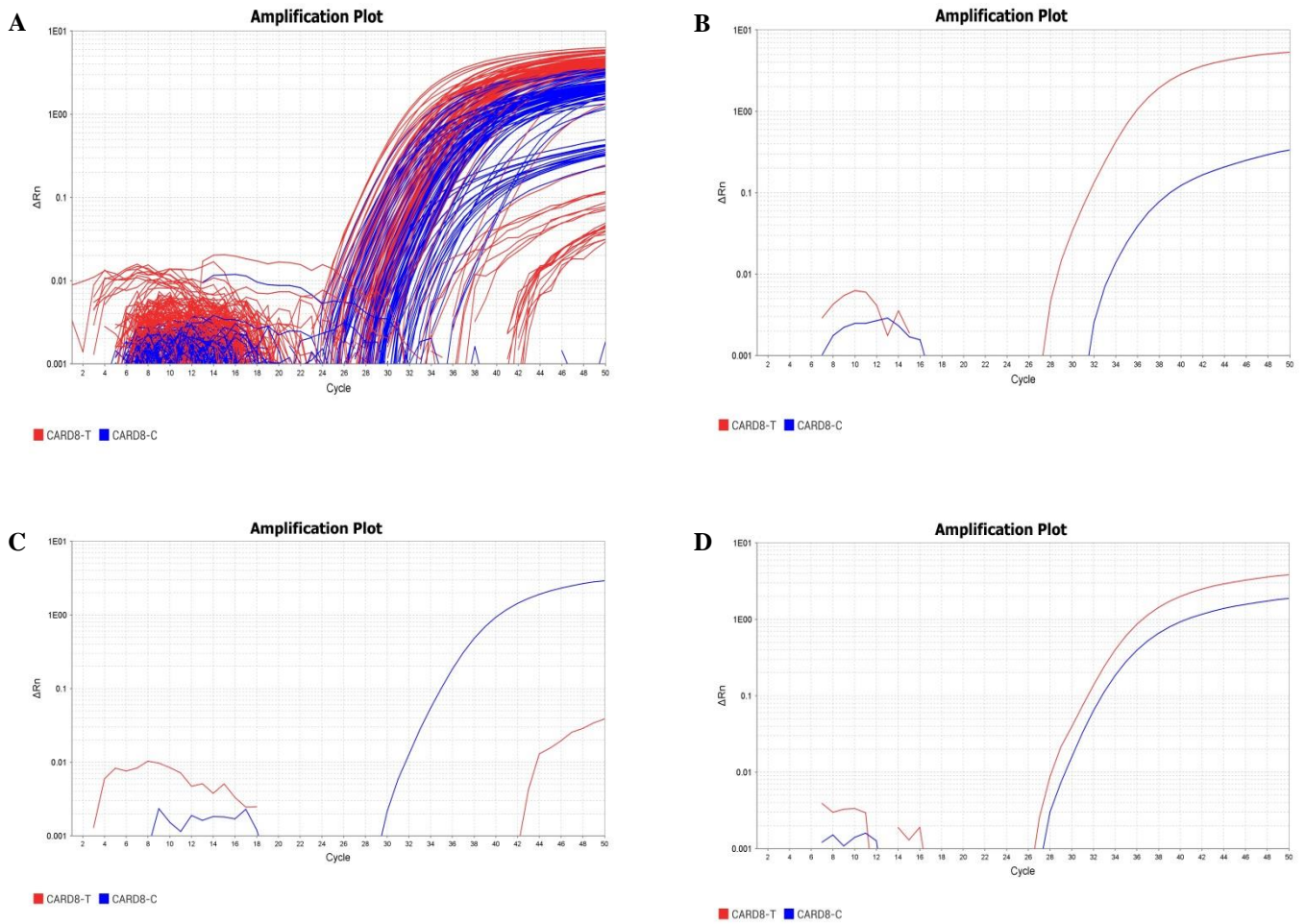
A-Curvas de amplificação de 96 amostras. B-Homozigoto selvagem (AA). C-Homozigoto polimórfico (GG). D- Heterozigoto (AG).



**Figura 6** - Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs3806265 no gene *NLRP3*  
 A-Curvas de amplificação de 96 amostras. B-Homozigoto selvagem (TT). C- Heterozigoto (CT).

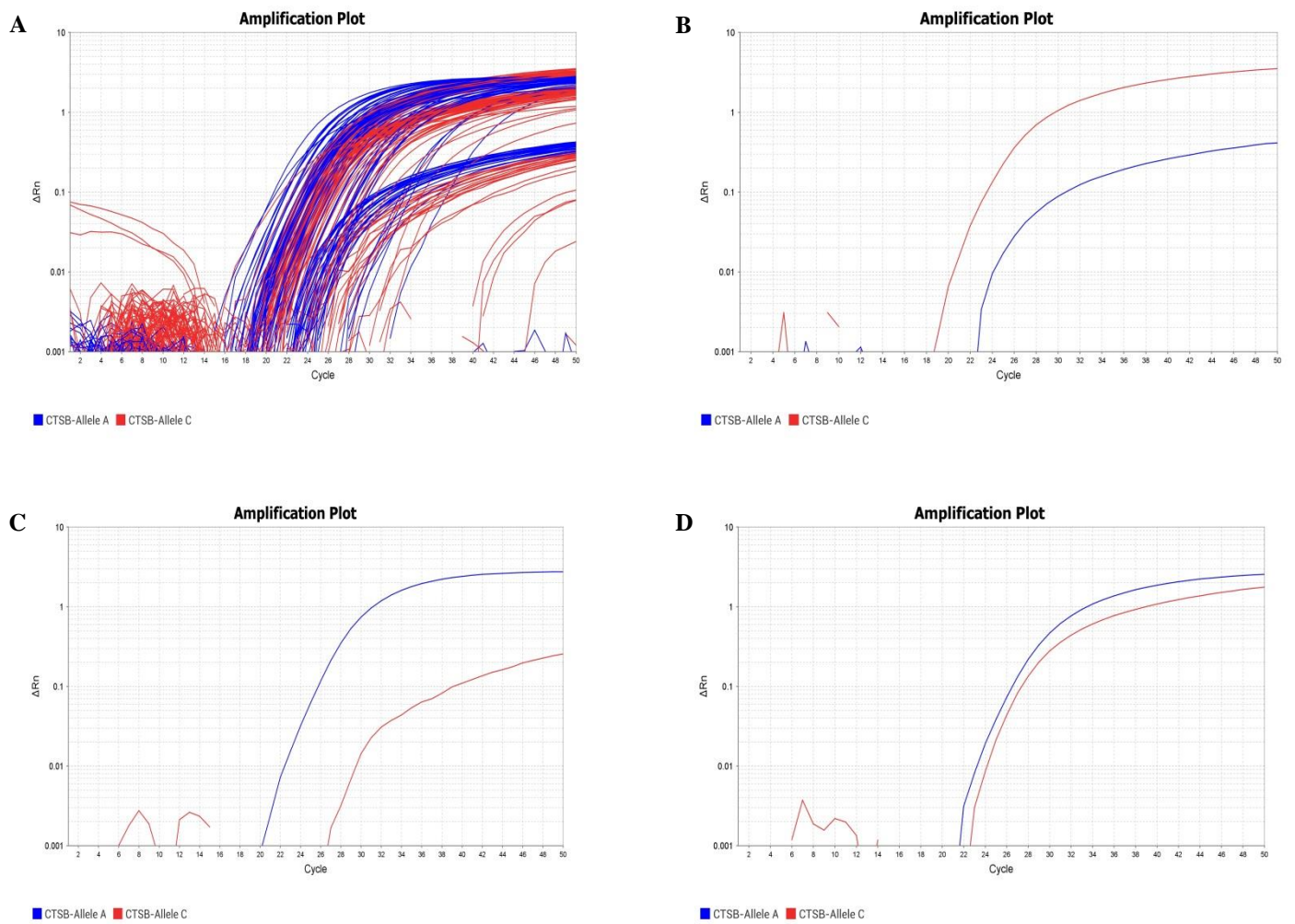


**Figura 7** - Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs1103577 no gene *AIM2*  
 A-Curvas de amplificação de 96 amostras. B-Homozigoto selvagem (TT). C-Homozigoto polimórfico (CC). D- Heterozigoto (CT).

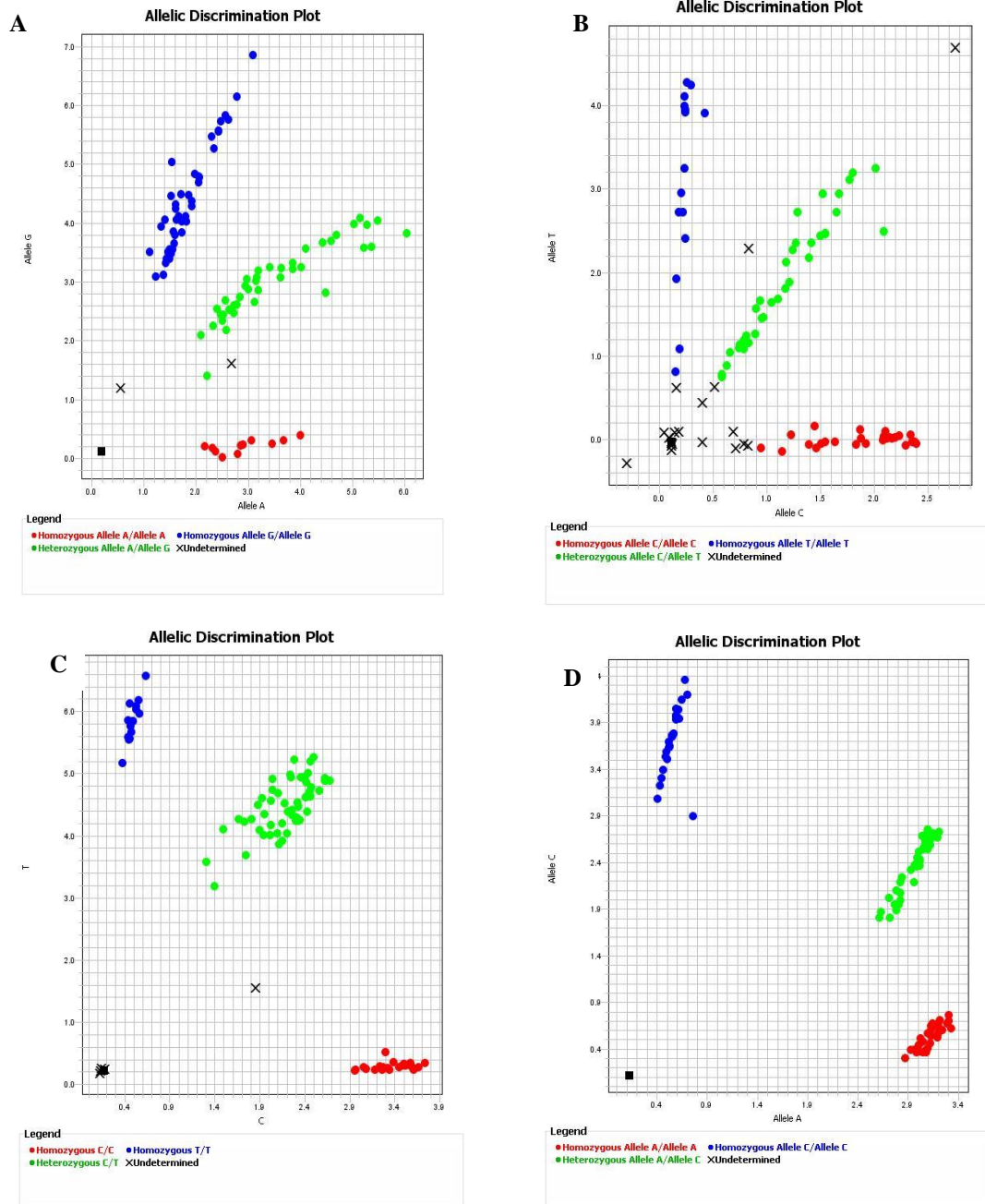


**Figura 8** – Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs2009373 do gene *CARD8*  
 A-Curvas de amplificação de 96 amostras. B-Homozigoto selvagem (TT). C- Homozigoto polimórfico (CC). D- Heterozigoto (CT).





