



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

AVALIAÇÃO DE VARIANTES DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNV) EM GENES DO
SISTEMA HLA EM PACIENTES COM TUBERCULOSE

MARIANA BRASIL DE ANDRADE FIGUEIRA

MANAUS

2023



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

MARIANA BRASIL DE ANDRADE FIGUEIRA

AVALIAÇÃO DE VARIANTES DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNV) EM GENES DO
SISTEMA HLA EM PACIENTES COM TUBERCULOSE

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: Prof^a Dr^a Aya Sadahiro

Coorientador: Prof Dr^a Alessandra Pontillo

Prof Dr. Maurício Morishi Ogusku

MANAUS

2023

Ficha Catalográfica

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

F475a Figueira, Mariana Brasil de Andrade
Avaliação de variantes de nucleotídeo único (SNV) em genes do sistema HLA em pacientes com tuberculose / Mariana Brasil de Andrade Figueira . 2023
152 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Aya Sadahiro
Coorientador: Alessandra Pontillo
Coorientador: Maurício Morishi Ogusku
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Tuberculose. 2. Tuberculose pulmonar. 3. Tuberculose extrapulmonar. 4. SNV - Single-Nucleotide Variants. 5. HLA - Antígeno Leucocitário Humano. I. Sadahiro, Aya. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Dedico este trabalho à minha família, especialmente
aos meus amados pais Francisco Otávio e Inês Maria,
ao meu esposo Thamerson e ao meu filho João Miguel!
Vocês são meu alicerce diário! Obrigada por tudo!*

Amo vocês!

*À minha querida amiga e mãe-científica, Prof^a Dr^a Aya Sadahiro,
que me apresentou com outros olhos o mundo da pesquisa
e é uma pessoa de excelência para mim!*

Gratidão sempre!

Em memória do meu amado irmão, **Aluízio Brasil**, no qual sua trajetória aqui na terra foi marcada pela sua bondade inigualável e sempre acreditou na minha competência profissional e à minha avó materna, **Maria Lima Brasil**, uma mulher temente a Deus que nunca esquecia de rezar por mim! Saudades eternas!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por tudo que Ele tem feito e proporcionado em minha vida!

Aos meus amados pais, **Francisco Otávio Figueira** e **Inês Maria Brasil**, e irmãos **Aluizio Brasil** (*in memoriam*) e **Otávio Brasil** pelo amor incondicional e por me ajudaram nos momentos que mais precisei. Vocês sempre estiveram ao meu lado, me incentivando diariamente e me ensinando a persistir, principalmente, nos momentos mais difíceis.

Ao meu esposo **Thamerson Tavares** e ao meu filho **João Miguel Brasil**, minha mais nova família e meu alicerce diário, pelo companheirismo e amor em todos os momentos!

À minha querida mãe-científica e amiga **Dra. Aya Sadahiro** que mesmo não me conhecendo, me deu a oportunidade de ser sua aluna e fazer parte de seu grupo de pesquisa. Prof. Aya, sem dúvidas, é uma pessoa incrível, humana, ética e exemplar. Obrigada de coração pelo acolhimento, dedicação e parceria durante esses anos. Certamente, aprendi e amadureci muito com a senhora e sentirei saudades! Gratidão sempre!

Aos meus coorientadores, professor **Dr. Mauricio Ogusku** e professora **Dra. Alessandra Pontillo**, pela amizade, conhecimentos transmitidos e ensinamentos diários, principalmente na área de genética molecular.

Aos meus colegas do laboratório LIM: **Alena Diniz**, **Allyne Almeida**, **Gilberto Bazé**, **Laianne Lopes**, **Marcos Gurgel** pela ajuda na rotina laboratorial e parceria; e ao **Dhêmerson de Souza** que compartilhou seus conhecimentos na área de genética e sempre prestativo nas análises estatísticas.

Aos técnicos e amigos do Laboratório de Micobacteriologia do INPA: **Maisa Porto**, **Tânia** e seu **Ray** por todo suporte técnico fornecido e convivência durante os experimentos no laboratório.

Aos **funcionários** da Policlínica Cardoso Fonte e aos **pacientes** pelo aceite em participar da nossa pesquisa mesmo diante da condição física debilitada causada pela doença e confiança depositada em nossa equipe.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa, a **FAPEAM** pelo apoio financeiro para a concretização deste trabalho bem como ao **LIM** (Laboratório de Imunologia Molecular) e ao **INPA** (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), locais renomados fundamentais e de apoio para a realização da pesquisa.

À **UFAM**, **Coordenação** e **Secretaria**, especialmente ao **Edson**, **Magda** e **Ana Paula**, do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada pela oportunidade de oferecer o curso e desenvolvimento da pesquisa.

Aos **professores do PPGIBA** que dispõe de seu tempo para nos ensinar e compartilhar conhecimentos e aos **meus colegas do programa** no qual vivenciamos diversos momentos juntos!

Finalmente, agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram nessa caminhada e realização deste trabalho!

Muito obrigada!

RESUMO

Doenças infecciosas como a tuberculose (TB) continuam sendo uma das principais causas de óbito no mundo. Depois da COVID-19, a TB é a segunda principal causa de morte no mundo devido a um único agente infeccioso. A TB é causada por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e que nos dias atuais ainda é considerada uma ameaça global e um grave problema de saúde pública. No ano de 2022, segundo a Organização Mundial de Saúde cerca de 10,6 milhões de pessoas desenvolveram TB e 1,30 milhão de óbitos ocorreram. No contexto nacional, o estado do Amazonas (84,1 casos/100 mil habitantes) bem como a capital Manaus (115,8 casos/100 mil habitantes) registraram os maiores coeficientes de incidência de TB do país. Os altos índices apresentados na região nos intrigam a investigar os motivos dessas taxas elevadas. Além disso, outro fato curioso é que apenas 5-10% dos indivíduos infectados com o bacilo causador da TB desenvolvem a doença ativa. Os mecanismos que envolvem a interação micobactéria-hospedeiro constituem alvos interessantes de estudo visto que o sistema imune inato e adaptativo montam respostas com o intuito de eliminar o patógeno. Neste contexto, têm-se um conjunto de genes localizados no sistema HLA (Antígeno Leucocitário Humano) que codificam moléculas relacionadas a apresentação de antígenos, conectam respostas imunes inata e adaptativa, modulam as respostas imunológicas e na síntese de proteínas do sistema complemento. Levando em consideração que a TB é uma doença multifatorial e fatores genéticos do hospedeiro como variantes de nucleotídeo único (SNV) têm sido associados aos diferentes desfechos clínicos e variabilidade individual à presença do patógeno, o estudo teve como objetivo avaliar SNV em genes do sistema HLA (rs9271300 no gene *HLA-II*, rs1049033 e rs1632937 localizados no gene *HLA-G* e o rs1051792 no gene *MICA*) e sua relação com a concentração das citocinas IL-6, IL-1 β , IFN- γ e TNF- α em pacientes com TB no Estado do Amazonas. Um total de 1275 amostras foram analisadas sendo 150 de pacientes com TB extrapulmonar (TBe), 531 de pacientes com TB pulmonar (TBp) e 594 controles recrutados da Policlínica Cardoso Fontes na cidade de Manaus. A técnica de qPCR (PCR Quantitativa em Tempo Real) foi utilizada para genotipagem das amostras. A quantificação das citocinas foi feita pela técnica ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) em amostras de plasma. A partir dos resultados obtidos, foi observada uma associação estatisticamente significativa para proteção do SNV rs9271300 à TBe ($p=0,0307$; OR=0,54) e TBp ($p=0,0110$; OR=0,55) e do genótipo AA do SNV rs1051792 foi associado com o aumento do risco para o sexo masculino à TBe ($p_{adj}=0,0069$; OR=1,85). Ademais, para os SNV rs1049033 e rs1632937 não foram observadas associações genéticas com a proteção ou suscetibilidade à TB nos grupos investigados. De maneira geral, houve uma maior produção das citocinas IL-1 β , IFN- γ e TNF- α em pacientes com TB do que controles e as concentrações da IL-6 foi semelhante tanto na população caso quanto controle. Os resultados deste estudo, certamente, contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desfecho da TB, principalmente em nossa população amazonense.

Palavras-chave: Tuberculose, SNV, *HLA-II*, *HLA-G*, *MICA*.

ABSTRACT

Infectious diseases tuberculosis (TB) continue to be a major cause of death worldwide. After COVID-19, TB was the second leading cause of death worldwide due to a single infectious agent. TB is caused by species of *Mycobacterium tuberculosis* complex and presently it is still considered a global threat and a serious public health problem. As per the World Health Organization in 2022, an estimated 10,6 million people fell ill and 1,30 million died of TB in the country. The national context, the state of Amazonas (84,1 cases/100 thousand inhabitants) and Manaus (115,8 cases/100 thousand inhabitants) recorded the highest TB incidence coefficient in Brazil. The high rates presented in the region intrigue us to investigate the reasons for this. Furthermore, another curious fact is that around 5-10% of individuals infected develop the active disease. The mechanisms involve mycobacterium-host interaction are interesting targets of study because the innate and adaptive immune system mount responses to eliminate the pathogen. In this context, there is a conjunct of genes located in the HLA (Human Leukocyte Antigen) system which encode related proteins to the presentation of antigens, connects innate and adaptive immune responses, immune signaling and regulation and synthesis of complement proteins. Considering the TB is a multifactorial disease and host genetic factors such as Single-Nucleotide Variants (SNV) have been associated with different clinical outcomes and individual variability in the presence of the pathogen, the research aims to evaluate SNV in different genes located the HLA system (rs9271300 in gene *HLA-II*, rs1049033 e rs1632937 in *HLA-G* e o rs1051792 in *MICA*) and relationship with concentration of cytokine IL-6, IL-1 β , IFN- γ and TNF- α in patients with TB in the State of Amazonas. A total of 1275 samples have been analyzed being 150 patients with extrapulmonary TB (TBe), 531 patients with pulmonary TB (TBp) and 594 controls recruited from the Policlínica Cardoso Fontes in the city of Manaus. The qPCR technique (Quantitative Real Time PCR) was used for genotyping the samples. Quantification of cytokines will be done by the ELISA technique (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) in plasma samples. Of the analyzed samples, it was observed is associated with protection for TBe ($p=0,0307$; OR=0,54) e TBp ($p=0,0110$; OR=0,55) of the SNV rs9271300 and AA genotype of SNV rs1051792 is associated with increased risk for TBe ($p_{adj}=0,0069$; OR=1,85). SNV rs1049033 and rs1632937 located in the HLA-G gene no association was observed between the study groups. In general, serum IL-1 β , IFN- γ and TNF- α concentrations were higher in patients with TB than those in Controls. IL-6 concentrations were similar in both the case and control populations. Therefore, the results of this study can contribute to a better clarification of the mechanisms involved in the outcome of TB, especially in our Amazonian population.

Keywords: Tuberculosis, SNV, *HLA-II*, *HLA-G*, *MICA*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aids	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> - Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	Célula apresentadora de Antígeno
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette Guérin
CLRs	Receptores de lectina tipo C
CFP-10	Cultura de Proteína Filtrada 10 kDa
COVID	<i>Corona Virus Disease</i> - Doença do Coronavírus
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i> -
ESAT-6	Antígeno Secretório 6 kDa
FcyR	Receptores Fcy
FVS/AM	Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	<i>Huma Leukocyte Antigen</i> - Antígeno Leucocitário Humano
IFN- γ	Interferon-gama
IGRA	<i>Interferon Gamma Release Assay</i> - ensaios de liberação de interferon-gama
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-2	Interleucina 2
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
IRF	Fatores regulares de interferon
LT- α	Linfotoxina alfa
LT- β	Linfotoxinas beta
MAF	Frequência do alelo menor
MICA	<i>Major histocompatibility complex class I chain-related genes A</i> - genes relacionados a cadeia de MHC de classe I
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NF-kB	<i>Nuclear factor Kappa B</i> - Fator de transcrição nuclear Kappa B
NLR	Receptores semelhante a família NOD
NMT	Micobactérias não causadoras de tuberculose
NK	Células <i>Natural killer</i>

OMS	Organização mundial de saúde
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR Quantitativa em Tempo Real
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
RC	Receptores de complemento
RE	Retículo endoplasmático
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RS	Receptores scavenger
SNV	<i>Single Nucleotide Variant</i> - Variantes de nucleotídeo único
TB	Tuberculose
TBp	Tuberculose pulmonar
TBe	Tuberculose extrapulmonar
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TH1	Linfócito T helper 1
TH2	Linfócito T helper 2
TH17	Linfócito T helper 17
TLR	Receptores semelhantes a toll
TNF	Fator de necrose tumoral
Tregs	Células T reguladoras
TRM-TB	Teste rápido molecular para TB

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura gênica do sistema HLA com as regiões de classe I, II e III...	34
Figura 2:	Estrutura da molécula MHC I e II com seus domínios.....	36
Figura 3:	Nomenclatura para alelos HLA.....	37
Figura 4:	Genes localizados na região do sistema HLA de classe I.....	38
Figura 5:	Isoformas da molécula HLA-G e seus respectivos domínios.....	40
Figura 6:	Localização genética dos genes MIC na região do HLA de classe I e a proteína codificada MICA.....	43
Figura 7:	Genes localizados na região do sistema HLA de classe II.....	45
Figura 8:	Genes localizados na região do sistema HLA de classe III.....	46
Figura 9:	Formas biologicamente ativas do TNF, solúvel e ancorada a membrana, e sua interação com os receptores TNRF1 e TNRF2 resultando no efeito biológico.....	48
Figura 10:	Fluxograma das atividades do projeto.....	63
Figura 11:	Curva de amplificação gerada para cada SNV selecionado no estudo..	72
Figura 12:	Desequilíbrio de ligação da população de pacientes com TB e controles avaliados para as quatro variantes em genes do sistema HLA.....	97
Figura 13:	Gráfico da análise de interação gênica dos SNV selecionados no modelo dominante.....	98
Figura 14:	Concentração de IL-6 nos grupos pacientes e controles.....	99
Figura 15:	Concentração da citocina IL-6 entre os genótipos dos SNV estudados em TBe, TBp vs Controles.....	100
Figura 16:	Concentração de IL-1 β nos grupos de pacientes com TB vs Controles.	102
Figura 17:	Concentração da citocina IL-1 β entre os genótipos dos SNV estudados em TBe, TBp vs Controles.....	103
Figura 18:	Concentração de IFN- γ nos grupos de TBp vs Controles (contatos e não-contatos).....	107
Figura 19:	Concentração da citocina IFN- γ entre os genótipos dos SNV estudados em TBp vs Controles.....	108
Figura 20:	Concentração de TNF- α nos grupos de TBp vs Controles (contatos e não-contatos).....	111
Figura 21:	Concentração da citocina TNF- α entre os genótipos dos SNV estudados em TBp vs Controles (contatos e não contatos).....	113

