

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

Alena Mileo Monteiro Diniz

**Investigação epidemiológica e relação entre
polimorfismos genéticos nos antígenos leucocitários
humanos (HLA) classe II (DRB1* e DQB1*) em indivíduos
com tuberculose pulmonar, extrapulmonar e sem
tuberculose no Estado do Amazonas**

Manaus-AM
2023

Alena Mileo Monteiro Diniz

Investigação epidemiológica e relação entre polimorfismos genéticos nos antígenos leucocitários humanos (HLA) classe II (DRB1* e DQB1*) em indivíduos com tuberculose pulmonar, extrapulmonar e sem tuberculose no Estado do Amazonas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Professora Doutora Aya Sadahiro

Manaus-AM
2023

Ficha Catalográfica

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

D585i Diniz, Alena Mileo Monteiro
Investigação epidemiológica e relação entre polimorfismos genéticos nos antígenos leucocitários humanos (HLA) classe II (DRB1* e DQB1*) em indivíduos com tuberculose pulmonar, extrapulmonar e sem tuberculose no Estado do Amazonas. / Alena Mileo Monteiro Diniz . 2023
80 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Aya Sadahiro
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Tuberculose. 2. Human Leukocyte Antigen-HLA. 3. Classe II (DRB1 e DQB1). 4. Imunogenética. I. Sadahiro, Aya. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Alena Mileo Monteiro Diniz

**Investigação epidemiológica e relação entre
polimorfismos genéticos nos antígenos leucocitários
humanos (HLA) classe II (DRB1* e DQB1*) em indivíduos
com tuberculose pulmonar, extrapulmonar e sem
tuberculose no Estado do Amazonas**

BANCA EXAMINADORA

Professora Doutora Aya Sadahiro

Presidente da banca

Professora Doutora Emilyn Costa Conceição Sharma

Membro da banca

Professora Doutora Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto

Membro da banca

Professora Doutora Paula Keiko Sato

Membro da banca

Professor Doutor Rajendranath Ramasawmy

Membro da banca

Manaus, junho de 2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, por absolutamente tudo.

Aos meus pais, incansáveis e incondicionalmente amorosos; meus maiores incentivadores.

À minha família (filha, esposo, irmãos, pais) pela paciência frente às minhas ausências em prol de meus estudos.

À professora Aya Sadahiro, pessoa quem tornou realidade este projeto, que sempre me incentivou e entendeu. Uma orientadora nata. Simplesmente alguém que me inspira.

À equipe do Laboratório de Imunologia da UFAM (Laianne, Ivanildo, Marcos, Alliny); e especialmente à Mariana Brasil, que sempre esteve disposta a tirar minhas dúvidas e a ajudar no laboratório e nas análises.

Aos colegas do PPGIBA Josué Lacerda e José do Espírito Santo, que ajudaram nas análises dos dados.

Ao professor Mauricio Morishi Ogusku, quem sempre me ajudou com amostras de pacientes.

Ao professor e amigo Edson Brazão Castro, pela receptividade e pelo incentivo desde a entrada no PPGIBA às conversas enriquecedoras.

À professora Zeli, quem me apresentou o PPGIBA.

A todos os pacientes que, na fragilidade da doença, cederam parte de si em prol do saber.

DEDICATÓRIA

À minha filha, Ana Laura, para que – assim como eu – ela possa amar os estudos e a busca pelo saber.

Especialmente aos meus avós, Russo e Janu (*in memoriam*). Vocês semearam em mim o amor pelos estudos e pelo aprendizado...

Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.
Isaac Newton

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa e transmissível causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A forma clínica mais frequente é a tuberculose pulmonar (TBP), entretanto outros órgãos e/ou sistemas podem ser acometidos, ocasionando a tuberculose extrapulmonar (TBExP). Apesar de ser uma enfermidade antiga, a tuberculose continua sendo um importante problema de saúde pública mundial. No Brasil, em 2022, mais de 78 mil casos novos foram notificados e ocorreram cerca de 2,2 óbitos/100 mil habitantes em decorrência da TB. Nesse mesmo ano, o Amazonas registrou 84,1 casos/100 mil habitantes e 4,0 óbitos por TB/100 mil habitantes, os maiores coeficientes da doença no País. Esses dados estimulam pesquisas em imunologia, uma vez que a maioria dos indivíduos infectados por *M. tuberculosis* consegue controlar a infecção e menos de 10% evoluem para doença ativa. Além disso, a TB apresenta amplo espectro clínico, sugerindo que fatores imunogenéticos, como as moléculas de HLA- *Human Leukocyte Antigen* (antígeno leucocitário humano) classe II possa estar envolvida na evolução da doença. Essas moléculas estão constitutivamente presentes nas células apresentadoras de antígenos e formam complexos com peptídeos que serão apresentados aos linfócitos T *helper* (Th). Na TB, a resposta imune por linfócitos Th1 é importante para o controle da infecção. Por este motivo, o objetivo desta pesquisa foi investigar a distribuição dos alelos do gene de HLA classe II (-*DRB1* e -*DQB1*) em indivíduos com TB. Este estudo incluiu 519 participantes, sendo 195 indivíduos com TBP, 67 com TBExP e 257 controles sem TB, todos recrutados em centro de referência do Amazonas. Amostras de escarro permitiram identificar micobactérias envolvidas, enquanto amostras sanguíneas permitiram avaliar os alelos de HLA. Os resultados obtidos revelaram que *HLA-DRB1*04* foi o alelo mais frequente em indivíduos com TBP (23,8%) quando comparado ao grupo sem TB (14,6%) ($p=0,0005$; OR 1,833; IC95% 1,305 a 2,556) e comparado aos indivíduos com TBExP (12,7%) ($p=0,009$; OR 2,155; IC95% 1,257 a 3,847). *HLA-DRB1*07* foi o alelo mais frequente nos controles sem TB (10,7%) que nos indivíduos com TBP (4,6%) ($p=0,0014$; OR 0,404; IC95% 0,234 a 0,686). *HLA-DQB1*02* foi o alelo mais frequente nos controles sem TB (15,2%) comparando com indivíduos com TBP (10,0%) ($p=0,0281$; OR 0,621; IC95% 0,408 a 0,942). *HLA-DQB1*0302* foi mais frequente em indivíduos com TBP (22,1%) comparando com controles (13,0%) ($p=0,0005$; OR 1,887; IC95% 1,330 a 2,661) e na comparação com TBExP (11,9%) ($p=0,0150$; OR 2,086; IC95% 1,188 a 3,624). Não houve associação do HLA com a forma clínica TBExP, mas este grupo apresentou o maior número de indivíduos *blanks*/homozigotos para o alelo *HLA-DRB1* (7,5%) ($p=0,0415$; OR 2,510; IC95% 1,145 a 5,768). Os achados permitem concluir que indivíduos com os alelos *HLA-DRB1*04* e *DQB1*0302* apresentam maiores chances de evoluírem para TBP enquanto os alelos *HLA-DRB1*07* e *HLA-DQB1*02* parecem ter efeito protetor somente para a forma TBP.

Palavras-chave: tuberculose; HLA-antígeno leucocitário humano; -*DRB1**; *DQB1**; imunogenética.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious and transmissible disease caused by mycobacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. The most common clinical form is pulmonary tuberculosis (PTB), however other organs and/or systems can be affected, causing extrapulmonary tuberculosis (ExPTB). Despite being an ancient disease, tuberculosis remains as a major public health problem worldwide. In Brazil, in 2022, there were more than 78,000 new cases of TB, approximately 2.2 deaths/100,000 inhabitants due to TB. In that same year, Amazonas recorded 84.1 TB cases/100,000 inhabitants and 4.0 deaths caused by TB/100 thousand inhabitants, the highest rates of the disease in the country. These data encourage research in the field of immunology, given that most individuals infected with *M. tuberculosis* can control the infection and less than 10% progress to active disease. Furthermore, TB has a broad clinical spectrum, suggesting that immunogenetic factors, such as HLA - Human Leukocyte Antigen (human leukocyte antigen) class II molecules, may be involved in the evolution of the disease. These molecules are constitutively present in antigen-presenting cells and form complexes with peptides that will be presented to T helper (Th) lymphocytes. In TB, the immune response by Th1 lymphocytes is important for controlling the infection. For this reason, the objective of this research was to investigate the distribution of HLA-class II gene alleles (DRB1 and DQB1) in individuals with TB. This study included 519 participants, 195 were PTB patients, 67 ExPTB and 257 healthy controls, all recruited from a reference center in Amazonas. Sputum samples made it possible to identify the mycobacteria involved, while blood samples made it possible to evaluate HLA alleles. The results revealed that HLA-DRB1*04 was the most frequent allele in PTB patients (23.8%) when compared with the control group (14.6%) ($p = 0.0005$; OR 1.833; 95%CI 1.305 to 2.556) and with ExPTB patients (12.7%) ($p = 0.009$; OR 2.155; 95%CI 1.257 to 3.847). HLA-DRB1*07 was more frequent in the control group (10.7%) when compared with PTB patients (4.6%) ($p = 0.0014$; OR 0.404; 95%CI 0.234 to 0.686). As for DQB1 alleles, HLA-DQB1*02 was the most frequent in the control group (15.2%) when compared with PTB patients (10.0%) ($p = 0.0281$, OR 0.621; 95% CI 0.408 to 0.942); while HLA-DQB1*0302 was the most frequent in PTB patients (22.1%), compared with controls (13.0%) ($p = 0.0005$; OR 1.887; 95%CI 1.330 to 2.661) and with ExPTB patients (11.9%) ($p = 0.0150$; OR 2.086; 95%CI 1.188 to 3.624). There was no association between HLA and the ExPTB clinical form, but this group had the highest number of individuals who were blank/homozygous for HLA-DRB1 (7.5%) ($p = 0.0415$; OR 2.510; 95% CI 1.145 to 5.768). Finally, in the assessed groups, individuals expressing HLA-DRB1*04 and DQB1*0302 alleles are more likely to develop the pulmonary clinical form of TB. On the other hand, the HLA-DRB1*07 and HLA-DQB1*02 alleles seem to have a protective effect only for the PTB form.

Keywords: tuberculosis; HLA-human leukocyte antigen; -DRB1*; DQB1*; immunogenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fatos ligados à TB em marcos históricos.....	19
Figura 2: Receptores para <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e vias de sinalização celular da resposta imune; destaque para a via MyD88, NOD2, TRIF.....	27
Figura 3: Esquema de alguns dos genes de HLA, presentes no cromossomo 6, didaticamente divididos nas três classes de HLA (I, II, III).	36
Figura 4: Estrutura molecular do MHC classes I e II.....	37
Figura 5: Etapas metodológicas para extração e tipificação do HLA.....	49
Figura 6: Bandas de HLA, em gel de agarose a 1,5%, coradas com SYBR GREEN®- Sybr Safe após corrida de eletroforese, e revelação no transiluminador de luz azul para visualização. Fotografia de 17/08/2021.	50
Figura 7: Frequência dos alelos -DRB1* em pacientes (TBP e TBExP) e controles	61
Figura 8: Frequência dos alelos -DQB1* em pacientes (TBP e TBExP) e controles.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis epidemiológicas em pacientes com TB (pulmonar e extrapulmonar) e controles.	56
Tabela 2: Vacinação e hábitos comparando grupos dois a dois.	57
Tabela 3: Vacinação e hábitos (fumo e consumo de álcool) entre pacientes com TB (pulmonar e extrapulmonar) e controles.....	58
Tabela 4: Sítios de acometimento de tuberculose extrapulmonar dentre os pacientes avaliados.	59
Tabela 5: Alelos HLA-DRB1* e comparação entre grupos para determinar associação (risco ou proteção) com a TB.....	64
Tabela 6: Alelos HLA-DQB1* e comparação entre grupos para determinar associação (risco ou proteção) com a TB.....	66

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	<i>Adenosina Deaminase</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> (células apresentadoras de antígenos)
BCG	<i>Bacilo Calmette-Guérin</i>
ESAT-6	<i>6 kDa Early Secreted Antigenic Target</i> (Alvo Antigênico de 6kDa Secretado Precocemente)
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)
Fas	<i>Factor Related Apoptosis</i> (Fator Relacionado à Apoptose)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
Hsp70	<i>Heat Shock Protein of 70 kDa</i> (Proteína do Choque Térmico de 70 kDa)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
IFN-γ	Interferon gama
IGRA	<i>IFN-gamma Release Assay</i> (Ensaio de Liberação de Interferon gama)
IRF3	<i>Interferon Regulatory Factor 3</i> (Fator Regulatório de Interferon 3)
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response 88</i> (Resposta Primária de Diferenciação Mieloide)
NETs	<i>Neutrophilic Extracellular Traps</i> (Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos)
NK	<i>Natural killer cell</i> (Células Naturais Killer)
NLR	<i>NOD-like receptors</i> (Receptores semelhantes a NOD)
NOD	<i>Nucleotide Oligomerization Domain</i> (Domínio de Oligomerização de Nucleotídeo)

NRAMP1	<i>Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1</i> (gene da proteína 1 associada à resistência natural do macrófago)
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
SSP	<i>Sequence Specific Primer</i> (Iniciador de Sequência Específica)
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral Alfa)
Th1	<i>T helper 1 Lymphocyte</i> (Linfócito T auxiliar 1)
Th2	<i>T helper 2 Lymphocyte</i> (Linfócito T auxiliar 2)
Treg	<i>Regulatory T cells</i> (Linfócito T regulador)
TLR	<i>Toll-like receptors</i> (Receptores Semelhantes a <i>Toll</i>)
vs	<i>versus</i>

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Revisão literária	17
2.1. Evolução da TB dentro da história	17
2.2. Epidemiologia da TB.....	19
2.3. Transmissão, resposta imunológica, forma clínica e diagnóstico da TB.....	20
2.4. Resposta imune inata e adaptativa na TB e mecanismos de escape da <i>M. tuberculosis</i>	26
2.4.1. Resposta imune inata	26
2.4.2. Resposta imune adaptativa	31
2.5. Imunogenética na TB.....	35
2.5.1. Genes associados à TB	35
2.5.2 Major Histocompatibility Complex (MHC) e Human Leukocyte Antigen (HLA).....	35
2.5.3 HLA classe II (DR e DQ) na TB	39
2.5.4 Antropologia do HLA na TB	41
2.5.5 Estudos do HLA na TB.....	42
3. Justificativa	44
4. Objetivos	44
4.1. Objetivo Geral	44
4.2. Objetivos Específicos.....	44
4.2.1 Avaliar a associação entre variáveis sociodemográficas, epidemiológicas e clínicas entre indivíduos com tuberculose pulmonar, extrapulmonar e indivíduos sem tuberculose;.....	44
4.2.2 Avaliar as frequências dos polimorfismos de genes do HLA-DR e -DQ em indivíduos com tuberculose pulmonar e extrapulmonar em relação aos indivíduos sem tuberculose;.....	44
4.2.3 Analisar a associação dos polimorfismos de genes do HLA-DR e -DQ com risco para o desenvolvimento de tuberculose pulmonar e extrapulmonar.....	44
5. Método	44
5.1. Considerações éticas do projeto.....	44
5.2. População do estudo, local de estudo e cálculo da amostra	45
5.2.1 Critérios de inclusão	45
5.2.2 Critérios de exclusão	46
5.2. Amostras biológicas.....	46
5.2.1 Escarro.....	47
5.2.2 Sangue	47
5.3. Exames microbiológicos.....	47

5.4. Extração do DNA bacteriano e humano	47
5.4.1 DNA bacteriano	47
5.4.2 DNA humano.....	48
5.5. Tipificação do HLA classe II	48
5.6. Análises estatísticas	50
6. Resultados e Discussão	51
6.1 Resultados das variáveis sociodemográficas e epidemiológicas	51
6.2 Resultados das análises de HLA-DRB1* e -DQB1*	59
7. Conclusões	67
8. Considerações finais	68
9. Equipe de Pesquisa.....	69
10. Colaborações para esta pesquisa.....	69
Referências bibliográficas	70

1. Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Classificam-se nesse complexo as espécies: *M. tuberculosis var. tuberculosis*, *M. tuberculosis var. bovis*, *M. bovis BCG*; *M. tuberculosis var. africanum*, *M. tuberculosis var. microti*, *M. tuberculosis var. caprae* e *M. tuberculosis var. pinnipedi* (BRASIL, 2022a).

A variante *M. tuberculosis var. tuberculosis* (MTB) é a maior responsável pelos casos de TB em humanos. O bacilo MTB historicamente é conhecido por *bacilo de Koch*, em homenagem ao famoso pesquisador Robert Koch, quem pela primeira vez visualizou por microscopia o bacilo (GRADMANN, 2001; BARBERIS *et al.*, 2017).

Apesar de existir tratamento para a doença, a TB continua sendo grave problema de saúde pública. No período de 2020 a 2021, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a pandemia da covid-19 impactou negativamente as notificações de novos casos, bem como o tratamento da TB. No ano de 2021, estimou-se que 10,6 milhões de pessoas adoeceram de TB no mundo. Destas, em torno de 1,4 milhão de mortes ocorreu entre pessoas HIV-negativas; e 187 mil mortes entre pessoas com HIV (OMS, 2022).

De acordo com o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde do Brasil, publicado em março de 2023, foram notificados no Brasil, em 2022, 78.057 casos de TB (coeficiente de incidência nacional de 36,3 casos/100 mil habitantes). Treze estados brasileiros apresentaram coeficiente de incidência acima da média nacional; desses, três lideram o *ranking* com os piores índices: Amazonas (84,1 casos/100 mil hab.), Roraima (75,9 casos/100 mil hab.) e Rio de Janeiro (68,6 casos/100 mil hab.) (BRASIL, 2023).

Dados preocupantes, porém, que motivam a comunidade científica à realização de pesquisas e à elaboração de estratégias que possam contribuir direta ou indiretamente para o controle da TB no País e no mundo.

A infecção por MTB ocorre principalmente pelas vias aéreas superiores, após inalação de aerossóis que carregam bacilos liberados pela tosse, fala ou espirro da pessoa doente. Esses bacilos alcançam os alvéolos, e conseqüentemente células mieloides residentes no pulmão iniciam contato com esses micro-organismos. Os macrófagos alveolares (MA) pertencentes ao sistema imune inato internalizam os bacilos e são cruciais na preparação do cenário para a resposta imune subsequente contra MTB (MURPHY *et al.*, 2008; GUILLIAMS *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2019).

As células mieloides residentes no pulmão, em especial os MA, podem contribuir para a resistência do hospedeiro à infecção por MTB e podem ser fundamentais para o estabelecimento dos bacilos na fase inicial da resposta imune (MAYER-BARBER & BARBER, 2015).

Fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro são essenciais para a compreensão da resposta contra o bacilo causador da TB e, conseqüentemente, para as diferentes evoluções clínicas da doença. A forma clínica mais frequente é a TB pulmonar, responsável pela transmissão e pela manutenção da TB. No entanto, formas extrapulmonares merecem atenção, pois são igualmente importantes e preocupantes (HUANG *et al.*, 2019).

Formas de TB extrapulmonar (TBExP), tais como a pleural, ganglionar, miliar, cutânea, dentre outras, podem representar percentuais significativos no mundo ($\geq 30\%$). No Brasil, o percentual de casos notificados de TBExP compreende de 10 a 19% (OMS, 2020).

No panorama da TB no Brasil, o Amazonas apresentou, na série histórica de 2008 a 2016, coeficiente de incidência de TBExP de 10,0 casos/100 mil habitantes – taxa considerada alta em relação ao coeficiente nacional à época (4,6 casos/100 mil habitantes). Esses dados epidemiológicos indicam que os coeficientes de incidência no Amazonas são elevados tanto para TBP, quanto para TBExP (BRASIL, 2018).

Apesar do acometimento pulmonar ser o mais frequente, aproximadamente 25% dos doentes podem apresentar formas extrapulmonares, principalmente na pleura e nos gânglios linfáticos. As formas extrapulmonares resultam da circulação dos bacilos na corrente sanguínea e/ou linfática logo após a entrada desse agente no pulmão (RUAN *et al.*, 2012).

Na TBExP a forma mais comum é a pleural, desenvolvida a partir de uma infecção latente ou primária e reativada anos após a infecção primária, principalmente na fase adulta. A infecção pleural pode iniciar por contiguidade a partir da lesão no pulmão para o espaço subpleural ou por via hematogênica (CHAIMOWICZ, 2001).

Estima-se que a partir da exposição ao bacilo *M. tuberculosis* aproximadamente 30% dos indivíduos se tornem infectados; e destes, mais de 90% consigam controlar a infecção, de forma que menos de 10% desenvolvem a doença (LOBUE *et al.*, 2010; SHALER *et al.*, 2012). Dados apontam outros determinantes além de fatores sociais e tempo de contato com o paciente infectado; como o *status* imunológico do hospedeiro, que corrobora para o desenvolvimento da doença.

Evidências diversas revelam que o perfil genético do hospedeiro é fundamental na evolução da resposta contra *M. tuberculosis* (BELLAMY, 1998; HILL, 2001; GOLDFELD, 2004; HILL, 2006; EL BAGHDADI *et al.*, 2013).

O Antígeno Leucocitário Humano (HLA-*Human Leukocyte Antigen*) é um complexo codificado pelos genes mais polimórficos do genoma humano, sendo atualmente considerado “hiperpolimórfico”, constituído por 35.821 alelos registrados oficialmente até a presente data (BARKER *et al.*, 2023). As moléculas de HLA classe II são fundamentais durante a apresentação de antígenos de *M. tuberculosis* aos linfócitos TCD4+. Pesquisas revelam que diferenças no HLA em populações distintas se associam ao risco ou à proteção para TB; justamente devido a característica hiperpolimórfica deste complexo (GOLDFELD, *et al.*, 1998, HILL, 2006; THUONG *et al.*, 2008; EL BAGHDADI *et al.*, 2013).

Entre os alelos de HLA classe II associados à TB que representam especialmente risco para TBP, citam-se: *HLA-DRB1*16* (DUBANIEWICZ *et al.*, 2000), *HLA-DRB1*15* (BORNMAN *et al.*, 2004), *DQB1*06:01*, *DRB1*04*, *DQB1*03*, *DRB1*14*, *DQB1*HLA-DRB1*08*, (RUGGIERO *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005; LOMBARD *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2007; DUARTE *et al.*, 2011).

Uma metanálise com 31 artigos na população asiática detectou os seguintes alelos associados com TB: *HLA-DRB1*04*, *-DRB1*09*, *-DRB1*10*, *-DRB1*15* e *-DRB1*16* (TONG *et al.*, 2015).

A pesquisa de Souza de Lima *et al.*, (2016) identificou que o alelo *HLA-DRB1*04* (HLA-DR4) está associado à TBP na população amazonense investigada, dos quais dois subtipos foram associados ao risco para doença (*HLA-DRB1*04:11* e *DRB1*04:92*); e o subtipo *HLA-DRB1*04:07* foi relacionado à proteção.

Pacientes que desenvolvem TB e possuidores do *HLA-DRB1*07* (HLA-DR7) podem não responder aos antígenos utilizados nos Ensaio de Liberação de Interferon-gama (IGRA- *IFN-gamma Release Assay*), teste imunológico para detecção de indivíduos sensibilizados a MTB. Nessa situação provavelmente o HLA-DR7 não seja um bom ligante aos peptídeos utilizados no teste (HANG *et al.*, 2011).