**Figura 9** - Curva de amplificação gerada para o polimorfismo rs1692816 no gene *CTSB*  
 A-Curva de amplificação de 96 amostras. B-Homozigoto selvagem (CC). C-Homozigoto polimórfico (AA). D- Heterozigoto (AC).



**Figura 10** - Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo nos genes *NLRP1* (A), *AIM2* (B), *CARD8* (C) e *CTSB* (D). O X representa uma amostra indeterminada e o quadrado o controle negativo da reação.

A genotipagem foi realizada com base no perfil das curvas de amplificação geradas para os SNP (figura 5, 6, 7 e 8), nos grupos de pacientes com TB e controles. A partir disto, foram obtidas as frequências genótípicas e alélicas nos genes que codificam inflamaçãssoma (Tabela 4) e componentes relacionados (Tabela 6).

### 5.3.1. Frequência do alelo menor

As frequências de alelos menores (MAF) com os respectivos resultados do Equilíbrio de Hardy-Weinberg - EHW (valores de  $p$ -EHW) dos SNP estudados estão descritos na **Tabela 3**.

No presente estudo, a frequência do MAF do gene *NLRP1* rs35865013, o alelo A, foi de 0,34% para os controles, 0,36% no grupo de pacientes com TBP e 0,33% para TBE. A média da frequência do alelo A, reunindo os três grupos, foi de 0,35%. Esta distribuição foi comparável a da população europeia (0,35%), especialmente a da Escócia (0,34%). Resultados contrários foram observados na população do leste asiático, com frequência elevada do alelo A (0,78%) (Ensembl Genomes, 2019). No entanto, de acordo com os dados registrados na NCBI (HapMap ou 1000Genome), globalmente os alelos A e G, do gene *NLRP1* rs3586013, apresentam uma distribuição equitativa, ou seja de 0,50%, embora seja evidente a existência de grandes variações nas frequências dos alelos, dependendo da população investigada.

Para o polimorfismo no gene *NLRP3* rs3806265, a MAF foi o alelo C, tanto nos controles, quanto no grupo TBE (0,10%), como também no grupo TBP (0,12%). Para este SNP, globalmente o alelo menor é o alelo C com uma frequência de 0,46%. A população registrada com a menor MAF (alelo C) foi a europeia (0,33%) e a maior foi a americana (0,55%). A MAF encontrada no presente estudo para o gene *NLRP3* (alelo C) foi baixa quando comparada com as demais populações: africana (0,54%), leste asiático (0,46%) e sul da Ásia (0,43%) disponibilizado no NCBI (HapMap ou 1000Genome). Da mesma forma, as frequências do presente estudo foram menores quando comparadas aos resultados observados no estudo realizado por Yu et al. (2018), em pacientes acometidos com psoríase vulgaris na população chinesa, em que a MAF (alelo C) rs3806265 foi de 0,43%; e nos controles foi de 0,49%. É necessário destacar que um dos tratamentos utilizados para psoríase vulgaris é o inibidor do fator de necrose tumoral alfa (anti-TNF $\alpha$ ), condição no qual pode aumentar o risco da tuberculose ou reativação de infecção. Outro estudo realizado por Hanaei et al. (2018) neste mesmo SNP, em pacientes iranianos com colite ulcerativa, a MAF (alelo C) foi de 0,30%; e 0,23% nos controles. Por outro lado, o estudo analisado em pacientes com estomatite aftosa recorrente na população iraniana, a MAF (alelo C) foi semelhante ao encontrada no presente estudo visto que a frequência foi de 0,07% para pacientes e 0,23% para controles, embora o número amostral tenha sido pequeno (125 participantes) (BIDOKI et al., 2016).

Em relação ao polimorfismo no gene *AIM2* rs1103577, a MAF nos grupos controles (0,47%), pacientes com TBP (0,44%) e TBE (0,49%) foi o alelo T. Para este SNP, globalmente o alelo menor é o alelo C com uma frequência de 0,39%. A população registrada com a menor MAF para o alelo T foi a americana (0,36%) e a maior foi a africana (0,91%), ainda com base nos dados do projeto 1000 Genome. A MAF encontrada no presente estudo para o gene *AIM2* (alelo T) assemelha-se com a população europeia, com frequência em torno de 0,40%. Neste contexto, a população italiana, da região de Toscana, foi a que apresentou frequência comparável (0,43%) a encontrada neste estudo.

Finalmente, no que diz respeito aos polimorfismos nos genes dos componentes relacionados ao inflamassoma, para o gene *CARD8* rs2009373 a MAF nos grupos estudados (alelo T) tanto para os controles quanto no grupo de pacientes com TBP foi de 0,46%; e 0,40% para os pacientes com TBE. Globalmente, o alelo menor do polimorfismo no gene *CARD8* é o alelo C, com uma frequência de 0,47%. No entanto, a população Americana (Colômbia, México, Peru e Porto Rico) registrou, a menor frequência para o alelo T com 0,41%, e a maior frequência foi a da população do leste asiático com 0,77%. Entretanto, a MAF encontrada no presente estudo para este SNP no gene *CARD8* (alelo T) assemelha-se a população do sul da Ásia (0,46%). É interessante notar que a subpopulação com frequências semelhantes ao encontrada no presente estudo foi a do Paquistão (0,44%), um dos países onde a incidência de TB é alta.

Para o SNP no gene *CTSB* rs1692816, a MAF no grupo controle (alelo A) foi 0,49% e nos grupos de pacientes com TBP e TBE (alelo C) foram 0,48% e 0,45%, respectivamente. Globalmente, o alelo menor é o alelo A com uma frequência de 0,43%. Ao analisar os grupos TBP e TBE, bem como todos os grupos reunidos (Controles+TBP+TBE), a MAF foi o alelo C. Quando comparamos com a MAF encontrada no grupo controle, constata-se que os valores encontrados foram semelhantes para ambos os alelos (Alelo A com 0,49% e o alelo C com 0,51%). Portanto, a MAF encontrada no presente estudo para o gene *CTSB* foi semelhante a população do leste asiático (0,50%) e subpopulação foi a chinesa (Pequim) (0,48%).

A MAF para os SNP nos genes *CARD8* e *CTSB* assemelhou-se as frequências encontradas no continente asiático. Segundo a WHO (2018), a maioria dos casos estimados de TB no ano de 2017 foi no continente asiático (44,0%), seguido África (25,0%) e Ocidental do Pacífico (18,0%). Proporções menores ocorreram na Região do Mediterrâneo Oriental (7,7%), Américas (2,8%) e Europa (2,7%). É interessante notar que os 30 países com alta carga de TB



representaram 87,0% de todos os casos novos estimados mundialmente, e oito desses países responderam por dois terços do total global. Entre esses países estão à Índia (27%), China (9%), Indonésia (8%), Filipinas (6%), Paquistão (5%), Nigéria (4%), Bangladesh (4%) e África do Sul (3%). Destes, com exceção da Nigéria e África do sul, fazem parte do continente asiático.

**Tabela 3** – Frequência dos alelos menores (MAF) dos SNP, com as respectivas avaliações do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p$ -EHW) obtidas nos grupos de casos e controles.

Gene	ID SNP	Alelo menor	TBP n,%	TBP $p$ -EHW	TBE n,%	TBE $p$ -EHW	Controles n,%	Controles $p$ -EHW
<i>NLRP1</i>	rs35865013	A	n=415 296 (0.36)	0.7489	n=122 80 (0.33)	0.5368	n=533 364 (0.34)	0.3374
<i>NLRP3</i>	rs3806265	C	n=181 43 (0.12)	0.0820	n=103 21 (0.10)	0.0400	n=278 54 (0.10)	0.4933
<i>AIM2</i>	rs1103577	T	n=416 369 (0.44)	0.4269	n=126 124 (0.49)	0.3764	n=532 501 (0.47)	0.5425
<i>CARD8</i>	rs2009373	T	n=408 374 (0.46)	0.6899	n=100 80 (0.40)	0.5317	n=534 487 (0.46)	0.9305
<i>CTSB</i>	rs1692816	C A	n=417 402 (0.48) 432 (0.52)	0.6241	n= 56 50 (0.45) 62 (0.55)	0.8540	n=532 543 (0.51) 521 (0.49)	0.4361

Legenda. ID SNP: identificação do SNP; TBP: pacientes com TB pulmonar; TBE: pacientes com TB extrapulmonar; Valor  $p$ -EHW: valor de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

De maneira geral, foi observado que para os genes *NLRP1*, *AIM2*, *CARD8* e *CTSB*, o alelo selvagem apresentou uma frequência menor, em relação ao alelo polimórfico, embora as diferenças sejam discretas para os genes *AIM2*, *CARD8* e *CTSB*, visto que a frequência encontrada entre os grupos estava em torno de 0,45%.

Os SNP analisados neste estudo, até o momento, ainda não foram relatados em outras pesquisas de polimorfismos, mencionando as MAF, em doenças transmissíveis e não transmissíveis. Não foi possível relacionar as frequências encontradas com as de outras populações com TB. Mesmo assim, os dados de frequência permitem compreender e explorar a distribuição das MAF na população amazônica, da mesma forma que esse conhecimento poderá ser útil e contribuir para pesquisas futuras em pacientes acometidos com TB ou para outras doenças.

### 5.3.2 Análise de associação para os polimorfismos

É importante destacar que os polimorfismos nos genes *NLRP1*, *AIM2*, *CARD8* e *CTSB* estudados estavam distribuídos de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos analisados como mostram a **Tabela 3** e **Tabela 4**. No entanto, foi observado desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg na frequência dos SNP do gene *NLRP3* rs3806265 ( $p=0,0457$ ) no grupo TBP vs. Controle como também no grupo de TBP vs. TBE ( $p=0,0329$ ), provavelmente devido ao pequeno número amostral. Os polimorfismos não resultaram em desequilíbrio de ligação (DL) na população estudada (Apêndice V).