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Condições de reação de qPCR que serão usadas para cada sondas dos SNV selecionados.....	70
Quadro 2:	Características gerais das sondas alelos-específicas do experimento.....	70
Quadro 3:	Condições de termociclagem que serão utilizadas no experimento.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Número de alelos referentes a cada HLA.....	37
Tabela 2:	Estudos de associação de variantes genéticas no sistema HLA em doenças infecciosas. ID SNV: identificação da variante de nucleotídeo único.....	54
Tabela 3:	Estudos de variantes genéticas no sistema HLA na TB.....	57
Tabela 4:	Descrição geral da população recrutada para estudo: controles, pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar nos grupos estudados....	76
Tabela 5:	Aspectos gerais da população recrutada referente aos controles, pacientes com TB pulmonar (TBp) e extrapulmonar (TBe) quanto as variáveis vacinação BCG, tabagismo e alcoolismo.....	79
Tabela 6:	Formas clínicas da TB extrapulmonar (TBe) recrutadas no estudo.....	81
Tabela 7:	Frequências genotípicas e alélicas e resultados da análise de associação dos SNV selecionados no melhor modelo genético e após os ajustes com as variáveis sexo e idade.....	82
Tabela 8:	Comparação entre as frequências da população controle em relação às outras populações globais disponíveis nos bancos da Ensembl.....	84
Tabela 9:	Tabela 9: Análise do SNV rs9271300 entre o grupo de pacientes com TBe, TBp e Controles nos modelos genéticos.....	86
Tabela 10:	Análise do SNV rs9271300 após os ajustes por sexo e idade em grupo de pacientes com TBe vs. Controles nos modelos genéticos.....	87
Tabela 11:	Resultado da análise de associação do SNV rs9271300 após os ajustes por sexo e idade em grupo de pacientes com TBe vs. Controles nos modelo overdominante.....	88
Tabela 12:	Análise do SNV rs1049033 entre o grupo de pacientes com TBe, TBp e Controles nos modelos genéticos.....	89
Tabela 13:	Análise do SNV rs1632937 entre o grupo de pacientes com TBe, TBp e Controles nos modelos genéticos.....	90
Tabela 14:	Análise do SNV rs1051792 entre o grupo de pacientes com TBe, TBp e Controles nos modelos genéticos.....	91
Tabela 15:	Análise do SNV rs1051792 após os ajustes por sexo e idade em grupo de pacientes com TBe vs. Controles nos modelos genéticos.....	92
Tabela 16:	Resultado da análise de associação do SNV rs1051792 após os ajustes por sexo e idade em grupo de pacientes com TBe vs. Controles no modelo dominante.....	93
Tabela 17:	Análise do SNV rs1051792 após os ajustes por sexo e idade em grupo de pacientes com TBe vs TBp nos modelos genéticos.....	94
Tabela 18:	Resultado da análise de associação do SNV rs1051792 após os ajustes por sexo e idade em grupo de pacientes com TBe vs. TBp no modelo dominante.....	94
Tabela 19:	Resultados da análise de regressão logística multivariada nos grupos estudados após ajustes por sexo e idade considerando o melhor modelo de herança genético.....	96
Tabela 20:	Resultados da análise de haplótipos no grupo de TB vs Controles nos SNV.....	97

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Aspectos gerais da tuberculose.....	20
2.2 Epidemiologia da tuberculose.....	24
2.3 Resposta imune ao complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
2.3.1 Resposta imune inata.....	26
2.3.2 Resposta imune adaptativa.....	28
2.3.2.1 Apresentação de antígenos micobacterianos aos linfócitos T CD4+ naive.....	29
2.3.2.2 Apresentação de antígenos micobacterianos aos linfócitos T CD8+naive.....	30
2.4 Sistema de antígenos leucocitários humanos (Sistema HLA).....	33
2.4.1 Genes HLA de classe I.....	38
2.4.2 Genes HLA de classe II.....	44
2.4.3 Genes HLA de classe III.....	46
2.5 Variantes de nucleotídeo único (SNV).....	51
2.6 Associações de SNV em genes do sistema HLA nas doenças infecciosas.....	53
2.6.1 Estudos imunogenéticos na tuberculose.....	55
3 JUSTIFICATIVA.....	58
4 OBJETIVOS.....	61
5 MÉTODOS.....	63
5.1 Fluxograma das atividades.....	63
5.2 Aspectos éticos.....	64
5.3 Tipo de estudo.....	64
5.4 Local de estudo.....	64
5.5 População de estudo.....	64
5.6 Grupos estudados e critérios de inclusão.....	65
5.6.1 Critérios de inclusão.....	65
5.6.1.1 Pacientes com TB pulmonar (TBp).....	65
5.6.1.2 Pacientes com TB extrapulmonar (TBe).....	65
5.6.1.3 Controles de pacientes com TB (contatos).....	66
5.7 Critérios de exclusão.....	66
5.8 Recrutamento e coleta de dados dos pacientes e controles.....	66
5.9 Seleção dos pacientes e controles.....	67
5.10 Cálculo amostral.....	67
5.11 Critérios de seleção dos SNV.....	68
5.12 Amostras biológicas de sangue total e escarro.....	68

5.13 Exames micobacteriológicos nas amostras de escarro.....	68
5.14 Extração de DNA das amostras de sangue.....	69
5.15 Genotipagem dos SNV por qPCR - Ensaio TaqMan.....	69
5.16 Quantificação das citocinas IL-6, IL-1 β , IFN- γ e TNF- α por ELISA.....	73
5.17 Análises estatística.....	73
5.18 Apoio Financeiro.....	74
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
6.1 Descrição geral da população estudada.....	76
6.2 Resultados das análises de associação dos SNV selecionados.....	81
6.2.1 Análise de associação do SNV rs9271300 no gene <i>HLA-II</i>	85
6.2.2 Análise de associação dos SNV rs1049033 e rs1632937 no gene <i>HLA-G</i>	88
6.2.3 Análise de associação do SNV rs1051792 no gene <i>MICA</i>	91
6.2.4 Análise de associação dos SNV por regressão logística multivariada.....	96
6.3 Análise de Haplótipos.....	97
6.4 Análise de interação gênica.....	98
6.5 Análise da quantificação de IL-6.....	98
6.6 Análise da quantificação de IL-1 β	102
6.7 Análise da quantificação de IFN- γ	106
6.8 Análise da quantificação de TNF- α	110
7 CONCLUSÃO.....	115
Considerações gerais.....	116
CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	118
EQUIPE DE PESQUISA.....	121
REFERÊNCIAS.....	123
ANEXO.....	152

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa multifatorial e complexa causada por diferentes espécies pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (FORRELLAD et al., 2013) mantendo-se como uma das dez principais doenças infecciosas responsáveis por elevados índices de mortalidade no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente um quarto da população mundial está infectada com o bacilo causador da TB, sendo, portanto, um grave problema de saúde pública (WHO, 2023; BRASIL, 2023).

Embora os esforços propostos para erradicar epidemia da TB em até 2030-2035 estão como uma das principais metas globais, com a pandemia da COVID-19 este cenário se torna desafiador. Anualmente, estima-se que mais de 10 milhões de pessoas continuam a adoecer com TB (WHO, 2023). No ano de 2021, cerca de 1,6 milhão de pessoas morreram ocasionada pelo bacilo causador da TB e aproximadamente 10,3 milhões de pessoas adoeceram com TB (WHO, 2022).

No ano de 2022, a TB foi a segunda principal causa de morte no mundo devido a um único agente infeccioso, depois da COVID-19, resultando em quase o dobro de mortes do que os indivíduos com HIV/AIDS. Dados publicados recentemente pela OMS informou que cerca de 10,6 milhões de pessoas desenvolveram TB e 1,30 milhão de óbitos ocorreu no mundo em 2022, dados que ainda refletem um cenário preocupante (WHO, 2023).

Sabe-se que um indivíduo bacilífero pode transmitir a TB através da ação de expelir gotículas contendo partículas viáveis do bacilo pela fala, tosse ou espirro que podem ser inaladas por outro indivíduo (BRASIL, 2011). Uma vez inaladas, as micobactérias alcançam os pulmões onde são reconhecidas principalmente pelos macrófagos alveolares do hospedeiro, resultando na resposta imune inata (LERNER et al., 2015). A resposta imune inata corresponde a uma defesa imediata e é desencadeada após estímulos derivados da interação de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) com os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes na superfície celular do patógeno (BHATT; SALGAME, 2007; KLEINNIJENHUIS et al., 2011).

No decorrer da infecção, estímulos persistentes das micobactérias desencadeiam a resposta imune adaptativa e os linfócitos T são fundamentais no combate *M. tuberculosis* (VANKAYALAPATI; BARNES, 2009; CACCAMO et al., 2015). No entanto, para que haja

reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos T é necessário a apresentação dos antígenos em moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) denominado em humanos como HLA (Antígeno Leucocitário Humano) (THORSBY, 2009; JASENOSKY et al., 2015).

O sistema HLA consiste em um conjunto de genes que codificam moléculas relacionadas na apresentação de antígenos, conectando as respostas imunes inata e adaptativa, além das suas funções na modulação das respostas imunológicas e na síntese de proteínas do sistema complemento (MATZARAKI et al., 2017). Entre as diversas funções desempenhadas pelas moléculas do sistema HLA, certamente uma das mais importantes envolve a indução e a regulação de respostas imunológicas na defesa contra inúmeros microrganismos, pois os linfócitos T reconhecem antígenos estranhos complexados as moléculas de HLA (SHANKARKUMAR, 2004). Diante disso, o sistema HLA exerce funções importantes nas doenças infecciosas (GHODKE et al., 2005; BLACKWELL et al., 2009).

Após a interação micobactéria-hospedeiro, diferentes desfechos podem ser observados, como a eliminação do bacilo; ou a formação do granuloma, com participação importante de células dos sistemas inato e adaptativo, tais como macrófagos e linfócitos, os quais restringem os bacilos na massa originada com evolução para uma TB latente; ou ainda ocorrer a reativação da TB através do granuloma formado meses ou anos posteriores; ou reinfeção com outra cepa micobacteriana; ou a infecção progredir para TB ativa (BHATT; SALGAME, 2007; MOLLER et al., 2010; ERNST, 2012).

A relação existente entre o hospedeiro, patógeno e o ambiente forma uma tríade que influencia no resultado e controle da infecção (SIA et al., 2015). Em relação ao hospedeiro, fatores genéticos como as variantes de nucleotídeo único (SNV) podem estar envolvidas no fenótipo tanto da infecção quanto evolução para doença, pois diferentes variantes genéticas foram descritas como razões preponderantes na suscetibilidade ou resistência à afecções (MÖLLER et al., 2018).

A partir disso, nos últimos anos, inúmeras pesquisas envolvendo SNV em genes relacionados a resposta imune na TB vêm sendo desenvolvidas para uma melhor compreensão da complexidade da doença e na variedade de respostas frente ao bacilo (HILL et al., 1998; AZAD et al., 2012). Diferentes estudos trazem evidências que a predisposição genética do hospedeiro associa-se a suscetibilidade ou resistência à TB (PONTILLO et al., 2013; LEE et al. 2015; SOUZA DE LIMA et al., 2016; BARLETTA-NAVECA et al., 2018;

HARISHANKAR et al., 2018; CHEN; MA, 2020; SOUZA DE LIMA et al., 2020; FIGUEIRA et al., 2021; AMORAS et al., 2023).

Neste contexto, os produtos gerados pelos genes do sistema HLA participam em diferentes afecções infecciosas (SPÍNOLA, 2016). Na TB, as pesquisas imunogenéticas precisam ser conduzidas para compreender a influência de SNV localizados nos genes do sistema HLA, principalmente em relação aos genes HLA não clássicos e a forma clínica extrapulmonar, até o momento, pouco estudado em comparação com os demais (SAURABH et al., 2016; ALAM et al., 2021).

Indubitavelmente, a imunopatogênese ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* é multifatorial e diversos mecanismos ainda permanecem desconhecidos com lacunas a serem preenchidas (DE MARTINO et al., 2019). Combinado a isso, sabe-se que fatores socioeconômicos, ambientais e característicos do hospedeiro têm sido associados aos diferentes desfechos clínicos e a extensa variabilidade individual à presença do patógeno visto que aproximadamente 30% dos indivíduos expostos ao *M. tuberculosis* são infectados (ORLOVA; SCHURR, 2017). Destes, 90% conseguem controlar a infecção através da eliminação do bacilo ou desenvolvimento da TB latente, devido ao controle desempenhado pelo sistema imune do hospedeiro. Os 5 a 10% restantes podem desenvolver a TB ativa por falhas na resposta imune (SHALER et al., 2012). Esses aspectos reforçam que o *status* imunológico do hospedeiro é crucial para o resultado e progressão da infecção à doença (CADENA et al., 2017).

Diante do exposto, o presente estudo avaliou variantes de nucleotídeo único (SNV) em genes que codificam moléculas do sistema HLA (Antígeno Leucocitário Humano) em pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar visto que são componentes chaves envolvidos na indução e regulação da resposta imune à TB.

Revisão Bibliográfica

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da tuberculose

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa crônica descoberta por Robert Koch em 1882 (KOCH, 1882) que nos dias atuais ainda é a responsável por milhares de óbitos no mundo (WHO, 2023). A TB é causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* que incluem as seguintes espécies: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. suricattae* e *M. orygis* (TIENTCHEU et al., 2017; GAGNEUX, 2018, BRASIL, 2023).

As micobactérias são agrupadas no gênero *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae*, subordem *Corynebacteriaceae* e da ordem *Actinomycetales* (RASTOGI et al., 2001). O gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do complexo *M. tuberculosis*, micobactérias não causadoras de tuberculose (NMT) (FEDRIZZI et al., 2017) e *M. leprae*, agente etiológico da hanseníase (GRIFFITH et al., 2007; GRIFFITH et al., 2010).

As micobactérias são bacilos intracelulares facultativos aeróbicos, imóveis, não formadores de esporos, álcool-ácido resistente com morfologia de bastonete retos ou levemente curvos com 0.2 a 0.6 µm de largura e 1.0 a 10 µm de comprimento e caracterizada por conter grande quantidade de ácidos micólicos (60–90 átomos de carbono) (PFYFFER; VINCENT, 2010). A estrutura celular das micobactérias é constituída de um complexo envelope externo. O envelope é composto de uma membrana plasmática localizada mais internamente, parede celular e uma camada externa. Na membrana plasmática estão presentes proteínas (porinas, proteínas de transporte), fosfatidilinositol manosídeos e lipoarabinomananas que se ancoram na membrana plasmática, estendendo-se pela parede celular alcançando a superfície da micobactéria. Entre a membrana plasmática e o peptidoglicano situa-se um espaço periplasmático (JANKUTE et al., 2015).

A parede celular apresenta camadas de peptidoglicano com unidades intercaladas de N-acetilglucosamina e ácido N-glicolilmurâmico cuja função é conferir rigidez, formato e estabilidade osmótica para o bacilo (VOLLMER et al., 2008). Um componente ligado ao peptidoglicano é o polissacarídeo arabinogalactana e seus resíduos são esterificados em componentes de ácidos graxos de elevado peso molecular denominados ácidos micólicos (VICENT et al., 2018).

Além disso, modelos são propostos evidenciando membrana externa (micomembrana) heterogênea rica em glicolípideos como monomicolato de trealose e dimicolato de trealose, fosfolípídios e de lipídios específicos da espécie, como glicopeptidolípídios, dimicocerosato de ftiocerol e sulfolípídios que parecem atuar como fatores de virulência (ZUBER et al., 2008; CHIARADIA et al., 2017; VICENT et al., 2018).

Entre as micobactérias pertencentes ao complexo, o principal agente etiológico causador de TB em humanos é *M. tuberculosis* (GAGNEUX, 2018). Esse patógeno é conhecido por ser um microrganismo intracelular que reside em macrófagos e células dendríticas no interior de fagossomos, apresentando a capacidade de evadir dos mecanismos de defesa do hospedeiro (CARDONA; IVANYI, 2011).

O bacilo causador da TB é transmitido pela via respiratória podendo causar a forma mais comum de TB que é a pulmonar, mas pode haver a forma extrapulmonar acometendo diferentes órgãos como a pleural, os gânglios linfáticos, ossos, fígado, sistema nervoso central, trato geniturinário, trato gastrointestinal (CRUZ-KNIGHT; BLAKE-GUMBS, 2013).

A TB extrapulmonar pode ocorrer através da infecção primária ou por reativação da TB latente e, geralmente, resultadas da disseminação do bacilo via hematogênica e/ou linfática a partir do foco primário no pulmão (FLYNN; CHAN, 2001). As principais formas clínicas de TB extrapulmonar incluem pleural, ganglionar e osteoarticulares (RAMIREZ-LAPAUSA et al., 2015).