Estudos imunogenéticos em diferentes populações tornam-se importantes para identificar quais alelos do gene de HLA são mais associados à TB. Além disso, permitem verificar *in silico* alelos específicos de HLA que são ligantes fortes ou fracos aos antígenos de vários patógenos, incluindo os peptídeos antigênicos de *M. tuberculosis*.

A fim de ampliar o conhecimento sobre genes do HLA e TB, este estudo apresenta quais alelos de *-DRB1** e *-DQB1** estão relacionados com risco e proteção na TB nas formas pulmonar e extrapulmonar, comparados a um grupo controle de indivíduos sem TB.

2. Revisão literária

2.1. Evolução da TB dentro da história

Acredita-se que o gênero *Mycobacterium* se originou há mais de 150 milhões de anos, com as primeiras infecções afetando homínídeos na África Oriental. A evolução de um ancestral de *M. tuberculosis* pode ter ocorrido entre 20.000 e 15.000 anos a.C., inicialmente entre tribos nômades (BARBERIS *et al.*, 2017).

Múmias egípcias com mais de 4.400 anos apresentaram deformidades ósseas sugestivas de lesões por TB, e papiros dessa época mostraram propostas terapêuticas com alfarroba, tâmaras, mel, fumigações; pois àquela época já se supunha que tal enfermidade seria transmitida pelo ar. Hipócrates citava a tísica como a doença mais disseminada e fatal daquele momento. Curioso é que, na medicina grega, o termo “tísica” (escrita *phthisis*) era relacionado ao decaimento, consumo, definhamento, não sendo restrita à TB (BARBERIS *et al.*, 2017).

Na Idade Média, o cirurgião Guy de Chauliac, em 1363 foi o primeiro a propor intervenção para cura da TB. Tal intervenção era baseada na remoção dos escrófulos (como eram chamados os “nós” de linfa cervical). Em 1679, Francis La Boe (Sylvius) utilizou o termo “tuberculose” pela primeira vez no livro *Opera Medic* ao descrever a anatomia e a patologia de tubérculos no pulmão e em outros locais afetados (LE BOE, 1679). Em 1839, Johann LuKas Schoenlein nomeou a doença que acometia os pulmões de “TB” (CCMS, 2016).

No século XVIII, a TB esteve associada aos poetas, intelectuais, artistas, pessoas de vida mais livre e distantes de costumes morais, sendo conhecida como “doença da paixão”, conferindo-lhe espaço em romances, peças e outros gêneros literários (CCMS, 2016).

Por acometer em sua maioria os pobres, especialmente no século XIX e início do século XX passou a ser interpretada como “mal social”. A negligência com a doença que acometia principalmente os pobres e se espalhava resultou em muitas mortes na Grã-Bretanha, em 1815, onde uma a cada quatro mortes ocorridas era por TB. Isso

levou a partir de 1880 à obrigatoriedade de notificação da doença no país (CCMS, 2016).

Em meados de 1897, no Brasil, disseminaram-se termos populares: “peste branca” (em razão da palidez cutânea) e “mal do peito”. O termo “galopante” era usado entre a população para casos de TB com evolução rápida e fatal (CCMS, 2016).

Em 1899, Bouchard foi o pioneiro a avaliar por meio de imagens o derrame pleural causado pela TB. Porém, somente a partir de 1903, com estudos de Marie Curie e Dunham, é que apareceram as primeiras classificações da TB de acordo com achados radiológicos (BOMBARDA *et al.*, 2001).

No Brasil, em 1936, o médico Manoel Dias de Abreu combinou exames radiográficos e fotografias para rastrear TB, ficando o método conhecido por abreugrafia e utilizado nos serviços públicos de saúde do trabalhador até 1990 (BOMBARDA *et al.*, 2001).

A TB tornou-se à época, das doenças infecciosas, a que mais matava; e mesmo os casos destinados a tratamentos em sanatórios tinham 75% de mortalidade em menos de cinco anos de doença (CCMS, 2016).

A partir de 1860, a TB foi associada com miséria, condições de moradia e subnutrição. Com efeito, em termos de saúde pública, foi combatida principalmente com a destruição de cortiços e de aglomerados em zonas urbanas. Uma teoria corrente à época acreditava que a TB estivesse ligada à hereditariedade, e o adoecimento em uma mesma família, ao mesmo tempo, reforçava tal teoria.

A moléstia era herdada constitucionalmente, e a morte vinha pois não havia cura. Com uma taxa anual média de mortalidade (em sete milhões) antes da descoberta do bacilo de Koch, a TB fez vítimas conhecidas: os poetas Castro Alves e Manoel Bandeira; o músico Chopin; os médicos René Laennec e Gaspar Vianna; bem como o escritor Franz Kafka (BERTOLLI FILHO, 2001).

Em 1882, Heinrich Hermann Robert Koch descreveu o bacilo causador da TB, tendo sido este denominado em sua homenagem – *bacilo de Koch*. Em termos de terapia, apenas com a descoberta da estreptomicina, em 1944, o primeiro antibiótico com ação sobre o bacilo, é que a incidência da TB começou a declinar, embora autoridades sanitárias mundiais alertem sobre o recrudescimento da doença e, de forma mais preocupante, para o crescimento de casos resistentes (GONÇALVES, 2000; OMS, 2020).

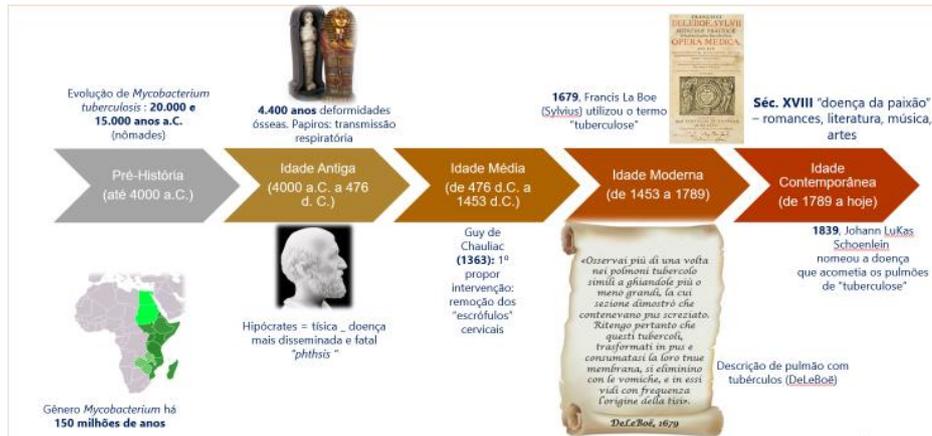


Figura 1: Fatos ligados à TB em marcos históricos

Fonte: Edição da autora utilizando imagens retiradas da web, com citação das fontes.

2.2. Epidemiologia da TB

Em 2014 e 2015, os membros da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização das Nações Unidas (ONU) assumiram, dentro dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, reduzir em 90% as mortes por TB e em 80% a taxa de incidência da doença (OMS, 2020).

Antes da pandemia de covid-19 vários países progrediram no combate à TB. Entre 2015 e 2019 a incidência de casos reduziu em 9%; e as mortes, em 14%. Porém, com a pandemia, em mais de 200 países houve queda nas notificações dos casos de TB, entre os quais estão Índia, Indonésia e Filipinas, onde houve redução entre 25 e 30% nas notificações de casos de TB (OMS, 2020).

De 2018 a 2019, 14 milhões de indivíduos infectados receberam tratamento contra a doença, o que equivale a pouco mais de um terço da meta (40 milhões) que deveria ter sido alcançada entre 2018 e 2022. Em 2019, cerca de 1,4 milhão de pessoas morreram por causas ligadas à TB; e, dos 10 milhões de pessoas que desenvolveram a doença, quase 3 milhões não foram notificados ou diagnosticados (OMS, 2020).

O Brasil está entre os 30 países considerados pela OMS como de alta carga para a TB, bem como para coinfeção TB-HIV. Até 2005, o coeficiente de incidência estava acima de 40 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2018; BRASIL, 2020).

No Brasil, em 2019, foram notificados 73.864 casos novos de TB, equivalentes a um coeficiente de incidência de 35 casos/100 mil habitantes. Em 2020, houve o registro de 66.819 casos, um coeficiente de incidência de 31,6 casos/100 mil habitantes, conforme informações dos Boletins Epidemiológicos de Tuberculose de

2019 e 2020. Tal redução não significa diminuição de casos novos, mas reflexo do menor número de diagnósticos e notificações da TB ocasionados pela pandemia da covid-19 como visto em mais de 200 países (BRASIL, 2019; BRASIL, 2020).

Dentre as regiões do Brasil, a Região Norte tem os maiores coeficientes de incidência. Na década de 1990, o Amazonas tinha o coeficiente de incidência em torno de 90 casos/100 mil habitantes, o que o manteve acima da média nacional. Em 2023, com coeficiente de incidência de 84,1 casos/100 mil habitantes, o Amazonas é o primeiro lugar do Brasil em casos novos de TB (BRASIL, 2018; BRASIL, 2020; BRASIL, 2023).

A série histórica da TB no Amazonas revela que a partir de 1993 houve queda no número de casos novos. Contudo, a partir de 2011, os coeficientes de incidência tiveram nova elevação, e mantiveram constante aumento, resultando no estado brasileiro com o maior coeficiente de incidência de TB (BRASIL, 2023).

De acordo com o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde do Brasil, publicado em março de 2023, foram notificados, em 2022, 78.057 casos de TB (coeficiente de incidência nacional de 36,3 casos/100 mil habitantes). Os coeficientes mais altos do País são do Amazonas (84,1 casos/100 mil hab.), Roraima (75,9 casos/100 mil hab.) e Rio de Janeiro (68,6 casos/100 mil hab.) (BRASIL, 2023).

2.3. Transmissão, resposta imunológica, forma clínica e diagnóstico da TB

Mycobacterium tuberculosis é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), aeróbio estrito e não formador de esporos, nem produtor de toxinas. É intracelular, capaz de resistir e de se multiplicar no interior de células fagocíticas. Melhor multiplicação ocorre em ambientes com pH neutro a alcalino (como o meio encontrado em lesões cavitárias pulmonares) e em tecidos ricos em oxigênio (sendo este o determinante principal da via de entrada da bactéria no hospedeiro: a via respiratória) (RODRIGUES & FILHO, 2007).

Transmissão e resposta imunológica

A via aérea é a única com relevância no contágio e transmissão, tornando o portador da forma pulmonar a fonte mais importante do ponto de vista epidemiológico em razão da detecção do bacilo no escarro (método direto ou *Ziehl-Neelsen*) (RODRIGUES & FILHO, 2007).

Esses pacientes bacilíferos eliminam ao menos 5.000 bacilos por mililitro de escarro e podem transmitir partículas viáveis e/ou aerossóis ao falar, espirrar, tossir.

As gotículas oriundas do trato respiratório inferior foram denominadas gotículas de *Plügge*. As gotículas, quando pequenas e em suspensão, evaporam e permanecem com os núcleos de *Wells* (contendo um ou dois bacilos), os quais, em condições de pouca ventilação e iluminação, podem ser infectantes em indivíduos susceptíveis (RODRIGUES & FILHO, 2007).

Os bacilos que entram no hospedeiro alcançam os alvéolos; e conseqüentemente células mieloides residentes no pulmão (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas) iniciam contato com esses bacilos. Os macrófagos alveolares (MA) pertencentes ao sistema imune inato internalizam os bacilos por fagocitose e são cruciais na preparação do cenário para a resposta imune subsequente contra *M. tuberculosis* (MURPHY *et al.* 2008; GUILLIAMS *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2019).

Essas células mieloides residentes no pulmão, em especial os MA, podem contribuir para a resistência do hospedeiro à infecção por *M. tuberculosis* e podem ser fundamentais para o estabelecimento dos bacilos na fase inicial da resposta imune (MAYER-BARBER & BARBER, 2015).

As células dendríticas presentes no tecido pulmonar são tão importantes quanto os macrófagos, pois também internalizam os bacilos. Essas células ativadas passam a expressar CD11c, CD103 e a produzir citocinas (IL12 e IL 23), que contribuem para maior expressão das moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC-*Major Histocompatibility Complex*) classe II, bem como das moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86) (MAYER-BARBER *et al.*, 2011).

Essas células ativadas migram para os linfonodos regionais mais próximos a fim de realizar a apresentação de antígenos de *M. tuberculosis* para as células da imunidade adaptativa – nesse caso, para os linfócitos TCD4+ *naïves* (MAYER-BARBER *et al.*, 2011). De fato, as células dendríticas ativam linfócitos e induzem tolerância às células T quando estiverem expressando MHC e autoantígenos, o que evita reações autoimunes (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

Cabe destacar que as células dendríticas também expressam MHC de classe I e podem apresentar antígenos da micobactéria aos linfócitos TCD8+ (BOOM *et al.*, 2003). Na verdade, as células dendríticas do sistema inato fazem a conexão com as células T do sistema adaptativo. As respostas mediadas por células TCD4+ e TCD8+ são importantes para conter a infecção na TB (FLYNN & CHAN, 2001).

A imunidade mediada por linfócitos TCD4+ é a marca frequente de resistência do hospedeiro à infecção por *M. tuberculosis* com promoção e diferenciação celular

para uma resposta específica de linfócitos Th1 e liberação de IFN- γ (MAYER-BARBER & BARBER, 2015).

No entanto, mesmo para uma resposta protetora Th1 contra patógenos, as vias regulatórias exercem um papel na homeostase imune e são necessárias para evitar respostas exacerbadas que possam causar danos teciduais. Embora as estratégias de evasão por *M. tuberculosis* ocorram no interior de fagócitos, ações realizadas por linfócitos T regulatórios (Treg) também podem contribuir para a persistência dos bacilos no hospedeiro (MAYER-BARBER & BARBER, 2015).

No caso da resposta celular, esta é desencadeada após bacilos inalados atingirem especialmente os alvéolos periféricos do terço médio do pulmão direito. Na falha da imunidade celular, esses bacilos podem alcançar imediatamente linfonodos do mediastino por via linfática e a resposta inflamatória (pulmonar e linfática) responsável pela formação do complexo primário (RODRIGUES & FILHO, 2007).

Decorridas de duas a seis semanas após a infecção, nota-se a resposta celular, compreendida pela migração de linfócitos, macrófagos ativados, quimiocinas, colágeno e elastina, expressa na forma de um granuloma (RAJA, 2004).

O complexo primário da TB é definido por um conjunto constituído pelo nódulo de Ghon (vários granulomas), por linfangite e por linfadenite. Esse complexo pode evoluir para cura ou doença, dependendo da virulência da micobactéria e da hipersensibilidade e da resistência do hospedeiro (BOMBARDA *et al.*, 2001).

Por meio da disseminação hematológica e linfática, os bacilos do complexo primário podem atingir outros órgãos com estrutura retículo-histiocitária, como linfonodos, fígado, baço, medula óssea, rins, sistema nervoso central, o que constitui a primo-infecção. Nessa primeira infecção, alterações clínicas costumam ser imperceptíveis em até 95% dos indivíduos infectados; e de 5 a 10% podem apresentar-se como TB secundária, de acometimento tardio e ocasionada por diminuição das defesas imunológicas ou pela reexposição aos bacilos oriundos do ambiente (reinfecção) (RODRIGUES & FILHO, 2007).

Quanto mais reexposições ou novas cargas bacilíferas, maior a reação de hipersensibilidade e a resposta imune celular, que diminuem a possibilidade de disseminação hemato-linfática, mas aumentam a agressão tecidual (RODRIGUES & FILHO, 2007).

Na TB, a resposta imune por linfócitos Th1 ou Th2 depende não apenas do microambiente de citocinas, mas também do sítio da lesão ou disseminação (sanguínea). Além disso, a expressão da resposta por subpopulações de linfócitos T

determina os estágios e a gravidade da manifestação clínica. A TB limitada costuma apresentar resposta predominantemente de linfócitos Th1 e níveis mais elevados de IFN- γ . Já casos graves de TB e a forma disseminada apresentam níveis mais baixos de IFN- γ circulando no sangue periférico (RAJA, 2004).

Formas clínicas e diagnóstico

Clinicamente, a TB classifica-se em: pulmonar (TBP) e extrapulmonar (TBExP). A forma pulmonar pode ser primária e secundária. A TBP primária ocorre quando indivíduo que nunca teve contato com o bacilo adoece. É mais comum em crianças. A TBP secundária acontece após nova infecção (reinfecção exógena) ou por reativação de bacilos latentes (reinfecção endógena) (BOMBARDA *et al.*, 2001).

Quando ocorre disseminação hematogênica da TB, esta é chamada TB miliar, sendo classificada em TB miliar primária ou aguda disseminada; e TB miliar tardia ou hematogênica crônica (BOMBARDA *et al.*, 2001; RODRIGUES & FILHO, 2007).

A TB extrapulmonar (TBExP) acomete diferentes locais e se denomina de acordo com o órgão ou tecido acometido: TB pleural/pleuris tuberculoso, pericardite, peritonite, linfadenite, TB do sistema nervoso central, urinária, genital, TB do tubo digestório, osteoarticular, vertebral, coxofemoral, TB cutânea, ocular, TB laríngea (RODRIGUES & FILHO, 2007).

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC-*Centers for Disease Control and Prevention*) e Centros Nacionais de Prevenção de HIV/AIDS, Hepatite Viral, IST e TB (*National Centers for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD and TB Prevention*), casos de TB notificados classificam-se de acordo com o sítio de isolamento da micobactéria: pulmonar, pleural, linfático (cervical, intratorácico, axilar), laríngeo, ósseo ou articular, geniturinário, meníngeo, peritoneal (CDC, 2019).

O diagnóstico laboratorial da TBP normalmente emprega baciloscopia (coloração do bacilo álcool ácido resistente-BAAR), cultura e testes moleculares. A baciloscopia é importante epidemiologicamente por detectar os pacientes bacilíferos que mantêm a cadeia de transmissão. Embora no escarro espontâneo oriundo de lesões extensas e cavitárias a sensibilidade seja em torno de 80%, a sensibilidade média fica entre 40% e 60%; em até 20% nos pacientes com lesões mínimas; e de 20% a 60% nos coinfectedados pelo HIV (SILVA *et al.*, 2021).

A TBExP em linfonodos mais comum é a linfadenite mediastínica decorrente da TB primária. Contudo o acometimento pode acontecer em linfonodos do abdômen, cervical, pele e outros (RODRIGUES & FILHO, 2007).

A TBExP tipo pleural normalmente resulta da contiguidade de pequenos focos pulmonares adjacentes e está comumente associada à pleura direita. A TB pleural bilateral em geral resulta da disseminação miliar. Clinicamente, pode-se apresentar como pneumonia aguda, com febre moderada a alta, dor torácica ventilatório-dependente ou com piora ao tossir (RODRIGUES & FILHO, 2007).

Casos suspeitos de TBExP apresentam baixa sensibilidade na baciloscopia. Na TB ganglionar o diagnóstico ocorre por aspirado com agulha ou ressecção do gânglio. Já na TB pleural, a baciloscopia do líquido pleural tem sensibilidade inferior a 5% e encontra na dosagem de Adenosina Deaminase (ADA) forte indicativo para TB quando em valores acima de 40 U/L (SILVA *et al.*, 2021).

Devido à maior dificuldade em diagnosticar TBExP, pode haver atraso no tratamento, o que contribui para a gravidade da doença. Por essas razões, diferentes métodos diagnósticos vêm sendo empregados: teste tuberculínico (TT) ou Derivado Proteico Purificado (PPD-*Purified Protein Derivative*), dosagem de ADA e o IGRA. Este é recomendado pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (Conitec) desde novembro de 2020 com o intuito de diagnosticar TB latente pacientes imunocomprometidos (BRASIL, 2018).

Na Coreia, o IGRA realizado em amostras de pacientes com suspeita clínica de TBExP demonstrou maior positividade (70,2% *versus* 33,3%) em casos de TBExP ativa comparados com controles sem TB. Além disso, o IGRA teve sensibilidade de 70,2% e especificidade de 66,7% quando foram avaliadas formas de TBExP ativa. A maior sensibilidade (81,8%) e a maior especificidade (80,0%) ocorreram na linfadenite tuberculosa. Em geral, o IGRA teve sensibilidade de 38,5% e especificidade de 50,0% em casos de TB pleural (JUNG *et al.*, 2015).

A pericardite por TB comumente ocorre por contiguidade de focos mediastinais e pode ser concomitante à TB pleural. Apresenta clínica súbita, podendo confundir-se com insuficiência cardíaca congestiva. A TB peritoneal costuma advir da doença miliar ou de TB adjacente aos linfonodos do abdômen, intestino ou trompas uterinas, tendo clínica inespecífica, manifestada por febre, perda ponderal, dor abdominal, ascite, fato que acaba por retardar o diagnóstico (RODRIGUES & FILHO, 2007).

Cultura para micobactérias em material respiratório tem sensibilidade elevada (em torno de 80%) e especificidade alta (de 98%), tanto que, em baciloscopias negativas há aumento de 20 a 40% nas taxas de detecção da infecção com o emprego da cultura (SILVA *et al.*, 2021).

A cultura é considerada pela OMS o padrão-ouro para o diagnóstico da TB. Pode ser feita tanto em meios sólidos, como Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh, quanto em meios líquidos, que utilizam sistemas automatizados não radiométricos, como o Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT-MycoBacteria Growth Indicator Tube, Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA). Em meios sólidos, a desvantagem está na demora para detectar crescimento (de duas a oito semanas), enquanto em meios líquidos automatizados o resultado varia de dez a 42 dias (SILVA *et al.*, 2021).

Mesmo na TBExP, apesar de rendimento mais baixo na detecção, indica-se a cultura. Nas formas pleurais, a cultura tem rendimento inferior a 15% (SILVA *et al.*, 2021).

Nas formas paucibacilares de TB, a cultura pode apresentar falso negativo. Nesses casos, uma ferramenta de auxílio diagnóstico é o teste Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA), que mostra boa sensibilidade (KOHLI *et al.*, 2021).

É um teste molecular que detecta e amplifica o DNA bacteriano e tendo vantagens, como: necessita apenas de uma amostra de escarro, o resultado apronta em até duas horas, fornece teste de sensibilidade e resistência à rifampicina, além de ter sensibilidade ao escarro de adultos em torno de 90%. Por essas vantagens, foi indicado pela OMS, em 2011, como teste rápido para detecção da TB. No Brasil é denominado “teste rápido molecular para tuberculose” (TRM-TB) (SILVA *et al.*, 2021).

A fim de melhorar o diagnóstico de formas paucibacilares, o Xpert MTB/RIF foi aprimorado no teste Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid), que apresenta os resultados como “não detectado” (negativo), “detectado” (positivo) e “detectados traços” (inconclusivo, o qual requer investigação) (SILVA *et al.*, 2021).

Outro teste molecular validado pela OMS é o *line probe assay*, que identifica a micobactéria, avalia a resistência à rifampicina, à isonizida, a fluoroquinolonas e a drogas injetáveis utilizadas no tratamento da TB (WHO, c2018).