Posteriormente foram avaliadas as distribuições dos SNP quanto a frequência alélica e genotípica na população nos dois grupos estudados composto de pacientes com TBP vs. controles e pacientes com TBP vs. TBE. Foi realizada a análise de associação dos SNP com as variáveis: idade, sexo, tabagismo e alcoolismo. Além disso, foram realizadas análises de haplótipos e interação gênica. As variáveis, sexo e idade foram incluídas na análise como variáveis de ajuste. Os resultados das análises de associação, para os cinco SNP selecionados, estão descritos na **Tabela 4** e **6**. Cada SNP será discutido separadamente nos tópicos a seguir.

### 5.3.2.1 Análise de associação para o gene *NLRP1*

Na análise de associação do SNP rs35865013 no gene *NLRP1* entre os grupos investigados de pacientes com TBP vs. Controle e TBP vs. TBE, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos e os alelos, nos quatro modelos de herança genética (Dominante, recessivo, codominante e superdominante) analisados, conforme consta na **Tabela 4**. Na análise de associação do SNP por idade, sexo, tabagismo e alcoolismo (Dados não mostrados) também não houve valores estatisticamente significativos. Como visto anteriormente (**Tabela 3**), a frequência do SNP rs35865013 encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Quanto à distribuição alélica, o alelo G foi o mais frequente nos grupos estudados, principalmente no grupo TBE (0,67%) e controle (0,66%). Em relação ao alelo A, este foi mais frequente no grupo de TBP (0,36%) em comparação com os demais grupos, mas não apresentaram diferenças significativas em relação aos controles e pacientes com TBP e TBE.

A respeito da distribuição genotípica, os resultados obtidos neste estudo apontaram uma frequência maior do genótipo homozigoto G/G (0,44%) para o grupo controle e, o genótipo heterozigoto A/G, foi frequente tanto para os pacientes com TBP (0,47%), quanto para os pacientes com TBE (0,48%) (**Tabela 4**).

Polimorfismos genéticos em *NLRP1* podem estar associados a doenças infecciosas. No estudo de Santos et al. (2016), que contempla a contribuição da genética do inflamassoma NLRP1, na população amazônica em pacientes com malária infectados com *Plasmodium vivax*, constataram que o SNP rs12150220, no gene *NLRP1*, foi associado com a gravidade da doença ( $p=0,001$ ; OR=3,89). Outro estudo, realizado por Pontillho et al. (2013), encontrou associação, a partir da combinação de haplótipos em *NLRP1* (rs2137722/G-rs12150220/A-rs2670660/G) com a suscetibilidade à hanseníase, principalmente na forma paucibacilar da doença ( $p=0,001$ ; OR=2,78).

Mesmo diante dos resultados apresentados para o gene *NLRP1* rs35865013 e não terem sido observados dados significativos com a TB, é importante ressaltar que outras regiões de polimorfismos para esse mesmo gene devem ser investigadas para TB.

### 5.3.2.2 Análise de associação para o gene *NLRP3*

Para o SNP (rs3806265) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quanto às distribuições genótípicas e alélicas, entre os pacientes com TBP vs. controles e, tampouco, entre pacientes com TBP vs. TBE. Do mesmo modo, também não houve associação do SNP do gene *NLRP3* com risco ou proteção nas análises realizadas nos três grupos de investigação, nos quatro modelos de herança genética (Dominante, recessivo, codominante e superdominante) (**Tabela 4**).

Na análise de associação do SNP por idade, sexo, tabagismo e alcoolismo também não houve dados estatisticamente significativos (Dados não mostrados). Este SNP (rs3806265) apresentou um leve desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, nos grupos TBP vs. controles, assim como no TBP vs. TBE (**Tabela 3**). Acredita-se que o desvio do EHW seja proveniente do número reduzido de casos ou devido à baixa frequência deste SNP na população investigada. Por este aspecto, faz-se necessário realizar investigações futuras, para analisar se a população estudada, está de fato sofrendo algum efeito de seleção em relação a este SNP (GUO et al., 1992; LIU et al., 2010).

Em relação a frequência alélica, observou-se que o alelo T foi predominante nos três grupos, apresentando frequências semelhantes, Controle e TBE com 0,90% e TBP com 0,88%). O alelo C apresentou uma frequência em torno de 0,12% (**Tabela 4**). Quanto à distribuição genotípica, esta mostrou que o genótipo T/T predominou em todos os grupos, principalmente nos controle (0,81%) e no grupo TBE (0,80%). No entanto, o genótipo C/T foi mais frequente no grupo de pacientes com TBP (0,24%). Na população em estudo não foi encontrado o genótipo polimórfico C/C nos três grupos avaliados.

É importante ressaltar que em polimorfismos com frequência inferior a 10% não se pode afirmar que não houve uma associação, pois necessita de um número amostral elevado de casos e controles para obtenção de um poder estatístico satisfatório (OLIVEIRA et al., 2011). Diante disso, os resultados devem ser analisados com cautela, devido a baixa frequência do alelo polimórfico. Nesta situação, é importante ampliar o número de casos, para confirmar os resultados observados.

Além disso, os polimorfismos em genes de inflamassomas, principalmente para o *NLRP3*, estão sendo investigados para diversas doenças, mas no contexto de doenças infecciosas, essas pesquisas ainda são limitadas. Estudos anteriores foram realizados por

Souza de Lima et al. (2016) do gene *NLRP3*, mas em outra região de SNP rs10754558, que mostrou associação do genótipo G/G com efeito protetor para TB pulmonar. Embora os resultados apresentados para o gene *NLRP3* rs3806265 necessitem ser confirmados quanto a existência ou não de associação com a doença TB, é importante incluir nas investigações outras regiões gênicas de *NLRP3*, visto que são genes promissores envolvidos na resposta imune a TB.

**Tabela 4** - Resultado da análise de associação dos SNP em genes de inflamassomas *NLRP1*, *NLRP3* e *AIM2* nos grupos estudados

Gene	ID SNP	Alelos Genótipos	Controles n,%	TBP n,%	TBE n,%	TBP vs. Controles				TBP vs. TBE			
						valor- <i>p</i>	OR (95% IC)	valor- <i>p</i> ajust.	OR (95% IC)	valor- <i>p</i>	OR (95% IC)	valor- <i>p</i> ajust.	OR (95% IC)
<i>NLRP1</i>	rs35865013		<b>n=(533)</b>	<b>n=(415)</b>	<b>n=(122)</b>								
		G	702 (0.66)	534 (0.64)	164 (0.67)	0.6677				0.5074			
		A	364 (0.34)	296 (0.36)	80 (0.33)								
		G/G	236 (0.44)	170 (0.41)	53 (0.43)		(O)				(R)		
		A/G	230 (0.43)	194 (0.47)	58 (0.48)	0.2695	1.16 (0.89-1.50)	0.5362	1.14 (0.75-1.75)	0.3079	1.41 (0.71-2.81)	0.3631	0.73 (0.36-1.46)
		A/A	67 (0.13)	51 (0.12)	11 (0.09)								
<i>NLRP3</i>	rs3806265		<b>n=(278)</b>	<b>n=(181)</b>	<b>n=(103)</b>								
		T	502 (0.90)	319 (0.88)	185 (0.90)	0.0457				0.0329			
		C	54 (0.10)	43 (0.12)	21 (0.10)								
		T/T	224 (0.81)	138 (0.76)	82 (0.80)		(O)				(C)		
		C/T	54 (0.19)	43 (0.24)	21 (0.20)	0.2294	1.32 (0.84-2.08)	0.6273	1.16 (0.64-2.08)	0.5114	0.82 (0.46-1.48)	0.6798	0.88 (0.48-1.62)
		C/C	0	0	0								
<i>AIM2</i>	rs1103577		<b>n=(532)</b>	<b>n=(416)</b>	<b>n=(126)</b>								
		C	563 (0.53)	463 (0.56)	128 (0.51)	0.9479				0.2266			
		T	501 (0.47)	369 (0.44)	124 (0.49)								
		C/C	145 (0.27)	133 (0.32)	35 (0.28)		(R)				(R)		
		C/T	273 (0.51)	197 (0.47)	58 (0.46)	0.1141	0.80 (0.60-1.06)	<b>0.0276</b>	<b>0.69 (0.50-0.96)</b>	0.1964	0.73 (0.46-1.17)	0.2031	1.37 (0.85-2.21)
		T/T	114 (0.22)	86 (0.21)	33 (0.26)								

Legenda. ID SNP: identificação do SNP; TBP: pacientes com TB pulmonar; TBE: pacientes com TB extrapulmonar; Valor-*p*: valor de *p*; Valor *p* ajust: valor de *p* ajustado por sexo e idade; OR: *odds ratio* e IC95%: intervalo de confiança de 95%. Foi adotado o melhor modelo de herança genética para cada SNP, sendo C=codominante; D=dominante; R=recessivo; O=overdominante. O valor significativo,  $p < 0,05$ , está destacado em negrito.

### 5.3.2.3 Análise de associação para o gene *AIM2*

Para o SNP (rs1103577) também não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas quanto às distribuições genóticas e alélicas entre os pacientes com TBP e grupo controle, bem como entre pacientes com TBP e TBE (**Tabela 4**). No entanto, interessante, quando a análise das frequências do SNP foi realizada, após a correção por sexo e idade, houve associação do gene *AIM2* a proteção para TBP, no modelo de herança genética recessivo. Esses resultados sugerem um efeito protetor do genótipo T/T deste SNP no desenvolvimento de TBP ( $p_{ajust}=0,027$ ; OR=0,69) (**Tabela 5**). Este SNP estava condizente com os parâmetros do equilíbrio de Hardy-Weinberg (**Tabela 3**).

Os resultados detalhados de associação estratificada por sexo e idade no grupo TBP vs. Controles são mostrados na **Tabela 5**. Na análise desses dados, verifica-se que o alelo menor T do SNP no gene *AIM2* rs1103577 foi mais frequente em controles e no sexo masculino, sugerindo uma tendência deste polimorfismo para proteção nos indivíduos do sexo masculino ( $p=0,05$ ; OR=0,68), de acordo com o modelo de herança recessivo (C/T+TT: 0,73 nos controles *versus* 0,68 nos casos de TBP). Para o sexo feminino não houve associação estatisticamente significativa.



**Tabela 5** - Resultado da análise de associação do SNP no gene *AIM2* rs1103577 nos grupo TBP vs. Controles com o fator de correção para sexo e idade

Genótipo	TBP	Controle	Valor- <i>p</i>	OR (95% CI)	Valor- <i>p</i> ajust	OR (95% CI)
<b>Modelo Recessivo</b>	<b>n=416</b>	<b>n=532</b>				
C/T-T/T	283 (0.68)	387 (0.73)				
C/C	133 (0.32)	145 (0.27)	0.1141	0.80 (0.60-1.06)	<b>0.0276</b>	0.69 (0.50-0.96)
<b>MASCULINO</b>						
	n=256	n=278				
C/T-T/T	181 (0.71)	217 (0.78)	<b>0.0513</b>	0.68 (0.46-1.02)	0.1173	0.70 (0.44-1.10)
C/C	75 (0.29)	61 (0.22)				
<b>FEMININO</b>						
	n=160	n=254				
C/T-T/T	102 (0.64)	170 (0.67)	0.5076	0.87 (0.57-1.32)	0.6536	0.90 (0.56-1.44)
C/C	58 (0.36)	84 (0.33)				

Legenda. TBP: pacientes com TB pulmonar; Valor-*p*: valor de *p*; Valor *p* ajust: valor de *p* ajustado por sexo e idade; OR: *odds ratio* e IC95%: intervalo de confiança de 95%. O valor significativo,  $p < 0,05$ , está destacado em negrito.