A TB pleural é a forma mais comum dentre as TB extrapulmonares, principalmente em adultos jovens (BRASIL, 2019), podendo ser consequência da disseminação de um foco infeccioso pela via hematogênica ou por contiguidade, ou seja, a partir do pulmão. Da mesma forma, os bacilos podem alcançar a pleura através do vazamento ou ruptura de algum foco subpleural, resultando num derrame pleural unilateral e autolimitado (BERGER; MEJIA, 1973).

A TB ganglionar é a segunda forma mais frequente de TB extrapulmonar acometendo, principalmente, os gânglios da região cervical e a lesão pode envolver naturalmente (RAMIREZ-LAPAUSA et al., 2015). Essa forma extrapulmonar é mais comum em crianças e adultos jovens e, normalmente, não resulta em envolvimento sistêmico (FONTANILLA et al., 2011).

A TB osteoarticular pode acometer qualquer osso, no entanto o comprometimento mais comum desse grupo é espondilite e doença de Pott, principalmente a região torácica (jovens) e lombar (idosos) (WARES, 2005; URVASHI et al., 2018). Outra forma é a TB cutânea que pode ocorrer através de inoculação exógena ou propagação endógena por extensão contígua em pacientes previamente infectados ou disseminação hematogênica para a pele, linfática ou contígua de focos próximos a pele formando feridas (SANTOS et al., 2014).

Uma das formas mais graves e progressivas de TB primária que acomete não somente o pulmão, mas também qualquer outro órgão é a TB miliar ou tuberculose hematogênica generalizada (MERT, 2017). Os bacilos da TB alcançam a circulação sanguínea durante a infecção primária ocorrendo principalmente em crianças ou após a reativação de um foco latente. Geralmente, os órgãos mais afetados incluem o pulmão, fígado, baço, gânglios linfáticos, meninges e medula óssea. Essa forma acomete principalmente indivíduos imunossuprimidos (MERT et al., 2001).

Outras formas de TB extrapulmonar incluem peritoneal; no pericárdio originado a partir a partir de focos de bacilos presentes nos linfonodos mediastinais ou na pleura; linfadenite que acomete os linfonodos nas cadeias cervicais e supraclaviculares posteriores e a meningoencefalite tuberculosa acomete o sistema nervoso central (GOLDEN et al., 2005).

Diferentes pesquisas trazem evidências que o destino da micobactéria depende principalmente do sistema imunológico do hospedeiro (CHACKERIAN et al., 2002). Após a exposição ao bacilo, *Mycobacterium tuberculosis*, aproximadamente 30% dos indivíduos serão infectados. Destes indivíduos infectados, 90% conseguem controlar a ação do bacilo, através da defesa imunológica eficiente do hospedeiro e tornam-se TB latente, e são assintomáticos, os 10% restantes podem apresentar uma falha no sistema imune e evoluem para a TB ativa (SHALER et al., 2012).

Clinicamente, os pacientes com TB são classificados em portadores da infecção latente, caracterizada por não apresentar sintomas e não transmitir o bacilo da TB para outros indivíduos, e em TB pulmonar ativa que é a forma transmissível da doença. Logo, a forma latente se torna um reservatório para casos futuros de TB ativa (PAI et al., 2016).

De modo geral, o diagnóstico é baseado nas manifestações clínicas características da patologia, diagnóstico diferencial, exames de imagem (Radiografia ou tomografia computadorizada de tórax) e bacteriológico (BRASIL, 2019).

O diagnóstico bacteriológico é realizado através da baciloscopia direta (ou exame microscópico) que consiste na pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) pelo método de Ziehl-Nielsen em amostras de escarro ou biópsias ou outras amostras para suspeitas de TB extrapulmonar. Este método é de baixo custo, simples e identifica em torno de 60 a 80% dos casos de TB pulmonar em amostras de boa qualidade. Combinado a baciloscopia, tem-se o teste padrão ouro que é a cultura microbiológica, pois esta apresenta elevada sensibilidade e especificidade e os testes moleculares (TRM-TB: teste rápido molecular para TB, GeneXpert®) (BRASIL, 2023).

Adicionalmente, para os casos de TB latente, o IGRA (*Interferon Gamma Release Assay*-ensaios de liberação de interferon-gama) é outro teste que tem auxiliado no diagnóstico. Outro teste bastante utilizado que identifica casos de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* em adultos e crianças bem como auxilia no diagnóstico de TB ativa em crianças é a prova tuberculínica. Na prova tuberculínica, um derivado proteico purificado do bacilo causador da TB é inoculado através da via intradérmica, no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, para medir a resposta imune celular a esses antígenos (BRASIL, 2019).

Em relação ao esquema terapêutico antiTB em adultos e adolescentes, este consiste em uma combinação padronizada de medicamentos objetivando ação bactericida precoce, capacidade de prevenção a bacilos resistentes e ação esterilizante. A primeira linha de tratamento antiTB no Brasil compreende duas fases: a primeira é intensiva ou de ataque para reduzir a transmissão da doença e a segunda é a de manutenção para eliminar os patógenos persistentes e diminuir a possibilidade de recidiva (BRASIL, 2019).

O esquema terapêutico inclui quatro antibióticos usados na fase intensiva e dois na fase de manutenção. Para melhorar a adesão ao tratamento, o esquema medicamentoso é disponível em comprimidos de doses fixas combinadas, ou seja, quatro fármacos associados em um único comprimido (4 em 1) constituídos por rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol utilizados nos dois primeiros meses (fase de ataque) ou dois comprimidos em um (2 em 1), rifampicina e isoniazida, utilizados nos quatro meses restantes (fase de manutenção), totalizando no mínimo seis meses de tratamento. Para TB extrapulmonar, o tratamento varia de acordo com a forma clínica e gravidade da doença (BRASIL, 2019).

Na TB, diferentes fatores têm sido associados ao risco de desenvolver a doença, por exemplo: diabetes (JEON et al., 2008; DOOLEY et al., 2009; KHALIL et al., 2016),

tabagismo (GAMBHIR et al., 2010; CHAN et al., 2014; ALTET et al., 2017), alcoolismo (IMTIAZ et al., 2017), estado nutricional (ZACHARIAH; HARRIES, 2002; LETTOW et al., 2004; LÖNNROTH et al., 2010; ANURADHA et al., 2018), deficiência de vitamina D (NNOAHAM; CLARKE, 2008; TALAT et al., 2010; HAMMAMI et al., 2021), utilização de drogas ilícitas (SILVA, 2018), quadro de imunossupressão (pacientes que convivem com HIV (SOURIANT et al., 2019), câncer ou pacientes em uso de medicamentos imunossupressores), resistência aos medicamentos assim como fatores genéticos do hospedeiro (BEN AYED et al., 2018; DUARTE, 2018; MEYER; THYE, 2019).

Embora a TB seja uma patologia milenar e diferentes pesquisas tenham sido realizadas, ainda é considerada uma doença complexa, em que diversos aspectos ainda não estão completamente compreendidos (TURNER et al., 2017).

2.2 Epidemiologia da tuberculose

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a TB está entre as dez principais causas de óbito ocasionadas por um único microrganismo infeccioso ocupando a segunda posição, ficando atrás apenas da COVID-19. Mundialmente, estima-se que aproximadamente um quarto da população está infectada com o bacilo causador da TB (WHO, 2023).

No contexto mundial, apesar da queda notória de notificações de casos de TB em 2020 decorrentes da pandemia da COVID-19, entre os anos de 2019 e 2021, houve uma estimativa de aumento no número de indivíduos que adoeceram e morreram devido à TB. Em 2019 aproximadamente 10,0 milhões de indivíduos adoeceram com TB e 1,2 milhão de indivíduos soronegativos para o HIV morreram (WHO, 2020). Em 2020, cerca de 10,1 milhões de pessoas adoeceram com TB e 1,3 milhão de óbitos (WHO, 2021).

No ano de 2021 cerca 10,3 milhões de pessoas adoeceram com TB, representando um aumento de 4,5% em comparação ao ano de 2020 e 1,6 milhão de pessoas morreram (WHO, 2022). Recentemente, a OMS divulgou os dados referentes ao ano de 2022 no qual estima-se que 10,6 milhões de pessoas desenvolveram TB com uma taxa de incidência de 133 casos/100 mil habitantes. Ademais, a TB causou aproximadamente 1,30 milhão de óbitos entre pessoas soropositivas para o HIV e 1,13 milhão de pessoas soronegativas para o HIV. Diante deste cenário, essas informações reforçam que a TB ainda é considerada uma doença desafiadora e preocupante (WHO, 2023).

O Brasil, em 2022, registrou 78.057 casos novos de TB no qual representa um coeficiente de incidência de aproximadamente 36,3 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2023), estimativa que o enquadra entre os 30 países com os maiores casos de TB (BRASIL, 2021). Em relação ao coeficiente de mortalidade cerca de 2,2 casos/100 mil habitantes morreram de TB (BRASIL, 2023).

De acordo com o boletim epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde sobre o panorama da TB no Brasil, em 2022, os maiores coeficientes de incidência por Unidades da Federação foram o estado do Amazonas (84,1 casos/100 mil habitantes), Roraima (75,9 casos/100 mil habitantes) e Rio de Janeiro (68,6 casos/100 mil habitantes). Em relação aos estados que apresentaram os maiores coeficiente de mortalidade por TB foram o Rio de Janeiro (5,0 óbitos/100 mil habitantes), Amazonas (3,5 óbitos/100 mil habitantes) e Pernambuco (3,3 óbitos/100 mil habitantes) (BRASIL, 2023).

Em 2022, no contexto regional, a Região Norte apresentou um coeficiente de incidência de 52,7 casos/100 mil habitantes, o maior comparado as demais regiões do Brasil. No aspecto casos novos de TB, a Região Norte registrou 9.998 e o Amazonas com 3.658 casos. A capital Manaus apresentou o coeficiente de incidência de 115,8 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2023).

Perante o exposto, este cenário referente a elevadas taxas de coeficiente de incidência de TB são registradas no Amazonas anualmente. Entre os diferentes fatores associados a patogênese da TB tem-se os fatores genéticos do hospedeiro, em especial os relacionados ao *status* imunológico, que inegavelmente podem influenciar na variabilidade interindividual frente a diferentes respostas contra o bacilo e contribuir no desenvolvimento, progressão ou regressão da afecção. Além disso, podem nos fornecer uma melhor compreensão das altas taxas de incidência na presente região (KAUFMANN et al., 2005).

2.3 Resposta imune ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*

A resposta imune ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* é o resultado da interação entre a virulência micobacteriana e a resistência do hospedeiro de forma independente no qual o torna um processo complexo, multifatorial e envolve diversos mediadores químicos e componentes da resposta imune inata e adaptativa (COOPER, 2009; CARDONA, 2018; JEE, 2020).

O bacilo causador da TB infecta um novo organismo humano após este inalar gotículas e aerossóis contendo bacilos viáveis expelidos por um indivíduo doente bacilífero através da tosse, fala, espirro ou canto (O'GARRA et al., 2013). Uma vez inalados, os bacilos alcançam o espaço alveolar nos pulmões sendo capturados por células fagocitárias, principalmente macrófagos alveolares residentes que são células centrais envolvidas na resposta imune a TB bem como células dendríticas, neutrófilos e *natural killer* (LIU et al., 2017). Assim, inicia-se a primeira linha de defesa denominada resposta imune inata com a finalidade de eliminar o agente invasor (MARAKALALA et al., 2018).

2.3.1 Resposta imune inata

A resposta imune inata inicia quando as células fagocíticas do hospedeiro internalizam as micobactérias. Essa interação patógeno-hospedeiro ocorre devido a presença de PRR (Receptores de reconhecimento padrão) presentes nas células ou nos líquidos orgânicos que reconhecem os PAMPs (Padrões moleculares associados a patógenos) nos patógenos (PAI et al., 2016). Sabe-se que ambas as respostas, inata e adquirida, à infecção pelas micobactérias, em sua grande maioria, dependem do reconhecimento de PAMPs pelos PRRs (COOPER, 2009).

Os PRRs expressos na superfície das células fagocitárias podem ser receptores de lectina tipo C (CLRs) como manose, molécula ligada à adesão intercelular tipo 3 grambina não-integrina de células dendríticas (DC-SIGN) e Dectina-1; receptores *scavenger* (SRs); receptores de complemento (CRs); receptores Fcy (FcyR); receptores semelhantes a toll (TLR) e os sensores que formam inflamassomas como receptores da família NOD (NLR) (*NOD-like receptor (NLR) Family*), PYHIN (*PYD like and HIN domain-containing proteins*) como AIM2 e TRIM (*Tripartite motif proteins*) (MORTAZ et al., 2015).

Esses receptores reconhecem PAMPs presentes na parede celular do bacilo da TB (Lipoarabinomanana, Lipomananas, Fosfatidil inositol-manosídeo, trealose dimicolato, ácidos micólicos, arabinogalactana e peptidoglicano) bem como fatores de virulência (ESAT-6, CFP-10) (SHIKAWA et al., 2016). Uma vez estabelecido a interação entre PAMPs e PRRs resulta na ativação de vias de sinalização celular como o fator de transcrição NF-κB (*Nuclear factor Kappa B* - Fator de transcrição nuclear Kappa B) (KUMAR et al., 2011).

Diferentes estudos trazem evidências do papel crítico dos receptores TLR no reconhecimento das micobactérias de modo que os principais TLRs envolvidos na patogênese da TB são TLR2 (DRAGE et al., 2009), TLR4 (ABEL et al., 2002) e TLR9 (BAFICA et al., 2005). A interação entre TLRs com os PAMPs específicos podem desencadear vias de sinalização intracelular dependente do recrutamento de algumas moléculas adaptadoras (MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM) ou uma via independente através da produção de citocinas pró-inflamatórias (KAWAI; AKIRA, 2006).

Após a interação com MyD88 há o recrutamento de outras proteínas adjacentes como membros da família IRAK e TRAF para o complexo que, por conseguinte, ativa as proteínas MAPKs e JNKs e, assim, resultando na ativação de diferentes fatores de transcrição como fatores regulares de interferon (IRF) bem como NF- κ B que induz genes inflamatórios e/ou IFN tipo I (KAWAI et al., 2006). Múltiplos sinais dependentes da proteína adaptadora MyD88, por exemplo, tem sido relacionada a resistência do hospedeiro a micobactérias sendo importante nas respostas pró-inflamatórias geradas na presença do patógeno (FENG et al., 2003).

Além desses, têm sido destacado na imunopatogênese da TB os PRR que formam complexos multiproteicos conhecidos como inflamassoma. Os inflamassomas recrutam caspase-1, uma enzima que ativa formas precursoras de citocinas (pró-IL1 β e pró-IL18) em suas formas ativas (IL1 β e IL18), fundamentais para o controle da infecção, e induzindo a célula infectada com as micobactérias a piroptose (WAWROCKI et al., 2017).

Outro mecanismo utilizado pelos macrófagos ativados após fagocitarem as micobactérias é através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS), moléculas tóxicas para o microrganismo (KUMAR et al., 2011; ZUÑIGA et al., 2012).

Em conjunto, essa primeira linha de defesa entre PRRs-PAMP e as subsequentes cascatas de sinalização intracelular decorrentes desta interação podem resultar na fagocitose, apoptose, autofagia e ativação dos inflamassomas, mecanismos importantes para a defesa do hospedeiro (LIU et al., 2017).