O diagnóstico da TBExP, por ser menos sensível comparado à TBP, compromete a terapia e favorece a resistência medicamentosa. A linfadenite tuberculosa, meningite tuberculosa e forma cutânea constituem algumas das formas extrapulmonares, cujos sítios de infecção reduzem a penetração, a difusão e a concentração das medicações antituberculosas, especialmente a rifampicina. Essas formas clínicas podem induzir casos de TB-MDR (TB multidroga resistente) quando há resistência simultânea a, pelo menos, rifampicina e isoniazida; ou TB monoresistente à rifampicina (SIBANDZE *et al.*, 2020).

Além da resistência medicamentosa decorrente de prejuízos da distribuição, da penetração e da difusão de certos fármacos, ocorrem determinados genótipos de micobactéria mais resistentes, como os do Leste Asiático, Leste Africano e Euro-Americano. Esses, além da maior resistência inerente ao genótipo, contribuem para maior contágio, disseminações mais rápidas e doenças mais graves (SIBANDZE *et al.*, 2020).

O diagnóstico radiológico, tem por método de escolha na avaliação inicial a radiografia de tórax. Podem ser utilizadas também a tomografia computadorizada e a cintilografia. Dentre os achados radiográficos comumente encontrados, estão: linfonodomegalias mediastinais, consolidações (podendo coexistir broncogramas de permeio semelhante às pneumonias bacterianas), opacidades retículo-micronodulares difusas, calcificações e nódulos pulmonares, derrame pleural, até cavitações parenquimatosas, configurando achados radiológicos dos mais diversos (BOMBARDA *et al.*, 2001).

2.4. Resposta imune inata e adaptativa na TB e mecanismos de escape da *M. tuberculosis*

2.4.1. Resposta imune inata

Os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP-*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) presentes nas micobactérias interagem com os receptores de reconhecimento padrão (PRR-*Pattern Recognition Receptors*) situados nas células fagocíticas do hospedeiro, especialmente, receptores *Toll* (*Toll like Receptors-TLR*): TLR2, TLR4 e TLR9 ou com receptores solúveis (receptores do complemento e de manose) e assim, conseguem invadir e estabelecer-se no interior das células (AMARAL *et al.*, 2016; RAJA, 2004).

Essa sinalização por TLRs requer o envolvimento de uma proteína adaptadora chamada Resposta Primária de Diferenciação Mieloide 88” (MyD88-*Myeloid Differentiation Primary Response*). Antígenos da micobactéria como “Alvo Antigênico de 6 kDa Secretado Precocemente” (6kDa *Early Secreted Antigenic Target-ESAT-6*) sinalizam via TLR2 promovendo apoptose de macrófagos infectados via MyD88 (figura 2, setas tracejadas) e proteína “Domínio de Morte Associada ao Fator Relacionado a Apoptose” (FADD-*Factor Related Apoptosis (Fas)-Associated Death Domain*). Adicionalmente, derivados de macrófagos infectados que são reconhecidos por receptores *scavengers* CD36 como os mediadores lipídicos e prostaglandinas

(PGE2) modulam indiretamente a morte dessas células (AMARAL *et al.*, 2016; RAJA, 2004).

Além de receptores TLR, a ativação de macrófagos após invasão da micobactéria envolve um “Domínio Ligante de Nucleotídeo” (NOD-*Nucleotide Oligomerization Domain*) que é receptor do citosol, e receptores classificados em quatro famílias de proteínas contendo “NOD e Repetições ricas em Leucinas” (NLR; *NOD-leucine-rich repeat containing protein*): representado pelo domínio “Transativação Ácida”(Acidic *Transactivating Domain*); NLRB -formado pelo domínio de “Repetição de proteínas de Baculovirus inibidoras de apoptose”- (BIR- *Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Protein Repeat Domain*), NLRC (domínio de “recrutamento de caspases”), CARD-*Caspase Recruitment Domain* e NLRP (domínio de Pirina) (AMARAL *et al.*, 2016).

A *M. tuberculosis* tem na constituição o ácido muramil dipeptídeo (MDP-*Muramyl Dipeptide*) como ativador de NOD-2. Após ativação via NOD-1 e NOD-2 ocorre translocação do Fator Nuclear kappa B (NF- κ B-*Nuclear Factor kappa B*), o que resulta na produção das citocinas pró-inflamatórias: Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α -*Tumor Necrosis Factor-alpha*) e Interleucina (IL-1 β) (Figura 2, setas vermelhas). Além da ativação de NOD-1 e NOD-2 relacionar-se à apoptose, a ativação de NLRP3 pela micobactéria também contribui para produção de IL-1 β , potencializa a apoptose de macrófagos e favorece persistência do patógeno (AMARAL *et al.*, 2016).

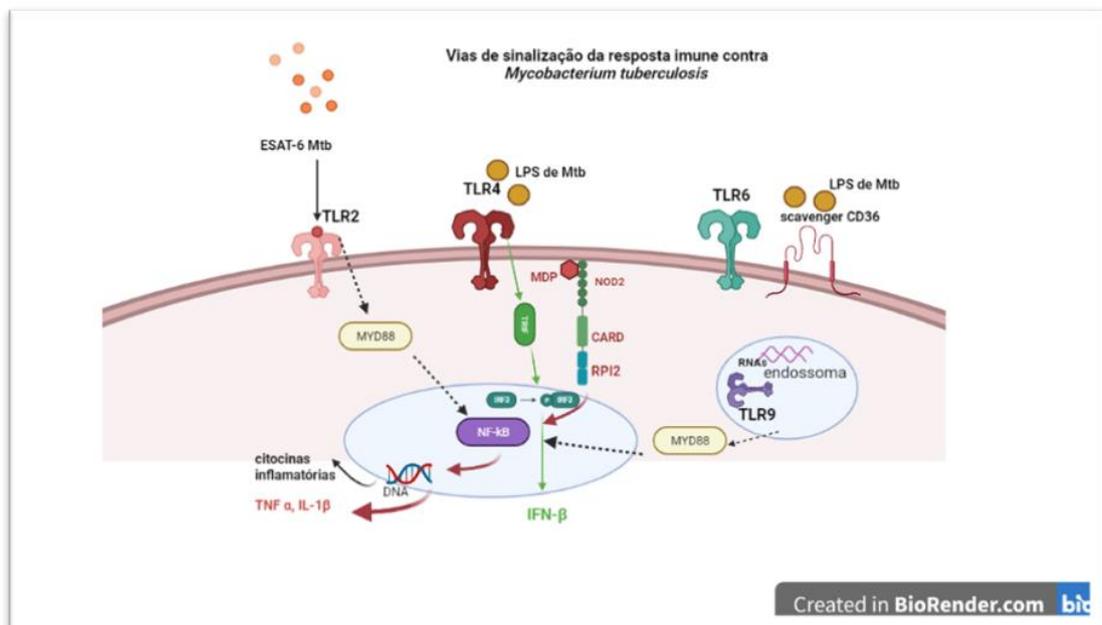


Figura 2: Receptores para *Mycobacterium tuberculosis* e vias de sinalização celular da resposta imune; destaque para a via MyD88, NOD2, TRIF.

Fonte: Elaboração da autora.

Após a fagocitose da micobactéria por macrófagos e ativação das vias de sinalização, o resultado é a liberação de IFN- γ e citocinas inflamatórias. Em destaque, a IL-8, quimiocina produzida primariamente por monócitos/macrófagos e expressa por fibroblastos, queratinócitos e linfócitos. A IL-8 constitui fator ativador de neutrófilos e passou a chamar-se ligante de quimiocina (padrão C-X-C) 8 – (CXCL8-*Chemokine C-X-C motif Ligand 8*), por ser expressa pelo gene de mesmo nome, o *gene CXCL8*, localizado no cromossomo 4q (GUERREIRO *et al.*, 2011; RAJA, 2004).

Dentre os mecanismos da imunidade inata que buscam conter a bactéria, estão a fagocitose dos macrófagos infectados, a produção de IL12, a Proteína de Macrófagos Associadas à Resistência Natural (Nramp-*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*) de macrófagos e de neutrófilos e as células *natural killer (NK)* (RAJA, 2004).

Os macrófagos infectados por micobactérias podem sofrer indução de morte celular durante o processo de fagocitose. Embora haja controvérsias se a apoptose (morte celular não inflamatória) elimina as micobactérias ou desativa macrófagos favorecendo a multiplicação dos bacilos, tanto a apoptose quanto a necrose contribuem para a disseminação do patógeno e a evolução para TB grave (AMARAL *et al.*, 2016).

A apoptose é caracterizada pela ativação das caspases 3, 7, 8, 9 e 10; pela condensação de cromatina e fragmentação do núcleo, bem como pela ativação de vias extrínsecas e intrínsecas, com regulação positiva de genes pró-apoptóticos, como os genes de *TNF- α* , *Fas*, *Faz-ligante*, *gene do Mediador de morte celular que interage com células B de linfoma 2* (Bim- *B-cell lymphoma-2-Bcl-2 Interacting Mediator of cell death*) e genes das caspases 3, 5, e 7 (AMARAL *et al.*, 2016).

O gene *BCL-2* em baixa expressão contribui para maior apoptose de macrófagos em granulomas (RAJA, 2004). Já a necrose (morte celular com destruição da membrana plasmática) resulta na liberação de núcleo e citoplasma de macrófagos infectados, os quais atuam como Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs- *Damage-Associated Molecular Patterns*) ativando sensores da resposta inflamatória e reparo, a exemplo dos induzidos por vírus (AMARAL *et al.*, 2016).

Semelhante à necrose, ocorre morte celular programada por piroptose, pironecrose, ETose ou NETos, ativadoras do inflamassoma. Durante uma infecção, há liberação de cromatina para o espaço celular, chamada de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs-*Neutrophil Extracellular Traps*) ou Armadilhas Extracelulares (Ets- *Extracellular Traps*). Por interações eletrostáticas, o DNA

desdobrado se liga à micobactéria e/ou a peptídeos antimicrobianos, o que facilita a morte do patógeno e causa danos teciduais. Os bacilos de *M. tuberculosis* são resistentes ao efeito microbicida dos NETs (AMARAL *et al.*, 2016).

Para tentar conter a infecção, após a fagocitose, ocorre a produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos (APC) e macrófagos, em razão da maior expressão do gene da *IL12-p40* ou de seu receptor. Níveis mais elevados de IFN- γ produzido pelas células TCD4+ e NK ativadas durante a apresentação do patógeno também contribuem para elevar os níveis de IL-12. Inclusive, o conhecimento de que IL-12 protegeria contra infecção por micobactéria vem sendo explorado como alvo de vacinas (RAJA, 2004).

Observa-se, no início da infecção, quando a *M. tuberculosis* não é contida, uma mudança no balanço de citocinas. Há produção diminuída de IFN- γ , e não primariamente redução na produção de IL-12 ou aumento de IL-4 e IL-10 (citocinas que pela ação anti-inflamatória reduzem resposta Th1 em detrimento de Th2, favorecendo infecções tuberculosas) (RAJA, 2004).

Além disso, a liberação de Fator Transformador de Crescimento beta (TGF- β -*Transforming growth factor beta*) por monócitos após contato com micobactéria “desativaria” macrófagos, reduziria espécies reativas de oxigênio (ROS-*Reactive Oxygen Species*) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), inibiria a proliferação e a função de células T, reduziria a capacidade de reconhecimento de antígeno e limitaria a destruição das APC infectadas (RAJA, 2004).

A Nramp-1 é uma proteína do citosol (intracelular) que transporta nitrito para o meio ácido do fagossomo, onde este é convertido em óxido nítrico, atuando na lise da bactéria. Os neutrófilos constituem uma das primeiras células a migrar para a área do granuloma, seguidos por células *natural killer*, células γ/δ e células α/β . O fator estimulante de crescimento de granulócitos-macrófagos (GM-CSF-*Granulocyte and Monocyte Colony-Stimulating Factor*) promove a internalização da micobactéria pelos neutrófilos (ABBAS *et al.*, 2015).

Ainda importante na resposta inata, com função na destruição das células infectadas por *M. tuberculosis*, estão as células *natural killer* (NK), um tipo diferenciado de linfócito que são células grandes, com numerosos grânulos citoplasmáticos e expressam os Grupos de Diferenciação (CD-*Cluster of Differentiation*) CD56, CD16 e CD3 e secretam IFN- γ , essencial no controle da micobactéria (ABBAS *et al.*, 2015).

As NK agem por lise direta do patógeno, por lise de monócitos infectados ou por ativação de células fagocíticas no local da infecção. Além disso, a presença da IL-2

ativa células NK, importantes contra TB causada pelo complexo *Mycobacterium avium*. No mais, a citotoxicidade das células NK também pode resultar em apoptose e produção de IFN- γ que promove a lise das células infectadas com micobactérias (RAJA, 2004).

Além de alterações no fagolisossomo há mudanças no pH do meio e nos níveis de enzimas digestivas. A infecção por micobactéria persiste ainda em função da migração reduzida de macrófagos infectados, o que mitiga a apresentação de antígenos para células T (RAJA, 2004).

Um novo mecanismo de escape envolve um sensor citosólico de DNA, a proteína 204 Induzível por IFN (*IFI204-IFN Inducible protein 204*), que contribui com a produção de IFN tipo I por estimular a expressão do gene *IFN*, via estimulador de genes de IFN (*STING- Stimulator of IFN Genes*) e fator regulador 3 (*IRF3-IFN Regulatory Factor 3*), resultando em maiores níveis de IFN-tipo I, que exerce regulação negativa na imunidade inata antituberculosa (quanto mais IFN-tipo I é gerado, mais facilmente a bactéria causará a infecção, dado que a *M. tuberculosis* utiliza essa via de sinalização do citosol a seu favor) (CHAI *et al.*, 2020).

M. tuberculosis utiliza vias que envolvem a enzima sintase cíclica Monofosfato de Guanosina-Monofosfato de Adenosina (cGAS-cíclica sintase), que consiste na mudança da localização subcelular desse sensor citosólico e entrada no núcleo ou na membrana plasmática (mesma estratégia possivelmente usada na distinção do DNA próprio do não próprio). Essa mudança de localização do sensor acarretaria deficiência nessa via, menor sinalização via STING e consequente diminuição na expressão do Fator Nuclear Kappa B (*NF- κ B-Nuclear Factor Kappa B*) e *IRF3*. O resultado é a menor ativação de células dendríticas e macrófagos, o que reduziria a apoptose de células infectadas (CHAI *et al.*, 2020).

Ainda como estratégia de escape das micobactérias está o sensor citosólico de Ausência do Melanoma 2 (*AIM2-Absent In Melanoma 2*). Esse sensor é sensibilizado na presença do micro-organismo e ativa o inflamassoma, que age catalisando formas precursoras de citocinas (pró-IL-1 β e pró-IL-18) em formas ativas (IL-1 β e IL-18), combatendo a infecção. No entanto *M. tuberculosis* utiliza a inibição de AIM2 para reduzir níveis de citocinas pró-inflamatórias e causar a infecção (CHAI *et al.*, 2020).

Na via citosólica do RNA bacteriano, descobriu-se que exossomos (vesículas extracelulares contendo RNA da micobactéria apresentados por macrófagos infectados) ativaria o Gene Indutor do Ácido Retinoide I (*RIG-I-Retinoic acid-Inducible Gene I*), o gene da proteína 5 associada à diferenciação de melanoma (*MDA5-*

Melanoma Differentiation-Associated protein 5) e o gene da proteína Kinase R (*PKR-Protein Kinase R*) por meio da proteína adaptadora de sinalização mitocondrial antiviral (*MAVS- Mitochondrial Antiviral-Signaling protein*). O resultado é a maior expressão de *NF-κB* e *IRF3* e a maior produção de interleucinas pró-inflamatórias destruidoras de macrófagos infectados. Em camundongos, a deleção de genes envolvidos nessas vias de sinalização favorece a evasão da bactéria e a infecção (CHAI *et al.*, 2020).

A resposta imune inata contra *M. tuberculosis* envolve uma rede complexa de mecanismos já descritos que podem afetar e direcionar a resposta imune adaptativa, outro eixo importante no controle e no desfecho na infecção tuberculosa.

2.4.2. Resposta imune adaptativa

A imunidade adaptativa na TB envolve participação principalmente dos linfócitos TCD4+, TCD8+ e de componentes solúveis. Uma vez que as APC do sistema inato internalizam os peptídeos micobacterianos, estes são processados e expressos em moléculas do MHC para posterior apresentação aos linfócitos T (RAJA, 2004).

Os linfócitos TCD4+ reconhecem os peptídeos micobacterianos expressos em moléculas de MHC classe II, enquanto os linfócitos TCD8+ reconhecem moléculas de MHC classe I por meio dos seus receptores de células T (*TCR-T Cell Receptors*) (RAJA, 2004).

As células TCD4+ têm como função primária a produção de IFN-γ e citocinas ativadoras de macrófagos. Células TCD8+ produzem IFN-γ e IL-4. Nos pulmões, o maior número de linfócitos TCD8+ e os maiores níveis de IL-4 regulam positivamente a resposta Th2, favorecendo a TB ativa e uma resposta lenta ao tratamento, o que na clínica aparece como maior quantidade de linfócitos TCD8+ no lavado broncoalveolar (RAJA, 2004).

MHC classe I e II são moléculas proteicas presentes na superfície celular com a função de reconhecerem e apresentarem antígenos próprios e externos para o sistema imune adaptativo. Isso possibilita que uma diversa gama de antígenos seja reconhecida pelas células TCD4+ e TCD8+(BOOM *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, as moléculas de MHC classe I (expressas em todas as células nucleadas) são carregadas por peptídeos e transportadas para membrana plasmática para reconhecimento por células TCD8+. As moléculas de MHC classe I reconhecem peptídeos antigênicos de patógenos clivados por proteassomas e entregues via citosol

ao retículo endoplasmático. Antígenos particulados de *M. tuberculosis* não necessariamente fazem essa via no citosol, mas sim apresentam uma via alternativa para apresentação de antígenos às células TCD8+ (BOOM *et al.*, 2003).

Já moléculas de MHC classe II (presentes em macrófagos, células dendríticas e células B) possibilitam internalizar bacilos por endocitose ou fagocitose, o que permite que a micobactéria permaneça nos endossomas e ocorra posterior fusão aos lisossomas. Nessa etapa, há ação de proteases que clivam antígenos maiores em peptídeos que tardiamente se ligam ao MHC classe II em pH ácido (BOOM *et al.*, 2003).

M. tuberculosis interfere na maturação do MHC classe II, pois diminui a expressão do Transativador de Classe II (CIITA-*Class II Transactivator*) e ainda interfere na sinalização de IFN- γ pela ação de uma lipoproteína de 19 kDa da micobactéria especialmente mediada por HLA-DR. Disso resulta uma menor apresentação de antígenos para células TCD4+, o que justifica uma imunidade não efetiva no início da infecção e consequente persistência do patógeno (BOOM *et al.*, 2003).

O componente solúvel da imunidade adaptativa constitui-se de quimiocinas e citocinas. Dentre as quimiocinas, uma molécula de superfície, denominada Molécula de Adesão Intracelular (*ICAM-1- Intercellular Adhesion Molecule-1*), é produzida por estímulo de *M. tuberculosis* e atrai linfócitos TCD4+, TCD8+ e células dendríticas diferenciadas (células epitelioides), as quais secretam osteopontina, fibronectina e integrina, componentes da matriz extracelular e constituintes do granuloma tuberculoso (RAJA, 2004).

Um terceiro tipo celular, não restrito ao MHC, são as células T γ/δ . Estas células são grandes linfócitos granulares, com aspecto de células dendríticas, presentes em tecidos linfoides, com ação citotóxica e papel na imunidade precoce, contribuindo para infecção latente (RAJA, 2004).

Após a fagocitose de *M. tuberculosis*, macrófagos e células dendríticas expressam o gene IL 12B, o que resulta em maior liberação de IL-12, citocina que ativa linfócitos TCD4+ e células NK. As células fagocíticas, juntamente com as células T, secretam TNF- α e IL-1 e regulam a expressão de genes de quimiocinas e seus receptores, bem como outras moléculas de adesão, que incluem selectina E, ICAM-1, Molécula de Adesão Celular Vascular-1 (*VCAM-1-Vascular Cellular Adhesion Molecule-1*), Proteína Químioatraente de Monócitos-1 (*MCP-1-Monocyte Chemoattractant Protein-1*), Proteínas Inflamatórias de Macrófagos (*MIP-*

Macrophage Inflammatory Protein) MIP1- α , MIP1- β e MIP2, e citocina presumidamente Secretada e Expressa por células T Normais, Regulada pela Ativação (*RANTES-Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted*). Entre os receptores de quimiocinas regulados positivamente pelo aumento de TNF- α , citam-se o receptor de quimiocina-padrão C-C (*CCR-Chemokine C-C motif receptor*) 2 (receptor de MCP-1) e CCR5 (receptor de RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β) (RAJA, 2004).

Além da IL-1, a IL-6 aumenta na resposta inflamatória e promove maior diferenciação de células T. A elevação da IL-1 acarreta maior produção de IL-2 e de seus receptores que, por sua vez, promove expansão do *pool* de células Th1. Por outro lado, as células Th2 recrutadas para o local da infecção liberam mais IL-4 (RAJA, 2004).

Além da IL-4, tem ação anti-inflamatória a IL-10 (produzida por macrófagos e células T durante a infecção por micobactéria). A IL-10 inibe linfócitos TCD4+ e APC (tendo sido demonstrado em camundongos). Também com atuação anti-inflamatória, tem-se o TGF- β , capaz de inibir a proliferação de células T, interferir na função de células NK e células T citotóxicas e diminuir a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-1. O TGF- β está presente em lesões granulomatosas de pacientes com TB e é produzido por monócitos infectados (RAJA, 2004).

As células T podem ser divididas em subpopulações, diferenciadas e determinadas pelos tipos de antígenos apresentados e as citocinas liberadas. A função efetora da célula T sofre influência do meio inflamatório e de adjuvantes. Algumas subpopulações de linfócitos T (Th1, Th17 e T regulatórias ou Treg) medeiam a resposta imune contra micobactéria. Esse envolvimento de células T é dinâmico e presente também na imunidade inata (BEHAR *et al.*, 2014).

No início da infecção, células T do componente inato aparecem como células T e células T NK inativas. Células T NK inativas têm maturação no timo e possuem um TCR semi-invariante que reage com o CD1d (proteína relacionada com o MHC classe I) exercendo ação citotóxica e produzindo rapidamente citocinas que destroem células infectadas, sem terem sido sensibilizadas previamente (BEHAR *et al.*, 2014).

No começo da infecção, destacam-se as células Th17. Estas secretam IL-17 e recrutam polimorfonucleares (PMN), que são importantes no início da infecção, mas que se tornam prejudiciais ao hospedeiro se permanecerem por mais semanas. No curso da infecção por *M. tuberculosis*, ganham destaque as células Th1, secretoras de IFN- γ e atuantes na supressão da resposta Th17 (BEHAR *et al.*, 2014).

Sendo polifuncionais, os subconjuntos de linfócitos T produzem diferentes citocinas e, embora existam exceções, células Th1 produzem IFN- γ ; Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-13; e Th17 produzem a IL-17. As células TCD8+ tornam-se importantes no período de TB latente devido à função citotóxica direta (BEHAR *et al.*, 2014).

O microambiente de citocinas é o maior regulador de células TCD4+ *naives*. A dicotomia Th1/Th2 pode ser aplicada aos linfócitos B, diferenciando-os em B efetor-1 (Be1) e B efetor-2 (Be2). Linfócitos Be1 secretam IFN- γ e IL-12 se tiverem no meio TNF, IL-10 e IL-6, oriundos de Th1. Linfócitos Be2 secretam IL-2, IL-4 e IL-13, mas também IL-10 e IL-6 (CHAN *et al.*, 2014).