No que diz respeito a estudos de polimorfismos genéticos em *AIM2*, em humanos principalmente na TB, são pouco investigados. O único estudo encontrado na literatura a respeito desse gene na TB foi o desenvolvido por Souza de Lima et al. (2016), mas em outra região de polimorfismo (rs35130877) na população amazônica, contudo eles não encontraram associação deste SNP com proteção ou risco de desenvolver TB. Em relação a outras doenças infecciosas, não há relatos na literatura até o momento.

Os resultados encontrados neste estudo para o gene *AIM2* foram relevantes visto que, para nosso conhecimento, este é o primeiro relato de associação deste SNP rs1103577 no gene *AIM2* com proteção a TB. A investigação de SNP em outras regiões para esse gene de inflamação é necessária e bastante promissora para compreendermos melhor o papel deles na TB.

### 5.3.2.4 Análise de associação para o gene *CARD8*

Conforme a análise para o SNP (rs2009373), não foi observada evidência de associação estatisticamente significativa quanto às distribuições genóticas e alélicas entre os pacientes com TBP vs. grupo controle e pacientes com TBP vs. TBE (**Tabela 6**). Quando foram analisados o SNP após a correção por sexo e idade, embora os resultados não tenham sido significativos nas análises entre TBP e controles, é importante mencionar que estes apresentaram uma tendência de associação com efeito protetor para o desenvolvimento de TB no modelo genético dominante ( $p=0,0592$ ; OR=0,54). Na análise entre os grupos TBP e TBE, após a correção por sexo e idade, observou-se associação estatisticamente significativa para proteção a TB no modelo de herança genética dominante ( $p_{ajust}=0,026$ ; OR=0,48). Esses resultados sugerem um efeito protetor do genótipo T/T deste SNP no desenvolvimento de TB (**Tabela 7**). Este SNP estava condizente com os parâmetros do equilíbrio de Hardy-Weinberg (**Tabela 3**).

Em relação às frequências alélicas deste polimorfismo, foi observado que o alelo C foi o mais frequente em todos os grupos investigados. Sobre a distribuição genotípica, no grupo de TBP vs. controle, as frequências foram semelhantes entre os grupos. O genótipo heterozigoto C/T foi o mais frequente em ambos os grupos, seguido do genótipo C/C. Ao comparar os grupos de pacientes (TBP vs. TBE), observamos que a frequência do genótipo T/T foi maior no grupo de TBP (**Tabela 6**).

Os resultados detalhados de associação estratificada por sexo e idade no grupo TBP vs. TBE estão descritos na **Tabela 7**. Na análise desses dados, verificamos que o alelo menor T do SNP no gene *CARD8* rs2009373 foi mais frequente em pacientes com TBP que em TBE. Entretanto, para o sexo feminino, este polimorfismo apresentou valores significativos ( $p=0,038$ ; OR=0,35), com efeito protetor para TBP, de acordo com o modelo de herança dominante (0,21 para TBP *versus* 0,08 nos casos de TBE). Após as correções para sexo e idade, o dado permaneceu estatisticamente significativo ( $p=0,04$ ; OR=0,35). Apesar da associação ter sido significativa para TBE em pacientes do sexo feminino, não podemos afirmar que de fato há efeito um protetor, pois o resultado do intervalo de confiança não foi satisfatório (**Tabela 7**). Para o sexo masculino não houve associação estatisticamente significativa.

**Tabela 6** - Resultado da análise de associação dos SNP nos componentes relacionados ao inflamassoma, *CARD8* e *CTSB* nos grupos estudados

Gene	ID SNP	Alelos Genótipos	Controles n,%	TBP n,%	TBE n,%	TBP vs. Controles				TBP vs. TBE					
						valor-p	OR (95% IC)		valor-p ajust.	OR (95% IC)		valor-p	OR (95% IC)		valor-p ajust.
<i>CARD8</i>	rs2009373		<b>n=(534)</b>	<b>n=(408)</b>	<b>n=(100)</b>										
		C	581 (0.54)	442 (0.54)	120 (0.60)	0.8955				0.9285					
		T	487 (0.46)	374 (0.46)	80 (0.40)										
		C/C	157 (0.29)	122 (0.30)	34 (0.34)										
		C/T	267 (0.50)	198 (0.48)	52 (0.52)	0.6546	(D) 0.94 (0.73-1.22)		0.0592	0.54 (0.27-1.06)		0.07995	(D) 1.69 (0.92-3.12)		<b>0.0260</b>
T/T	110 (0.21)	88 (0.22)	14 (0.14)												
<i>CTSB</i>	rs1692816		<b>n=(532)</b>	<b>n=(417)</b>	<b>n=(56)</b>										
		C	543 (0.51)	402 (0.48)	50 (0.45)	0.8455				0.8540					
		A	521 (0.49)	432 (0.52)	62 (0.55)										
		C/C	143 (0.27)	94 (0.23)	15 (0.28)										
		A/C	257 (0.48)	214 (0.51)	20 (0.35)	0.1244	(R) 0.79 (0.59-1.07)		0.0808	0.77 (0.57-1.03)		<b>0.02727</b>	(O) 0.53 (0.30-0.94)		<b>0.02618</b>
A/A	132 (0.25)	109 (0.26)	21 (0.37)												

Legenda. ID SNP: identificação do SNP; TBP: pacientes com TB pulmonar; TBE: pacientes com TB extrapulmonar; Valor-*p*: valor de *p*; Valor *p* ajust: valor de *p* ajustado por sexo e idade; OR: *odds ratio* e IC95%: intervalo de confiança de 95%. Foi adotado o melhor modelo de herança genética para cada SNP, sendo C=codominante; D=dominante; R=recessivo; O=overdominante. Valores significativos,  $p < 0,05$ , está destacado em negrito.

**Tabela 7** - Resultado da análise de associação do SNP no gene *CARD8* rs2009373 nos grupo TBP vs. TBE com o fator de correção sexo e idade

Genótipo	TBP	TBE	Valor- <i>p</i>	OR (95% CI)	Valor- <i>p</i> ajust	OR (95% CI)
	n=408	n=100				
C/T-C/C	320 (0.78)	86 (0.86)	0.07995	1.69 (0.92-3.12)	<b>0.0260</b>	<b>0.48 (0.25-0.96)</b>
T/T	88 (0.22)	14 (0.14)				
<b>MASCULINO</b>						
	n=253	n=54				
C/T-C/C	198 (0.78)	44 (0.82)	0.5943	0.82 (0.39-1.73)	0.5943	0.82 (0.39-1.73)
T/T	55 (0.22)	10 (0.18)				
<b>FEMININO</b>						
	n=155	n=46				
C/T-C/C	122 (0.79)	42 (0.92)	<b>0.03872</b>	<b>0.35 (0.12-1.05)</b>	<b>0.04059</b>	<b>0.35 (0.12-1.06)</b>
T/T	33 (0.21)	4 (0.08)				

Legenda. TBP: pacientes com TB pulmonar; TBE: pacientes com TB extrapulmonar; Valor-*p*: valor de *p*; Valor *p* ajust: valor de *p* ajustado por sexo e idade; OR: *odds ratio* e IC95%: intervalo de confiança de 95%. Os valores significativos,  $p < 0,05$ , estão destacados em negrito.

Os estudos sobre SNP do gene *CARD8*, na infecção por TB, são raros. No entanto, é importante citar que no estudo realizado por Souza de Lima et al. (2016) ao avaliarem outra região polimórfica do gene *CARD8* (rs6509365) em pacientes com TBP, não foi observado associação. Fato que confirma a relevância da investigação de outras regiões do mesmo gene, que possam estar associados a doença, conforme visto no presente estudo.

### 5.3.2.5 Análise de associação para o gene *CTSB*

Na análise para o SNP (rs1692816) foi observada associação estatisticamente significativa quanto às distribuições genóticas e alélicas entre os pacientes com TBP vs. TBE no modelo genético overdominante ( $p=0,027$ ; OR=0,53), mas no grupo de pacientes com TBP e controles não houve associação. Da mesma forma, após a análise do SNP com correção por sexo e idade foi observado dado estatisticamente significativo, ao comparar o

grupo de TBP vs. TBE ( $p=0,026$ ;  $OR=0,50$ ) (**Tabela 6**). Ao comparar o grupo de TBP vs. TBE, observa-se que o genótipo heterozigoto A/C foi mais frequente em pacientes com TBP (0,51%) do que em pacientes com TBE (0,36%), sugerindo que este genótipo está associado a proteção contra o desenvolvimento de TBP, dado que permaneceu após a correção por sexo e idade (**Tabela 8**).

De modo geral, em relação às frequências alélicas deste polimorfismo, observou-se que no grupo controle o alelo C (0,51%) foi mais frequente, embora as frequências não tenham sido tão diferentes em comparação com o alelo A (0,49%). Nos grupos de TBP e TBE, o alelo A foi o mais frequente. Entre os genótipos, o A/C apresentou maior frequência nos controles e no grupo de TBP. O genótipo A/A foi o mais frequente no grupo TBP, ao passo que nos pacientes de TBE, este genótipo (A/A) foi o que apresentou maior frequência (0,37%). Ao comparar o grupo de TBP vs. TBE quanto às frequências alélicas, observou-se que o alelo A foi frequente em ambos os grupos. Quanto ao genótipo, o A/C foi frequente no grupo de TBP (0,51%) e o A/A frequente no grupo de TBE (0,37%).

Estudos de polimorfismos genéticos em *CTSB*, principalmente na TB, também são pouco investigados. O estudo realizado por Souza de Lima et al. (2016) avaliou duas regiões de polimorfismo no gene *CTSB* (rs12338 e rs8898) na população amazônica em pacientes infectados com TB. Neste estudo, não foi encontrada associação, entretanto o SNP rs8898 apresentou uma tendência para efeito protetor ( $p=0,04$ ;  $OR=0,67$ ). Conforme comentado anteriormente, e para confirmar a associação ou não do gene *CTSB* na TB, será importante ampliar o número de casos, bem como selecionar e investigar outras regiões polimórficas deste gene.