A resposta imune inata é primordial e eficiente para eliminar o bacilo e conter a infecção precocemente dependendo dos fatores relacionados ao hospedeiro e ao bacilo como: exposição, carga bacilar, duração de contato, entre outros (MARTINO et al., 2019). Assim, as

interações do bacilo com o sistema imune inato podem limitar a infecção e regular a imunidade adaptativa (VERRALL et al., 2020; CHAI et al., 2020).

2.3.2 Resposta imune adaptativa

Durante a resposta imune inata, as micobactérias podem evadir do sistema imune através da inibição dos fagossomas (RAMACHANDRA et al., 2001), neutralização das moléculas efetoras dos macrófagos ou estímulos de produção de citocinas inibitórias (IL-10 e TGF- β) no qual favorece seu crescimento e proliferação (BHATT; SALGAME, 2007; ZUÑIGA et al., 2012). Com isso, quantidades crescentes desses antígenos são expostas e o sistema imune do hospedeiro monta respostas específicas contra as micobactérias por meio da interação entre linfócitos com os macrófagos e células dendríticas, desencadeando a imunidade adquirida (BOOM et al., 2003).

A resposta imune adquirida ao patógeno da TB tem início lento em razão das características do próprio bacilo, pois, o mesmo apresenta crescimento lento, e do ambiente relativamente imunoprivilegiado do tecido alveolar regulado com proteína surfactante favorecendo a interação da micobactéria com os macrófagos, fato que limita a capacidade das células dendríticas de responderem à infecção e migrarem para o linfonodo rapidamente (BEHAR et al., 2014).

Nove dias após a infecção, as células dendríticas, que são as mais especializadas na ativação de linfócitos T *naive*, localizadas no parênquima pulmonar, migram com os bacilos internalizados para os linfonodos regionais, iniciando a resposta pelos linfócitos T *naive*. Nos linfonodos, as células dendríticas apresentam peptídeos dos bacilos expressos em moléculas de MHC (Complexo principal de histocompatibilidade) aos linfócitos T *naive* onde os mesmos são ativados, se proliferam e se tornam linfócitos efetores (ZUÑIGA et al., 2012).

O processamento de antígenos proteicos micobacterianos extracelulares ocorre quando as APCs internalizam os antígenos em compartimentos vesiculares (endossomas) através de endocitose ou fagocitose. No interior APCs, à medida que os endossomas se fundem com os lisossomas, enzimas presentes nessas vesículas degradam as proteínas em peptídeos micobacterianos. Enquanto isso, no retículo endoplasmático, as moléculas de MHC de classe II são produzidas e transportadas para o endossoma, onde há os antígenos processados, associada a uma proteína chamada cadeia invariável. Posteriormente, ocorre a degradação da cadeia invariável gerando um fragmento que permanece na fenda da molécula MHC II

denominado CLIP (peptídeo de cadeia invariante associado à classe II). O CLIP é removido pela ação da enzima HLA-DM permitindo a ligação dos peptídeos na molécula MHC. Assim, ocorre a associação do peptídeo a molécula MHC (complexo peptídeo-MHC classe II). Este complexo é transportado e expresso na superfície celular com os antígenos (ROCHE; FURUTA, 2015).

Uma vez formados, esses peptídeos complexados as moléculas de MHC classe II são expressos na superfície celular do APC e potencialmente reconhecidas pelas células T CD4+ *naive*. O início da polarização dos linfócitos T exige a expressão de antígenos micobacterianos em moléculas MHC (sinal 1), comunicação das moléculas coestimulatórias com seus ligantes específicos (sinal 2) e o envolvimento de citocinas inflamatórias para as células T (sinal 3) (BEHAR et al., 2014). Destes, o sinal 1 e 2 são clássicos, sendo a interação com o TCR (Receptor de célula T), o principal sinal (BOOM et al., 2013).

2.3.2.1 Apresentação de antígenos micobacterianos aos linfócitos T CD4+ *naive*

Quando os antígenos micobacterianos são expressos em moléculas MHC na superfície das APCs, estas interagem com linfócitos T CD4+ *naive*. A comunicação ocorre devido os linfócitos T CD4+ *naive* expressarem TCR. O TCR somente consegue reconhecer o antígeno se este estiver expresso em moléculas MHC de classe II. Além deste sinal, tem-se a interação entre moléculas coestimuladoras presentes no linfócito CD28 com seus ligantes específicos CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) expressos na superfície celular da APC (CHEN; FLIES, 2013). Em conjunto, esses dois sinais culminam em eventos celulares como a produção da citocina IL-2 que estimulam a ativação e diferenciação em subconjuntos de linfócitos T CD4+ bem como medeia a interação entre os linfócitos B específicos para o antígeno e os linfócitos T auxiliares. Isso promove a sobrevivência de linfócitos T efetores específicos para o antígeno, tentando controlar a infecção (ROCHE; FURUTA, 2015).

Dependendo do microambiente de citocinas, a resposta efetora será direcionada, principalmente, em diferenciação de linfócitos T *naive* em T_{H1} produtores de uma importante citocina envolvida no controle da infecção pelo bacilo da TB chamada IFN- γ . Além do IFN- γ , há produção também de TNF e GM-CSF (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) (DENNIS, 1991). O IFN- γ ativa macrófagos regulando iNOS (sintase de óxido nítrico induzível) e a síntese de NO (óxido nítrico), importantes moléculas envolvidas na eliminação do bacilo (KUMAR et al., 2011) e parece modular o processamento de antígenos

no fagossoma em humanos na tuberculose (BOBADILLA et al., 2013). Da mesma forma que o IFN- γ , o TNF também pode ativar macrófagos de forma isolada ou em conjunto com IFN- γ , induzir a apoptose dos macrófagos infectados com o bacilo bem como favorecer integridade do granuloma (BEHAR et al., 2014). Assim, essas citocinas cooperam para eliminação do patógeno e controle da infecção (HOSSAIN, NORAZMI, 2013).

Como visto, após a ativação em linfócitos T CD4 efetores ocorrerá a expansão clonal e proliferação, resultando em respostas direcionadas as células-alvo que expressam o antígeno específico para o patógeno. Embora a resposta T_H1 seja a predominante na resposta imune a TB, ocorrem também diferenciação em linfócitos T_H2 (RAJA, 2004) e T_H17 (ETNA et al., 2014).

A produção das citocinas TGF- β (MANGAN et al., 2006) e IL-6 (VELDHOEN et al., 2006) contribuem para que algumas subpopulações de linfócitos T CD4+ *naive* se diferenciem em T_H17, células produtoras da citocina pró-inflamatória IL-17 que é composta por 6 isoformas (IL-17A a IL-17F) (KOLLS; LINDÉN, 2004). IL-17A parece contribuir no recrutamento de neutrófilos para o pulmão e células T produtoras de IFN- γ (KHADER et al., 2007) bem como na construção do granuloma, amplificando a resposta contra o bacilo (SCRIBA et al., 2008). Adicionalmente, IFN- γ regula a indução dessas células (CRUZ et al., 2006).

2.3.2.2 Apresentação de antígenos micobacterianos aos linfócitos T CD8+*naive*

Os linfócitos T CD8+ são importantes células na defesa contra o bacilo causador da TB visto que as micobactérias podem residir em vacúolos no interior da célula ou os antígenos serem produzidos intracelularmente e, assim, estes precisam ser processados e apresentados via MHC de classe I aos linfócitos T CD8+ conferindo resistência à infecção (FLYNN et al., 1992; SOUSA et al., 2000; VAN PINXTEREN et al., 2000; LEWINSOHN et al., 2007).

Classicamente, o processamento dos antígenos micobacterianos citoplasmáticos envolve, principalmente, a clivagem por complexos enzimáticos com atividade proteolítica chamados de proteassomas. As proteínas citosólicas direcionadas a esse complexo enzimático são marcadas com várias ubiquitinas para serem degradadas em peptídeos neste proteasseoma. Uma vez clivados, os peptídeos gerados são entregues ao retículo endoplasmático (RE) por meio das TAPs (Transportadoras associadas ao processamento de

antígenos) presentes na membrana do RE e se ligam as moléculas de MHC de classe I sintetizadas recentemente, ligadas ao TAP através da glicoproteína tapasina. No RE, as ERAPs (aminopeptidases residentes no retículo) checam e aparam o peptídeo quanto ao tamanho adequado para ser ligado a fenda da molécula (VAN KAER, 2002). A tapasina libera o complexo peptídeo-MHC de classe I e assim são transportados para a membrana plasmática para posterior apresentação aos linfócitos T CD8⁺ (PFEIFER et al., 1993; LEWINSOHN et al., 2006).

A apresentação de antígenos micobacterianos do MHC de classe I envolve além dos sinais 1 e 2 descritos anteriormente, um sinal 3 gerado pelas citocinas IL-12 e IFN do tipo 1. Uma vez ativados, os linfócitos T CD8⁺ se diferenciam em linfócitos T citotóxicos e conseguem eliminar as células infectadas com micobactérias através da exocitose de grânulos citotóxicos, interação do Fas com o FasL e secreção de TNF no qual resulta na apoptose da célula infectada (FLYNN; CHAN, 2001). Outro aspecto importante que amplifica ainda mais as respostas contra o bacilo é a produção de citocina IFN- γ , IL-2 e IL-21 pelos linfócitos T CD4⁺ que aprimoram e regulam as respostas exercidas pelos linfócitos T CD8⁺ de modo que ambas as células cooperam entre si para o controle da infecção (GREEN et al., 2013).

No decorrer deste processo, após a eliminação do bacilo, a maioria dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ efetores sofrem apoptose e pequenas populações desses linfócitos se tornam células de memória circulantes que respondem ao antígeno no local da infecção e podem se diferenciar em células T CD8⁺ efetoras de forma mais rápida e produzindo citocinas (JASENOSKY et al., 2015).

Adicionalmente, dependendo da natureza do antígeno, se este for de natureza lipídica, glicolipídeos ou lipopeptídeos derivados de *M. tuberculosis* (ácidos micólicos e fosfatidil inositol-manosídeo) podem ser apresentados em moléculas semelhantes ao MHC chamadas de CD1 aos receptores de células T $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (TCR). Essa interação permite a síntese de IFN- γ pelas células T que atuam na eliminação dos macrófagos infectados (COHEN; BRENNER, 2009).

Essas células efetoras migram do linfonodo através da circulação e se direcionam para o pulmão devido aos recorrentes estímulos inflamatórios locais. Nos pulmões, as células efetoras específicas para o antígeno ativam as células fagocíticas infectadas com as micobactérias, amplificando a resposta com o intuito de interromper a proliferação micobacteriana. Os linfócitos T CD4⁺ interagem diretamente com MHC de classe

II em macrófagos infectados com *M. tuberculosis* e com células dendríticas. Os linfócitos T CD8⁺ reconhecem antígenos micobacterianos através de MHC de classe I exercendo função de lise das células infectadas com o bacilo através da liberação de grânulos (perforina, granulicina) (MARTINO et al., 2019). Se neste momento, o sistema imune não falhar e se tornar resistente a presença do bacilo, a resposta tem duração de 18 a 20 dias para conter a infecção (COOPER, 2009).

Na resposta imune à TB, existem diversificadas respostas pelos linfócitos T e isso possibilita que uma variedade de antígenos micobacterianos sejam reconhecidos e, por conseguinte, haja uma maior capacidade de identificar a presença do microrganismo (BOOM et al., 2003).

Além disso, devido aos estímulos inflamatórios persistentes na região do pulmão, a produção de citocinas pelos linfócitos T CD4⁺ (TNF e IFN- γ) e a expressão de algumas quimiocinas (CCL3) favorecem o recrutamento de macrófagos, neutrófilos e linfócitos B, que podem resultar na formação do granuloma (ULRICHS; KAUFMANN, 2006).

O granuloma é um conjunto de células do sistema imunológico caracterizado na TB humana por uma região central por tecido necrótico acelular caseoso rodeado pelas células que o constituem como os macrófagos ativados, células epitelioides e células gigantes de Langhans, assim como linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, linfócitos B, neutrófilos, células dendríticas e fibroblastos (SAUNDERS et al., 2007). Este processo se torna um campo de batalha dinâmico com vestígios tanto do patógeno quanto do hospedeiro e o resultado da sua formação ainda é controverso visto que pode controlar a proliferação das micobactérias nos macrófagos, ao mesmo tempo em que pode causar danos teciduais e ser um microambiente que permite a manutenção da infecção (RAMAKRISHNAN, 2012; SHALER et al., 2013).

O estabelecimento persistente da infecção contribui para a proliferação e expansão das células T reguladoras (Tregs) na resposta imune a TB. As células Treg suprimem as respostas T_H1 com consequente inibição de IFN- γ favorecendo a persistência da infecção ao tentar limitar as respostas dos linfócitos T (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006; SCOTT-BROWNE et al., 2007; RAHMAN et al., 2009). De forma complementar, no decorrer da infecção crônica há deficiência gradual e progressiva da atividade dos linfócitos T e citocinas produzidas bem como aumento da expressão de receptores inibitórios (PD-1) (BEHAR et al., 2014).

Assim, o sistema imune do hospedeiro é capaz de eliminar o bacilo através da resposta imune inata ou os indivíduos podem desenvolver a TB ativa após a exposição as micobactérias ou controlar a proliferação das micobactérias permanecendo durante anos no tecido infectado estabelecendo uma infecção latente (ou assintomática) ou a TB latente ser ativada em situações de imunossupressão (MARTINO et al., 2019).

2.4 Sistema de antígenos leucocitários humanos (Sistema HLA)

O sistema HLA consiste em um conjunto de genes abundantemente polimórficos pertencentes a região do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) contendo aproximadamente 4 milhões de bases de comprimento (HUGH et al., 1984; CHOO, 2007). Este complexo é responsável por codificar proteínas envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos T em humanos, sendo assim consideradas componentes chave na regulação das respostas imunes adaptativas e na vigilância imunológica na defesa contra microrganismos invasores (BODMER, 1997), além do seu importante papel na rejeição de transplantes (MONTGOMERY et al., 2018).

Em humanos, devido a molécula HLA ter sido identificada pela primeira vez na superfície dos leucócitos recebeu o nome de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA - *Human leukocyte antigens*) (DAUSSET, 1984; DAUSSET, 1999; THORSBY, 2009). Com mais de 220 genes de diferentes funções e considerados os mais polimórficos do genoma humano, o sistema HLA é constituído por três regiões denominadas HLA de classe I, II e III classificadas segundo os critérios que envolvem a estrutura das moléculas produzidos e a função dos mesmos. Estas regiões situam-se no mesmo *loci* no braço curto do cromossomo 6 na banda 6p21.31 (BORGAONKAR; BIAS, 1974; FRANCKE; PELLEGRINO, 1977) **(Figura 1)**.