Um tipo específico de célula B estudada tem sido a célula B, que expressa IL-10 (implicada como modulador da autoimunidade, inflamação, infecções e câncer). Linfócito B com expressão de IL-10 foi classificado pelos tipos de receptores: célula B tipo CD19+CD138-CD1d^{hi} (produtor de IL-10 e IL-6) e linfócito B CD138+ do plasma (produtor de IL-10 e IL-35, mas não de IL-6) (CHAN *et al.*, 2014).

Anticorpos podem modular células B pela ligação aos receptores de Fc γ (Fc γ R) sendo este alvo para vacinas contra patógenos intracelulares como *M. tuberculosis* e câncer. O receptor Fc γ RIIB atenua na maturação de células dendríticas e exerce efeito regulatório negativo nas células T (tolerância periférica de células T) (CHAN *et al.*, 2014).

Há mais de meio século, sabe-se que, nos centros germinativos de linfonodos, se desenvolvem os mecanismos pelos quais as células B participam na formação da resposta imune. O primeiro estímulo no centro germinativo começa com apresentação de antígenos da micobactéria às células TCD4+ *helper* foliculares (CHAN *et al.*, 2014).

Células TCD4+ auxiliam na ativação de células B e resultam na expansão de células B, hipermutação somática, maturação de afinidade, *switching* de classe das imunoglobulinas, geração de células B de memória e plasmócitos produtores de anticorpos, formando a base da resposta duradoura contra infecções. E esses anticorpos específicos para *M. tuberculosis* podem opsonizar bacilos extracelulares, formar complexos imunes com fatores do complemento, além de se ligarem a receptores Fc específicos de células T efectoras (CHAN *et al.*, 2014).

Tanto a diferenciação de células T quanto a maturação de células B são influenciadas pelo microambiente de citocinas nos centros germinativos dos linfonodos quando da chegada das APC infectadas por *M. tuberculosis* (CHAN *et al.*, 2014).

2.5. Imunogenética na TB

2.5.1. Genes associados à TB

Estudos sobre associação de genes e doenças têm sido amplamente usados para avaliar *loci* genéticos e riscos para determinadas patologias, incluindo infecções. Por meio de análise genômica integrativa foram identificados polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs- *Single Nucleotide Polymorphisms*), vias mais suscetíveis e genes implicados em risco para TB. Dentre 694 genes avaliados com associação às doenças, 49 foram documentados e estão associados à TB. Os genes: *C2CD2*, *HLA-DRB6*, *LPCAT2* e *HLA-DQB1* conferem risco para infecção. Além desses, *CDC16*, *RPS5*, *HIATL1*, *RPS23*, *CARD9* e *ZNF197* foram sugestivamente significativos ao risco para TB (XU *et al.*, 2020).

Genes relacionados ao sistema imunológico, tais como, IFNG (gene do IFN- γ), TNFA (gene do *TNF- α* -fator de necrose tumoral alfa), *NRAMP1* (gene de Nramp 1), IL10 (gene da interleucina-10), *IL1B* (gene da interleucina-1 β), MBL (gene da *lectina ligante de manose*), VDR (*gene do receptor de vitamina D*) e genes de HLA classe I e II foram associados à suscetibilidade para formas de TB, especialmente, a pulmonar (GOLDFELD, 2004; SALLAKCI *et al.*, 2007; SELVARAJ *et al.*, 2008; THUONG *et al.*, 2008; RAJA, 2004).

2.5.2 Major Histocompatibility Complex (MHC) e Human Leukocyte Antigen (HLA)

O conjunto de genes do MHC é responsável por codificar as moléculas do complexo de histocompatibilidade presente em todos os vertebrados superiores. Em humanos, é denominado *antígeno leucocitário humano* (HLA-*Human Leukocyte Antigen*). O complexo HLA é altamente polimórfico e está localizado na região 6p21.31, no braço curto do cromossomo 6 (figura 3) (KLEIN & SATO, 2000a).

Esse complexo contém mais de 220 genes (MCDEVITT, 2000; SHIINA *et al.*, 2009; ROBINSON *et al.*, 2020), em sua maioria relacionados ao sistema imune. O mapa gênico ampliado do MHC compreende 421 *loci* (excluindo genes de RNA) e possui comprimento de 7,6Mb, é, portanto, maior que o mapa gênico anterior do MHC clássico, que tinha 3,6Mb de comprimento e 224 *loci*. Os genes do HLA podem ser agrupados em classe I, II e III (HORTON *et al.*, 2004).

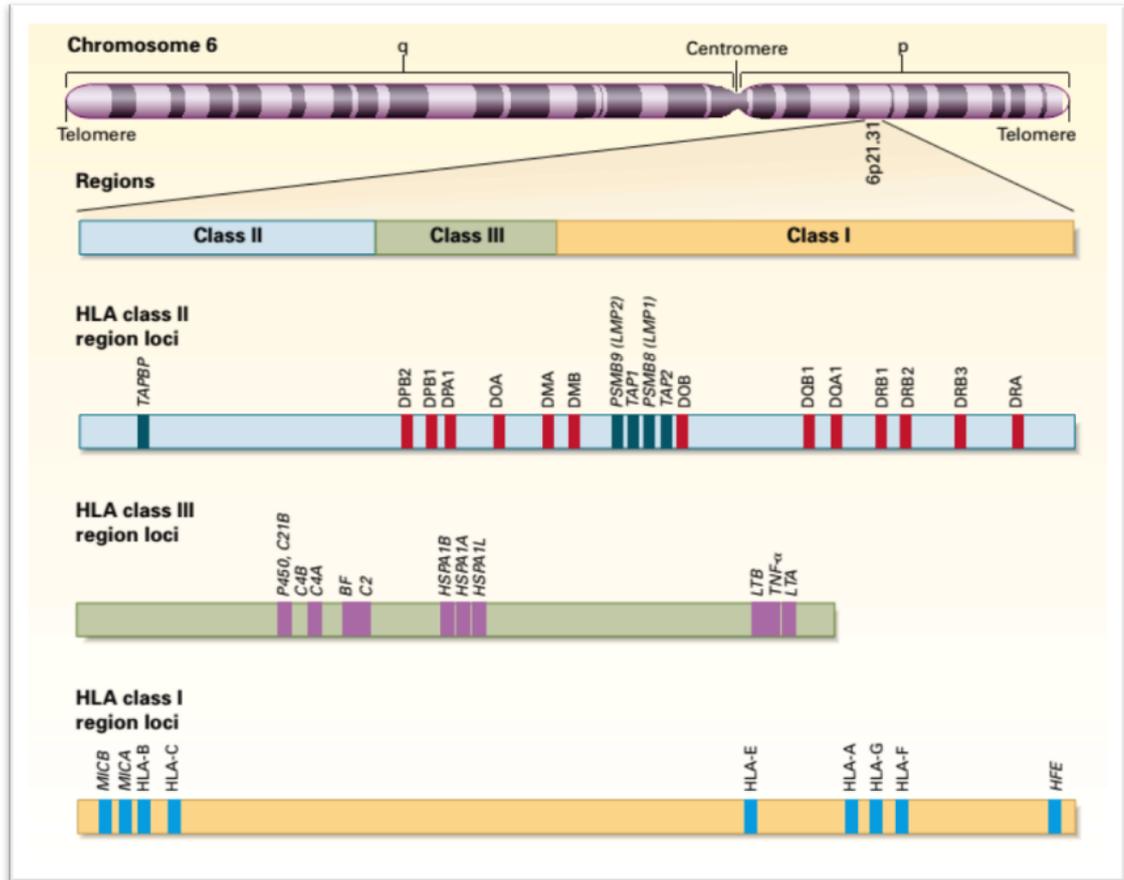


Figura 3: Esquema de alguns dos genes de HLA, presentes no cromossomo 6, didaticamente divididos nas três classes de HLA (I, II, III).

Fonte: Klein; Sato, 2000.

Os genes de HLA classe I codificam moléculas clássicas de histocompatibilidade, com destaque para HLA-A, B e C, expressas em praticamente todas as células nucleadas e que participam do processo de apresentação de peptídeos aos linfócitos TCD8+ (KLEIN & SATO, 2000a; HORTON *et al.*; 2004; NEEFJES *et al.*, 2011; PISHESHA *et al.*, 2022).

Genes de HLA classe II codificam moléculas clássicas, sendo especialmente estudadas as moléculas de HLA-DR, DQ e DP, presentes constitutivamente em APC: células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Essas moléculas de HLA classe II participam da apresentação de peptídeos aos linfócitos TCD4+ (KLEIN & SATO, 2000a; HORTON *et al.*; 2004; NEEFJES *et al.*, 2011; PISHESHA *et al.*, 2022).

Os genes de classe III codificam algumas proteínas do sistema complemento, entre as quais Fator B (Bf), C2 e C4 (GRUEN & WEISSMAN, 2001).

Posteriormente, foram relatados vários genes de classe III codificados na extremidade telomérica do cromossomo 6, sendo a maioria codificadora de proteínas envolvidas nas respostas inflamatórias. Merecem destaque, além dos genes do HLA,

a família de genes TNF, AIF1 (*Allograft Inflammatory factor 1* ou fator inflamatório 1 do aloenxerto) e HSP70 (*Heat Shock Protein of 70 kDa*) ou Proteína do Choque Térmico de 70 kDa (GRUEN & WEISSMAN, 2001).

Constitucionalmente, conforme visto na figura 4, as moléculas de HLA classe I são compostas por duas cadeias polipeptídicas distintas ligadas de forma não covalente: cadeia pesada (cadeia α) e uma cadeia formada por um polipeptídeo não polimórfico que não é codificado pelos genes da região do MHC (cadeia de β 2-microglobulina) (ABBAS *et al.*, 2015).

As moléculas de classe II do MHC são constituídas por duas cadeias polipeptídicas heterodímeras de glicoproteínas (α e β), que estão ligadas de forma não covalente, formadas por uma cadeia α com aproximadamente 34 kDa, e uma cadeia β , com aproximadamente 28 kDa (figura 4). Os segmentos amino terminais das cadeias α 1 e β 1 interagem para formar a fenda de ligação de peptídeos, enquanto os segmentos α 2 e β 2 possuem sítio de ligação para as moléculas coestimuladoras (ABBAS *et al.*, 2015).

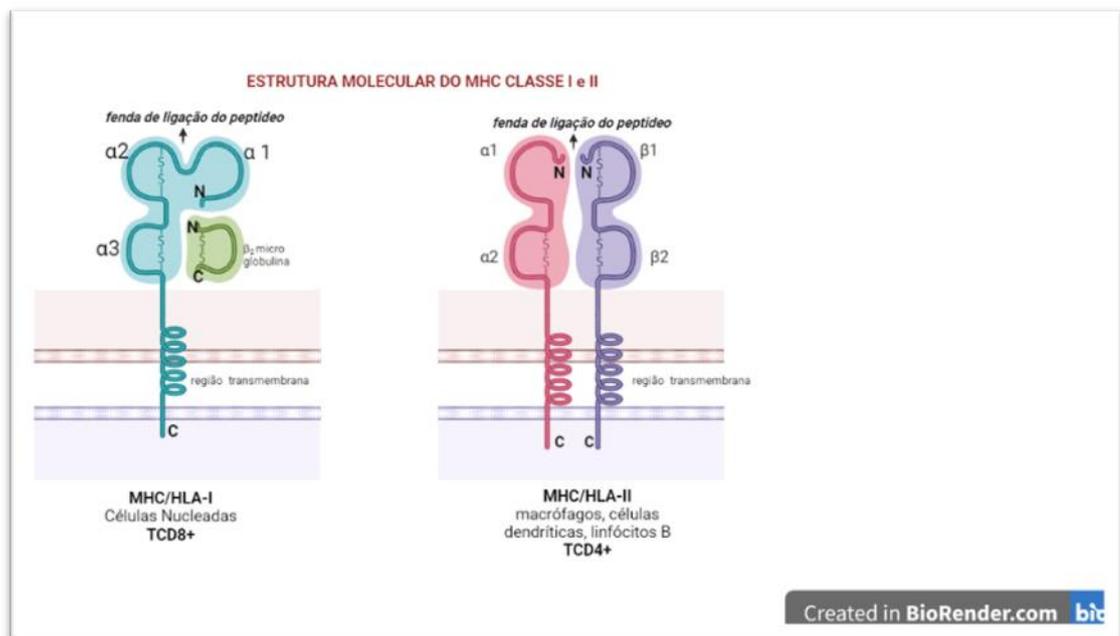


Figura 4: Estrutura molecular do MHC classes I e II.

Fonte: Elaboração da autora

O estudo do HLA permite compreender vários aspectos da imunobiologia, entre eles a tolerância imunológica central e periférica, a manutenção do repertório de células T *naives* (GOLDRATH & BEVAN, 1999) e os mecanismos envolvidos nas respostas imunes a diversas doenças transmissíveis e não transmissíveis (KLEIN & SATO, 2000b; PISHESHA *et al.*, 2022).

Durante uma infecção, as respostas imunes adaptativas normalmente necessitam da ajuda das APC do sistema imune inato, que levam as informações sobre os peptídeos antigênicos ligados às moléculas de HLA. Espera-se que o complexo peptídeo/HLA exibido pelas APC seja reconhecido pelos TCR o que inicia a ativação celular (JENSEN, 2007; NEEFJES *et al.*, 2011).

Várias outras interações entre moléculas coestimuladoras e seus ligantes também devem acontecer completando a sinalização celular. A ativação de linfócitos T poderá conduzir à eliminação de células infectadas e estimular a resposta humoral de linfócitos B, com produção de anticorpos e liberação de mediadores da resposta imune e inflamatória (citocinas e quimiocinas), o que contribui para a eliminação ou o controle do agente infeccioso (JENSEN, 2007; NEEFJES *et al.*, 2011).

As moléculas do MHC exercem um papel central na conexão da resposta imune inata e adaptativa. Conforme relatado por diversos imunologistas, as etapas do processo de apresentação de peptídeos para as células T devem ser adequadamente reguladas, pois são fundamentais para o sucesso da resposta imune, seja durante uma infecção, na tolerância imunológica, seja no controle e na eliminação de células tumorais (GOLDRATH & BEVAN, 1999; KLEIN & SATO, 2000a; VYAS *et al.*, 2008; PISHESHA *et al.*, 2022).

Ademais – não menos importante que a estimulação de uma resposta imune –, é a tolerância para os antígenos próprios. Nesse processo, há participação valiosa das moléculas do MHC. Durante o desenvolvimento e a maturação dos linfócitos T (timócitos) ocorre a seleção positiva e negativa com a ajuda das moléculas de MHC no timo. Células do epitélio tímico cortical apresentam os peptídeos próprios, ligados ao MHC. Caso os timócitos reajam fortemente a esse complexo, serão eliminados desse órgão. No entanto os timócitos que reagirem com baixa afinidade ao complexo MHC/peptídeo-próprio serão selecionados positivamente e se tornarão de fato linfócitos T, sendo liberados para atuarem nos órgãos linfoides periféricos (TAKAHAMA, 2006; KONDO *et al.*, 2019, KISIELOW, 2019).

Nesse contexto, moléculas do MHC – mais precisamente moléculas de HLA (em humanos) – fazem parte de um importante sistema polimórfico na resposta imunológica. Tais moléculas estão associadas com suscetibilidade ou resistência a diversas enfermidades, incluindo TB.

2.5.3 HLA classe II (DR e DQ) na TB

O HLA exerce posição central entre a imunidade inata e a adaptativa por estar envolvido na ligação aos peptídeos antigênicos que serão reconhecidos por células T da imunidade adaptativa. Por essa razão, o HLA (classe I e II) é descrito por alguns imunogeneticistas como “as lentes utilizadas pelos linfócitos T para reconhecerem o mundo dos antígenos” (VYAS *et al.*, 2008; NEEFJES *et al.*, 2011; VAN KASTEREN *et al.*, 2014; PISHESHA *et al.*, 2022).

Outrossim, a diversidade de receptores disponíveis nos linfócitos permite que praticamente qualquer peptídeo antigênico (próprio ou não próprio) seja reconhecido, estimulando ou tolerando uma resposta imune de acordo com o arsenal de sinalização celular e com os componentes do microambiente no momento da interação MHC/peptídeo ao TCR (VYAS *et al.*, 2008; NEEFJES *et al.*, 2011; VAN KASTEREN *et al.*, 2014; PISHESHA *et al.*, 2022).

Por esse breve comentário, percebe-se o papel das moléculas de HLA. Sem dúvida, a investigação dos genes de HLA em doenças – em especial na TB – poderá trazer contribuições significativas para compreensão da resposta imune na TB e os possíveis caminhos que levam às diferentes formas clínicas dessa moléstia após a infecção por *M. tuberculosis*.

No repertório de receptores dos linfócitos T do hospedeiro, os TCR devem reconhecer os peptídeos complexados nas moléculas de HLA, expostos pelas células APC. A partir desse evento, espera-se que as demais moléculas coestimuladoras completem a ativação celular para uma resposta efetiva contra o bacilo (REITH *et al.*, 2005; PISHESHA *et al.*, 2022).

A alteração na expressão do HLA e/ou a falha de outro componente ligado a esse processo poderá tornar o indivíduo mais suscetível a desenvolver determinada doença, pois a atuação combinada das células do sistema inato e adaptativo é crucial nesse controle como é o caso da TB. Além disso, a resposta de linfócitos Th1 com produção de IFN- γ tem sido caracterizada como protetora na TB, mas obviamente essa resposta não ocorre de forma isolada (REITH *et al.*, 2005; PISHESHA *et al.*, 2022).

Vários são os fatores envolvidos na eliminação ou na persistência do bacilo no hospedeiro humano, e os genes do HLA têm sido associados tanto à suscetibilidade quanto à proteção contra TB. As análises e as metanálises descrevem os prováveis alelos de HLA classe I e classe II associados com TB (FLYNN & CHAN, 2001; GUPTA *et al.*, 2012).

As moléculas de HLA classe II (HLA-DR e DQ) podem se ligar a inúmeros peptídeos; e estes podem ser reconhecidos por linfócitos Th. Porém esse reconhecimento inicial pode não ser suficiente para definir o tipo de resposta celular que será gerada ou inclusive a não resposta que previne uma autoimunidade (LA GRUTA *et al.*, 2018).

Inúmeros fatores são necessários para que a sinapse imunológica aconteça, desde a organização e a movimentação das moléculas presentes na membrana celular ao microambiente de citocinas no momento da interação HLA/peptídeo e TCR. Essa interação é fundamental para o início da resposta imune celular adaptativa. E, como a região gênica do HLA é bastante polimórfica, os peptídeos de *M. tuberculosis* gerados podem se ligar com maior ou menor afinidade a determinados HLA (DENDROU *et al.*, 2018).

Estudos *in silico* (com simulação computacional) podem ajudar a selecionar os melhores peptídeos de *M. tuberculosis* para vacinas contra TB, ou seja, peptídeos com maior afinidade com os HLA mais frequentes na população. Seria uma estratégia para a seleção mais rápida de peptídeos imunogênicos, capazes de gerar uma resposta celular protetora com foco nos linfócitos Th (MUSTAFA, 2013).

Além disso, indivíduos que expressam HLA não ligadores ou ligadores de baixa afinidade aos peptídeos de *M. tuberculosis* também devem ser investigados. Isso porque eles podem ser mais suscetíveis ao desenvolvimento da TB (não conseguem estimular uma resposta adaptativa de linfócitos T) ou podem ser indivíduos resistentes, que, mesmo com altas exposições aos bacilos da TB, não se tornam infectados. Isso provavelmente por terem um sistema fagocítico muito eficiente, capaz de eliminar o bacilo, gerando peptídeos não ligadores aos HLA e conseqüentemente, não deixando rastros para os linfócitos T serem ativados (SIMMONS *et al.*, 2018).

Diversas pesquisas de HLA e TB em diferentes populações do mundo e Estudos de Associação Ampla do Genoma (GWAS – *Genome-wide Association Studies*) em várias doenças contribuíram para fortalecer a importância da investigação de genes na região do MHC (KENNEDY *et al.*, 2017; THORBALL *et al.*, 2021).

Pelos motivos expostos, estudos a respeito da associação do HLA com doenças são considerados relevantes, com destaque para as moléculas de HLA classe II, envolvidas na interação com linfócitos Th – umas das células mais importantes do sistema adaptativo e fundamentais na resposta imune da TB.

HLA-DR e DQ estão na rota de expressão ligada aos peptídeos micobacterianos, na superfície de macrófagos e de células dendríticas, sendo reconhecidos pelos linfócitos TCD4+ (FLYNN & CHAN, 2001; GUPTA *et al.*, 2012).

2.5.4 Antropologia do HLA na TB

Em estudos com populações da Ásia, os alelos *-DRB1*15* (TONG *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2015); *-DRB1*04* (YANG, 2016) e *-DQB1*05* (GOLDFELD *et al.*, 1998) foram associados ao maior risco para TB.

Em populações africanas, os alelos *-DRB1*11:01* e *-DQB1*05* (GRIFONI *et al.*, 2018) apontaram risco para TB, e *-DQB1*03*, proteção para TB (WAMALA *et al.*, 2016). Adicionalmente, em populações da Europa (Polônia) e Oriente Médio (Síria), *-DRB1*11* associou-se ao risco para TB (DUBANIEWICZ *et al.*, 2005).

Populações da Europa e Oriente Médio apresentaram risco de TB na associação com os alelos *-DRB1*14* (DUARTE *et al.*, 2011); *-DRB1*16* (DUBANIEWICZ *et al.*, 2000); *-DRB1*08* (KURANOV *et al.*, 2014) e *-DQB1*03* e *-DQB1*05* (DUBANIEWICZ *et al.*, 2005).

Nas Américas (Brasil e Canadá) *-DRB1*04* (SOUZA *et al.*, 2016) e *-DQB1*05* (LINDA *et al.*, 2017) foram associados ao risco para formas pulmonares de TB.

A correlação de alelos conferindo risco ou proteção para TB entre populações do Leste, Sudeste e Sul da Ásia, África e Américas (incluindo índios da Amazônia) reforça a ideia da ancestralidade comum oriunda das primeiras migrações populacionais do continente africano no período Pleistoceno, de 100.000 a 10.000 anos a. C., pelo Estreito de Bering e por rotas migratórias como da Australásia (Rota Malaio-Polinésia) (CAMPELO DOS SANTOS *et al.*, 2022).

As migrações teriam ocorrido em canoas primitivas de ilha em ilha. A população migrante teria chegado às Américas e habitado a América do Sul (Uruguai e Costa Atlântica brasileira) e o Panamá, com alguns grupos subindo para os Estados Unidos e o centro-sul do Canadá pela costa do Atlântico (há mais ou menos 1.500 anos) (CAMPELO DOS SANTOS *et al.*, 2022).

Essas distintas rotas migratórias decorrentes de povos de etiologia diversas, explicaria os diferentes alelos de HLA dessa população com povos do Oriente Médio e Europa; bem como explicaria por que índios da América do Sul se assemelham aos povos da Oceania e se diferem dos índios da América do Norte. Os australásios compartilham mais variantes genéticas com populações das Américas, como as que

falam tupi, incluindo a população amazônica. A ancestralidade varia de 2 a 85% (SKOGLUND & REICH, 2016).