**Tabela 8** - Resultado da análise de associação do SNP no gene *CTSB* rs1692816 nos grupos TBP vs. TBE com o fator de correção sexo e idade

Genótipo	TBP	TBE	Valor- <i>p</i>	OR (95% CI)	Valor- <i>p</i> ajust	OR (95% CI)
	n=417	n=56				
A/A-C/C	203 (0.49)	36 (0.64)	<b>0.02727</b>	<b>(O)</b> 0.53 (0.30-0.94)	<b>0.02618</b>	<b>0.50 (0.27-0.94)</b>
A/C	214 (0.51)	20 (0.36)				
<b>MASCULINO</b>						
	n=258	n=31				
A/A-C/C	130 (0.51)	21 (0.68)	0.06440	0.48 (0.22 -1.07)	0.60871	1.23 (0.55-2.74)
A/C	128 (0.49)	10 (0.32)				
<b>FEMININO</b>						
	n=159	n=25				
A/A-C/C	73 (0.46)	15 (0.60)	0.18932	0.57 (0.24-1.34)	0.27881	0.61 (0.25-1.51)
A/C	86 (0.54)	10 (0.40)				

Legenda. TBP: pacientes com TB pulmonar; TBE: pacientes com TB extrapulmonar; Valor-*p*: valor de *p*; Valor *p* ajust: valor de *p* ajustado por sexo e idade; OR: *odds ratio* e IC95%: intervalo de confiança de 95%. Os valores significativos,  $p < 0,05$ , estão destacados em negrito.

### 5.3.2.6 Análise de haplótipos

A análise da frequência de haplótipos para os genes *NLRP3* e *AIM2* foi realizada no grupo de TBT (TBP+TBE) e controles (**Tabela 8**), de TBP e controles, bem como no grupo de TBP e TBE (Dados não apresentados).

Na análise entre TBT e controles, embora o polimorfismo no gene *NLRP3* (rs3806265) apresentou desvio do EHW (**Tabela 3**), valores significativos ( $p=0,0361$ ) foram observados para a combinação rs3806265/C e rs1103577/C. A combinação do genótipo raro de *NLRP3* (rs3806265/C) e *AIM2* (rs1103577/C) foi associada ao risco para o desenvolvimento de TB, tanto na forma pulmonar quanto extrapulmonar (OR=2,15). Ambos os SNP estão localizados em variantes intrônicas pelo qual sugere-se a hipótese que essa combinação pode afetar a estabilidade do RNA mensageiro, reduzindo o número de receptores a serem expressos e, conseqüentemente, diminuindo a detecção do patógeno. Em

relação às análises de haplótipos para o grupo de TBP e controles, bem como TBP e TBE não foram encontradas associações estatisticamente significativas.

No presente momento, ainda não foram relatados estudos sobre associações de haplótipos em genes de inflamassoma *NLRP3* e *AIM2* nas regiões estudadas, principalmente na TB. Para o nosso conhecimento, ainda não tinham sido descritas pesquisas de associação de haplótipos para esses SNP em genes de inflamassoma.

**Tabela 9** - Haplótipos dos genes *NLRP3*(rs38062651) e *AIM2* (rs1103577) em pacientes com TBT (TBP+TBE) e controles.

Haplótipos rs3806265-rs1103577	Frequência total	Frequência controle	Frequência TBT	Valor- <i>p</i>	OR (95% CI)
T-C*	0.4876	0.497213	0.478180		1.00
C-T	0.0560	0.066763	0.045414	0.3061	0.72 (0.38-1.35)
T-T	0.4067	0.404018	0.409407	0.6321	1.05 (0.86-1.29)
C-C raro	0.0496	0.032006	0.066999	<b>0.0361</b>	<b>2.15 (1.04-4.45)</b>

Legenda. \*Haplótipo de referência; Valor-*p*: valor de *p*; OR: *odds ratio* e IC95%: intervalo de confiança de 95%. O valor significativo,  $p < 0,05$ , está destacado em negrito.

### 5.3.2.7 Análise de interação gênica

A análise da interação entre os genes foi realizada para avaliar o efeito da interação entre os SNP de inflamassoma e os componentes relacionados na TB. Desta forma, foi realizada a análise no SNP no gene *NLRP3* rs3806265 com o componente *CARD8* rs2009373 (Dados não apresentados) e do gene *NLRP3* rs3806265 com o *AIM2* rs1103577 nos grupos estudados (**Tabela 9**).

Na análise entre o SNP entre o gene *NLRP3* rs3806265 e o componente *CARD8* rs2009373, não foi encontrada associação estatisticamente significativa. Entretanto, observou-se uma interação estatisticamente significativa entre rs3806265 em *NLRP3* e rs1103577 em *AIM2*, incluindo todos os pacientes com TB (TBP+TBE). Com base nos resultados obtidos, há indicação que existe cooperação entre os SNP *NLRP3* rs3806265 e *AIM2* rs1103577 na proteção contra o desenvolvimento de TB. Deve-se levar em consideração que o polimorfismo no gene *NLRP3* apresentou desvio do EHW (**Tabela 3**).

**Tabela 10** - Análise de interação entre os genes *NLRP3* (rs38062651) e *AIM2* (rs1103577) em pacientes com TB (TBP+TBE)

Interação gênica	Estimativa	Valor- <i>p</i>	Mediana	Estimativa	Valor- <i>p</i>	Mediana
<b>rs3806265:rs1103577</b>						
CT:CT	-0.2572	0.6269		-0.2899	0.6188	
CC:CT	NA	NA		NA	NA	
CT:TT	-1.5626	<b>0.0105</b>	0.8446	-1.9732	<b>0.0027</b>	0.768
CC:TT	NA	NA		NA	NA	

Legenda: NA = Não-avaliado. Valor-*p*: valor de *p*; Mediana: valor da mediana (Média dos resíduos mínimos e máximos) gerado pelo programa estatístico R é o parâmetro que determina se é fator de risco ou proteção. Valores de mediana maiores que 1 são associadas a risco e menores que 1 a proteção; Valor *p* ajust: valor de *p* ajustado por sexo e idade. O valor significativo,  $p < 0,05$ , está destacado em negrito.

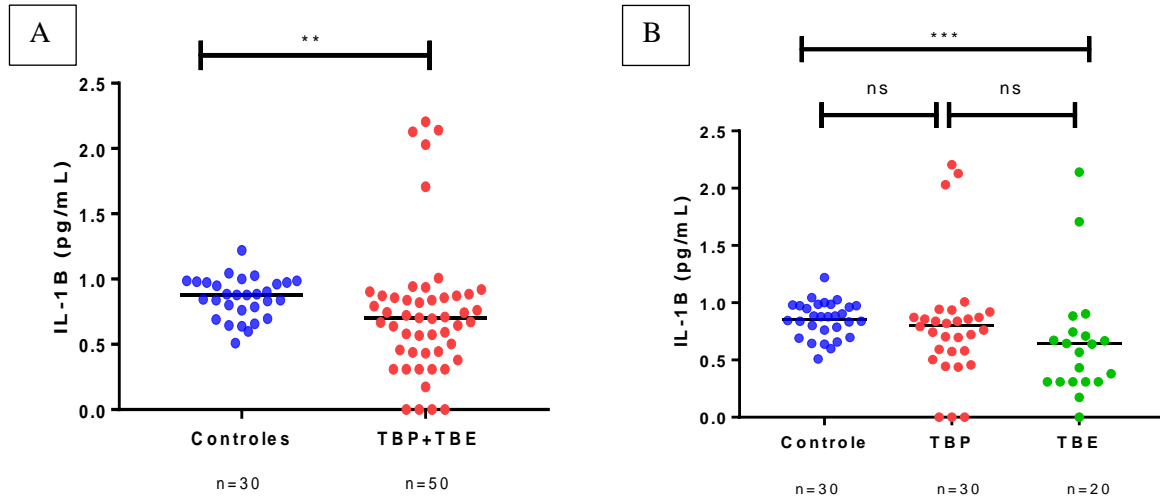
#### 5.4 Análise da quantificação de IL-1 $\beta$ para o gene *CTSB*

Para a determinação de IL-1 $\beta$  foi realizado ELISA em 30 amostras de pacientes com TB pulmonar (TBP), 20 amostras de pacientes com TB extrapulmonar (TBE) e 30 indivíduos do grupo controle.

Após a comparação dos resultados de IL-1 $\beta$  entre os grupos de pacientes e controles, observou-se que houve diferenças estatisticamente significativas (**Figura 11A**). É possível visualizar concentrações discretamente mais elevadas da citocina IL-1 $\beta$  nos controles (**Figuras 11A e 11B**). Além disso, a maioria dos pacientes do grupo TBE apresentou concentrações mais baixas da IL-1 $\beta$  em comparação aos demais grupos (**Figura 11B**). Com base nesses resultados, sugerimos que a citocina IL-1 $\beta$  deve ter um papel fundamental no controle e eliminação do bacilo, pois o grupo controle é formado pelos contatos dos pacientes de TB.

Curiosamente, após nova análise excluindo os três casos de TBP que estão “outlier” (**Figura 11B**), observamos que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Dados não apresentados). Esse dado sugere-se que os indivíduos controles (contatos) possivelmente devem responder melhor a presença do patógeno durante a infecção.

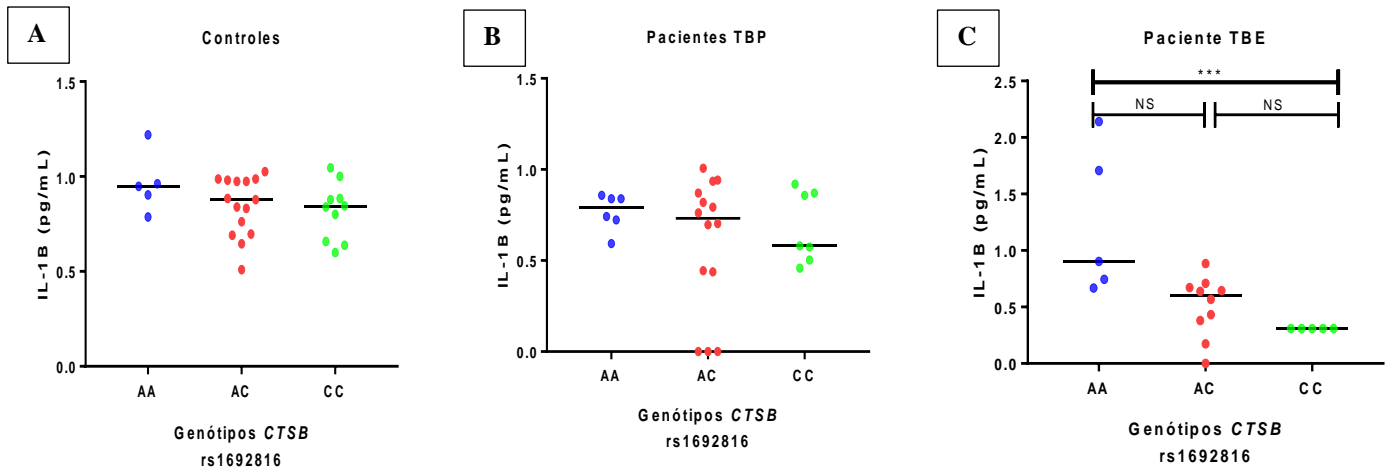




**Figura 11** - Concentração de IL-1 $\beta$  nos grupos estudados. (A) Comparação da concentração da citocina nos controles e pacientes (TBP+TBE) através do teste não paramétrico Mann Whitney  $p < 0.001$ . (B) Comparação da concentração da citocina nos controles, TBP e TBE através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis  $p > 0.0001$ ; NS=não significativo; \*\*\* alto nível de significância.