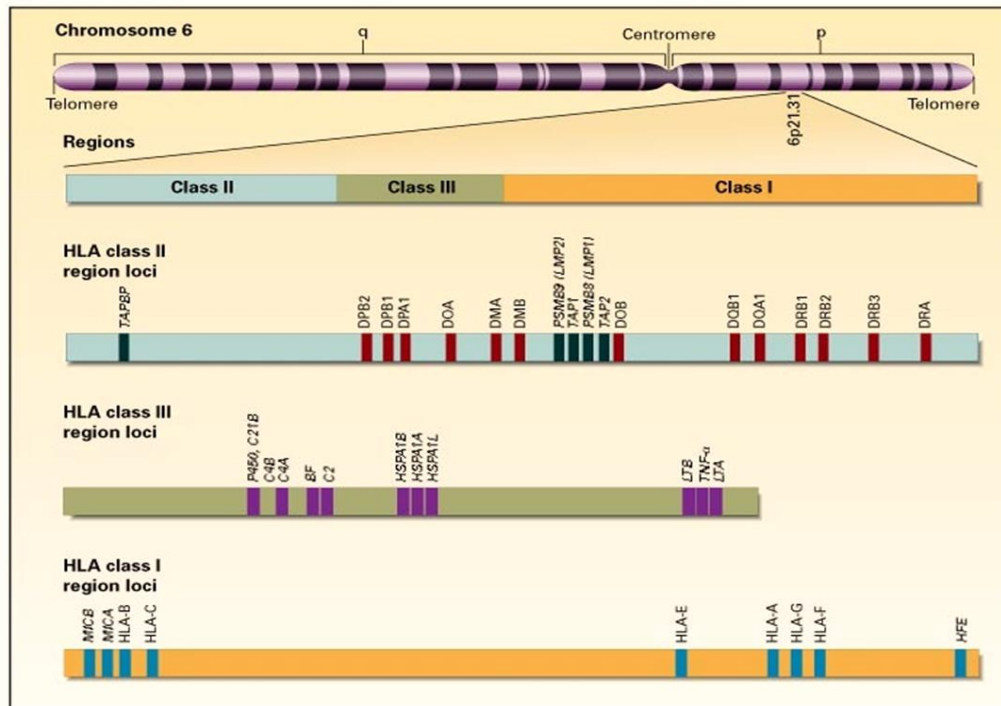


Figura 1: Estrutura gênica do sistema HLA com as regiões de classe I, II e III. Fonte: Adaptado de Klein et al., 2000.

Cada região é constituída por diferentes genes, sendo alguns relacionados diretamente a resposta imune na apresentação e reconhecimentos de antígenos (principalmente, os genes da região HLA-I e II) e os que embora não envolvidos diretamente na apresentação de antígenos, estes codificam moléculas regulatórias importantes para a defesa do sistema imunológico contra microrganismos invasores (principalmente, os genes da região HLA-III) (KLEIN et al., 2000).

No *locus* HLA de classe I, os genes estão localizados na região telomérica do MHC sendo responsáveis por codificar tanto proteínas clássicas HLA-A, HLA-B e HLA-C quanto as não clássicas HLA-E, HLA-F, HLA-G. Nesta região localizam-se também os genes *MICA* e *MICB* (RIZZO et al., 2016).

Em relação a estrutura da glicoproteína HLA de classe I, esta é um heterodímero, composta por duas cadeias polipeptídicas (α e β). A cadeia α (cadeia pesada e longa) apresenta os seguintes domínios: $\alpha 1$, $\alpha 2$ (ambos domínios de ligação do peptídeo) e $\alpha 3$ (domínio semelhante a imunoglobulina) que estão dispostos na região extracelular continuado por uma porção transmembrana hidrofóbica que ancora a molécula na membrana celular e uma cauda citoplasmática hidrofílica (**Figura 2**) (GOLDBERG; RIZZO, 2015). No domínio

$\alpha 3$ que o CD8 se liga. A cadeia curta β (beta-2-microglobulina) é codificada por outros genes fora do cromossomo 15. A molécula de HLA classe I está presente na superfície da membrana das células nucleadas e também na superfície de plaquetas (KLEIN et al., 2000).

A associação da $\beta 2$ -microglobulina com a cadeia α , importante para manter a conformação adequada da molécula, é através de ligação não covalente. Após o processamento, os peptídeos são carregados na fenda de ligação formada pelos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ de modo que permite a ligação de cerca de 8-10 aminoácidos (STROMINGER, 1987). A proteína HLA de classe I acopla peptídeos que serão reconhecidos pelo Receptor de linfócitos T (TCR) dos linfócitos T CD8+ citotóxico, principalmente em respostas virais e neoplásicas, mas também com participação na resposta imune a tuberculose (SOUSA et al., 2000).

Na região do HLA de classe II, os genes localizam-se na região mais centromérica do cromossomo codificando moléculas heterodímeras que podem ser clássicas HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP e não clássicas HLA-DM e HLA-DO. A denominação destes genes é em forma de letras no qual a primeira letra indica a classe (D) e a segunda é referente a família (R, Q, P, M e O) podendo vir seguido da cadeia (α ou β) (KLEIN et al., 2000b).

Estruturalmente, a glicoproteína é composta por duas cadeias polipeptídicas (α e β) de modo que a cadeia α tem os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e a cadeia β , os domínios $\beta 1$ e $\beta 2$, ambos domínios presentes no exterior da célula continuado por uma porção transmembrana hidrofóbica que ancora a molécula na membrana celular e uma cauda citoplasmática hidrofílica (**Figura 2**). No domínio $\beta 2$ que a molécula CD4 interage com a molécula HLA que pode estar presentes em células apresentadoras de antígenos como macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e células epiteliais tímicas (ROCHE; FURUTA, 2015). A fenda de ligação dos peptídeos é aberta entre a região aminoterminal $\alpha 1$ e $\beta 1$ no qual é possível a ligação de cerca de 13-25 aminoácidos que podem se prolongar para o lado externo da fenda. Uma vez codificada, a proteína HLA de classe II acopla peptídeos que serão reconhecidos pelo receptor de linfócitos T (TCR) dos linfócitos T CD4+ auxiliares, desempenhando importantes papéis na resposta imune (WILLIAMS, 2001).

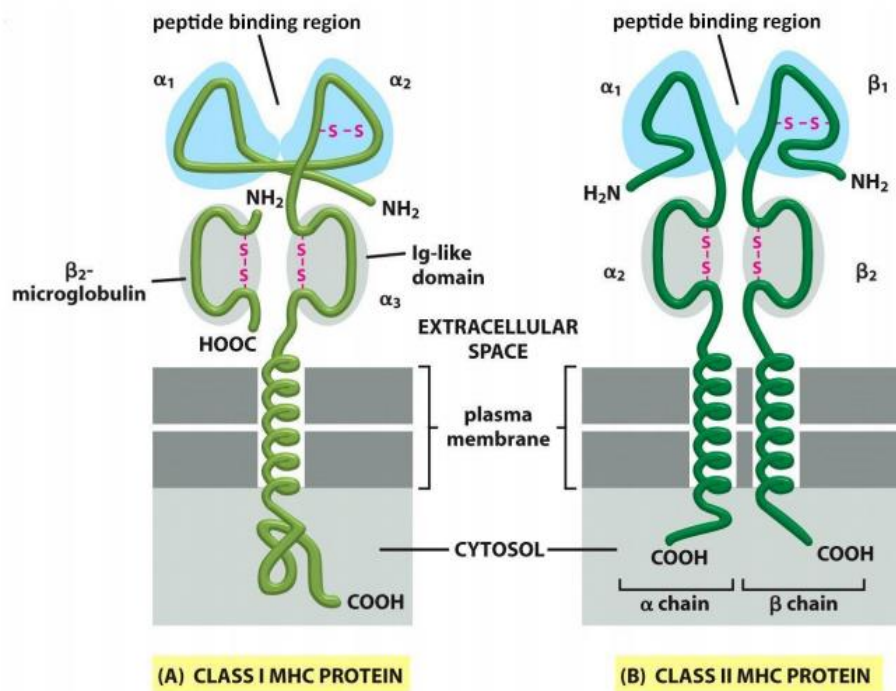


Figura 2: Estrutura da molécula MHC I e II com seus domínios. Fonte: Adaptado Alberts et al. 2008.

Finalmente, o HLA de classe III, os genes estão localizados entre as regiões de classe I e II e codificam moléculas envolvidas na regulação da resposta imune bem como na cascata inflamatória, por exemplo: proteínas do sistema complemento, hidroxilase, TNF e linfotoxinas (CHOO, 2007).

Um fato interessante sobre o sistema HLA é a sua diversidade molecular e graças ao avanço nas técnicas moleculares é possível identificar inúmeros alelos. Essas informações são continuamente atualizadas devido a complexidade do sistema e isso tem contribuído na elucidação de dados desconhecidos (SHIINA; KULSKI, 2004). Atualmente, existem 38.416 HLA e alelos relacionados para cada gene descritos nas bases de dados. Na **Tabela 1** tem-se o número de alelos para cada gene, até o presente momento, disponível no site <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>.

Tabela 1: Número de alelos referentes a cada HLA.

Glicoproteína	Números de alelos HLA
Alelos HLA Classe I	25.844
Alelos HLA Classe II	10.970
Alelos HLA	36.814
Outros alelos não HLA	805
Número de alelos confidenciais	03

Fonte: Disponível em <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>.
Último acesso em: 14 de novembro de 2023.

Além disso, devido a região gênica do HLA ser considerado altamente polimórfico e centenas de alelos continuamente sendo identificados para cada gene (**Tabela 1**), a nomeação de cada alelo HLA tem um número exclusivo correspondente apresentando até quatro conjuntos de dígitos separados por dois pontos representando a designação numérica do alelo. O Comitê de Nomenclatura dos Fatores do Sistema HLA da Organização Mundial da Saúde através de workshops internacionais de histocompatibilidade normatizou a denominação dos alelos da seguinte forma (**Figura 3**) (Instituto de Bioinformática Europeia, 2020):

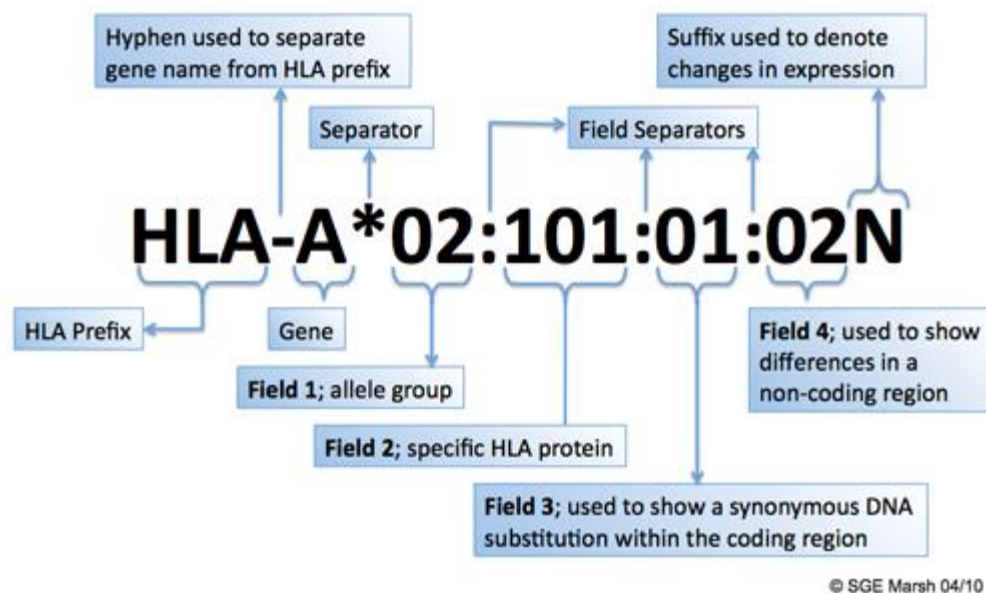


Figura 3: Nomenclatura para alelos HLA. Legenda: Nomenclatura para alelos de HLA de classe I. Disponível em <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>.

Em relação aos alelos HLA de classe II segue a mesma regra da nomenclatura para alelos HLA classe I com a adição das cadeias α e β representadas pelas letras A e B, respectivamente, devido apresentarem mais de uma cadeia polimórfica. No exemplo *HLA-*

*DRB1*13:01:01:02* apresenta um locus *HLA-DRB1* no qual a faz parte da classe D, família R, cadeia beta e a designação numérica (Instituto de Bioinformática Europeia, 2020).

De maneira geral, além do envolvimento na indução e apresentação de antígenos durante a resposta imune adaptativa, os produtos gerados pelo complexo sistema HLA são diversos como por exemplo: receptores, moléculas sinalizadoras e reguladoras que medeiam respostas inflamatórias, assim como interações com as células *natural killer* importantes na resposta imune inata (SHIINA et al., 2009).

2.4.1 Genes HLA de classe I

Os genes HLA de classe I localizados na região mais telomérica do MHC são responsáveis por codificar proteínas clássicas HLA-A, HLA-B e HLA-C, não clássicas HLA-E, HLA-F e HLA-G como também apresentam os genes relacionados a cadeia de MHC de classe I (MIC) (**Figura 4**). Os genes clássicos são mais polimórficos quando comparadas com os genes não clássicos (THORSBY, 2009). Embora estudos tenham descrito que o HLA-B é o *locus* mais significativo e polimórfico da classe I, seguido do HLA-A e HLA-C, outros *locus* (HLA-E, F, G, H, J, K e L) podem não ser importante como locus para a função de apresentadores de peptídeos, mas podem sim influenciar na regulação da resposta (SHANKARKUMAR ET AL., 2004). Os locus HLA-H, -J, -K, -L, -N, -P, -S, -T, -U, -V, -W e -Y são sequências nucleotídicas de DNA com estruturas semelhantes a genes, mas não são transcritas e, consequentemente, não geram produtos proteicos associados denominados pseudogenes (WILLIAMS, 2001).

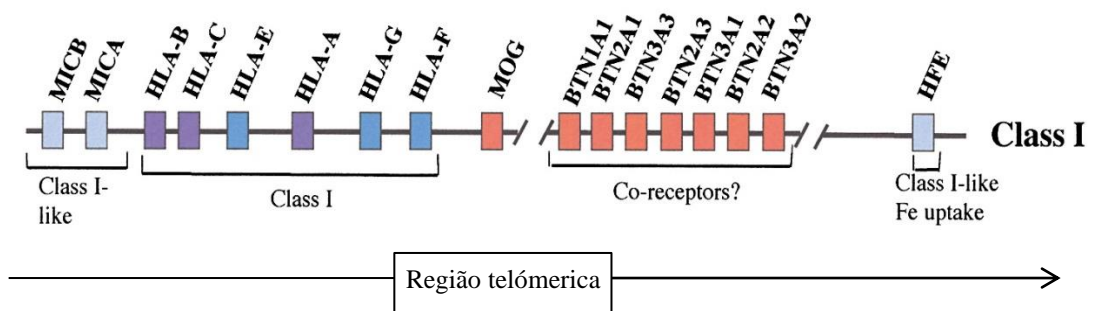


Figura 4: Genes localizados na região do sistema HLA de classe I. Fonte: Adaptado de TROWSDALE, 2001.

Dentre os HLAs não clássicos citados, o HLA-E e o HLA-G são bastante investigados e demonstraram ter funções importantes na TB. O antígeno leucocitário humano E (HLA-E) é uma molécula deste grupo que vem ganhando destaque pelas suas funções moduladoras tanto na imunidade inata quanto adaptativa bem como pela sua participação na imunopatogênese da

TB (JOOSTEN et al., 2010; CACCAMO et al., 2015; VAN MEIJGAARDEN et al., 2015; McMURTREY et al., 2017; PREZZEMOLO et al., 2018).

O HLA-E se caracteriza por sua limitada variabilidade alélica e é expresso fisiologicamente em diferentes tecidos, células imunológicas e, principalmente, células endoteliais, mas a sua expressão pode variar dependendo da condição patológica. Estruturalmente, a molécula HLA-E apresenta uma cadeia pesada sustentada na membrana e uma cadeia leve (β 2-microglobulina) (JOOSTEN et al., 2016).

Dentre as inúmeras funções descritas para o HLA-E tem-se apresentação de antígenos provenientes de sequências sinais compartilhadas por outros membros de HLA-I às células NK regulando a citotoxicidade dessas células, apresentar aos linfócitos T CD8⁺ sequências específicas de antígenos para posterior ativação, expansão clonal e geração de linfócitos T de memória (O'CALLAGHAN et al., 1998; LI et al., 2001; GROTZKE et al., 2009; JOOSTEN et al., 2016). O peptídeo complexado a molécula HLA-E pode interagir com receptores estimuladores (CD94/NKG2C) ou inibidores (CD94/NKG2A) das células NK (BRAUD et al., 1998; LEE et al., 1988; WADA et al., 2004) como também podem apresentar peptídeos aos TCR $\alpha\beta$ dependente de CD8 (PIETRA et al., 2001; CACCAMO et al., 2015; JOOSTEN et al., 2016).