Semelhança no HLA explicaria imunogeneticamente por que África, Ásia e certas populações das Américas (como povos de etnia indígena) apresentam elevada incidência de TB. Além disso, migrações e miscigenações conferem hiperpolimorfismo de HLA e vantagem evolutiva, como melhor e mais rápida resposta imunológica frente a patógenos conhecidos (SKOGLUND & REICH, 2016).

2.5.5. Estudos do HLA na TB

Os genes do MHC foram descobertos em 1937 por Peter Gorer, a partir da rejeição de transplantes teciduais realizados em camundongos, nos quais foram chamados de *histocompatibilidade-2* (H-2). Essa região gênica, no entanto, teve uma de suas grandes funções reveladas entre 1960 e 1970, quando Baruj Benacerraf, Hugh McDevitt e colaboradores demonstraram que esses genes eram importantes na resposta imune a antígenos proteicos, em especial no reconhecimento de antígenos pelas células T (ZINKERNAGEL & DOHERTY, 1974).

Estudos têm mostrado associação de genes do HLA classe II com suscetibilidade ou proteção à TB pulmonar (GOLDFELD, 2004; DUBANIEWICZ *et al.*, 2000; LOMBARD *et al.*, 2006; THUONG *et al.*, 2008; YULIWULANDARI *et al.*, 2010; MAGIRA *et al.*, 2012; EL BAGHDADI *et al.*, 2013; entre outros).

Há estudos de associações do MHC classe II, especialmente quanto à suscetibilidade para o desenvolvimento de TB, para os genes de HLA-B, -DQ (DQ-1 maior risco para TBP) e -DR (predispondo à TBP em presença do subtipo -*DRB1*1501*) estando esses entre os mais relacionados com a disseminação de *M. tuberculosis* (RAJA, 2004).

Em razão do polimorfismo do HLA, uma variedade de alelos de HLA classe II associados com TBP já foram descritos: *HLA-DRB1*0803* e *DQB1*0601* (KIM *et al.*, 2005), *-DQB1*0503* (DELGADO *et al.*, 2006), *-DRB1*14* (DUARTE *et al.*, 2011), *-DRB1*04*, *-DRB1*09*, *-DRB1*10*, *-DRB1*15* e *-DRB1*16* (TONG *et al.*, 2015).

É conhecida a associação de TBP avançada, cavitação e doença extrapulmonar com o *HLA-B*15*, e de TB pleural com *HLA-DRB1**. Assim como para outras infecções (hanseníase, hepatite C, esquistossomose) a presença dos alelos de genes do HLA -DR e -DQ está associada à perda de controle da vigilância imunológica sobre determinados antígenos específicos, resultando em disseminação, a qual é ainda

mais expressiva quando da presença dos alelos *-DQB1*0307* e *-DQB1*0308* (SHANDERA, *et al.*, 2013).

Os alelos *-DQB1** tanto homocigotos quanto heterocigotos estiveram presentes na TBExP, em suas diferentes formas clínicas, em um estudo realizado em sul-africanos e americanos, de ambos os sexos e de diversas faixas etárias. Nesses indivíduos, as formas mais comuns de TBExP foram: TB linfonodal, miliar, sistema nervoso central, pleural, óssea/articular e abdominal (SHANDERA *et al.*, 2013).

Mulheres iraquianas com genótipo *-DRB1*07* (62% em mulheres e 38% em homens) tinham risco relativo de 4,35 vezes de desenvolver TBExP se comparadas com indivíduos saudáveis. Presença do genótipo *-DRB1*03* (72% nas mulheres e 28% nos homens) gerava um risco relativo de 3,2 vezes para o desenvolvimento de TBExP comparados com indivíduos saudáveis. Também foi observado, ainda em mulheres, maior risco de TBExP na presença do genótipo *-DRB1*15* (KADHIM & NADA, 2021).

Não apenas em doenças infecciosas determinados alelos associam-se com desfecho favorável ou não. Exemplo disso é a arterite de Takayasu (AT), doença inflamatória crônica da parede dos vasos, especificamente da artéria aorta e seus ramos, e que se assemelha à TB por manifestar granulomas de paredes arteriais; sobretudo na presença de alelos *HLA-B** (tanto na TB quanto na arterite) (SOTO *et al.*, 2007).

Contudo a AT se difere da TB especificamente para os alelos de *HLA-B** associados à doença. Casos de arterite de Takayasu associaram-se aos alelos *HLA-B*39*, *B*44* e *B*52*. TBP teve associação ao alelo *HLA-B*35*; e TBExP, aos alelos *HLA-B*39* e *B*40*, o que sugere diferença na distribuição dos alelos de *HLA-B** entre pacientes com AT e TB apesar de compartilharem semelhanças histológicas inflamatórias (SOTO *et al.*, 2007).

A importância do HLA na apresentação de antígenos para células T não consiste apenas em promover a imunidade adaptativa. Constitui-se ferramenta para terapias contra a TB por meio da construção de anticorpos com a mesma afinidade TCR para epítopos imunodominantes da micobactéria, como acontece com anticorpos produzidos a partir de *E. coli* HB2151 para o epítipo imunodominante Ag85Bp/HLA-A0201, o qual apresenta forte ligação ao HLA-A de classe I, sendo capaz de ativar células TCD8+, o que resulta em apoptose das células fagocíticas infectadas com a micobactéria (ORTEGA *et al.*, 2020).

3. Justificativa

O estudo de -DR e -DQ importam, pois moléculas do HLA classe II apresentam antígenos para os linfócitos TCD4+ e a imunidade mediada por estes linfócitos é a marca frequente de resistência do hospedeiro à infecção por *M. tuberculosis*.

Esta pesquisa amplia a investigação quanto ao papel do HLA classe II na predisposição ou proteção contra a TBP e a TBExp. Dentre as principais justificativas, está o conhecimento quanto o papel do *HLA-DRB1** (já descrito na associação com TB na população amazônica) e *-DQB1** no curso da doença e na associação com sua forma clínica.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Caracterizar geneticamente os antígenos leucocitários humanos – HLA classe II (-DRB1* e -DQB1*) em indivíduos diagnosticados com tuberculose no Estado do Amazonas e investigar associações com as formas pulmonar e extrapulmonar.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1 Avaliar a associação entre variáveis sociodemográficas, epidemiológicas e clínicas entre indivíduos com tuberculose pulmonar, extrapulmonar e indivíduos sem tuberculose;

4.2.2 Avaliar as frequências dos polimorfismos de genes do HLA-DR e -DQ em indivíduos com tuberculose pulmonar e extrapulmonar em relação aos indivíduos sem tuberculose;

4.2.3 Analisar a associação dos polimorfismos de genes do HLA-DR e -DQ com risco para o desenvolvimento de tuberculose pulmonar e extrapulmonar.

5. Método

5.1. Considerações éticas do projeto

O presente estudo está vinculado ao projeto “Avaliação de polimorfismos genéticos relacionados à resposta imunológica na tuberculose”, coordenado pela

professora Aya Sadahiro. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM), no dia 25 de agosto de 2019, sob número de Parecer: 3.530.854 e número CAAE 19021519.9.0000.5020.

5.2. População do estudo, local de estudo e cálculo da amostra

Os pacientes com e sem TB foram recrutados na Policlínica de Referência em Pneumologia Cardoso Fontes, da Secretaria de Saúde do Estado do Amazonas (SUSAM).

A Policlínica Cardoso Fontes é uma unidade de saúde especializada nos casos de TB no Estado e está localizada na região centro-sul de Manaus. Atende pacientes sintomáticos respiratórios, suspeitos de TB por meio de demanda referenciada pelo Sistema de Regulação (SISREG). Até novembro de 2022, possuía cerca de 600 indivíduos em tratamento para TB na unidade.

Os participantes recrutados neste estudo foram de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos. Os controles foram indivíduos não diagnosticados com TB (que conviviam ou conviveram com indivíduos com TB), mas que não desenvolveram a doença.

O cálculo amostral foi realizado a partir dos dados disponibilizados pela Policlínica Cardoso Fontes, quanto ao número de casos diagnosticados para TBP e TBExp no ano de 2019. O programa *Gpower versão 3.1* foi utilizado para determinar o tamanho amostral, de forma que agrupou 120 indivíduos com TBExp; 160 indivíduos com TBP e 160 controles, totalizando 440 participantes.

5.2.1 Critérios de inclusão:

Indivíduos com TBP

Foram incluídos indivíduos sintomáticos respiratórios com exame(s) de escarro positivo na baciloscopia e/ou teste *Xpert MTB/RIF* para *M. tuberculosis* e/ou ainda cultura positiva para micobactéria.

Indivíduos com TB extrapulmonar

Foram incluídos indivíduos em tratamento (independentemente do período) e com tratamento finalizado, de acordo os seguintes critérios:

a) Indivíduos suspeitos clinicamente de TBExP em qualquer topografia, com diagnóstico baseado em resultado positivo de cultivo de amostra biológica para *M. tuberculosis* e/ou por exame molecular positivo para complexo micobactéria.

b) Indivíduos suspeitos clinicamente de TBExP em qualquer topografia, sem diagnóstico por método microbiológico ou molecular, mas com presença de achados histopatológicos sugestivos de TB como presença de granulomas, com ou sem necrose caseosa, e de células gigantes, além de bacilos álcool-ácido resistentes.

c) indivíduos suspeitos clinicamente de TBExP em 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.

Controles – contatos

O grupo controle foi constituído de contatos (comunicantes) sem TB, dos indivíduos com TBP e TBExP. Os contatos foram acompanhantes de indivíduos com TB ou, que conviveram com casos de TB, sem consanguinidade com estes.

5.2.2. Critérios de exclusão:

Excluíram-se indivíduos de nacionalidade estrangeira, com outras doenças associadas entre as quais: neoplasias, Aids, diabetes, hepatites, doenças infecciosas de acometimento respiratório e doenças autoimunes. Excluídos ainda gestantes, transplantados ou que usaram imunorregulador.

Indivíduos com TBExP que, no decorrer do projeto, mudaram o diagnóstico de TB para outras doenças também foram excluídos.

Os contatos que no decorrer do projeto apresentaram sintomas e/ou resultado da baciloscopia e cultura positiva para TB foram excluídos do grupo controle.

5.2. Amostras biológicas

Os pacientes diagnosticados com TBP e TBExP na Policlínica Cardoso Fontes, que aceitaram participar do projeto assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), responderam a um questionário com informações sociodemográficas e epidemiológicas e, em seguida, as amostras de escarros e sangue periférico foram coletadas. As amostras de escarro foram encaminhadas para

o Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) no qual foram realizados os exames microbiológicos. As amostras de sangue foram encaminhadas para a UFAM.

5.2.1 Escarro

Indivíduos com TBP, TBExP e controles sem TB receberam instruções para coleta de escarro conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2008). As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA para realização dos exames bacteriológicos e moleculares a fim de identificar as micobactérias isoladas e ainda, para armazenamento destas.

5.2.2. Sangue

Coletaram-se 5 mililitros (mL) de sangue periférico dos indivíduos com TBP, TBExP e dos controles, em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As amostras foram encaminhadas para a extração de DNA e para tipificação do HLA no Laboratório de Imunologia Molecular (LIM) do Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFAM.

5.3. Exames microbiológicos

As amostras de escarros coletadas foram submetidas aos exames de baciloscopia direta pós-concentrado; e na sequência foi realizado o cultivo bacteriano, pelo método Petroff, Kudoh e Ogawa (PKO). As técnicas seguiram o padronizado por Salem et al. (1990) e Salem et al. (2007).

5.4. Extração do DNA bacteriano e humano

5.4.1 DNA bacteriano

A partir do crescimento micobacteriano na cultura foi realizada a extração de DNA por termólise (LEÃO et al. 2004). Brevemente, uma pequena porção da colônia micobacteriana foi homogeneizada em 200 uL de água ultrapura ou tampão TET (Triton X-100, 1% Tris-EDTA) e incubado a 96°C por 60 minutos e, posteriormente, congelado a -20°C por pelo menos 2 horas. Esta suspensão foi reincubada à 96°C por 10 minutos e centrifugada a 14000 x g por 1 minuto. Em seguida, realizou-se a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para identificação de *M. tuberculosis*, segundo técnica preconizada por Van Embden et al. (1993), com os iniciadores (INS1:

5'CGTGAGGGGCATCGAGGTGGC3'; INS2: 5' GCGTAGGCGTCGGTGACAAA3'), específicos para o elemento de inserção IS6110, resultando em um fragmento de 245 pb.

5.4.2. DNA humano

Após a coleta de sangue foi realizada a extração de DNA seguindo técnica rápida com sais de brometo de tetrametilamônio (DTAB/CTAB), segundo Gustincich *et al.* (1991). As amostras de DNA extraídas foram armazenadas em *freezer* -20°C até o momento do uso.

5.5. Tipificação do HLA classe II

A tipificação dos alelos HLA classe II genéricos foi realizada por Iniciador de Sequência Específica (SSP-*Sequence Specific Primer*) com o *kit* comercial da One Lambda® (21001 Kittridge Street Canoga Park, CA 91303, EUA).

Com o *kit* One Lambda®, seguindo orientações do fabricante, uma placa contendo iniciadores para beta globina e HLA classe II foram acrescidos 50ng/μL de três amostras diferentes de DNA junto com DMIX contendo reagentes necessários para amplificação. Essa solução foi levada ao termociclador, processada em 30 ciclos, distribuídos em quatro estágios.

No primeiro estágio, foi realizado um ciclo a 96°C por dois minutos e dez segundos e após, mais um minuto a 63°C. No estágio dois, foram realizados nove ciclos, sendo dez segundos a 96°C e um minuto a 63°C. No estágio três, foram vinte ciclos, sendo dez segundos a 96°C, cinquenta segundos a 59°C e trinta segundos a 72°C. No estágio quatro foi realizado "hold" a 4°C. Após completá-los, foram aplicados 10μL das amostras em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR GREEN®- Sybr Safe e submetidos à corrida de eletroforese durante seis minutos. Em seguida, as amostras foram reveladas no transiluminador de luz azul para visualização das bandas.

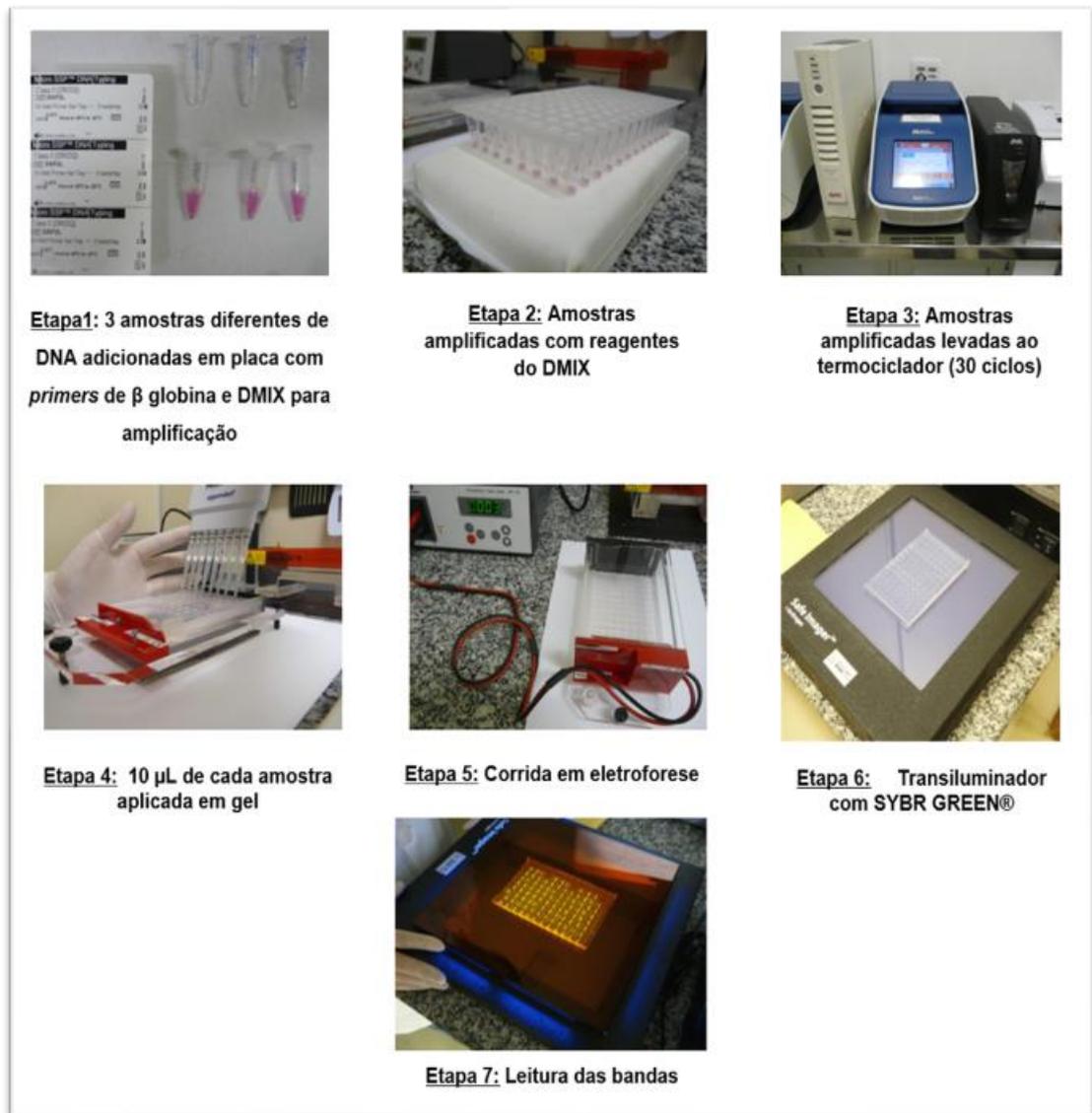


Figura 5: Etapas metodológicas para extração e tipificação do HLA.
 Fonte: Elaboração da autora

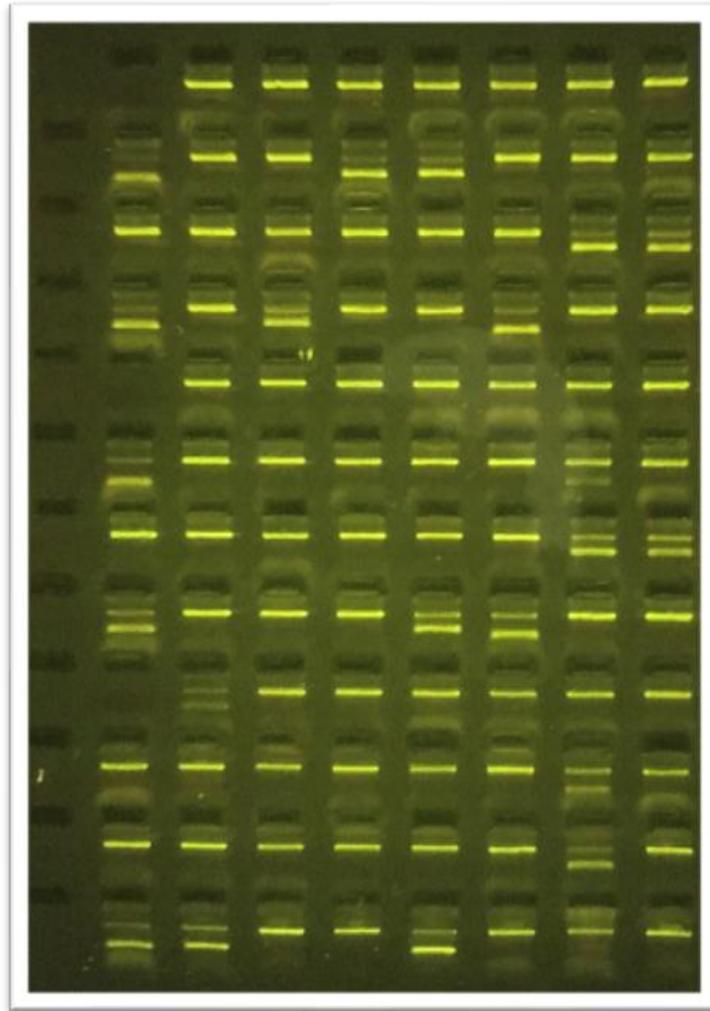


Figura 6: Bandas de HLA, em gel de agarose a 1,5%, coradas com SYBR GREEN®- Sybr Safe após corrida de eletroforese, e revelação no transiluminador de luz azul para visualização. Fotografia de 17/08/2021.

Fonte: Elaboração da autora.

5.6. Análises estatísticas

As análises das variáveis sociodemográficas e epidemiológicas foram realizadas a partir do banco de dados da planilha Excel® com cálculos de frequências simples, médias e desvio padrão, utilizando fórmulas no próprio *software*.

Na análise de associação do sexo entre os grupos, foi aplicado o teste de Qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates. Para análise de idade, foi utilizada a Análise de Variância de um fator (*One-way Analysis of Variance*).

Para o teste de associação dos alelos de HLA entre os grupos, foi utilizado o teste de *Qui-quadrado* (χ^2) ou *exato de Fisher* para comparar as frequências dos alelos encontrados. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$, com o intervalo de confiança de 95% (IC95%). O *software* GraphPad Prism 8® foi usado para os testes de contigência e *Qui-quadrado*.

Para estimar as frequências dos haplótipos DRB1*~DQB1* entre os grupos, foi usado o *software* Hapl-o-Mat®.

6. Resultados e Discussão

Foram obtidas 523 amostras: 257 controles, 195 indivíduos com TBP e 71 com TBExP. No grupo de TBExP quatro amostras foram excluídas das análises de HLA (uma por ser de indivíduo com nacionalidade estrangeira, uma amostra com pouco DNA e duas por falha na amplificação do DNA), do que resultaram 67 amostras de indivíduos com TBExP para genotipagem de HLA.

Os genes do HLA são codominantes, ou seja, somando-se alelos maternos e paternos, resultaram em 514 tipos de alelos nos controles, 390 alelos em indivíduos com TB pulmonar e 134 alelos em indivíduos com TBExP.

6.1. Resultados das variáveis sociodemográficas e epidemiológicas

Variáveis sociodemográficas: sexo, idade e naturalidade, bem como epidemiológicas: hábitos de vacinação com bacilo de Calmette-Guérin (BCG), tabagismo e consumo de álcool foram avaliados no contexto da doença e estão descritos nas Tabela 1 e 2.

Entre casos de TB e controles predominou o sexo masculino: 63,08% (TBP), 61,98% (TBExP) e 61,09% (controles). Apesar da diferença de frequência entre os sexos (62,79% de TB no sexo masculino *versus* 37,21% de TB no sexo feminino), não houve significado estatístico na comparação entre os grupos (teste de Fisher, $p > 0,05$). Este resultado, provavelmente foi devido as amostras nos três grupos terem proporção semelhante quanto o sexo masculino e feminino, conforme demonstrado na Tabela 1.

Embora os resultados apontem o sexo masculino, mais acometido, a TB pode atingir homens e mulheres, de qualquer faixa etária. No entanto, a prevalência da TB é significativamente maior entre homens adultos, principalmente em países de baixa e média renda. Há fortes evidências de que homens são prejudicados na busca ou no acesso aos cuidados contra TB em muitos locais (HORTON *et al.* 2016).