Nas análises dos genótipos de *CTSB* rs1692816 em relação as concentrações de IL-1 $\beta$ , observou-se concentrações mais elevadas desta citocina para o genótipo AA, no grupo dos controles e dos pacientes TBE. No grupo TBP as concentrações de IL-1 $\beta$  foram mais elevadas em comparação com o grupo TBE (**Figura 12B**). No grupo de pacientes com TBE houve diferença significativa com maior concentração da citocina nos pacientes com genótipo AA e uma menor concentração nos pacientes com genótipo CC. Entre os genótipos AC vs. AA e AC vs. CC, não houve diferenças significativas (**Figura 12C**).

Apesar da diferença da concentração de IL-1 $\beta$  entre os genótipos não ter sido significativa nos grupos de controles (**Figura 12A**) e pacientes com TBP (**Figura 12B**), pode-se observar que no grupo controle, a concentração da citocina foi semelhante entre os genótipos. No grupo de pacientes com TBP, os pacientes com genótipos AA e AC parecem apresentar concentrações de IL-1 $\beta$  mais elevadas.



**Figura 12** - Concentração da citocina IL-1 $\beta$  entre os genótipos do gene *CTSB*. (A) Concentração da citocina IL-1 $\beta$  nos controles através do teste de ANOVA, (B) pacientes com TBP através do teste de ANOVA e (C) pacientes com TBE através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis  $p > 0.001$ . NS=não significativo; \*\*\* alto nível de significância.

É importante destacar que existem outros fatores combinados a esses genes, como outras citocinas, por exemplo: IL-18, IL-33, IL-12, que podem estar envolvidos na resposta imune a TB, sendo necessário investigá-los em pesquisas futuras com a finalidade de se ter uma melhor compreensão da complexa rede de proteínas relacionadas à TB.

Outro aspecto a ser considerado, é em relação às diferentes respostas imunológicas na TB, principalmente nos pacientes com TBE, que apresentaram evoluções e desfechos bem variados da doença, condições que certamente refletiram diretamente nos resultados de polimorfismos genéticos e de IL-1 $\beta$ , sendo fatores limitantes nosso estudo.

*Conclusão*

---

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos objetivos propostos, dos resultados obtidos e das análises realizadas neste estudo, foi possível concluir:

1. As frequências dos SNP para os seguintes genes *NLRP1* rs35865013(A/G), *NLRP3* rs3806265 (T/C), *AIM2* rs1103577 (T/C), *CARD8* rs2009373 (T/C) e *CTSB* rs1692816 (C/A) entre os grupos analisados não apresentaram diferenças significativas.
2. Os SNP rs35865013 no gene *NLRP1* e o rs3806265 no gene *NLRP3* não foram associados à tuberculose (TB) nos grupos investigados.
3. O genótipo TT do SNP rs1103577 no gene *AIM2* foi associado para proteção no sexo masculino em pacientes com TB pulmonar (TBP), de acordo com o modelo de herança recessivo.
4. O genótipo TT do SNP rs2009373 no gene *CARD8* foi associado a proteção para o sexo feminino em pacientes com TB extrapulmonar (TBE), de acordo com o modelo de herança dominante.
5. O genótipo AC do SNP rs1692816 no gene *CTSB* foi associado a proteção para o sexo masculino em pacientes com TB extrapulmonar (TBE) de acordo com o modelo de herança overdominante.
6. O haplótipo no gene *NLRP3* (rs3806265/C) e *AIM2* (rs1103577/C) foi associado ao risco para o desenvolvimento tanto das formas de TBP quanto de TBE.
7. Houve interação entre os SNP rs3806265 no gene *NLRP3* e rs1103577 no gene *AIM2* para proteção contra o desenvolvimento de TB.
8. A citocina IL-1 $\beta$  apresentou maior concentração no grupo controle, no entanto na análise com os genótipos de *CTSB* rs1692816, os pacientes de TBE com genótipo AA apresentaram maior concentração de IL-1 $\beta$ , quando comparados aos pacientes com genótipo CC. Sugerindo que os pacientes com genótipo AA de *CTSB* rs1692816 liberam maior concentração de IL-1  $\beta$  e, conseqüentemente, uma melhor resposta da imunidade inata contra o bacilo da TB.
9. Finalmente, além dos objetivos propostos, foi possível observar que a vacina BCG foi associada ao efeito protetor contra a TB pulmonar e para TB extrapulmonar. E as variáveis tabagismo e alcoolismo, ambas foram associadas à suscetibilidade a infecção por TBP e TBE.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nesse estudo, foi possível determinar as frequências alélicas e genótípicas para os SNP em genes de inflamassoma, bem como associações relacionadas a risco ou proteção, em regiões polimórficas ainda não estudadas para a TB. Além disso, os resultados encontrados descrevem cada vez mais o importante papel dos inflamassomas na resposta imunológica a TB. O que torna os estudos imunogenéticos valiosos, contribuindo principalmente na definição dos perfis genéticos das populações e as suas relações com diversas doenças.

Diante dos resultados, as perspectivas futuras serão avaliar os efeitos funcionais dos polimorfismos de inflamassomas e os seus componentes relacionados, assim como a inclusão de outros SNP, com a finalidade de corroborar com os achados deste estudo para TB na nossa região.

*Equipe de Pesquisa*

---

## EQUIPE DE PESQUISA

Ordem	Nome	Título	Instituição	Contribuição no projeto
1	Mariana Brasil de Andrade Figueira	Mestranda	PPGIBA/ UFAM	Executora das atividades propostas no cronograma do projeto
2	Aya Sadahiro	Doutor	PPGIBA/ UFAM	Orientadora
3	Mauricio Morishi Ogusku	Doutor	INPA	Coorientador Colaboração nos exames baciloscópicos, cultivo e nos ensaios de Biologia molecular
4	Dhêmerson Souza de Lima	Doutorando	USP	Colaboração nas análises estatísticas
5	Joycenea da Silva Matsuda	Mestre	Policlínica Cardoso Fontes- SUSAM	Colaboração para avaliar os dados clínicos dos pacientes com Tuberculose.
6	Irineide Assumpção Antunes	Mestre	Policlínica Cardosos Fontes- SUSAM	Colaboração para avaliar os dados clínicos dos pacientes com Tuberculose.
7	Alessandra Pontillo	Doutor	USP	Forneceu assessoria nos ensaios de seleção e genotipagem dos genes de inflamassomas

**Legenda:** PPGIBA: Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada; UFAM: Universidade Federal do Amazonas; INPA: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; USP: Universidade de São Paulo; SUSAM: Secretaria do Estado de Saúde

*Referências*

---



## REFERÊNCIAS

- ABDALLA, H. et al. Mycobacterium tuberculosis infection of dendritic cells leads to partially caspase-1/11-independent IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion but not to pyroptosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. 1–10, 2012.
- ABEL, L. et al. Genetics of human susceptibility to active and latent tuberculosis: Present knowledge and future perspectives. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3099, n. 17, p. 1–12, 2017.
- AGOSTINI, L. et al. NALP3 forms an IL-1 $\beta$ -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. **Immunity**, v. 20, n. 3, p. 319–325, 2004.
- AGUILAR-AYALA, D. A. et al. “Genetic regulation of Mycobacterium tuberculosis in a lipid-rich environment”. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 55, p. 392–402, 2016.
- ALTET, N. et al. Assessment of the influence of direct tobacco smoke on infection and active TB management. **Plos one**, v.2, p. 1–17, 2017.
- AMARAL, E. P.; LASUNSKAIA, E. B.; D’IMPÉRIO-LIMA, M. R. Innate immunity in tuberculosis: How the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 1, p. 11–20, 2016.
- ANGELA HOUSTON, D. C. M. Extrapulmonary tuberculosis. **Medicine**, v. 42, n. 1, p. 18–22, 2014.
- AWAD, F. et al. Pharmacology & Therapeutics In fl ammasome biology , molecular pathology and therapeutic implications. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 187, p. 133–149, 2018.
- BARBÉ, F.; DOUGLAS, T.; SALEH, M. Advances in Nod-like receptors (NLR) biology. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 6, p. 681–697, 2014.
- BARLETTA-NAVECA, R. H. et al. Toll-like receptor-1 single-nucleotide polymorphism 1805T/G is associated with predisposition to multibacillary tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, p. 1–7, 2018.
- BARRETT, J. C. et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263–265, 2005.
- BEHAR, S. M. et al. Orchestration of pulmonary t cell immunity during mycobacterium tuberculosis infection: Immunity interruptus. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 559–577, 2014.
- BIDOKI, A. Z. et al. NLRP3 gene polymorphisms in Iranian patients with recurrent aphthous stomatitis. **Jounal of oral pathology and medicine**, v. 45, p. 136-140, 2016.
- BOOM, W. H. et al. Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis**, v. 83, n. 1–3, p. 98–106, 2003.

- BOOPATHI, N. M. Genotyping of Mapping Population. *Genetic Mapping and Marker Assisted Selection*. Nova Delhi, p. 39-80, 2013.
- BOUCHIER-HAYES, L. et al. CARDINAL, a Novel Caspase Recruitment Domain Protein, Is an Inhibitor of Multiple NF- $\kappa$ B Activation Pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 47, p. 44069–44077, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Tuberculose. Diagnóstico Laboratorial Baciloscopia. Ministério da Saúde, v. 1, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras microbactérias. Ministério da Saúde, v. 1, p. 434, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no brasil. Ministério da Saúde, v. 1, p.58-76, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Panorama da tuberculose no Brasil: A mortalidade em números. Ministério da Saúde, v.1, p.1-128, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Plano nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública. Brasília: Ministério da Saúde, 2017a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico-Especial Tuberculose. Ministério da Saúde, v.48, n.8. 2017b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Implantação do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil: primeiros passos rumo ao alcance das metas. Ministério da Saúde, v.49, n.11. 2018a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Panorama da tuberculose no Brasil: diagnóstico situacional a partir de indicadores epidemiológicos e operacionais. Brasília: Ministério da Saúde, 2018b.
- BRIKEN, V.; AHLBRAND, S. E.; SHAH, S. Mycobacterium tuberculosis and the host cell inflammasome: a complex relationship. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. October, p. 62, 2013.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.
- CADENA, A. M.; FORTUNE, S. M.; FLYNN, J. L. Heterogeneity in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, p. 1–12, 2017.
- CARDONA, P.-J. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 36, n. 1, p. 38–46, 2017.
- CENTIS, R. Tuberculosis, social determinants and co-morbidities (including HIV). **Pulmonology**, v. 24, n. 2, 2018.
- COOKE, G. S.; HILL, A. V. S. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nature Reviews Genetics*, v. 2, n. 12, p. 967–977, 2001.