Estudos demonstram que peptídeos do bacilo causador da TB podem ser apresentados por HLA-E aos linfócitos T CD8⁺ (HEINZEL et al., 2002; JOOSTEN et al., 2010; CACCAMO et al., 2015; VAN MEIJGAARDEN et al., 2015; McMURTREY et al., 2017; PREZZEMOLO et al., 2018). Na infecção por *M. tuberculosis*, estudos mostram que nos fagossomas podem ocorrer o processamento com degradação proteossomal e transporte com moléculas TAP e apresentação destes antígenos fagossomais por uma via alternativa retículo endoplasmático-fagossoma. Nessa vesícula há uma expressão aumentada de HLA-E e esse fato favorece a apresentação de peptídeos fagossomais em comparação com os demais membros de classe I (GUERMONPREZ et al., 2003; HOUDE et al., 2003; GROTZKE et al., 2009).

Além da TB, a expressão e apresentação de antígenos em moléculas HLA-E já foi demonstrado em infecções por citomegalovírus (ULBRECH et al., 2000; PIETRA et al., 2003; ROMAGNANI et al., 2004), vírus Epstein–Barr (JORGENSEN et al., 2012), vírus da hepatite C (SCHULTE et al., 2009), *Salmonella typhi* (SALERNO-GONÇALVES et al., 2004).

Além do HLA-E, outro gene que tem sido explorado devido a suas funções imunorregulatórias é o HLA-G (RIZZO et al., 2016). Primeiramente identificado em células coriocarcinomas (ELLIS et al., 1896), o antígeno leucocitário humano G (HLA-G) foi caracterizado por apresentar variantes restritas expresso fisiologicamente na superfície de células fetais chamadas trofoblastos (KOVATS et al., 1990), tecidos imunoprivilegiados ilhotas pancreáticas (CIRULLI et al., 2006), córnea (LE DISCORDE et al., 2003), precursores de linhagens eritrocíticas e endoteliais (MENIER et al., 2004), timo em adultos (MALLET et al., 1999) e líquido amniótico (HACKMON et al., 2004) ou na forma solúvel, produzidos por monócitos (NGUYEN-LEFEBVRE et al., 2016). O HLA-G possui sete isoformas de proteínas (HLA-G1 a G7) sendo as isoformas G1 a G4 acopladas a membrana e as G5 a G7 apresentam-se na forma solúvel (PAUL et al., 2000).

O HLA-G se assemelha estruturalmente as moléculas clássicas de HLA de classe I de modo que as isoformas G1 a G7 apresentam em comum no mínimo um domínio $\alpha 1$ e uma encurtada cauda citoplasmática. O HLA-G1 é a isoforma mais completa quanto as características estruturais e a isoforma HLA-G7 constituída apenas pelo domínio $\alpha 1$ (**Figura 5**) (DONADI et al., 2011).

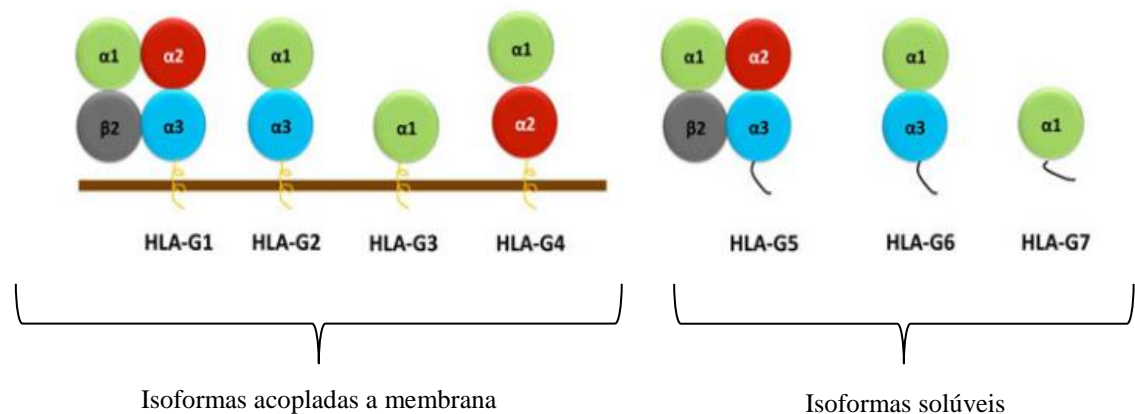


Figura 5: Isoformas da molécula HLA-G e seus respectivos domínios. Fonte: Adaptado de DONADI et al., 2011.

Diferentemente de outras moléculas HLA de classe I, o HLA-G não interage com receptores TCR e sim a receptores leucocitários inibitórios conhecidos como ILT2 (*Immunoglobulin-like transcript 2*) presentes em linfócitos, células dendríticas, macrófagos e células NK e ILT4, expressos restritamente em linhagens mielóides (células dendríticas, macrófagos e monócitos), e KIR2DL4 (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) expressos em células NK e linfócitos T CD8+. Além disso, o HLA-G possui maior afinidade de

interação com ILT4 em relação as demais moléculas HLA-A, HLA-B e HLA-C (SHIROISHI et al., 2003).

Estudos têm demonstrado o papel inibitório da HLA-G sobre diversas células efetoras da resposta imune como linfócitos T CD4+, T CD8+, células NK e lise de células T $\gamma\delta$ bem como efeitos sobre a maturação e funcionalidade das APCs (CAROSELLA et al., 2008). Adicionalmente, tem sido destacado a função tolerogênica da molécula HLA-G de inibir a proliferação dos linfócitos T CD4+ resultando em apoptose das células T CD8+ e indução das células T reguladoras supressoras (SAURABH et al., 2016).

A expressão do HLA-G é induzida em diversas condições patológicas, como infecções virais (HIV, citomegalovírus, vírus da influenza A, vírus do papiloma humano, hepatite B e C), bacterianas (*Pseudomonas aeruginosa*, *H. pylori*) (AMIOT et al., 2014; RIZZO et al., 2017), parasitárias (leishmaniose visceral) (DONAGHY et al., 2007), doenças inflamatórias, autoimunes (lúpus eritematoso sistêmico) transplantes e neoplasias malignas (LEMAOULT et al., 2003; MORANDI et al., 2016).

Na TB, embora a função do HLA-G não seja completamente esclarecida e expressões desta molécula foram demonstradas na TB (ZHAO et al., 2005), um estudo realizado por Saurabh et al. (2016) destacam o papel promissor como biomarcador desta molécula nas diferentes formas clínicas de TB ao avaliarem o perfil de expressão tanto do HLA-G ligado à membrana quanto do HLA-G solúvel, na TB pleural comparada a TB miliar.

Neste mesmo estudo foi demonstrado níveis elevados do HLA-G solúvel em pacientes com TB miliar quando comparados a TB localizada ativa, sugerindo que este aumento do HLA-G solúvel pode estar mediando a indução de FoxP3 e aumento da IL-10 pelas células T regulatórias, fato este que pode estar favorecendo a imunossupressão e evolução para a forma disseminada da doença (SAURABH et al., 2016).

Adicionalmente, outro achado que traz evidências da participação desta molécula na TB foi após o bloqueio do HLA-G que resultou no aumento significativo da produção de IFN- γ e TNF- α por linfócitos T em pacientes com TB pleural, indicando que o HLA-G suprime a produção de IFN- γ e TNF- α por células T (SAURABH et al., 2018). A interação da molécula HLA-G com receptores dos linfócitos T (ILT4) parece aumentar a produção de citocinas com perfil Th2 (IL-10, IL-4 e IL-13) e diminuir as citocinas com perfil Th1 (IFN- γ , IL -2 e TNF- α), importantes citocinas envolvidas no controle da infecção por micobactérias. Associados a

esses fatores, a elevada expressão do HLA-G nas neoplasias malignas e nas infecções virais bem como nas infecções bacterianas podem favorecer a evasão desses agentes do sistema imune do hospedeiro (KANAI et al., 2001).

Além disso, pesquisas têm destacado o papel imunomodulador do HLA-G em algumas condições patológicas no qual pode contribuir para evasão de microrganismos devido a supressão das respostas do sistema imune e assim favorecer a disseminação do patógeno no hospedeiro (DONADI et al., 2011; FAINARDI et al., 2011).

Adjacente ao locus dos genes clássicos HLA-B e HLA-C têm-se alguns membros da família dos genes *MIC*: *MICA* (*Major histocompatibility complex class I chain-related genes A*) e o gene *MICB* (*Major histocompatibility complex class I chain-related genes B*) considerados genes funcionais que codificam uma glicoproteína de superfície celular relacionada com a cadeia de classe I do MHC (**Figura 6**) (BAHRAM et al., 1994).

Estruturalmente, as moléculas codificadas pelos genes *MICA* e *MICB* contêm três domínios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), um domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática sendo que não estão associadas a um domínio $\beta 2$ -microglobulina. Cada domínio é codificado por uma região exônica distinta (**Figura 6**) (BAHRAM et al., 1994; FODIL et al., 1996; BARANWAL; MEHRA, 2017). Além desses, faz parte dessa família de genes outros cinco conhecidos como pseudogenes (*MICC*, *MICD*, *MICE*, *MICF* e *MICG*) situados ao longo da região de classe I (BAHRAM et al., 1996).

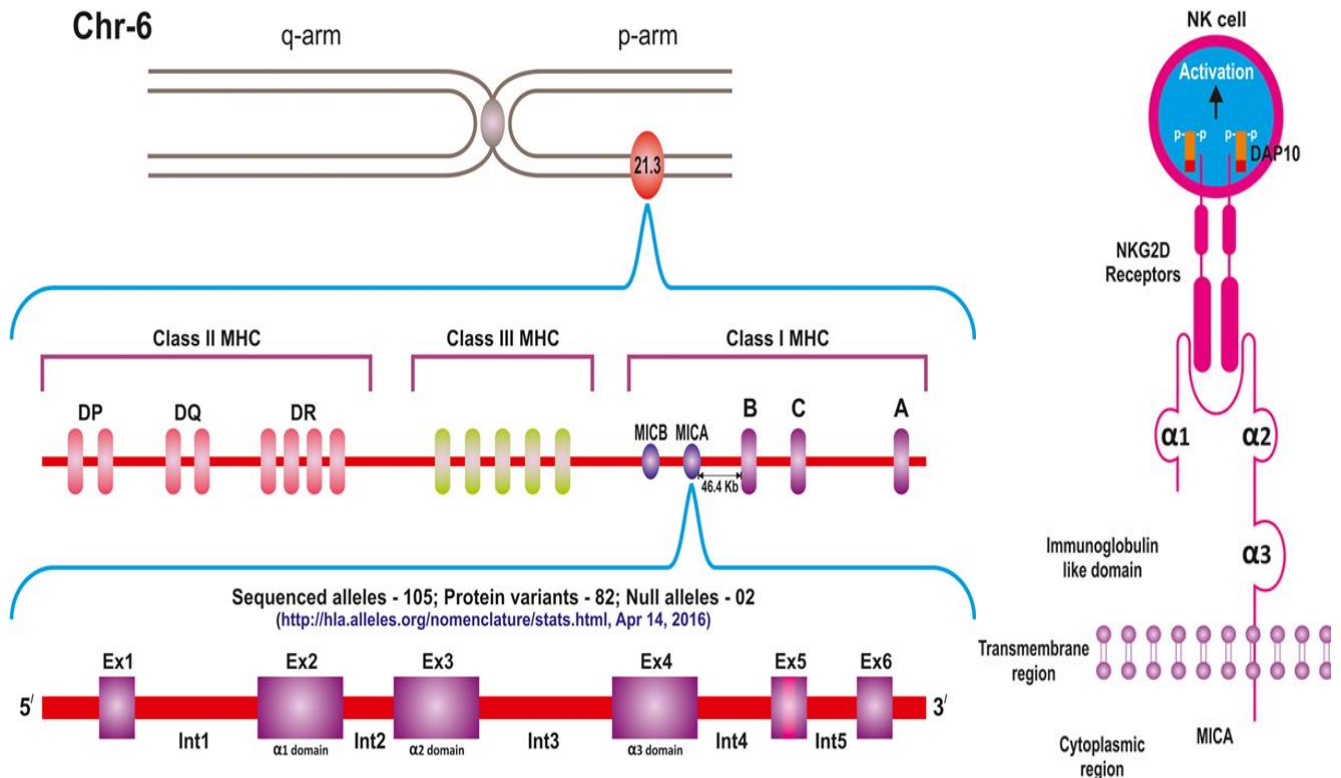


Figura 6: Localização genética dos genes *MIC* na região do HLA de classe I e a proteína codificada MICA. Membros da família dos genes *MIC*, *MICA* e *MICB*, localizam-se na região do MHC de classe I e estruturas proteicas são codificadas por exons diferentes. O exon 2 codifica o domínio $\alpha 1$, exon 3 o domínio $\alpha 2$, o exon 4 o domínio $\alpha 3$, exon 5 codifica a região transmembranar e o exon 6 a cauda citoplasmática. Fonte: Adaptado de BARANWAL; MEHRAI, 2017.

Em relação aos genes *MIC*, o *MICA* é o mais estudado e caracterizado em comparação com *MICB*. A proteína MICA é expressa em condições de estresse ou lesão celular em diferentes tecidos e células como monócitos, endoteliais, fibroblastos, epitélio gástrico, queratinócitos (ZWIRNER et al., 1997; ZWIRNER et al., 1999). Embora a proteína MICA não seja expressa em linfócitos T e B em repouso, a expressão desta pode ser estimulada pela produção de IL-2 e resultar numa baixa expressão em linfócitos T CD4⁺ ativadas (MOLINERO et al., 2006). A proteína MICA apresenta formas acopladas a membrana e solúvel (MICAs) (SCHRAMBACH et al., 2007).

As proteínas MICA não estão envolvidas na apresentação de antígenos aos receptores TCR dos linfócitos T devido a disposição da própria estrutura molecular que é desordenada e flexível do sulco da hélice $\alpha 2$ (SCHRAMBACH et al., 2007), mas essas proteínas interagem com receptores ativador NKG2D presentes na superfície das células *natural killer*, linfócitos T $\gamma\delta$ e T CD8⁺ $\alpha\beta$ (LANIER et al., 2005) resultando em uma atividade citotóxica das células que expressam MICA e, assim, eliminando estas células estressadas (BAUER et al., 1999; BAHRAM et al., 2005; BARANWAL; MEHRA, 2017).

Estudos têm demonstrado que em infecções bacterianas, virais e em neoplasias há aumento da expressão MICA sinalizando que a célula está em sofrimento ou perigo e a interação de MICA com receptores NKG2D resulta na eliminação das células infectadas (DAS et al., 2001). Na infecção por *M. tuberculosis*, poucos estudos experimentais em modelos animais foram conduzidos para avaliar a participação desta proteína na imunopatogenia da doença, mas diante das inúmeras funções e a relação existente entre interação dos receptores NKG2D das células NK com MICA liberar IFN- γ , uma citocina chave na resposta imune a TB, torna-o um importante gene a ser estudado (SOUZA et al., 2012; CHEN et al., 2019).

Diante do exposto, os genes HLA de classe I que codificam importantes proteínas envolvidas na apresentação de antígenos bem como na modulação das respostas imunológicas certamente são moléculas que representam um alvo promissor de investigação na área da imunologia, principalmente no contexto de doenças infecciosas (JOOSTEN et al., 2016).