Dados da OMS, de 2019, revelaram maior percentil de TB entre homens adultos (56% de todos os casos) comparados a 32% em mulheres adultas e a 12% em crianças (OMS, 2020).

Neste estudo, a frequência de TB (tanto pulmonar quanto extrapulmonar) foi maior que aquela relatada pela OMS: 62,79% de TB no sexo masculino *versus* 37,21% de TB no sexo feminino. Isso pode ser atribuído ao elevado coeficiente de incidência da doença no Amazonas, o maior do País (84,1/100 mil habitantes) (BRASIL, 2023).

Fatores imunogenéticos da população estão associados à suscetibilidade ou à proteção para TB (SIMMONS *et al.*, 2018), incluindo predomínio de determinados tipos de HLA, a citar o *HLA-DR4*, fortemente associado com predisposição à doença (SOUZA *et al.*, 2016).

A circulação de cepas mais virulentas de *M. tuberculosis* (como a Beijing) na Região Norte, descritas em Roraima e em Belém, pressupõe, devido à proximidade com o Amazonas, que isso seja fator corroborante para a alta prevalência de TB nos estudos envolvendo população local (TATARA *et al.*, 2019).

Dentre as famílias de *M. tuberculosis* descritas em amostras de pacientes com TB coletadas nessas regiões e utilizando a técnica *spacer oligonucleotide typing* (*Spoligotyping*), destacam-se linhagens da família LAM (*Latin-American-Mediterranean*), H (Haarlem) e T também isoladas em países da América do Sul como a Venezuela. Recentemente, há descrição de cepas Beijing entre populações indígenas e não indígenas circulando no Estado de Roraima (TATARA *et al.*, 2019).

Esses achados de cepas resistentes (Beijing) comuns na Ásia – mais precisamente entre populações chinesas – e ainda, entre populações da América do Sul são condizentes com os estudos envolvendo ancestralidade em comum dos alelos de HLA entre Ásia e América do Sul (CAMPELO DOS SANTOS *et al.*, 2022; SKOGLUND & REICH, 2016).

Embora cepas Beijing não tenham sido detectadas por PCR Multiplex em amostras do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) até 2022, a dinâmica migratória de Roraima para o Amazonas, acelerada especialmente com venezuelanos, pode ter introduzido no Estado, linhagens Beijing resistentes (VIANA *et al.*, 2022).

Hábitos como tabagismo e consumo de álcool descritos na literatura contribuem para desenvolvimento de formas da TB (QUAN *et al.*, 2022; FRIEDMAN, 1987; WIGGER *et al.*, 2022).

Nesta avaliação, a idade média dos pacientes com TBP foi 40,39 anos e nos pacientes com TBExP foi 34,11 anos. Entre os controles, a média de idade ficou em 30,17 anos. Isto demonstra predomínio da doença na faixa etária produtiva. A comparação da idade nos três grupos mostrou diferença significativa entre os

pacientes com TBP e controles ($p < 0,0001$), bem como entre TBP e TBExP ($p = 0,0026$ ANOVA) conforme comparado na Tabela 1.

Observa-se que a TBP predominou em adultos acima de 40 anos enquanto a extrapulmonar abaixo dessa idade. Isso pode ser explicado em partes, pois indivíduos mais velhos já foram expostos a uma maior carga bacilífera e/ou mais reexposições, o que determina maior reação de hipersensibilidade e resposta imune celular, diminui a possibilidade de disseminação hemato-linfática e aumenta a agressão tecidual (RODRIGUES & FILHO, 2007; BOMBARDA *et al.*, 2001).

Neste estudo, a análise da vacinação revelou não evitar a doença, visto que 85,08% dos casos de TB (pulmonar e extrapulmonar) aconteceram em indivíduos vacinados, enquanto 40,08% dos controles sem TB receberam a vacina (Tabela 3). Tal resultado corrobora estudos sobre a eficácia protetora variável da vacina BCG em adultos (de 0 a 80% em ensaios clínicos), uma vez que não previne satisfatoriamente a TBP ou a sua transmissão (SOLEIMANPOUR *et al.*, 2022; GOUDOURIS *et al.*, 2023).

Análise da Tabela 2 demonstra que, entre os não vacinados, 12,7% tiveram TBExP e 10,77% apresentaram TBP. No grupo controle, 0,78% não receberam a vacina contra TB. Essa diferença entre formas extrapulmonares e pulmonares, apesar de não ter significância estatística ($p = 0,7392$) e sob possibilidade de viés de seleção (ocasionada pela ausência dessa informação em muitos pacientes), demonstra que a vacina pode reduzir a disseminação da doença. Essa disseminação, incluindo formas de meningite por TB, é observada de forma consistente nas crianças (SOLEIMANPOUR *et al.*, 2022).

O hábito de fumar representou risco para TBP, pois ocorreu em 24,5% dos pacientes *versus* 8,13% dentre controles ($p = 0,0054$) conforme demonstrado na Tabela 2. Essa associação entre tabagismo e TB começou a ser descrita em 1956, no Reino Unido, a partir da observação de que homens acima de quarenta anos expostos à fumaça do tabaco adoeciam mais de TB. Em 1969, outro estudo também no Reino Unido observou que a incidência de TB ajustada para idade e sexo era duas vezes maior entre fumantes que em não fumantes (QUAN *et al.*, 2022).

O fumo está associado à TB latente, pior prognóstico, maior carga bacilífera, atraso no diagnóstico, doença mais grave, falha na terapia medicamentosa e recaída após tratamento (QUAN *et al.*, 2022). Além disso, interfere na fagocitose de macrófagos alveolares M1, pois a fumaça se acumula nos lisossomos dos macrófagos, o que dificulta a lise de *M. tuberculosis*, além de diminuir a expressão de

moléculas de adesão CD11a e CD54. Outro mecanismo favorecedor para a infecção pela micobactéria é a redução na produção de surfactante A e D pelo epitélio de revestimento alveolar (QUAN *et al.*, 2022).

Diminuição na expressão de TLR2 e TLR4, redução na expressão e excreção de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, RANTES e IL-8, polarização para M2 com maior biossíntese de colágeno, redução na autofagia e maior produção de ROS são outros efeitos do tabagismo sobre macrófagos alveolares (QUAN *et al.*, 2022).

Neutrófilos expostos à fumaça do cigarro têm função, atividade e degranulação comprometidas; ocorre morte atípica de neutrófilos, que resulta em aumento destes e em estado pró-inflamatório. Há ainda redução das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs -*Neutrophil Extracellular Traps*) (LU *et al.*, 2021; QUAN *et al.*, 2022).

Indivíduos expostos ao fumo apresentam diminuição das células dendríticas, menor liberação de IL-12 e conseqüentemente menor proliferação de células TDC4+ específicas para antígenos pulmonares. O tabagismo reduz a apresentação de antígenos pelas células dendríticas ao MHC classe II (NOSS *et al.*, 2000).

Redução nas células TCD4+ e na diferenciação em Th1; menor secreção de IFN- γ ; maior ativação de células Treg com atenuação da resposta inflamatória decorrente da maior expressão do fator de transcrição Caixa de Forquilha P3 (FoxP3- *Forkhead box P3*), ocorrem pelo fumo, resultando em maior quantidade de micobactérias nos pulmões (ISAJEVS *et al.*, 2009; SEMPLE *et al.*, 2013).

Quando da avaliação do consumo de álcool entre os participantes do estudo, observou-se que nos casos de TBP ele foi referido em 60% dos indivíduos *versus* 17,5% no grupo controle sem TB ($p < 0,0001$), conforme é demonstrado na Tabela 3.

A associação entre consumo de álcool e TB é antiga. Desde 1805 foi observada maior incidência de pneumonias e TB entre consumidores de álcool (RUSH, 1805), o qual é atualmente, depois da desnutrição, o fator de risco mais associado com TB, superando a infecção pelo HIV e o tabagismo (QUEM, 2020).

Nesta amostra, consumo de álcool foi associado com TBP ($p = 0,0001$), porém não demonstrou associação com TBExp ($p = 0,8224$), evidenciado na Tabela 2. Esse resultado corrobora estudos a respeito de que consumidores de álcool são mais propensos à TBP do que a extrapulmonar, além de serem mais predispostos às lesões cavitárias (FISKE *et al.*, 2009).

Múltiplos são os fatores que fazem do álcool preponderante para desenvolvimento da TB: sociais, epidemiológicos, fisiológicos, imunológicos. Socialmente, o consumo de álcool retarda o acesso aos cuidados, ao diagnóstico e

ao tratamento (FRIEDMAN, 1987). Epidemiologicamente, contribui para a disseminação – pacientes com TB e consumidores de álcool costumam frequentar estabelecimentos com maior concentração de pessoas, como bares, além de apresentarem maior comprometimento pulmonar, o que inclui lesões cavitárias com alta carga bacilífera (WIGGER *et al.*, 2022).

Fisiologicamente, o álcool interfere no metabolismo, na absorção e nas concentrações de fármacos utilizados no tratamento da doença (FRIEDMAN, 1987).

Imunologicamente, o consumo crônico de álcool gera estresse oxidativo por reduzir os níveis pulmonares de glutathiona (GSH) e de dissulfeto de glutathiona (GSSH) envolvidos na redução de radicais livres. Essa redução da glutathiona ocorre por disfunção mitocondrial causada tanto pelo álcool quanto por *M. tuberculosis*; por redução de Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) e pelo aumento na geração de ROS (LIANG *et al.*, 2014; WAGNER *et al.*, 2014).

O álcool interfere negativamente na expressão do Fator Nuclear Eritroide 2 (Nrf2-*Nuclear Factor Erythroid-2*), que é um fator de transcrição ativador de genes antioxidantes e efetor imune inato (JENSEN *et al.*, 2013).

A redução nos níveis de GSH resulta em aumento da permeabilidade intercelular do epitélio alveolar, reduz a síntese de surfactante, limita a fagocitose de macrófagos alveolares e compromete a eliminação da micobactéria (LIANG *et al.*, 2012).

A combinação desses fatores, aliada à variação genética dos indivíduos, pode ajudar a explicar diferenças no desfecho da doença a partir da infecção por *M. tuberculosis*.

Tabela 1: Variáveis epidemiológicas em pacientes com TB (pulmonar e extrapulmonar) e controles.

VARIÁVEIS	TBP	TBExP	Controles	TBP X Controles			TBExP X Controles			TBP X TBExP		
	n =195 (%)	n = 71 (%)	n =257 (%)	OR	IC 95%	Valor-p	OR	IC 95%	Valor-p	OR	IC 95%	Valor-p
SEXO												
Masculino, n (%)	123 (63,08)	44 (61,98)	157 (61,09)	1,045	0,7101 a 1,546	0,9021	0,9965	0,5901 a 1,682	0,9001	1,048	0,6019 a 1,834	0,9828
Feminino, n (%)	72 (36,92)	27 (38,02)	96 (37,35)									
Sem informação			4 (1,56)									
IDADE	n = 195 (%)	n = 71 (%)	n = 257 (%)									
Md e DP	40,45 ± 14,33	34,11 ± 11,23	30,17 ± 11,92		6,679 a 13,88	<0,0001		-0,6436 a 8,524	0,1082		1,886 a 10,79	0,0026
NATURALIDADE	n = 195 (%)	n = 70 (%)	n = 257 (%)									
Manaus	84 (43,07)	43 (61,43)	72 (28)									
Municípios do AM	53 (27,18)	15 (21,43)	5 (1,95)		NA			NA			NA	
Outros Estados	27 (13,85)	11 (15,71)	5 (1,95)									
Sem informação	31 (15,90)	1 (1,43)	175 (68,10)									

Legenda: Na análise de associação do sexo entre os grupos foi aplicado o teste de χ^2 com correção de Yates. Para análise de idade foi utilizado teste ANOVA one way. Md=Média; DP=Desvio padrão; AM=Amazonas, NA=Não se aplica. Valores $p < 0,05$ foram considerados significativos; OR=odds ratio e IC= intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Tabela 2: Vacinação e hábitos comparando grupos dois a dois.

VARIÁVEIS	TBP	TBExP	Controles	TBP X Controles			TBExP X Controles			TBP X TBExP		
	n =195 (%)	n = 71 (%)	n =257 (%)	OR	IC 95%	Valor-p	OR	IC 95%	Valor-p	OR	IC 95%	Valor-p
VACINA BCG	132 (%)	69 (%)	105 (%)									
Sim	111 (56,92)	60 (84,5)	103 (40,08)									
Não	21 (10,77)	9 (12,70)	2 (0,78)	0,1026	0,02343 a 0,4054	0,0007	0,1294	0,02761 a 0,5260	0,0084	0,7929	0,3253 a 1,838	0,7392
Não informado	63 (32,31)	2 (2,80)	152 (59,14)									
TABAGISMO	102 (%)	69 (%)	86 (%)									
Sim	25 (24,50)	7 (10,14)	7 (8,13)									
Não	77 (75,50)	62 (89,86)	79 (91,87)	3,664	1,507 a 9,601	0,0054	1,274	0,4669 a 3,469	0,88	2,876	1,163 a 7,444	0,0305
Não informado	93	1	171									
ALCOOLISMO	35 (%)	69 (%)	80 (%)									
Sim	21 (60)	14 (20,29)	14 (17,5)									
Não	14 (40)	55 (79,71)	66 (82,5)	7,071	2,938 a 17,06	<0,0001	1,200	0,5299 a 2,717	0,8224	5,893	2,415 a 14,39	0,0001
Não informado	160	2	177									

Na análise de associação entre os grupos foi aplicado o teste de χ^2 com correção de Yates. Valores $p < 0,05$ foram considerados significativos; OR=odds ratio e IC= intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Tabela 3: Vacinação e hábitos (fumo e consumo de álcool) entre pacientes com TB (pulmonar e extrapulmonar) e controles.

VARIÁVEIS	TB (TBP + TBExP)	CONTROLES	Valor-p	OR	IC
VACINA	201 (%)	105 (%)			
Sim	171 (85,08)	103 (40,08)	0,0004	0,1107	0,02568 a 0,4048
Não	30 (14,92)	2 (0,78)			
TABAGISMO	171 (%)	86 (%)			
Sim	32 (18,71)	7 (8,13)	0,0408	2,598	1,085 a 6,489
Não	139 (81,28)	79 (91,87)			
ÁLCOOL	104 (%)	80 (%)			
Sim	35 (33,65)	14 (17,5)	0,0221	2,391	1,161 a 4,956
Não	69 (66,34)	66 (82,5)			

Na análise de associação entre os grupos foi aplicado o teste de (χ^2) com correção de Yates. Valores $p < 0,05$ foram considerados significativos; OR=*odds ratio* e IC= intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Entre os casos de TBExP este estudo mostrou prevalência da TB pleural (58,20%) e ganglionar (22,38%). A disseminação miliar, a TBExP óssea e TBExP para mamas representaram 2,98% cada dentre as formas extrapulmonares. Em 4,47% dos casos, houve acometimento simultâneo de pulmões e pleura, constituindo TBP com envolvimento pleural. Esses dados, consolidados na tabela 4, reforçam estudos sobre predomínio de TB pleural dentre as formas extrapulmonares (CHAIMOWICZ, 2001).

Tabela 4: Sítios de acometimento de tuberculose extrapulmonar dentre os pacientes avaliados.

Local atingido	n (67)	%
pleural	39	58,20%
ganglionar	15	22,38%
pulmonar e pleural	3	4,47%
óssea	2	2,98%
mamária	2	2,98%
miliar	2	2,98%
peritoneal	1	1,5%
ocular	1	1,5%
mediastino	1	1,5%
pleural e ganglionar	1	1,5%

6.2 Resultados das análises de HLA-DRB1* e -DQB1*

Na tipificação de -DRB1* foram identificados 14 alelos. Uma categoria de alelos não identificados pelo *kit* de HLA foi denominada “blank”. Tanto em formas pulmonares quanto em extrapulmonares os alelos mais frequentes foram: *HLA-DRB1*04* (TBP= 23,8% versus TBExp= 12,7%), *-DRB1*13* (TBP= 12,3% versus TBExp= 13,4%) e *-DRB1*08* (TBP= 10,5% versus TBExp= 10,4%) (figura 7).

Esses resultados estão de acordo com estudos revisados que mostram a prevalência de determinados alelos na TBP entre os quais, *-DRB1*04* (WU *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2016), *-DRB1*13* (LOMBARD *et al.*, 2006) e *-DRB1*08* (KIM *et al.*, 2005) em populações da África, Ásia e Américas.

O alelo menos frequente entre os casos de TB foi *-DRB1*0302* (TBP= 0,3% versus TBExp= 1,5%) (figura 7).

Por sua vez, o alelo *-DRB1*04* foi associado com risco para TBP comparado com os controles ($p=0,0005$). Esse resultado corrobora os achados em estudos com amazônidas, nos quais os subtipos *-DRB1*04:11:01* e *-DRB1*04:92* conferem susceptibilidade à TBP enquanto, *-DRB1*04:07:01* confere proteção. Por meio da predição *in silico*, os autores verificaram que o subtipo *-DRB1*04:11:01* associava-se ao risco de TBP em razão da baixa ligação ao antígeno ESAT-6. Já, o subtipo *-DRB1*04:07:01* atribuía proteção à TBP por promover boa ligação ao antígeno e,

consequentemente, boa apresentação dos peptídeos de ESAT-6 aos linfócitos Th, o que induz resposta imune celular protetora contra *M. tuberculosis* (SOUZA *et al.*, 2016).

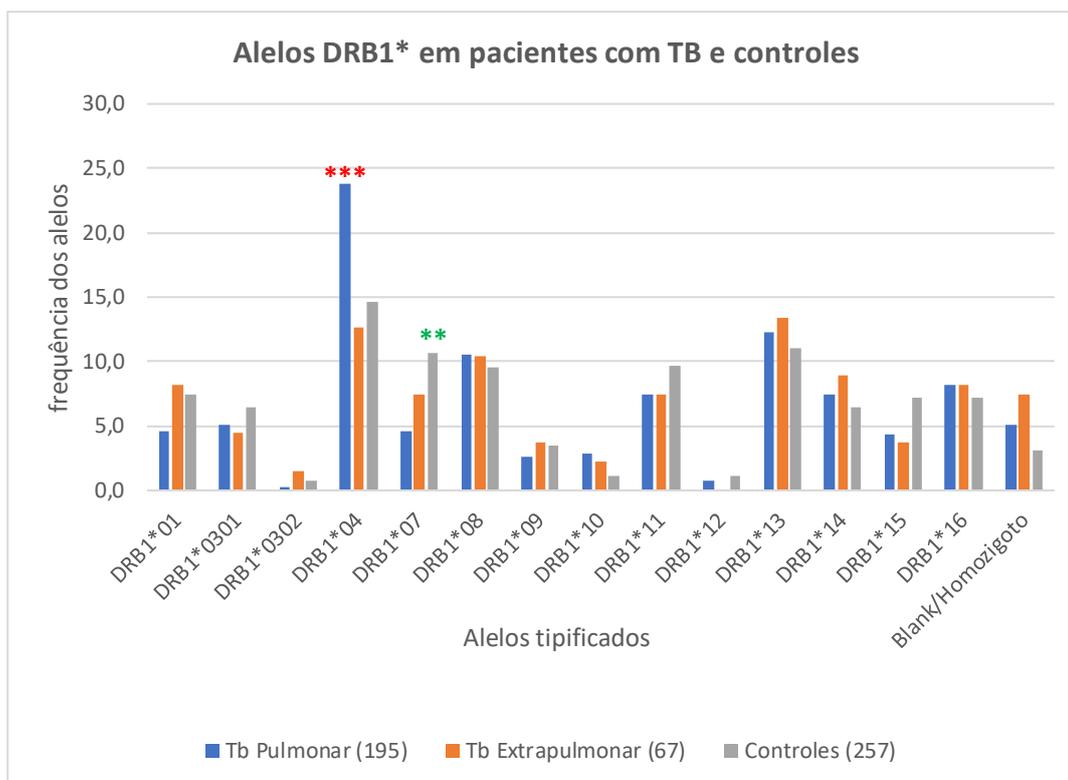
Na TBExP, os alelos tipificados não mostraram associação para proteção, tampouco para risco no desenvolvimento da doença. Contudo, na análise de “blanks” homocigotos, houve significância com valor de $p=0,0415$ (OR= 2,510; IC 95%= 1,145 a 5,768).

Isto traduz um preceito imunológico sobre a importância do polimorfismo de HLA, conferindo variabilidade de antígenos a serem apresentados para células Th. Quanto maior a miscigenação, maior a diversidade de alelos e haplótipos, o que permite respostas imunológicas mais efetivas (PISHESHA *et al.*, 2022; SKOGLUND & REICH, 2016).

O alelo *-DRB1*07* na amostra populacional do presente estudo, representou proteção para TBP ($p=0,0014$), conforme mostrado na figura 7 e Tabela 1. Esse resultado diferiu de um estudo iraquiano, no qual *-DRB1*07* foi mais frequente em mulheres do que em homens, e nas mulheres iraquianas mostrou risco maior para formas extrapulmonares de TB quando comparadas com indivíduos saudáveis (KADHIM & NADA, 2021).

Diferenças como essas retomam a origem migratória populacional distinta, que diferiu HLA de povos do Oriente Médio e Europa daqueles da Ásia, África e Américas, o que mostra a importância de inquéritos populacionais sobre o HLA, haja vista que, o mesmo alelo pode estar associado com risco ou com proteção para determinadas doenças em populações variadas (SKOGLUND & REICH, 2016; CAMPELO DOS SANTOS *et al.*, 2022).

Figura 7: Frequência dos alelos -DRB1* em pacientes (TBP e TBExp) e controles



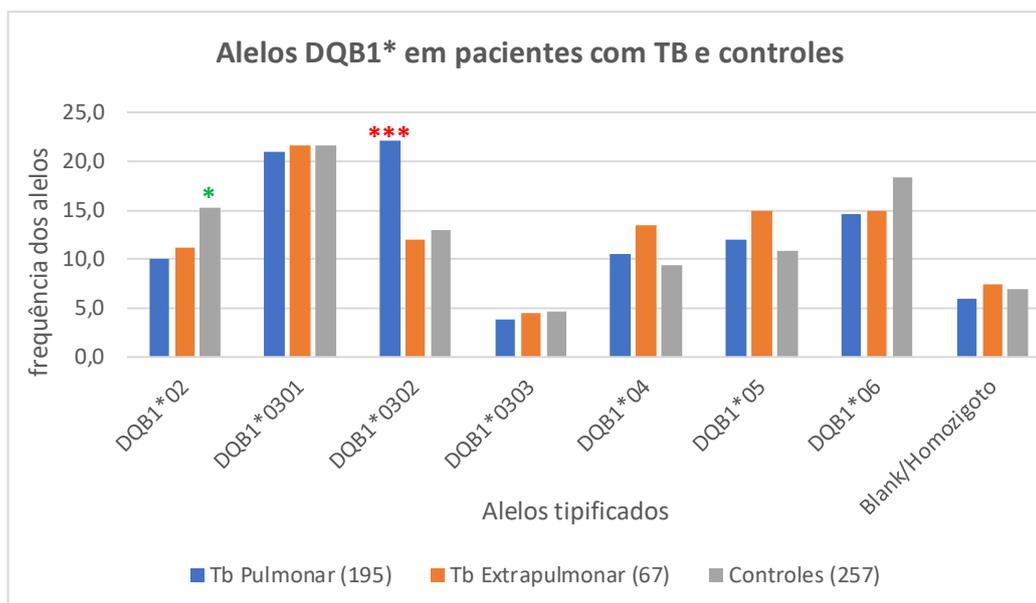
Legenda: *** ($p=0,0005$) demonstrando que -DRB1*04 associa-se a risco para TBP.
 ** ($p=0,0014$) indicando que DRB1*07 está associado à proteção contra tuberculose.
 Asterisco vermelho corresponde a risco; e verde corresponde a proteção.