- COOPER, A. M.; TORRADO, E. Protection versus pathology in tuberculosis: Recent insights. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 4, p. 431–437, 2012.
- COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. Consequences of genomic diversity in mycobacterium tuberculosis. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 431–444, 2014.
- CHATTERJEE, D.; KHOO, K. H. Mycobacterial lipoarabinomannan: An extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. **Glycobiology**, v. 8, n. 2, p. 113–120, 1998.
- CHAVARR, J.; VANCE, R. E.; VANCE, R. E. The NLRP1 inflammasomes. **Immunological Reviews**, v. 265, p. 22–34, 2015.
- CHINTA, K. C. et al. The emerging role of gasotransmitters in the pathogenesis of tuberculosis. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 59, p. 28–41, 2016.
- CYGLER, M. et al. Structure of rat procathepsin B: Model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. **Structure**, v. 4, n. 4, p. 405–416, 1996.
- DAFFÉ, M. The cell envelope of tubercle bacilli. **Tuberculosis**, v. 95, n. S1, p. S155–S158, 2015.
- DARVASI et al. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). **Reference Module in Life Sciences**, v. 2, p. 442–444, 2013.
- DEY, B.; BISHAI, W. R. Crosstalk between mycobacterium tuberculosis and the host cell. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 486–496, 2014.
- DICKINSON, D. P. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 13, n. 3, p. 238–275, 2002.
- DITTRICH et al. Toll-like receptor 1 variations influence susceptibility and immune response to Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 95, n. 3, p. 328–335, 2015.
- DSMZ. Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany, Prokaryotic Nomenclature. Disponível em: [www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html](http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html). Acessado em 10 de janeiro de 2019.
- EHLERS, S. DC-SIGN and mannosylated surface structures of Mycobacterium tuberculosis: a deceptive liaison. **European Journal of Cell Biology**, Germany, v. 89, n. 1, p. 95–101, 2010.
- EKLUND, D. et al. Human gene variants linked to enhanced NLRP3 activity limit intramacrophage growth of mycobacterium tuberculosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 5, p. 749–753, 2014.
- EMMA, C.; BROUGH, D.; MORTELLARO, A. Novel perspectives on non-canonical inflammasome activation. **Imunotargets and Therapy**, v.4, n.1, p. 131–141, 2015.
- ENSEMBL GENOMES. Disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html>. Acessado em 11 de dezembro de 2018.
- EPHREM, T. et al. Determinants of active pulmonary tuberculosis in Ambo Hospital, West

- Ethiopia. **African Journal of Primary Health Care and Family Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2015.
- EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature, LPSN bacterio.net, 2015. Disponível em: [www.bacterio.net/mycobacterium.html](http://www.bacterio.net/mycobacterium.html), disponível em 21.11.2017.
- FENG, S.; FOX, D.; MAN, S. M. Mechanisms of Gasdermin Family Members in Inflammasome Signaling and Cell Death. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 18, p. 3068–3080, 2018.
- 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.
- FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.
- FRANCHI, L.; MUÑOZ-PLANILLO, R.; NÚÑEZ, G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. **Nature Immunology**, v. 13, n. 4, p. 325–332, 2012.
- GAGNEUX, S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. Philosophical transactions of the Royal Society of London. **Series B, Biological sciences**, v. 367, n. 1590, p. 850–9, 2012.
- GALAGAN, J. E. Genomic insights into tuberculosis. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 5, p. 307–320, 2014.
- GENE, M.; SINGH, P. Significance of CCL2 ( – 2518A / G ), CCR2 ( 190G / A ) and TLR4 polymorphisms ( 896 A / G and 1196C / T ) in tuberculosis risk in Indian population. **Meta Gene**, v. 18, n. 1, p. 184–190, 2018.
- GOMES, T et al. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 9, p. 1–9, 2014.
- GONG, T.; JIANG, W.; ZHOU, R. Control of Inflammasome Activation by Phosphorylation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 43, n. 9, p. 685–699, 2018.
- GOOD, R. C. Opportunistic pathogens in the genus mycobacterium. **Anual Revist Microbiology**, v. 39, p. 347–369, 1985.
- GRIFFITHS, A. J .F. et al. Introdução à Genética. 9 th edition. **Guanabara Koogan**, p.712, 2009.
- GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, n. 2, p. 361–372, 1992.
- GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature Medicine**, v. 21, n. 7, p. 677–687, 2015.
- GUSTINCICH, S. et al. Fast metod for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. **Biotechniques**, v. 11, n. 3, p. 298–300, 1993.
- HANAEI, S. et al. Association of NLRP3 single nucleotide polymorphisms with ulcerative colitis : A case-control study. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 42, n. 3, p. 269–275, 2018.

- HERMANS, P. W. 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.
- HILL, P. C. et al. Risk factors for pulmonary tuberculosis: A clinic-based case control study in The Gambia. **BMC Public Health**, v. 6, p. 1–7, 2006.
- HONG, G.-S.; JUNG, Y.-K. Caspase recruitment domain (CARD) as a bi-functional switch of caspase regulation and NF-kappaB signals. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 19–23, 2002.
- IMTIAZ, S. et al. Alcohol consumption as a risk factor for tuberculosis : meta-analyses and burden of disease. **European Respiratory Journal**, v. 50, p. 1-13, 2017.
- ITO, S.; HARA, Y.; KUBOTA, T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 1, p. R52, 2014.
- JAKOBSEN, M. R.; PALUDAN, S. R. IFI16: At the interphase between innate DNA sensing and genome regulation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 6, p. 649-655, 2014.
- JIN, T. et al. Article Structures of the HIN Domain : DNA Complexes Reveal Ligand Binding and Activation Mechanisms of the AIM2 Inflammasome and IFI16 Receptor. **Immunity**, v. 36, n. 4, p. 561–571, 2012.
- JO, E.-K. et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. 2, p. 148–159, 2016.
- JOHNSON, M. M.; ODELL, J. A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. **Journal of Thoracic Disease**, v. 6, n. 3, p. 210–220, 2014.
- KENT, P.T et al. Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III Laboratory. U.S. Department of Health Education and Welfare, Technical Report, 1985.
- KESAVARDHANA, S.; KANNEGANTI, T. Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction. **International Immunology**, v. 29, n. 5, p. 201–210, 2017.
- KHOSHNOOD, S. et al. International Journal of Biological Macromolecules Novel vaccine candidates against *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 180–188, 2018.
- KIM, S.; MISRA, A. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 289–320, 2007.
- KLEINNIJENHUIS, J. et al. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p. 1–12, 2011.
- KO, D. C. et al. A Genome-wide In Vitro Bacterial-Infection Screen Reveals Human Variation in the Host Response Associated with Inflammatory Disease. **American Journal of Human Genetics**, v. 85, n. 2, p. 214–227, 2009.
- KOCH, R. The etiology of tuberculosis. **The germ theory of disease**, n.15 , p. 109-115, 1882.

- KRAWEZAK, M. et al. The mutational spectrum of single basepair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. **Human Mutation**, v. 90, p. 41-54, 1992.
- LAI et al. Functional polymorphisms of the TLR7 and TLR8 genes contribute to Mycobacterium tuberculosis infection. **Tuberculosis**, v. 98, p. 125-131, 2016.
- LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013–1022, 2014.
- LEE et al. Interferon gamma polymorphisms associated with susceptibility to tuberculosis in a Han Taiwanese population. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, p. 376-380, 2015.
- LI, S. et al. Cathepsin B contributes to autophagy-related 7 (Atg7)-induced nod-like receptor 3 (NLRP3)-dependent proinflammatory response and aggravates lipotoxicity in rat insulinoma cell line. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 42, p. 30094–30104, 2013.
- LI, J. et al. Microbial Pathogenesis Association of IFNG gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis but not with spinal tuberculosis in a Chinese Han population. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 238–243, 2017.
- LIMA, T. M. DE et al. Teste rápido molecular diagnóstico da tuberculose GeneXpert MTB / RIF para GeneXpert MTB / RIF assay for diagnosis of tuberculosis. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 55, n. 17, p. 67–78, 2013.
- LIU, H.; HU, Y. Hardy-Weinberg equilibrium in genetic epidemiology. **V. 35**, n. 1, p. 90-93, 2010.
- LÖNNROTH et al. Drivers of tuberculosis epidemics: The role of risk factors and social determinants. **Social Science & Medicine**, v. 68, n. 12, p. 2240-2246, 2009.
- MARTIN, C.; AGUILO, N.; GONZALO-ASENSIO, J. Vaccination against tuberculosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 36, n. 10, p. 648–656, 2018.
- MARTINON, F. et al. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- $\beta$ . **Molecular Cell**, v. 10, p. 417-426, 2002.
- MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 229–265, 2009.
- MANGTANI, P. et al. Protection by BCG Vaccine Against Tuberculosis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 4, p. 470-480, 2014.
- MANTHIRAM, K. et al. The monogenic autoinflammatory diseases define new pathways in human innate immunity and inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 832–842, 2017.
- MAYER-BARBER, K. D. et al. Innate and Adaptive Interferons Suppress IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Production by Distinct Pulmonary Myeloid Subsets during Mycobacterium tuberculosis Infection. **Immunity**, v. 35, n. 6, p. 1023–1034, 2011.
- MEYER, C. G.; THYE, T. Host genetic studies in adult pulmonary tuberculosis. *Seminars in*

Immunology, v. 26, n. 6, p. 445–453, 2014.

MCGOVERN, D. P. B. et al. TUCAN (CARD8) Genetic Variants and Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 131, n. 4, p. 1190–1196, 2006.

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

MONIN, L.; KHADER, S. A. Chemokines in tuberculosis: The good, the bad and the ugly. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 552–558, 2014.

MORTAZ, E. et al. Interaction of Pattern Recognition Receptors with *Mycobacterium Tuberculosis*. **Journal of Clinical Immunology**, v. 35, n. 1, p. 1–10, 2015.

NADERI, M. et al. Association of Genetic Polymorphisms of IFNGR1 with the Risk of Pulmonary Tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. **Tuberculosis research and treatment**, v. 2015, p. 1-5, 2015.

NADIRI, A.; WOLINSKI, M. K.; SALEH, M. The Inflammatory Caspases: Key Players in the Host Response to Pathogenic Invasion and Sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 7, p. 4239–4245, 2006.

NARDO, D. DE; PELLEGRINI, C. Canonical and Non-Canonical Activation of NLRP3 inflammasome at the Crossroad between immune Tolerance and intestinal inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n.32, p.1-12, 2017.

OCEJO-VINYALS et al. The IL-17 G-152A single nucleotide polymorphism is associated with pulmonary tuberculosis in northern Spain. **Cytokine**, v. 64, n.1, p. 58-61, 2013.

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

OLIVEIRA, L. C. et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms of some immune response genes in a population sample from São Paulo, Brazil. **Einstein**, v. 9, n. 3, p. 359-366, 2011.

ORAL, H. B. et al. Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. **Cytokine**, v. 35, n. 1, p. 143-147, 2006.

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

PARAMEL, G. V.; SIRSJÖ, A.; FRANSÉN, K. Role of genetic alterations in the NLRP3 and CARD8 genes in health and disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

PATHAN, N. et al. TUCAN, an Antiapoptotic Caspase-associated Recruitment Domain Family Protein Overexpressed in Cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 34, p. 32220–32229, 2001.

PLACE, D. E.; KANNEGANTI, T. ScienceDirect Recent advances in inflammasome biology. **Current Opinion in Immunology**, v. 50, p. 32–38, 2018.

PONTILLO, A. et al. Polymorphisms in In inflammasome ’ Genes and Susceptibility to HIV-1 Infection. **Journal of acquired immune deficiency syndromes**, v. 59, n. 2, p. 121–125,

2012.