2.4.2 Genes HLA de classe II

Como visto, os genes de HLA classe II estão localizados na região mais centromérica do cromossomo contendo os genes HLA-D com as seguintes sub-regiões HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP, genes clássicos, e não clássicos HLA-DM e HLA-DO. Cada molécula HLA-DR, DP e DQ apresentam uma ou mais sub-regiões com os genes A e B, responsáveis por codificar as cadeias α e β da molécula. A família de genes DR contem único gene DRA, que não apresentam variantes, enquanto a família DRB tem até nove genes DRB (DRB1 a DRB9) (CHOO, 2007). Outra característica desta região é que genes considerados não-HLA estão presentes neste *locus*, por exemplo: transportador associado ao processamento de antígeno *TAP1* e *TAP2* (TROWSDALE; KNIGHT, 2013), *PSMB8* e *PSMB9* responsáveis por codificar subunidades com propriedades catalíticas do proteassoma relacionados a degradação de proteínas (VAN KAER, 2002) e *TAPBP*, codifica a proteína de ligação a TAP (TENG et al., 2002) (**Figura 7**).

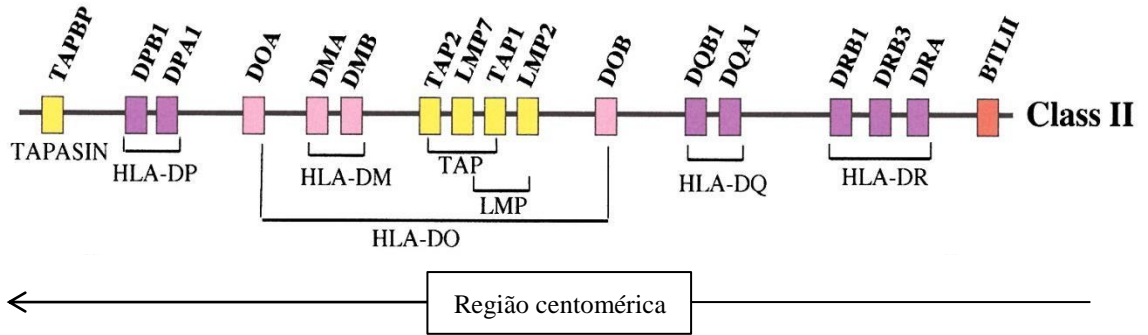


Figura 7: Genes localizados na região do sistema HLA de classe II. Fonte: Adaptado de TROWSDALE, 2001.

Os genes clássicos codificam proteínas HLA de classe II chaves para respostas imunes adaptativas, pois além de serem proteínas centrais na apresentação de peptídeos ao receptor das células T CD4⁺ e serem necessárias para a autotolerância, variações genéticas nessa região têm sido associadas a diferentes doenças autoimunes, inflamatórias e infecciosas (HANDUNNETHI et al., 2010).

As moléculas HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP são codificadas por diferentes *locus* no gene no qual apresentam cerca de 70% de semelhanças. Uma grande característica destas moléculas é a diversidade de variantes existentes. As variantes destas moléculas estão presentes nos seus respectivos domínios sendo para HLA-DR localizados no domínio β 1 e para as moléculas HLA-DQ e HLA-DP nos domínios α 1 e β 1, locais de ligação de peptídeos (DONADI, 2000). Dentre os HLAs de classe II clássicos, o HLA-DR é o mais extensivamente pesquisado e HLA-DP pouco se têm estudos sobre essa molécula em comparação com os demais (VAN LITH et al., 2010).

Atualmente, já foram descritos 10970 alelos para HLA de classe II sendo 65 alelos para o gene *DRA*, 4530 para *DRB*, 688 para *DQA1*, 42 para *DQA2*, 2491 para *DQB1*, 619 para *DPA1*, 5 para *DPA2*, 2393 para *DPB1*, 6 para *DPB2*, 58 para *DMA*, 82 para *DMB*, 92 para *DOA* e 63 para *DOB*. Para o gene *DRB* tem-se 3,588 alelos para *DRB1*, 1 para *DRB2*, 482 para *DRB3*, 248 para *DRB4*, 199 para *DRB5*, 3 para *DRB6*, 2 para *DRB7*, 1 para *DRB8* e 6 para *DRB9* (Instituto de Bioinformática Europeu-EBI/IMGT-HLA, 2023).

Diferentemente, os genes não-clássicos codificam proteínas que embora semelhantes a cadeia α e β do HLA de classe II, não ocorre expressão na superfície celular e suas funções estão ligadas ao carregamento de peptídeos de moléculas HLA classe II em compartimentos endossômicos/lisossomais, e assim modulam a incorporação de peptídeos nas moléculas clássicas. O locus *HLA-DM* é expresso em células apresentadoras de antígeno de classe II e é

composto por um gene de cadeia α , *DMA*, e um gene de cadeia β , *DMB*. No locus *HLA-DO*, os genes α e β estão localizados em regiões distantes um do outro, ou seja, separado por vários outros genes (*HLA-DM* e *TAP*) e este é expresso em linfócitos B (ALFONSO; KARLSSON, 2000; TING; TROWSDALE et al., 2002).

Essas moléculas têm sido associadas a diferentes doenças como diabetes do tipo 1, artrite reumatoide e esclerose múltipla (JONES et al., 2006). Estudos de associações genéticas em alelos em genes *HLA* de classe II com a TB têm sido descritas por pesquisadores (RAVIKUMAR et al., 1999; SHI et al., 2011; MAGIRA et al., 2012; SOUZA DE LIMA et al., 2016). Alelos em *HLA* foram associados a TB pulmonar *HLA-DRB1*1501* e *HLA-DQB1*0601* em pacientes com expectoração positiva na população indiana (RAVIKUMAR et al., 1999). Outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa identificou subtipos do alelo *HLA-DRB1*04* associados a TB pulmonar na população amazônica sendo o subtipo *HLA-DRB1*04:11:01* associado ao aumento do risco de desenvolvimento de TB pulmonar e *HLA-DRB1*04:07:01* à proteção (SOUZA DE LIMA et al., 2016). Conjuntamente, esses dados reforçam cada vez mais que esta região também representa um alvo a ser investigado na TB.

2.4.3 Genes HLA de classe III

Os genes HLA de classe III situam-se entre a região de classe II mais centromérica e classe I, mais telomérica. Neste *locus*, localizam-se diferentes genes que codificam proteínas envolvidas em um amplo espectro de funções do sistema imune, por exemplo: genes que codificam proteínas do sistema complemento (C2, C4A, C4B, Fator B), enzimas relacionadas com a síntese de esteroides, proteínas do choque térmico, fatores de necrose tumoral (TNF) e as linfotoxinas alfa (LT- α) e beta (LT- β) (**Figura 8**) (DONADI, 2000; TROWSDALE, 2001).

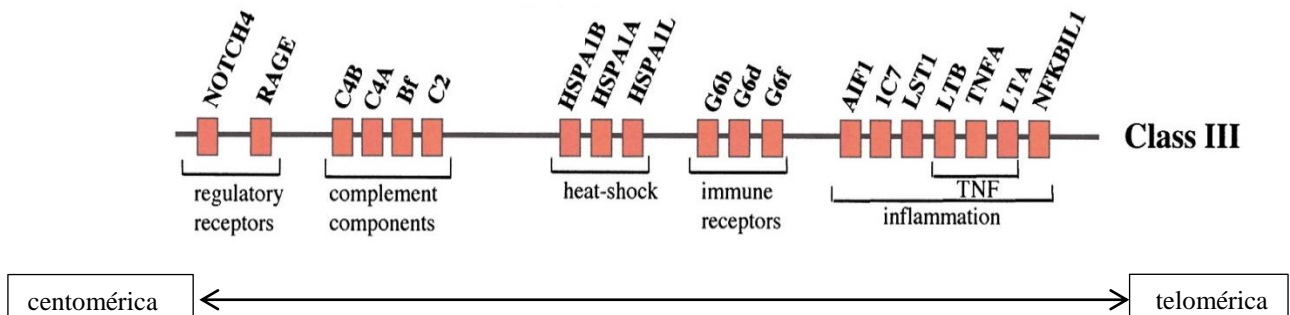


Figura 8: Genes localizados na região do sistema HLA de classe III. Fonte: Adaptado de TROWSDALE, 2001.

Na região de HLA de classe III estão localizados genes que codificam membros centrais da superfamília de ligantes TNF (TNFSF) como as citocinas TNF, LT- α e LT- β apontando cerca de 30% de homologia de aminoácidos em comum (LOCKSLEY et al., 2001; MacEWAN, 2002; XU et al., 2017). De modo geral, são citocinas envolvidas tanto na resposta imune inata quanto adaptativa (UPADHYAY; FU, 2013), participando e regulando uma variedade de processos como inflamação, diferenciação celular e apoptose (ETEMADI et al., 2013). Além disso, essas citocinas têm sido associadas a funções importantes na imunopatogênese da TB (ROACH et al., 2001; EHLERS et al., 2003; ALLIE et al., 2010).

O TNF (TNF- α) é uma potente citocina transmembrana do tipo II codificada pelo gene *TNF*, estimulado pelo processo infeccioso, estresse celular, inflamação, neoplasias e induz a síntese de outras citocinas como IL-6 e quimiocinas (CCL2, CCL4) (ROACH et al., 2002). A proteína pode apresentar-se em duas isoformas biologicamente ativas, solúvel ou ancorada na membrana celular, podendo ser sintetizada por diferentes células, principalmente macrófagos e monócitos ativados pela interação com receptores TLR como também linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ após interação com antígenos, mastócitos, células NK, células dendríticas (**Figura 9**) (CROFT et al., 2009).

O TNF é produzido primeiramente ancorado a membrana celular com seus domínios intracelulares e extracelulares e é clivado por uma enzima metaloproteinase conhecida como TACE (Enzima conversora do TNF) resultando numa forma homotrímica que pode se ligar aos receptores TNFR1 (*Tumor necrosis factor receptor 1*), expresso em diferentes tecidos (CHEN; GOEDDEL, 2001), e TNFR2 (*Tumor necrosis factor receptor 2*), expresso em células imunológicas e endoteliais (WAJANT et al., 2003). Por meio da ligação do TNF com os receptores que a bioatividade da proteína é exercida visto que a interação TNF-TNFR1 desencadeia intracelularmente na ativação do fator de transcrição NF- κ B e com isso transcreve moléculas envolvidas no processo inflamatório e apoptose. TNF-TNFR2 resulta na sobrevivência das células (HUDDLE, 2014) bem como parece aumentar a manutenção, expansão e função das células Treg (YANG et al., 2018).

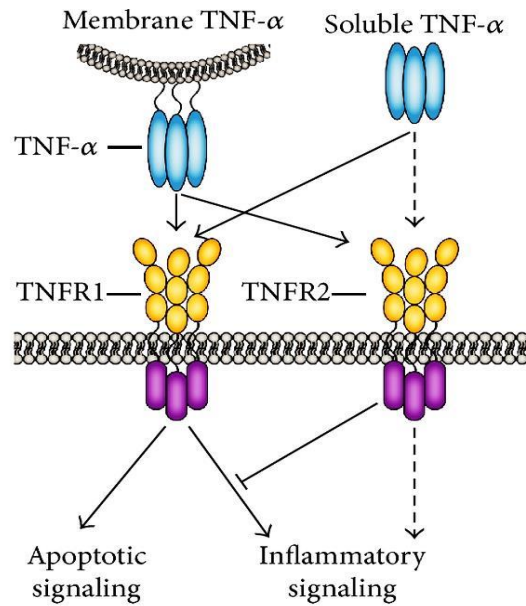


Figura 9: Formas biologicamente ativas do TNF, solúvel e ancorada a membrana, e sua interação com os receptores TNFR1 e TNFR2 resultando no efeito biológico. Fonte: Adaptado de Bremer, 2013.

Dentre o amplo espectro de atividades biológicas descritas para o TNF, esta é uma citocina caracterizada pelos seus efeitos pleiotrópicos e pró-inflamatórios na defesa do hospedeiro contra uma variedade de microrganismos intracelulares. Além disso, atua na proliferação, sobrevivência e diferenciação celular bem como desempenha ações apoptóticas em células-alvo (BREMER et al., 2013), quimiotaxia de células e controle do processo neoplásico (HEHLGANS; PFEFFER, 2005; BREMER, 2013).

O equilíbrio das funções mediadas pelo TNF é crucial para que suas propriedades inflamatórias e imunoestimulatórias não o caracterizem como um mediador responsável pelo desenvolvimento de doenças autoimunes como ocorre na artrite reumatoide (MATSUNO et al., 2002; VASANTHI et al., 2007), doença de Crohn (MAEDA et al., 1992; ARMSTRONG et al., 1997) e espondilite anquilosante (LANGE et al., 2000).

Por outro lado, artigos publicados descrevem o TNF como uma importante citocina no controle de doenças infecciosas visto que camundongos deficientes de TNF e o receptor TNFR1 foram mais suscetíveis a infecção causada por *Listeria monocytogenes* (NAKANE et al., 1988; PFEFFER et al., 1993; ROTHE et al., 1994; ENDRES et al., 1997), *Histoplasma capsulatum* (ALLENDOERFER; DEEPE, 1998), *Leishmania major* (VIEIRA et al., 1996) e *Trypanosoma cruzi* (CASTAÑOS-VELEZ et al., 1988).

Na infecção por *M. tuberculosis*, o TNF é uma das primeiras citocinas sintetizadas logo após a interação do patógeno com os macrófagos do hospedeiro (WAJANT; SIEGMUND et al., 2019). O TNF estimula a fagocitose dos bacilos pelos macrófagos ao mesmo tempo em que induz a produção de espécies intermediárias reativas de oxigênio para eliminar os bacilos viáveis nas células sendo essas ações potencializadas em combinação com IFN- γ (LIN et al., 2007).

Estudos experimentais demonstram o efeito protetor desta citocina na TB (FLYNN et al., 1995; BEAN, 1999; BEKKER et al., 2001; MOHAN et al., 2001). No estudo de Botha; Ryffel (2003), camundondos *knockout* para TNF infectados com cepas de *M. tuberculosis* H37Rv resultou na reativação da infecção caracterizada com cargas micobacterianas elevadas nos pulmões, baço e fígado. Outro papel do TNF na infecção por *M. tuberculosis* envolve a sua participação na estruturação, organização e dinâmica da formação do granuloma (ROACH et al., 2002).

Interessantemente, o TNF é uma das citocinas mais importantes na defesa contra o bacilo causador da TB e indivíduos tratados com antagonistas do TNF denotam um risco elevado de reativação de infecções latentes, principalmente ocasionada por *M. tuberculosis* com progressão rápida da infecção (SOLOVIC et al., 2010).

No que diz respeito a LT- α e LT- β , estas são formas de moléculas triméricas pertencentes ao complexo sistema linfotóxica que apresentam diferenças na estrutura, na localização, na interação com receptores celulares e podendo atuar de maneira isolada ou em associação, mas que tem ganhado destaque por serem reguladores envolvidos na organização do tecido linfóide (LU; BROWNING, 2014).

A LT- α é uma citocina secretada codificada pelo gene *LTA* anteriormente denominada Fator de Necrose Tumoral Beta (TNF- β) caracterizada como o homólogo mais próximo do TNF (HUDDLE, 2014). Estruturalmente, a molécula é constituída de três domínios homólogos (α 3) (DRUTSKAYA et al., 2010). A proteína codificada pode ser produzida predominantemente por linfócitos T CD4 e CD8 ativados bem como linfócitos B e em células NK (REMOUCHAMPS et al., 2011). Da mesma forma como ocorre com a citocina TNF, esta pode interagir com receptores de TNF, TNFR1 (MacEWAN, 2002) e TNFR2 (MEDLER; WAJANT, 2019).