Na análise de -DQB1* foram tipificados sete alelos e mais os “blanks” homozigotos. Os alelos de *HLA-DQB1** mais frequentes nos acometidos pela TB foram -DQB1*0302 (22,1% na TBP) e DQB1*0301 (21,6% na TBExp), enquanto o alelo -DQB1*0301 predominou entre os controles (21,6% dos alelos tipificados). As frequências desses e demais alelos podem ser visualizadas na figura 8.

A presença do alelo -DQB1*0302 foi associada ao risco para TBP quando comparado aos controles saudáveis ($p=0,0005$). Isso diverge de um estudo prévio em que presença de subtipos de -DQB1*03 – como é o caso dos alelos -DQB1*0307 e -DQB1*0308 – foi associada à disseminação da TB (SHANDERA *et al.*, 2013).

O alelo -DQB1*02 (presente em 15,2% dos controles) foi associado à proteção contra TBP ($p=0,0281$). As frequências dos alelos -DQB1* encontram-se detalhadas na figura 8 e os valores do teste de (χ^2), Razão de Probabilidade (OR-Odds Ratio) e Intervalo de Confiança (IC95%) são demonstrados na Tabela 2.

Figura 8: Frequência dos alelos -DQB1* em pacientes (TBP e TBExP) e controles



Legenda: *** ($p=0,0005$) demonstrando que -DQB1*0302 associa-se a risco para TBP.
 ** ($p=0,0281$) indicando que DQB1*02 está associado à proteção contra tuberculose.
 Asterisco vermelho corresponde a risco; e verde corresponde à proteção.

Esses resultados sugerem que indivíduos, ao expressarem *HLA-DRB1*04* e *DQB1*0302*, provavelmente não realizem uma boa apresentação dos antígenos de *M. tuberculosis* aos linfócitos Th, tornando-os mais suscetíveis à doença na forma pulmonar (TBP).

Na análise de haplótipos, DRB1*04~DQB1*03 foi o mais frequente nos três grupos, dos quais TBP= 24,20%, TBExP= 13,41% e controles= 13,96%. Não houve, porém, diferença significativa na distribuição dos haplótipos na comparação entre os grupos.

Figura 9: Frequência dos haplótipos em pacientes (TBP e TBExP) e controles

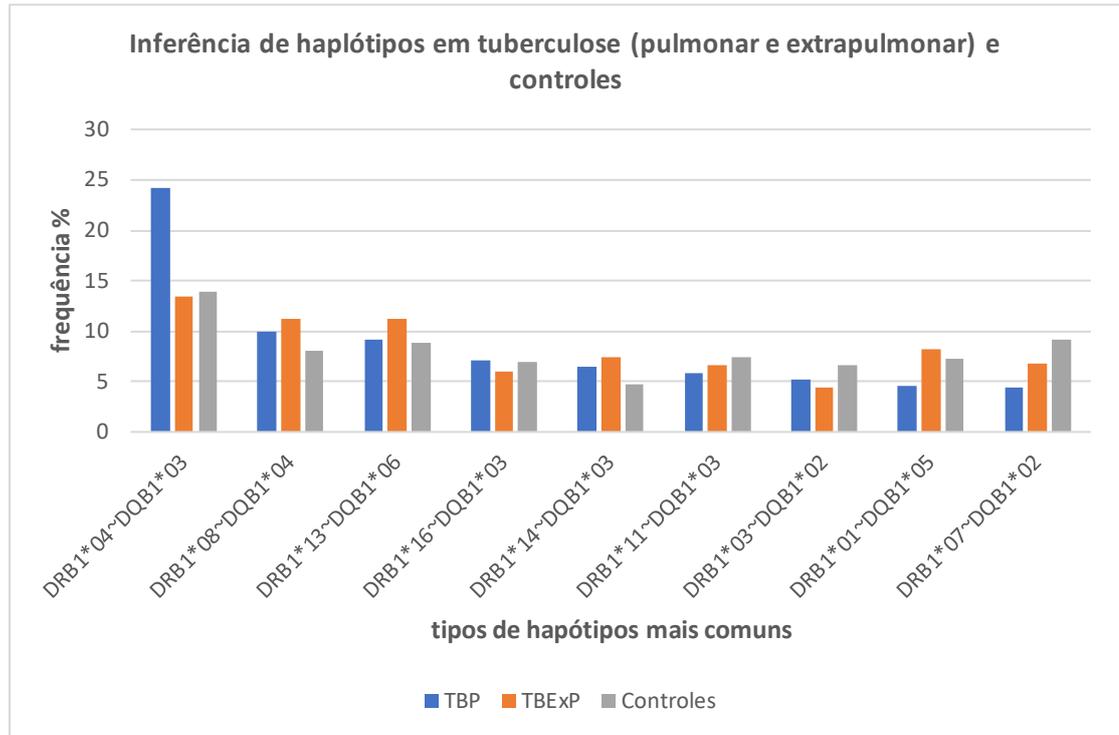


Tabela 5: Alelos de HLA-DRB1* e comparação entre grupos para determinar associação (risco ou proteção) com a TB

HLA-DRB1	TB pulmonar	TBP X Controles			TBExP	TBExP X Controles			Controles	TBP X TBExP		
		Alelos	n= 195 (%)	Valor de p		OR	IC 95%	n= 67 (%)		Valor de p	OR	IC 95%
DRB1*01	18 (4,6)	0,115	0,606	0,336 a 1,066	11 (8,2)	0,893	1,120	0,556 a 2,180	38 (7,4)	0,177	0,541	0,255 a 1,228
DRB1*0301	20 (5,1)	0,499	0,788	0,452 a 1,396	6 (4,5)	0,523	0,683	0,299 a 1,646	33 (6,4)	0,945	1,153	0,450 a 2,801
DRB1*0302	1 (0,3)	0,397	0,328	0,027 a 1,978	2 (1,5)	0,609	1,932	0,364 a 8,352	4 (0,8)	0,162	0,170	0,0117a 1,475
DRB1*04	93 (23,8)	0,0005	1,833	1,305 a 2,556	17 (12,7)	0,672	0,851	0,472 a 1,475	79 (14,6)	0,0090	2,155	1,257 a 3,847
DRB1*07	18 (4,6)	0,0014	0,404	0,234 a 0,686	10 (7,5)	0,342	0,673	0,329 a 1,340	55 (10,7)	0,298	0,600	0,274 a 1,288
DRB1*08	41 (10,5)	0,708	1,115	0,721 a 1,743	14 (10,4)	0,877	1,107	0,609 a 2,079	49 (9,5)	>0,9999	1,007	0,539 a 1,870
DRB1*09	10 (2,6)	0,540	0,725	0,347 a 1,542	5 (3,7)	0,799	1,068	0,427 a 2,812	18 (3,5)	0,548	0,679	0,251 a 1,813
DRB1*10	11 (2,8)	0,118	2,457	0,915 a 6,534	3 (2,2)	0,402	1,939	0,525 a 7,617	6 (1,2)	>0,9999	1,267	0,386 a 4,304
DRB1*11	29 (7,4)	0,276	0,746	0,462 a 1,211	10 (7,5)	0,523	0,748	0,367 a 1,510	50 (9,7)	>0,9999	0,996	0,492 a 2,031
DRB1*12	3 (0,8)	0,739	0,656	0,179 a 2,784	0 (0,0)	0,354	0,000	0,000 a 2,705	6 (1,2)	0,574	+infinity	0,298 a infinity

DRB1*13	48 (12,3)	0,645	1,125	0,754 a 1,698	18 (13,4)	0,546	1,244	0,698 a 2,197	57 (11,1)	0,851	0,905	0,514 a 1,650
DRB1*14	29 (7,4)	0,642	1,171	0,707 a 1,980	12 (9,0)	0,402	1,434	0,745 a 2,788	33 (6,4)	0,705	0,817	0,405 a 1,597
DRB1*15	17 (4,4)	0,101	0,588	0,332 a 1,057	5 (3,7)	0,210	0,500	0,209 a 1,208	37 (7,2)	>0,9999	1,176	0,436 a 2,960
DRB1*16	32 (8,2)	0,661	1,152	0,709 a 1,863	11 (8,2)	0,460	1,395	0,691 a 2,721	37 (7,2)	>0,9999	1,000	0,494 a 2,061
Blank/ homozigotos	20 (5,1)	0,1729	1,682	0,883 a 3,388	10 (7,5)	0,0415	2,510	1,145 a 5,768	16 (3,1)	0,431	0,670	0,318 a 1,411
Total	390 (100%)	-----	-----	-----	134 (100%)	-----	-----	-----	514 (100%)			

Legenda: O teste aplicado para esta análise foi o (χ^2) (Qui-quadrado) com correção de Yates ou teste exato de Fisher, dependendo da natureza dos dados. O valor adotado como significativo foi p valor igual ou inferior 0,05 (5%). Valores de p em vermelho indicam associação com risco para TB; e p em verde, proteção para TB.

Informações adicionais:

Os genes de HLA são codominantes; cada indivíduo expressará dois alelos diferentes para cada tipo de HLA, por isso o total de alelos é o dobro do número de pacientes e controles.

Tabela 6: Alelos HLA-DQB1* e comparação entre grupos para determinar associação (risco ou proteção) com a TB

HLA-DQB1*	TB pulmonar	TBP X Controles			TBExP	TBExP X Controles			Controles	TBP X TBExP		
		Valor de p	OR	IC 95%		Valor de p	OR	IC 95%		Valor de p	OR	IC 95%
Alelos	n=195 (%)				n= 67 (%)				n= 257 (%)			
DQB1*02	39 (10,0)	0,0281	0,621	0,408 a 0,942	15 (11,2)	0,302	0,705	0,389 a 1,264	78 (15,2)	0,8200	0,882	0,477 a 1,701
DQB1*0301	82 (21,0)	0,901	0,967	0,705 a 1,331	29 (21,6)	>0,9999	1,003	0,636 a 1,595	111 (21,6)	0,978	0,964	0,599 a 1,564
DQB1*0302	86 (22,1)	0,0005	1,887	1,330 a 2,661	16 (11,9)	0,8473	0,905	0,514 a 1,618	67 (13,0)	0,0150	2,086	1,188 a 3,624
DQB1*0303	15 (3,8)	0,661	0,817	0,435 a 1,569	6 (4,5)	>0,9999	0,957	0,404 a 2,315	24 (4,7)	0,947	0,853	0,326 a 2,172
DQB1*04	41 (10,5)	0,635	1,141	0,735 a 1,746	18 (13,4)	0,217	1,506	0,830 a 2,637	48 (9,3)	0,445	0,757	0,418 a 1,408
DQB1*05	47 (12,1)	0,663	1,121	0,745 a 1,703	20 (14,9)	0,254	1,435	0,842 a 2,470	56 (10,9)	0,478	0,7810	0,4541 a 1,354
DQB1*06	57 (14,6)	0,169	0,765	0,530 a 1,096	20 (14,9)	0,434	0,784	0,457 a 1,311	94 (18,3)	0,957	0,976	0,565 a 1,659
Blank/homozigotos	23 (5,9)	0,595	0,832	0,488 a 1,445	10 (7,5)	0,996	1,071	0,527 a 2,177	36 (7,0)	0,662	0,777	0,360 a 1,599
Total	390 (100%)	-----	-----	-----	134 (100%)	-----	-----	-----	514 (100)	-----	-----	-----

Legenda: O teste aplicado para esta análise foi o (χ^2) (Qui-quadrado) com correção de Yates ou teste exato de Fisher, dependendo da natureza dos dados. O valor adotado como significativo foi p valor igual ou inferior 0,05 (5%). Valores de p em vermelho indicam associação com risco para TB; p em verde, proteção para TB

Informações adicionais:

Os genes de HLA são codominantes; cada indivíduo expressará dois alelos diferentes para cada tipo de HLA, por isso o total de alelos é o dobro do número de pacientes e controles.

7. Conclusões

- Sexo masculino prevaleceu nos casos de TB e controles, sem valor de p significativo.
- A TBP foi frequente em indivíduos com média de idade de 40,45 anos.
- Vacina BCG não impediu a forma pulmonar da TB. Porém teve significado estatístico na comparação entre as formas extrapulmonares de TB e controles.
- Tabagismo e consumo de álcool mostraram associação com TBP, mas não com a TBExP.
- Nas análises de -DRB1*, dezesseis alelos foram identificados, sendo dois associados com TBP, e nenhum com TBExP.
- O alelo -DRB1*04 foi o prevalente na população amazônica avaliada, considerando os grupos TBP, TBExP e controles.
- O alelo -DRB1*04 foi associado ao risco de TBP, mas não de TBExP.
- Dez alelos de -DRB1* foram associados ao risco para TBP na comparação com TBExP.
- O alelo -DRB1*07 foi associado com proteção à TBP.
- *Blank*/Homozigoto -DRB1* favoreceu o desenvolvimento da doença para TB extrapulmonar quando comparado com os controles, mas não na comparação entre TB pulmonar e controles, nem entre TB pulmonar e extrapulmonar.
- Nas análises de DQB1*, sete alelos foram identificados.
- O alelo -DQB1*0302 foi associado com risco para TBP tanto na comparação com os controles, quanto na comparação com TBExP.
- O alelo -DQB1*02 foi associado com proteção contra TBP.
- O haplótipo DRB1*04~DQB1*03 foi o mais frequente nos três grupos.

8. Considerações finais

O estudo mostrou a distribuição dos subtipos dos genes de HLA classe II, -DRB1* e -DQB1* na TB (pulmonar e extrapulmonar) em população brasileira habitante da Região Amazônica.

Revelou também a presença de associações de alelos do gene de HLA classe II determinantes de risco ou de proteção contra TBP e TBExp. A partir dos subtipos de HLA tipificados nessa população, discutiu-se a influência do fator imunogenético na evolução de formas clínicas da doença, em função do papel das moléculas -DRB1* e -DQB1* na apresentação de antígenos e na interação entre resposta imune inata e adaptativa.

Ao analisar os subtipos dos alelos dos genes de HLA classe II mais frequentes na população amazônica, procurou-se correlacionar o alto coeficiente de incidência da TB no Amazonas a outras regiões do mundo (África, Ásia e Américas) que possuem elevado número de casos. Essa correlação partiu do pressuposto da origem comum dessas populações e da miscigenação do HLA, favorecida pelas rotas migratórias e essencial para o “hiperpolimorfismo” gênico, determinante na variabilidade da apresentação de antígenos e da resposta imune.

Estudos populacionais de HLA como este são necessários para compreender a distribuição e a variabilidade de subtipos de HLA em diferentes populações e quanto esses alelos e haplótipos influenciam no contexto de doenças infecciosas, autoimunes e neoplásicas.

Sobretudo em doenças infecciosas, que constituem problema de saúde pública mundial, como é o caso da TB, estudos desse escopo revelam as populações que necessitam de estratégias e intervenções diferenciadas, incluindo vacinas mais efetivas frente aos alelos de HLA com menor capacidade de apresentação de antígenos e com resposta imune menos eficiente.

9. Equipe de Pesquisa

Nome	Instituição	Função
Alena Mileo Monteiro Diniz	PPGIBA/UFAM	Doutoranda, executora do projeto
Aya Sadahiro	PPGIBA/UFAM	Orientadora
Mariana Brasil de Andrade Figueira (Doutoranda)	PPGIBA/UFAM	Colaboradora nas análises dos dados
Mauricio Morishi Ogusku	Laboratório de Micobacteriologia (INPA)	Assessoria nos exames de diagnóstico bacteriológico
Josué Lacerda	PPGIBA/UFAM	Colaborador nas análises estatísticas de inferência de haplótipos

10. Colaborações para esta pesquisa

Para a execução do projeto foram realizadas as seguintes colaborações:

a) Policlínica em Pneumologia Cardoso Fontes, da Secretaria de Saúde do Estado do Amazonas – SUSAM, auxílio das médicas Joycenéa da Silva Matsuda e Irineide Assumpção Antunes; e da farmacêutica-bioquímica, Maria do Perpétuo Socorro Borges Carriço Ferreira.

b) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), colaboração do pesquisador Mauricio Morishi Ogusku, Laboratório de Micobacteriologia, realizados baciloscopia, cultivo e moleculares para identificação das micobactérias.

c) Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM, com a colaboração da farmacêutica-bioquímica Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago, responsável técnica do Laboratório de HLA.

d) Universidade de São Paulo – USP, com a colaboração da professora e pesquisadora Alessandra Pontillo, responsável pelo Laboratório de Imunogenética.

Referências bibliográficas

ABBAS A.K., LICHTMAN A.M., PILLAI S. **Imunologia celular e molecular**. 8.^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

AMARAL E.P., LASUNSKAIA E.B., D'IMPERIO-LIMA M.R. Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. **Microbes and Infection**. 18. p.11-20. 2016. doi:10.1016/j.micinf.2015.09.005.

BANCHEREAU J., STEINMAN R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**. 1998, Mar 19;392(6673):245-52. doi: 10.1038/32588.

BARBERIS I., BRAGAZZI N.L., GALLUZZO L., MARTINI M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. **J Prev Med Hyg**. 2017 Mar;58(1): E9-E12.

BARKER D.J., MACCARI G., GEORGIU X., COOPER M.A., FLICEK P., ROBINSON J., MARSH S.G.E. **The IPD-IMGT/HLA Database**. Nucleic Acids Res. 2023 Jan 6;51(D1): D1053-D1060. doi: 10.1093/nar/gkac1011

BARRETT J.C. *et al.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**. 21: 263-265, 2005.

BEHAR S.M. *et al.* Orchestration of pulmonary T cell immunity during Mycobacterium tuberculosis infection: Immunity interruptus. **Seminars in Immunology**, Volume 26, Issue 6, Pages 559-577, December 2014. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.003

BELLAMY R. Genetics and pulmonary medicine bullet 3: Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations. **Thorax**, v. 53, n. 7, p. 588-593, 1998.

BERTOLLI FILHO C. **História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950**. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 248p, 2001.

BOMBARDA S., FIGUEIREDO C.M., FUNARI M.B.D.G., SOARES JÚNIOR J, SEISCENTO M., TERRA FILHO M. Imagem em tuberculose pulmonar. J. Pneumologia [internet]. 2001 nov; 27 (6): 329-40. Extraído de doi: 10.1590/S0102-35862001000600007

BOOM W.H., CANADAY D.H., FULTON S.A., GEHRING A.J., ROJAS R.E., TORRES M. Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis (Edinb)**. 2003;83(1-3):98-106. doi: 10.1016/s1472-9792(02)00054-9.

BORNMAN L. *et al.* Vitamin D Receptor Polymorphisms and Susceptibility to Tuberculosis in West Africa: A Case-Control and Family Study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 9, p. 1631-1641, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. Brasília: Ministério da Saúde, v.1, p.434. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Panorama da tuberculose no Brasil: indicadores epidemiológicos e operacionais**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, ISBN 978-85-334-2177-6. v.1, p.11,19. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 364 p.: il. ISBN 978-85-334-2696-2. 2018.

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**. SSN 2358-9450. Volume 49. n.º 11. Mar. 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 [recurso eletrônico]** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, ISBN 978-85-334-2620-7. P.125. 2018b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico Especial. Boletim Epidemiológico de Tuberculose**. 1.^a edição, 2019 e 2020. Brasília: Ministério da Saúde, 2019/2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Taxa de Incidência de Tuberculose (1990-2019) Série Histórica**. Brasília: Ministério da Saúde, p. 1-7. maio, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose e Micobactérias não Tuberculosas de Interesse em Saúde Pública no Brasil**.– Brasília: Ministério da Saúde, 2022a. 492 p.: il. ISBN 978-65-5993-146-0

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Boletim epidemiológico**. Número Especial, mar. 2022b. ISSN: 9352-7864

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. Número Especial, mar. 2023. ISSN: ISSN 9352–7864

CAMPELO DOS SANTOS A.L., OWINGS A., SULLASI H.S.L., GOKCUMEN O., DEGIORGIO M., LINDO J. Genomic evidence for ancient human migration routes along South America's Atlantic coast. **Proc. R. Soc. B**. 2022. 289: 20221078. doi:10.1098/rspb.2022.1078

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2019). Tuberculosis (TB). Extraído de: <https://www.cdc.gov/tb/programs/rvct/rvct-form.pdf>). Acessado em: 15 de maio de 2021.

CHAI Q. *et al.* New insights into the evasion of host innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*. Review article. **Cellular & Molecular Immunology**. (17): p. 901–913, 2020. doi: 10.1038/s41423-020-0502-z.

CHAIMOWICZ F. Age transition of tuberculosis incidence and mortality in Brazil. **Rev Saúde Pública**. 35(1):81-7. 2001.

CHAN J. *et al.* The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Seminars in Immunology**. 26. p. 588–600. 2014. doi:10.1016/j.smim.2014.10.005

CHEN B.F., WANG R., CHEN Y.J., ZHU Y., DING L., WEN Y.F. Association between HLA-DRB1 alleles and tuberculosis: a meta-analysis. **Genet Mol Res**. 2015 Dec 3;14(4):15859-68. doi: 10.4238/2015.December.1.37. PMID: 26634553.

DELGADO JC, *et al.* Aspartic Acid Homozygosity a Codon 57 of HLA-DQ β is associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. **Journal of Immunol**, v. 176, n. 2, p. 1090-1097, 2006.

DENDROU C.A., PETERSEN J., ROSSJOHN J., FUGGER L. HLA variation and disease. **Nat Rev Immunol**. 2018 May;18(5):325-339. doi: 10.1038/nri.2017.143. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29292391.

DUARTE R. *et al.* HLA class II alleles as markers of tuberculosis susceptibility and resistance. **Rev Port Pneumol**, v. 17, n. 1, p. 15-9, 2011.

DUBANIEWICZ A. *et al.* Molecular subtypes of the HLA-DR antigens in pulmonary tuberculosis. **Int J Infect Dis**, v. 4, n. 3, p. 129-33, 2000.

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

FISKE C.T., HAMILTON C.D., STOUT J.E. Alcohol use and clinical manifestations of tuberculosis. **J Infect**. 2009 May;58(5):395-401. doi: 10.1016/j.jinf.2009.02.015. PMID: 19418621; PMCID: PMC3821978.

FLYNN J.L., CHAN J. Immunology of tuberculosis. **Annu Rev Immunol**. 2001; 19:93-129. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.93.

FRIEDMAN L.N., SULLIVAN G.M., BEVILAQUA R.P., LOSCOS R. Triagem de Tuberculose em Alcoólatras e Viciados em Drogas. **Am Rev Respir Dis** (1987) 136 (5):1188–92. doi: 10.1164/ajrccm/136.5.1188

GOLDFELD A.E., *et al.* Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. **JAMA**, v. 279, n. 3, p. 226-8, 1998.