PONTILLO, A. et al. Infection , Genetics and Evolution NLRP1 haplotypes associated with leprosy in Brazilian patients. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 274–279, 2013.

PONTILLO et al. Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis Infection in HIV-Positive Patients Is Associated With CARD8 Genetic Variant. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 63, n. 2, p. 147-151, 2013.

QIAN, X. et al. Risk factors for extrapulmonary dissemination of tuberculosis and associated mortality during treatment for extrapulmonary tuberculosis. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 107, p. 1-14, 2018.

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

RAZMARA, M. et al. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 16, p. 13952–13958, 2002.

RHINES, A. S. The role of sex differences in the prevalence and transmission of tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 93, n. 1, p. 104–107, 2013.

ROGALL, T. et al. Towards a Phylogeny and Definition of Species at the Molecular Level within the Genus Mycobacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 4, p. 323–330, 1990.

RUAN, S.-Y. et al. Revisiting tuberculous pleurisy: pleural fluid characteristics and diagnostic yield of mycobacterial culture in an endemic area. **Thorax**, v. 67, n. 9, p. 822–827, 2012.

SAIGA et al. Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. **International Immunology**, v. 24, n. 10, p. 637-644, 2012.

SALLEM, J. I. et al. Valor relativo do exame direto, após concentração e por cultivo de escarro no diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar no Amazonas. **Journal Pneumologist**, v. 16, p. 133-136, 1990.

SANTOS, M. L.S. et al. Contribution of inflammasome genetics in Plasmodium vivax malária. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, p. 162-166, 2016.

SALLEM, J. I. et al. Valor relativo do exame direto, após concentração e por cultivo de escarro no diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar no Amazonas. **Journal Pneumologist**, v. 16, p. 133-136, 1990.

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. 1-13, 2012.

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

STROWIG, T. et al. Inflammasomes in health and disease. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 278–



286, 2012.

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

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

SUNDARAMURTHY, V.; PIETERS, J. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 14–15, p. 1671–1679, 2007.

TIENTCHEU, L. D.; KOCH, A.; NDENGANE, M. Immunological consequences of strain variation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **European Journal of Immunology**, v. 3, n. 47, p. 432–445, 2017.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 6, p. 455–462, 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, n. 2, p. 406–409, 1993.

VANCE, R. E. The NAIP/NLRC4 inflammasomes. **Current Opinion in Immunology**, v. 32, p. 84–89, 2015.

VERMA, D. et al. Gene polymorphisms in the NALP3 inflammasome are associated with interleukin-1 production and severe inflammation relation to common inflammatory diseases? **Arthritis and Rheumatism**, v. 58, n. 3, p. 888–894, 2008.

VERMA, D. et al. The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin-1 $\beta$  and IL-18 production. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 2–8, 2012.

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

WANG, B; YIN, Q. AIM2 inflammasome activation and regulation: A structural perspective. **Journal of Structural Biology**, v. 200, n. 3, p. 279–282, 2017.

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

WHO, Organização Mundial de Saúde. GLOBAL TB CONTROL 2015 REPORT, Disponível em [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/). Acessado em novembro de 2017.

WHO, Organização Mundial de Saúde. GLOBAL TB CONTROL 2016 REPORT, Disponível em [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/). Acessado em novembro de 2018.

WHO, Organização Mundial de Saúde. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2017. Disponível em [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/gtbr2017](https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017). Acessado em outubro de 2018.

WHO, Organização Mundial de Saúde. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2018. Disponível em [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/). Acessado em janeiro de 2018.

- XU, H. et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. **Nature**, v. 513, p. 237–241, 2014.
- YANG, W. E. et al. Cathepsin B Expression and the Correlation with Clinical Aspects of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Plos One**, v. 11, n. 3, p. 1-11, 2016.
- YU, C. H. et al. Mechanisms of NLRP1-Mediated Autoinflammatory Disease in Humans and Mice. **Journal of Molecular Biology**, p. 1–11, 2017.
- YU, P. et al. Association of NLRP1 and NLRP3 Polymorphisms with Psoriasis Vulgaris Risk in the Chinese Han Population. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 01-08, 2018.
- ZAHRT, T. C. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 2, p. 159–167, 2003.
- ZHOU et al. The -137G/C single nucleotide polymorphism in IL-18 gene promoter contributes to tuberculosis susceptibility in Chinese Han population. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 36, n.1, p. 376-380, 2015.
- ZHOU et al. P2X7 receptor in spinal tuberculosis: Gene polymorphisms and protein levels in Chinese Han population. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 57, n. 1, p. 138-144, 2018.

*Appendice*

---

## APÊNDICE

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

Além disso, as amostras armazenadas poderão ser utilizadas para estudos futuros, mas somente após a aprovação do novo projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP ou CONEP, e também com o seu reconsentimento por meio de um novo TCLE, para uso dessas amostras. Para qualquer detalhe sobre esta pesquisa, basta entrar em contato com a pesquisadora responsável ou um de seus colaboradores pelos telefones: (92) 991923539 ou 98116-0555 ou e-mails: vanessa\_almeida1212@hotmail.com, aya.sadahiro@gmail.com, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM, na Rua Teresina, 495, Adrianópolis, Manaus-AM, telefone (92) 3305-1181, ramal 2004, ou pelo e-mail: cep.ufam@gmail.com. Você aceita que o seu material biológico seja utilizado em estudos futuros?

Sim  Não

Consentimento Pós-Informação

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

Assinatura do paciente	ou						...../...../..... Data
							...../...../..... Data
Assinatura do pesquisador			<div style="border: 2px solid black; width: 100px; height: 100px; margin: 0 auto;"></div>	Impressão do polegar			

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

Além disso, as amostras armazenadas poderão ser utilizadas para estudos futuros, mas somente após a aprovação do novo projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP ou CONEP, e também com o seu re consentimento por meio de um novo TCLE, para uso dessas amostras. Para qualquer detalhe sobre esta pesquisa, basta entrar em contato com a pesquisadora responsável ou um de seus colaboradores pelos telefones: (92) 991923539 ou 98116-0555 ou e-mails: vanessa\_almeida1212@hotmail.com, aya.sadahiro@gmail.com, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM, na Rua Teresina, 495, Adrianópolis, Manaus-AM, telefone (92) 3305-1181, ramal 2004, ou pelo e-mail: cep.ufam@gmail.com. Você aceita que o seu material biológico seja utilizado em estudos futuros?

Sim  Não

Consentimento Pós-Informação

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

	ou		
Assinatura do Contato		Assinatura do pesquisador	<div style="border: 2px solid black; width: 100px; height: 100px; margin: 0 auto;"></div> Impressão do polegar
			...../...../..... Data  ...../...../..... Data

### APÊNDICE III - FICHA DE CADASTRO DE PACIENTES

FICHA DE CADASTRO DE PACIENTES	
DATA: ____/____/____	
Nº REGISTRO ESCARRO ____/____      Nº REGISTRO SANGUE ____/____	
Nome: _____ Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	
Endereço: _____ Fone: _____	
Data de Nascimento: ____/____/____    Idade: ____    Profissão: _____	
Cidade onde mora: _____    Naturalidade: _____	
Naturalidade (País): _____    Naturalidade (Avós): _____	
Informações Clínicas: Forma da TB: _____	
BCG: <input type="checkbox"/> Não                      PPD: <input type="checkbox"/> Não                      Exames de imagens <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Tipo: _____	
<input type="checkbox"/> Sim Data: ____/____/____ <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não reator    Resultado: _____	
<input type="checkbox"/> Não sabe informar <input type="checkbox"/> Reator ____ mm      _____	
_____	
Antecedente de Tuberculose:	
Pessoal: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim      Quando pela 1ª vez: _____	
Familiar:	
<input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Tios <input type="checkbox"/> Sogros <input type="checkbox"/> Colega de trabalho <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Primos <input type="checkbox"/> Cônjuge <input type="checkbox"/> Agregados	
<input type="checkbox"/> Irmãos <input type="checkbox"/> Filho(s) <input type="checkbox"/> Namorado <input type="checkbox"/> Outros <input type="checkbox"/> Avós <input type="checkbox"/> Cunhado <input type="checkbox"/> Vizinho <input type="checkbox"/> Não sabe informar	
Resultados anteriores de BAAR <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim    Onde? _____	
Resultado: 1) ____ 2) ____    Outros exames: _____	
Consome bebidas alcoólicas e/ou fuma?	
<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim, quantos cigarros por semana: _____	
<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim, Qual: <input type="checkbox"/> cerveja (1 dose=330mL) vinho (1 dose 100mL) Destilados (1 dose= 30mL), quantas doses por semana: _____	
_____	
Quadro clínico atual:	
<input type="checkbox"/> Tosse <input type="checkbox"/> Expectoração <input type="checkbox"/> Hemoptise <input type="checkbox"/> Dispneia <input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Dor torácica <input type="checkbox"/> Dor de cabeça <input type="checkbox"/> Emagrecimento	
<input type="checkbox"/> Cansaço <input type="checkbox"/> Outros. Quais? _____	
O paciente:	
<input type="checkbox"/> Não recebeu nenhum tratamento antes da coleta da amostra clínica atual	
<input type="checkbox"/> Está recebendo tratamento desde: _____    Medicação: _____	

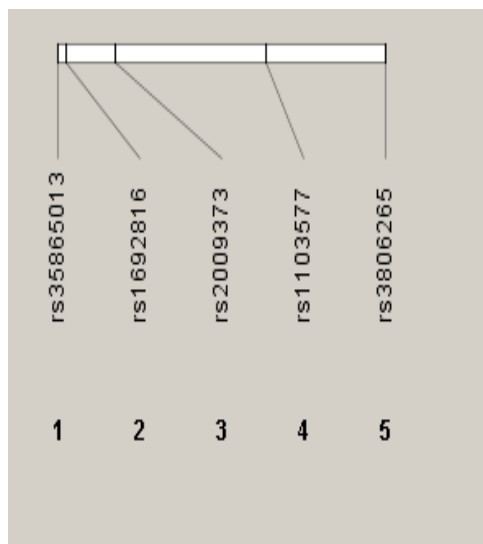
Observação: Esta ficha ficará em arquivo restrito sob responsabilidade do pesquisador principal (coordenador do Projeto) para manter o sigilo dos dados dos participantes.



## APÊNDICE IV - FICHA DE CADASTRO DE CONTATOS

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

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

**APÊNDICE V – DESIQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO**

Legenda: Desiquilíbrio de ligação (LD) dos SNP considerando pacientes com TB pulmonar, extrapulmonar e controles.

*Anexos*

---

## ANEXO

## ANEXO I - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PODER EXECUTIVO  
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UFAM

## PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

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

*Eliana Maria Pereira da Fonseca*  
 Profª. MSc. Eliana Maria Pereira da Fonseca

Coordenadora CEP/UFAM

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

Escola de Enfermagem de Manaus – EEM/UFAM

Rua Teresina, 4950 – Adrianópolis – CEP: 69057-070 – Manaus-AM – Fone: (92) 3305-5130 – E-mail: cep@ufam.edu.br