GOLDFELD A.E. Genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. **Tuberculosis**, v. 84, n. 1-2, p. 76-81, 2004.

GOLDRATH A.W., BEVAN M.J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. **Nature**. 1999 Nov 18;402(6759):255-62. doi: 10.1038/46218.

GONÇALVES H. Tuberculosis throughout the times. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, vol. VII (2): 303-325, July-oct. 2000.

GOUDOURIS E., ARANDA C.S., SOLÉ D. Implications of the non-specific effect induced by Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccine on vaccine recommendations. **J Pediatr** (Rio J). 2023 Mar-Apr;99 Suppl 1(Suppl 1):S22-S27. doi: 10.1016/j.jpmed.2022.09.002. Epub 2022 Oct 26. PMID: 36309066; PMCID: PMC10066422.

GRADMANN C. Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin. **Med Hist**. 2001 Jan;45(1):1-32. doi: 10.1017/s0025727300000028.

GRIFONI A., SIDNEY J., CARPENTER C., PHILLIPS E., MALLAL S., SCRIBA T.J., SETTE A., LINDESTAM ARLEHAMN C.S. Sequence-based HLA-A, B, C, DP, DQ, and DR typing of 159 individuals from the Worcester region of the Western Cape province of South Africa. **Hum Immunol**. 2018 Mar;79(3):143-144. doi: 10.1016/j.humimm.2018.01.004. PMID: 29398200.

GRUEN J.R., WEISSMAN S.M. Human MHC class III and IV genes and disease associations. **Front Biosci**. 2001 Aug 1;6: D960-72. doi: 10.2741/gruen.

GUERREIRO R., SANTOS-COSTA Q., AZEVEDO-PEREIRA J.M. As Quimiocinas e os seus Receptores. Características e Funções Fisiológicas. Artigo de Revisão. **Acta Med Port**. 24 (S4) 967-976, 2011. Extraído de: www.actamedicaportuguesa.com

GUILLIAMS M., DE KLEER I., HENRI S., POST S., VANHOUTTE L., DE PRIJCK S., et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. **J Exp Med**. 2013 Sep 23;210(10):1977-92. doi: 10.1084/jem.20131199.

GUPTA A., KAUL A., TSOLAKI A.G., KISHORE U., BHAKTA S. *Mycobacterium tuberculosis*: immune evasion, latency, and reactivation. **Immunobiology**. 2012 Mar;217(3):363-74. doi: 10.1016/j.imbio.2011.07.008.

GUSTINCICH S. *et al*. Fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. **Biotechniques**, (11), p. 298-300, 1991.

HANG N.T. *et al*. Analysis of factors lowering sensitivity of interferon- γ release assay for tuberculosis. **PLoS One**. 6(8): e23806. 2011.

HILL A.V. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 2, p. 373-400, 2001.

HILL A.V. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 40, p. 469-86, 2006.

HORTON R., WILMING L., RAND V., LOVERING R.C., BRUFORD E.A., KHODIYAR V.K., LUSH M.J., POVEY S., TALBOT C.C. JR, WRIGHT M.W., WAIN H.M.,

TROWSDALE J., ZIEGLER A., BECK S. Gene map of the extended human MHC. **Nat Rev Genet.** 2004 Dec;5(12):889-99. doi: 10.1038/nrg1489.

HORTON K.C. *et al.* Sex Differences in Tuberculosis Burden and Notifications in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Metanalysis. **PLOS Medicine**, p. 1-23. Sep 6, 2016. doi: 10.1371/journal.pmed.1002119.

HUANG L., NAZAROVA E.V., RUSSELL D.G. *Mycobacterium tuberculosis*: Bacterial Fitness within the Host Macrophage. **Microbiol Spectr.** 2019 Mar;7(2): 10.1128/microbiolspec.BAI-0001-2019. doi: 10.1128/microbiolspec.BAI-0001-2019.

IMAGENS da Peste Branca: Memória da Tuberculose. **Centro Cultural do Ministério da Saúde, CCMS.** Mostra Virtual, Rio de Janeiro, 2016. Extraído de: <http://www.ccs.saude.gov.br/peste-branca/tb-historia.php>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

ISAJEVS S., TAIVANS I., STRAZDA G., KOPEIKA U., BUKOVSKIS M., GORDJUSINA V., KRATOVSKA A. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD. **Eur Respir J.** 2009 Jan;33(1):61-7. doi: 10.1183/09031936.00145307. Epub 2008 Aug 6. PMID: 18684844.

JENSEN J.S., FAN X., GUIDOT D.M. Alcohol Causes Alveolar Epithelial Oxidative Stress by Inhibiting the Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway. **Am J Respir Cell Mol Biol** (2013) 48(4):511–7. doi: 10.1165/rcmb.2012-0334OC

JENSEN P.E. Recent advances in antigen processing and presentation. **Nat Immunol.** 2007 Oct;8(10):1041-8. doi: 10.1038/ni1516.

JUNG A.R. SHIN, YOON SOO CHANG, HYUNG JUNG KIM, CHUL MIN AHN, MIN KWANG BYUN. Diagnostic utility of interferon-gamma release assay in extrapulmonary tuberculosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** Volume 82, Issue 1, pages 44-48, May 2015. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.02.002

KADHIM H., NADA K. Human leukocyte antigen-genotyping according to sex in extrapulmonary tuberculosis patients in Iraq. **Rev Med Microbiol.** Volume 32, Issue 2, p. 124-127, Apr 2021. doi:10.1097/MRM.0000000000000240

KENNEDY A.E., OZBEK U., DORAK M.T. What has GWAS done for HLA and disease associations? **Int J Immunogenet.** 2017 Oct;44(5):195-211. doi: 10.1111/iji.12332.

KIM H.S. *et al.* Association of HLA-DR and HLA-DQ genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Koreans: preliminary evidence of associations with drug resistance, disease severity, and disease recurrence. **Hum Immunol**, v. 66, n. 10, p. 1074-81, 2005.

KISIELOW P. How does the immune system learn to distinguish between good and evil? The first definitive studies of T cell central tolerance and positive selection. **Immunogenetics.** 2019 Sep;71(8-9):513-518. doi: 10.1007/s00251-019-01127-8.

KLEIN J., SATO A. The HLA system. First of two parts. **N Engl J Med.** 2000a Sep 7;343(10):702-9. doi: 10.1056/NEJM200009073431006. PMID: 10974135.

KLEIN J., SATO A. The HLA system. Second of two parts. **N Engl J Med.** 2000b Sep 14;343(11):782-6. doi: 10.1056/NEJM200009143431106. Erratum in: **N Engl J Med** 2000 Nov 16;343(20):1504.

KONDO K., OHIGASHI I., TAKAHAMA Y. Thymus machinery for T-cell selection. **Int Immunol.** 2019 Mar 5;31(3):119-125. doi: 10.1093/intimm/dxy081.

KOHLI M. *et al.* Xpert MTB/RIF Ultra and Xpert MTB/RIF assays for extrapulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. **Cochrane Library**, 2021. doi: 10.1002/14651858.CD012768.pub3

KURANOV A.B., KOZHAMKULOV U.A., VAVILOV M.N., BELOVA E.S., BISMILDA V.L., ALENOVA A.H., ISMAILOV S.S., MOMYNALIEV K.T. HLA-class II alleles in patients with drug-resistant pulmonary tuberculosis in Kazakhstan. **Tissue Antigens.** 2014 Feb;83(2):106-12. doi: 10.1111/tan.12279. Epub 2014 Jan 7. PMID: 24397488.

LA GRUTA N.L., GRAS S., DALEY S.R., THOMAS P.G., ROSSJOHN J. Understanding the drivers of MHC restriction of T cell receptors. **Nat Rev Immunol.** 2018 Jul;18(7):467-478. doi: 10.1038/s41577-018-0007-5.

LEÃO S.C.; MARTIN A.; MEJIA M G.I.; PALOMINO J.C.; ROBLEDO J.; TELLES M.A.S.; PORTAELS F. 2004. *Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria.* Brussels: European Commission International Co-operation (INCO) for Developing countries (DEV) concerted Action (CA), 165p.

LE BOE F (SYLVIUS). Opera medica, 1679. In MORTON, L.T.: **A medical bibliography (Garrison and Morton).** London, Butler & Tammer Ltd., p. 300, 1983.

LIANG Y., HARRIS F.L., BROWN L.A. Alcohol Induced Mitochondrial Oxidative Stress and Alveolar Macrophage Dysfunction. **BioMed Res Int** (2014) 2014:371593. doi: 10.1155/2014/371593

LIANG Y., YELIGAR S.M., BROWN L.A. Chronic-Alcohol-Abuse-Induced Oxidative Stress in the Development of Acute Respiratory Distress Syndrome. **Scientific World Journal** (2012) 2012:740308. doi: 10.1100/2012/740308

LINDA A.L., LEIGH A.S., PETER W.N., ANDREW M.L., JODIE S.B., LEISEL C.M. *et al.* HLA-A, B, DRB1, DQA1, DQB1 alleles and haplotype frequencies in Dene and Cree cohorts in Manitoba, Canada. **Hum Immunol** (2017) 78:401–11. doi: 10.1016/j.humimm.2017.03.009

LOBUE P.A., ENARSON D.A., THOEN T.C. Tuberculosis in humans and its epidemiology, diagnosis, and treatment in the United States. **Int J Tuberc Lung Dis.** (10):1226-32, 2010.

LOMBARD Z., *et al.* Association of HLA-DR, -DQ, and vitamin D receptor alleles and haplotypes with tuberculosis in the Venda of South Africa. **Hum Immunol**, v. 67, n. 8, p. 643-54, 2006.

LU Z, VAN EECKHOUTTE H.P., LIU G., et al. Necroptosis Signaling Promotes Inflammation, Airway Remodeling, and Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Am J Respir Crit Care Med**. 2021 Sep 15;204(6):667-681. doi: 10.1164/rccm.202009-3442OC. PMID: 34133911.

MAGIRA E.E. *et al.* HLA-A and HLA-DRB1 amino acid polymorphisms are associated with susceptibility and protection to pulmonary tuberculosis in a greek population. **Hum Immunol**, v. 73, n. 6, p. 641-646, 2012.

MARSH S.G., ALBERT E.D., BODMER W.F. et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. **Tissue Antigens**. 2010 Apr;75(4):291-455. doi: 10.1111/j.1399-0039.2010.01466. x.

MAYER-BARBER K.D., BARBER D.L. Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to Mycobacterium tuberculosis Infection. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2015 Jul 17;5(12): a018424. doi: 10.1101/cshperspect. a018424.

MAYER-BARBER K.D., ANDRADE B.B., BARBER D.L., et al. Innate and adaptive interferons suppress IL-1 α and IL-1 β production by distinct pulmonary myeloid subsets during Mycobacterium tuberculosis infection. **Immunity**. 2011 Dec 23;35(6):1023-34. doi: 10.1016/j.immuni.2011.12.002.

MÉNDEZ-SAMPERIO P. Antigen presentation of mycobacterial peptides to human T cell clones can be immunomodulated by adding an MHC-specific inhibitor. **Cell Immunol**. 1993 Apr 15;148(1):1-9. doi: 10.1006/cimm.1993.1086.

MCDEVITT H.O. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. **Annu Rev Immunol**. 2000; 18:1-17. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.1.

MURPHY J., SUMMER R., WILSON A.A., KOTTON D.N., FINE A. The prolonged lifespan of alveolar macrophages. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 2008 Apr;38(4):380-5. doi: 10.1165/rcmb.2007-0224RC.

MUSTAFA A.S. In silico analysis and experimental validation of Mycobacterium tuberculosis -specific proteins and peptides of Mycobacterium tuberculosis for immunological diagnosis and vaccine development. **Med Princ Pract**. 2013;22 Suppl 1(Suppl 1):43-51. doi: 10.1159/000354206.

NEEFJES J., JONGSMA M.L., PAUL P., BAKKE O. Towards a system understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nat Rev Immunol**. 2011 Nov 11;11(12):823-36. doi: 10.1038/nri3084.

NOSS E.H., HARDING C.V., BOOM W.H. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits MHC class II antigen processing in murine bone marrow macrophages. **Cell Immunol** 2000; 201: 63–74. doi: 10.1006/cimm.2000.1633

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Global Tuberculosis Report**, 2020.

OMS. Progresso Global no combate à tuberculose está em risco, afirma OMS. OPAS/OMS Brasil. Brasília (DF), 14 out. 2020. Banco de Notícias. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6307:pr

ogrosso-global-no-combate-a-tuberculose-esta-em-risco-afirma-oms&Itemid=812.
Acesso em: 02 maio 2021.

ORTEGA P.A. *et al.* Selection of a Single Domain Antibody, Specific for an HLA-Bound Epitope of the Mycobacterial Ag85B Antigen. **Front. Immunol.** v.11, p. 577-815, Oct 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.577815.

PISHESHA N., HARMAND T.J., PLOEGH H.L. A guide to antigen processing and presentation. **Nat Rev Immunol.** 2022 Dec;22(12):751-764. doi: 10.1038/s41577-022-00707-2.

QUAN D.H., KWONG A.J., HANSBRO P.M., BRITTON W.J. No smoke without fire: the impact of cigarette smoking on the immune control of tuberculosis. **Eur Respir Rev.** 2022 Jun 7;31(164):210252. doi: 10.1183/16000617.0252-2021. PMID: 35675921; PMCID: PMC9488690.

QUEM G. *Relatório Global de Tuberculose 2020.* (2020)

RAJA A. Immunology of tuberculosis. Review Article. **Indian J Med Res**, 120, p.213-232, Oct 2004.

REITH W., LEIBUNDGUT-LANDMANN S., WALDBURGER J.M. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. **Nat Rev Immunol.** 2005 Oct;5(10):793-806. doi: 10.1038/nri1708.

ROBINSON J., BARKER D.J., GEORGIU X., COOPER M.A., FLICEK P., MARSH S.G.E. IPD-IMGT/HLA. **Database Nucleic Acids Research.** (2020) 48 (D1): D948-D955. <https://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>

RODRIGUES S.; FILHO T. Tuberculose. *In*: TAVARES W, MARINHO LAC **Rotinas de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias** – 2.^a ed. p. 977-993, São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

RUAN S.Y., *et al.* Revisiting tuberculous pleurisy: pleural fluid characteristics and diagnostic yield of mycobacterial culture in an endemic area. **Thorax.** 67(9):822-7, 2012. doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-201363.

RUSH B. An Inquiry into the Effects of Ardent Spirits Upon the Human Body and Mind: With an Account of the Means of Preventing, and of the Remedies for Curing Them. 4th ed. Philadelphia: Printed for Thomas Dobson. Archibald Bartram (1805).

RUGGIERO G., *et al.* Allelic distribution of human leucocyte antigen in historical and recently diagnosed tuberculosis patients in Southern Italy. **Immunology**, v. 111, n. 3, p. 318-322, 2004.

SALLAKCI N., *et al.* Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. **Tuberculosis**, v. 87, n. 3, p. 225-30, 2007.

SALEM J.I.; MARÓJA M.F.; CARVALHO F.F. *et al.* Valor relativo do exame direto, após concentração e por cultivo de escarro no diagnóstico bacteriológico da Tuberculose pulmonar no Amazonas. **Jornal de Pneumologia**, v. 16, p. 133-6, 1990.

SALEM J.I.; CARVALHO C.M.; OGUSKU M.M.; MAIA R.; RUFFINO-NETTO A. PKO – Alternative method for isolating mycobacteria from sputum. **Acta Amazonica**, v. 37, p. 419-24, 2007.

SELVARAJ P. *et al.* Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. **Cytokine**, v. 43, n. 1, p. 26-33, 2008.

SELVARAJ P., NISHA RAJESWARI D., JAWAHAR M.S., NARAYANAN P.R. Influence of HLA-DRB1 alleles on Th1 and Th2 cytokine response to Mycobacterium tuberculosis antigens in pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**. 2007 Nov; 87(6):544-50. doi: 10.1016/j.tube.2007.08.001. Epub 2007 Sep 7. PMID: 17826339.

SEMPLE P.L., BINDER A.B., DAVIDS M., MAREDZA A., VAN ZYL-SMIT R.N., DHEDA K. Regulatory T cells attenuate mycobacterial stasis in alveolar and blood-derived macrophages from patients with tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**. 2013 Jun 1;187(11):1249-58. doi: 10.1164/rccm.201210-1934OC. PMID: 23590266.

SHALER C.R.; HORVATH C.; LAI R.; XING Z. Understanding delayed T-cell priming, lung recruitment, and airway luminal T-cell responses in host defense against pulmonary tuberculosis. **Clin Dev Immunol**. 2012. doi: 10.1155/2012/628293.

SHANDERA, *et al.* An HLA association with disseminated tuberculosis. **J Med Med Res**. Vol.1(1); pp. 7-11, May 2013.

SHIINA T., HOSOMICHI K., INOKO H., KULSKI J.K. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity, and disease. **J Hum Genet**. 2009 Jan;54(1):15-39. doi: 10.1038/jhg.2008.5.

SIBANDZE *et al.* Machine learning reveals that Mycobacterium tuberculosis genotypes and anatomic disease site impacts drug resistance and disease transmission among patients with proven extra-pulmonary tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**. 20:556, 2020. doi: 10.1186/s12879-020-05256-4

SILVA D.R., RABAHI M.F., SANT'ANNA C.C., SILVA-JUNIOR J.L.R., CAPONE D., BOMBARDA S., *et al.* Diagnosis of tuberculosis: a consensus statement from the Brazilian Thoracic Association. **J Bras Pneumol**. 2021;47(2): e20210054

SIMMONS J.D., STEIN C.M., SESHADRI C., *et al.* Immunological mechanisms of human resistance to persistent Mycobacterium tuberculosis infection. **Nat Rev Immunol**. 2018 Sep;18(9):575-589. doi: 10.1038/s41577-018-0025-3.

SINGH M., *et al.* Immunogenetics of mycobacterial infections in the North Indian population. **Tissue Antigens**, v. 69, Suppl 1, p. 228-30, 2007.

SKOGLUND P., REICH D. A genomic view of the peopling of the Americas. *Current Opinion in Genetics & Development*. **ScienceDirect**. 2016, 41:27–35. doi: 10.1016/j.gde.2016.06.016

SOLEIMANPOUR S., YAGHOUBI A., SEDDIGHINIA F.S., REZAEI S.A.R. A century of attempts to develop an effective tuberculosis vaccine: Why they failed? **Int Immunopharmacol**, Volume 109, 2022, 108791, ISSN 1567-5769, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108791>.

SOTO M.E., *et al.* Comparison Distribution of HLA-B Alleles in Mexican Patients with Takayasu Arteritis and Tuberculosis. **Hum Immunol**. Volume 68, Issue 5, pages 449-453, May 2007. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2007.01.004>

SOUZA DE LIMA D., MORISHI OGUSKU M, PORTO DOS SANTOS M., DE MELO SILVA C.M., ALVES DE ALMEIDA V., ASSUMPÇÃO ANTUNES I., BOECHAT A.L., RAMASAWMY R., SADAHIRO A. Alleles of HLA-DRB1*04 Associated with Pulmonary Tuberculosis in Amazon Brazilian Population. **PLoS One**. 2016 Feb 22;11(2): e0147543. doi: 10.1371/journal.pone.0147543. PMID: 26901036; PMCID: PMC4764689.

TAKAHAMA Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. **Nat Rev Immunol**. 2006 Feb;6(2):127-35. doi: 10.1038/nri1781. PMID: 16491137.

TATARA M.B., PERDIGÃO J., VIVEIROS M., *et al.* Genetic Diversity and Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Roraima State, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**. 2019 Oct;101(4):774-779. doi: 10.4269/ajtmh.19-0324. PMID: 31392954; PMCID: PMC6779181.

THORBALL C.W., FELLAY J., BORGHESI A. Immunological lessons from genome-wide association studies of infections. **Curr Opin Immunol**. 2021 Oct; 72:87-93. doi: 10.1016/j.coi.2021.03.017.

THUONG N.T., *et al.* Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 12, p. e1000229, 2008.

TONG X., *et al.* Polymorphisms in HLA-DRB1 Gene and the Risk of Tuberculosis: A Meta-analysis of 31 Studies. **Lung**, v. 193, n. 2, p. 309-18, 2015.

WAGNER M.C., YELIGAR S.M., BROWN L.A., MICHAEL HART C. PPARgamma Ligands Regulate NADPH Oxidase, eNOS, and Barrier Function in the Lung Following Chronic Alcohol Ingestion. **Alcohol Clin Exp Res** (2012) 36(2):197–206. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011. 01599.x

WAMALA D., BUTEME H.K., KIRIMUNDA S. *et al.* Association between human leukocyte antigen class II and pulmonary tuberculosis due to mycobacterium tuberculosis in Uganda. **BMC Infect Dis** 16, 23 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1346-0>

WIGGER G.W., BOUTON T.C., JACOBSON K.R., AULD S.C., YELIGAR S.M., STAITIEH B.S. (2022). The Impact of Alcohol Use Disorder on Tuberculosis: A Review of the Epidemiology and Potential Immunologic Mechanisms. **Front Immunol**, 13, 864817. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.864817>

World Health Organization [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization; c2018 [cited 2021 Feb 1]. WHO policy statement: molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis. Available from: https://www.who.int/tb/laboratory/line_probe_assays/en/

WU F., ZHANG W., ZHANG L., et al. NRAMP1, VDR, HLA-DRB1, and HLA-DQB1 gene polymorphisms in susceptibility to tuberculosis among the Chinese Kazakh population: a case-control study. **Biomed Res Int.** 2013; 2013:484535. doi: 10.1155/2013/484535. Epub 2013 Sep 1. PMID: 24024195; PMCID: PMC3758880.

VAN EMBDEN J.D., et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J Clin Microbiol** 31:406-409, 1993.

VAN KASTEREN S.I., OVERKLEEF H., OVAA H., NEEFJES J. Chemical biology of antigen presentation by MHC molecules. **Curr Opin Immunol.** 2014 Feb; 26:21-31. doi: 10.1016/j.coi.2013.10.005

VIANA W.R.L. **Aplicação de técnicas moleculares para identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e genotipagem da linhagem Beijing em cepas de *M. tuberculosis* isoladas em Manaus – AM.** Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, 35 p., 2022.

VYAS J.M., VAN DER VEEN A.G., PLOEGH H.L. The known unknowns of antigen processing and presentation. **Nat Rev Immunol.** 2008 Aug;8(8):607-18. doi: 10.1038/nri2368.

XU M. et al. Integrative genomics analysis identifies promising SNPs and genes implicated in tuberculosis risk based on multiple omics datasets. **Aging (Albany NY).** 12 (19): 173-220, oct 15, 2020. doi: 10.18632/aging.103744

YANG P.L., HE X.J., ZANG Q.J., LI H.P., WANG G.Y., QIN J. Association of human leukocyte antigen DRB1 polymorphism and tuberculosis: a meta-analysis. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2016 Jan;20(1):121-8. doi: 10.5588/ijtld.14.0930. PMID: 26688538.

YULIWULANDARI R., et al. Association of HLA-A, -B, and -DRB1 with pulmonary tuberculosis in Western Javanese Indonesia. **Hum Immunol**, v. 71, n. 7, p. 697- 701, 2010.

ZINKERNAGEL R.M.; DOHERTY P.C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. **Nature**, v. 248, n. 450, p. 701-2, 1974.