Entre as atividades sugeridas para LT- α tem-se participação no desenvolvimento de órgãos linfoides (FU; CHAPLIN, 1999), indução do processo inflamatório (CUFF et al., 1998), controle no processo infeccioso (UPADHYAY; FU, 2013), recrutamento de linfócitos provenientes do estímulo de moléculas de adesão em células endoteliais (POBER et al., 1997) e atividades citotóxicas (WAR, 2008). No entanto, a maioria das pesquisas foi realizada em modelos animais e, conseqüentemente, os mecanismos exatos envolvidos em humanos não são completamente esclarecidos e necessitam de mais estudos (ETEMADI et al., 2013).

A LT- β é uma citocina pró-inflamatória limitada à superfície membranar celular codificada pelo gene *LTB* conhecido como fator de necrose tumoral C (TNFC) que estabiliza a LT- α à membrana celular. A combinação dos heterotrímeros LT- α e LT- β origina a forma LT- $\alpha\beta$ (BROWNING et al., 1993). Destes, tem-se duas formas: LT- $\alpha1\beta2$ e LT- $\alpha2\beta1$ (REMOUCHAMPS et al., 2011).

A LT- $\alpha1\beta2$ é constituída por uma molécula alfa e duas moléculas beta sendo a isoforma mais comum presente na superfície dos linfócitos com forte afinidade pelos LT β R, receptor de LT- β . Esta interação é fundamental para a manutenção da estrutura, microambiente e homeostasia do tecido linfoide (GOMMERMAN; BROWNING, 2003), assegurando resposta imune adequada contra microrganismos (REMOUCHAMPS et al., 2011). A forma LT- $\alpha2\beta1$ (duas moléculas alfas e uma molécula beta) interage com TNFR1 e TNFR2. Ambas as interações com TNFR1 e LT β R resultam na ativação do fator de transcrição NF- κ B induzindo a expressão de genes do processo inflamatório (WAR, 2005).

Adicionalmente, estudos apontam a participação de linfotoxinas na proliferação, diferenciação e função efetora das células NK (SCHNEIDER et al., 2004) bem como ação conjunta com TNF na conexão com outras moléculas (membros da família TNF, IFN e quimiocinas) formando redes de sinalização complexa importantes para a eficiência das respostas imunológicas (WAR, 2005).

Estudos sugerem o envolvimento das linfotoxinas na patogenia de diferentes doenças, por exemplo, a LT- α favorecendo o desenvolvimento de artrite reumatoide (CALMON-HAMATY ET AL., 2011; HIROSE et al., 2018) e diabetes do tipo 1 (ETTINGER et al., 2001). Além do mais, estudos em modelos animais têm demonstrado o papel essencial das linfotoxinas na resistência a diferentes infecções, por exemplo: *Staphylococcus aureus* (HULTGREN et al., 1998), *Toxoplasma gondii* (SCHLÜTER et al., 2003), *Leishmania*

donovani (ENGWERDA et al., 2004), *Listeria monocytogenes* (EHLERS et al., 2003; ROACH et al., 2005), *Plasmodium* sp. (ENGWERDA et al., 2002; TOGBE et al., 2008), inclusive por *M. tuberculosis*.

Experimentos em camundongos *knockout* para LT β R (EHLERS et al., 2003) e LT- α infectados com *M. tuberculosis* resultaram no aumento da infecção com elevada carga micobacteriana principalmente no pulmão quando comparados com os camundongos selvagens (ROACH et al., 2001). Similarmente a esses resultados, Allie et al. (2010) demonstraram que camundongos LT- $\alpha^{-/-}$ infectados com *M. tuberculosis* e *M. bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG) ocasionou aumento descontrolado da carga bacilar, desenvolvimento anormal do granuloma, necrose e diminuição de óxido nítrico sintase pulmonar independente de TNF.

Diante do exposto, o sistema HLA, além de ser bastante complexo e altamente variante, classicamente está implicado na apresentação de antígenos bem como na regulação e vigilância do sistema imunológico, ao mesmo tempo em que é constituído por uma variedade de genes dos quais codificam proteínas com funções ainda desconhecidas (TROWSDALE; KNIGHT, 2013). Nesta perspectiva, a diversidade de sequências genômicas, aspectos funcionais, interações, expressão gênica, variações de nucleotídeo único e de haplótipos do HLA constituem alvos interessantes de investigação (SHIINA et al., 2009).

2.5 Variantes de nucleotídeo único (SNV)

Em humanos, um dos parâmetros capazes de nos ajudar a decifrar diferentes respostas frente a um patógeno é a variabilidade genética no qual esta integra, além da sequência gênica, interações entre DNA, RNA, tradução em proteínas, regulação da transcrição e variantes presentes no código genético humano (MARQUES et al., 2016).

Pesquisas sobre variantes genéticas presentes no ser humano tem sido bastante realizadas e identificadas para uma melhor compreensão das características fenotípicas e associação com suscetibilidade a doenças (GRAY et al., 2000; MARCHINI et al., 2005), principalmente aquelas cuja complexidade pode ser influenciada por fatores genéticos do hospedeiro que certamente refletem na variabilidade interindividual no desfecho da TB (ABEL et al., 2014).

Conforme a última atualização da *Human Genome Variation Society* (HGVS), em 2016, os termos mutação e polimorfismo foram abolidos e recomenda-se a utilização de termos neutros como variante, com o intuito de evitar confusões quanto a definição e conotações negativas (RICHARDS et al., 2015; DEN DUNNEN et al., 2016).

Assim, existem diferentes tipos de variantes sendo as mais comuns que ocorrem no genoma humano: exclusão (del) quando a alteração de um ou mais nucleotídeos não estão presentes; inserção (ins), alteração de um ou mais nucleotídeos que são inseridos em uma sequência; exclusão/inserção (indel), alteração de um ou mais nucleotídeos que estão faltando e foram substituídas por várias novas letras; inversão, mudança onde mais de um nucleotídeo substitui a sequência original e é o complemento reverso da sequência original (exemplo: CTCGA para TCGAG) e de substituição, alteração onde um nucleotídeo é substituído por outro nucleotídeo como nas variantes de nucleotídeo único (SNV-*Single Nucleotide Variant*) (DEN DUNNEN et al., 2016).

O SNV é variação genética mais habitual de ser encontrada no genoma humano em que ocorre a mudança de apenas um único nucleotídeo na sequência genômica específica (por exemplo, A>C, A>T, A>G). No genoma humano, os SNV são encontrados mais frequentemente em regiões não-codificantes (introns), mas podem estar presentes em regiões codificantes (exons) e na própria região promotora (WANG; MOULT, 2001; BROMBERG; ROST, 2007).

Os SNV podem ser classificados quanto ao tipo de base em transição ou transversão e quanto aos efeitos resultantes dos SNV codificadores no processo de transcrição/tradução em sinônimos, também denominado silencioso, ou variantes não-sinônimos. Quanto ao tipo de base, uma variante é denominada de transição quando há substituição de um nucleotídeo da mesma classe de bases, ou seja, alteração de uma nucleotídeo de purina por outro de purina (por exemplo: A>G) ou a alteração de uma base pirimidina por outra pirimidina (por exemplo: C>T). Na transversão, a substituição de nucleotídeos ocorre por classes de bases diferentes, ou seja, substituição de um nucleotídeo de purina por pirimidina (A ou G > T ou C) ou de pirimidina por purina (C ou T > A ou G) (BROMBERG; ROST, 2007).

Quanto aos efeitos resultantes no processo de transcrição/tradução, uma variante é denominada sinônima quando a substituição resulta um códon que gera o mesmo aminoácido de modo que não altera a sequência do aminoácido da proteína resultante (HUNT et al., 2009). Variantes não-sinônimas (nsSNVs-*nonsynonymous*) resultam em sequências de

aminoácidos alteradas gerando impactos na função e estrutura da proteína no qual podem ser *missense*, alteração no aminoácido, e *nonsense*, gera um stop códon (SUNYAEV et al., 2000; SCHAEFER et al., 2012). Destes, SNV considerados não-sinônimos e regulatórios constituem as variantes que representam grandes consequências no fenótipo (NG; HENIKOFF, 2006).

SNV localizados em regiões não-codificantes podem ser 5'UTR, 3' UTR, introns, regiões intergênicas, pseudogenes e em alvos regulatórios (splicing, regulação transcricional e traducional bem como nos sítios regulatórios de miRNA). Embora o papel funcional de variantes genéticas em regiões intrônicas, em sua maioria, seja desconhecido, sabe-se que SNV nessas regiões podem influenciar na regulação da expressão gênica através da interação com pequenos RNAs não-codificadores microRNA (miRNA) no qual afeta a regulação pós-transcricional, estabilidade e tradução do RNAm. Além desse, têm-se os RNAs não-codificadores longos que parecem estar envolvidos no controle da expressão do RNAm (WARD; KELLIS, 2012).

Estudos caso-controle dentro da genética de populações associam diferentes variantes com proteção ou predisposição a doenças sejam infecciosas, autoimunes ou neoplásicas numa determinada população estudada (CHAKRAVARTI, 2001). Neste contexto, variantes genéticas em componentes do sistema imune representam um interesse promissor para uma melhor compreensão da complexidade de uma doença, principalmente na TB, visto que dos indivíduos que são expostos ao bacilo, 10% desenvolvem a TB ativa e 90% podem evoluir para TB latente (SHALER et al., 2012).

2.6 Associações de SNV em genes do sistema HLA nas doenças infecciosas

Como abordado, o sistema HLA é conhecido por apresentar inúmeras variantes genéticas no qual o torna um importante componente de investigação em doenças transmissíveis e não transmissíveis (MATZARAKI et al., 2017; SANCHEZ-MAZAS, 2020). A variabilidade deste sistema, em sua maioria, tem influência da diversidade de patógeno (CAGLIANI; SIRONI, 2013). Além da existência da variabilidade em *loci* HLA e diferenças nas frequências alélicas e haplotípicas dependendo da população, estudos de associação genética em genes do sistema HLA tem sido realizadas em diferentes populações. Essas características contribuem para traçar e desvendar o perfil dos indivíduos de uma determinada região (GRAY et al., 2000; TRATHERNE, 2008).

Estudos envolvendo SNV em genes do sistema *HLA* que modulam ou controlam a resposta imunológica em doenças infecciosas têm aumentado visto que alguns deles já foram encontrados associações quanto a proteção ou suscetibilidade numa variedade de doenças infecciosas como apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 2: Estudos de associação de variantes genéticas no sistema HLA em doenças infecciosas. ID SNV: identificação da variante de nucleotídeo único.

Doença Infecciosa	Gene	ID SNV/ alelos	Tipo de variante	Associação encontrada	População estudada	Referência
Aids	<i>HLA-B</i>	rs2523608 C>T	Intron	Proteção (Alelo T)	Afro-americanos	Pelak et al., 2010
	<i>HLA-C</i>	rs9264942 T>C	Intron	Proteção (Alelo C)	Caucasianas	Fellay et al., 2007; Fellay et al., 2009; Corrah et al., 2009; Bardeskar et al., 2016
Hepatite B	<i>HLA-C</i>	rs3130542 A>G	Intron	Risco (Alelo A)	Chinesa	Hu et al., 2013; Zhu et al., 2017
	<i>HLA-DPA1</i>	rs3077 T>G	3'UTR	Proteção (Alelo T)	Asiáticas	Wang et al., 2011; Brien et al., 2011; Guo et al., 2011; Zhu et al., 2017
	<i>HLA-DPB1</i>	rs9277535 G>A	3'UTR	Proteção (Alelo A)	Asiáticas	Kamatani et al., 2009; Wang et al., 2009; Zhu et al., 2017
	<i>HLA-DPB1</i>	rs9277378 G>A	Intron	Risco (Alelo A)	Chinesa	Wong et al., 2013
	<i>HLA-DPB1</i>	rs9277496 C>T	Intron	Risco (alelo T)	Japoneses	Nishida et al., 2016
	<i>HLA-DPB2</i>	rs9380343 C>T	Intron	Risco (Alelo T)	Turca	Akgöllü et al., 2019
	<i>HLA-DQA2 e HLA-DQB</i>	rs2856718 A>G	Intron	Rico (Alelo G)	Japonesa	Mbarek et al., 2011
	<i>HLA-DQB1 upstream</i>	rs9368737 T>C	Intron	Risco (Alelo C)	Japoneses	Nishida et al., 2016
	<i>HLA-DQB2</i>	rs7453920 A>G	Intron	Risco (Alelo G)	Japonesa	Mbarek et al., 2011
	<i>TNF</i>	rs361525 G>A	Região promotora	Rico (Alelo G)	Chinesa	Du et al., 2006
Hepatite C	<i>HLA-DQB1</i>	rs4273729 C>G	Intron	Proteção (Alelo C)	Europeia e africana	Duggal et al., 2013; Tamori et al., 2013
	<i>HLA-DPA1</i>	rs3077 C>T	3'UTR	Risco (Alelo T)	Chinesa	Xu et al., 2014
	<i>MICA</i>	rs2596542 C>T	Intron	Risco (Alelo T)	Japonesa	Tamori et al., 2013
	<i>TNF</i>	rs1800629 G>A	Região promotora	Risco (Alelo A)	Egípcios	Talaat et al., 2012; Tharwat et al., 2019
Hanseníase	<i>HLA-DQA1</i>	rs1071630 (T>C)	Exons SNV Missense	Risco (Alelo T)	Indiana	Wong et al., 2010

	<i>HLA-DRB1</i>	rs9270650 T>C	Intron	Risco (Alelo C)	Indiana	Wong et al., 2010
	<i>HLA-DRB1</i> *15	rs9271011 C>T	Intron	Risco (Alelo T)	Chinesa	Liu et al., 2015
	<i>HLA-DRAB1</i>	rs3135388 C>T	Intron	Risco (Alelo T)	Europeia	Krause-Kyora et al., 2018
	<i>MICA</i>	rs12660741 A>G	Intron	Risco (Alelo G)	Indiana	Wong et al., 2010
	<i>LTA</i>	rs2239704 A>C	Promotora	Risco (Alelo A)	Brasileira, vietnamita e indiana	Alcáis et al., 2007; Alter et al., 2011
Malária	<i>HLA-G</i>	rs9380142 A>G	3'UTR	Risco (Alelo G)	Africanos	Garcia et al., 2013; Sabbagh et al., 2013
	<i>TNF</i>	1800629 G>A	Intron	Risco (Alelo A)	Criança gambiana	McGuire et al., 1994
Leishmaniose tegumentar	<i>HLA-G</i>	rs1063320 C>G	3'UTR	Risco (Alelo G)	Brasileira	Sonon et al., 2019
	<i>TNF</i>	rs1800629 G>A	Intron	Risco (Alelo A)	Turca	Kirik et al., 2020
Leishmaniose visceral	<i>HLA-DRB1</i> – <i>HLA-DQA1</i>	rs9271858 A>G	3'UTR	Risco (Alelo G)	Indiana e Brasileira	Fakiola et al., 2013;
Dengue	<i>TNF</i>	rs1800629 G>A	Intron	Risco (Alelo A)	Cubanos/ Brasileira	Perez et al., 2010; Dettogni et al., 2015
	<i>MICB</i>	rs3132468 C>T	Intron	Risco (Alelo C)	Crianças vietnamitas/ tailandeses	Khor et al., 2011; Whitehorn et al., 2013;
		rs3134899 G>A	Intron	Risco (Alelo A)	Crianças vietnamitas/	Khor et al., 2011;

Legenda: ID SNV= identificação da variante de nucleotídeo único; nsSNV:nonsynonymous.

Em conjunto, esses estudos demonstram o quanto a variabilidade e características genéticas particulares de uma determinada população em relação ao gene *HLA* em estudos de associação com doenças podem influenciar no curso de uma infecção (MEYER et al., 2018). Além disso, as evidências acima reforçam que variantes genéticas no sistema *HLA* podem resultar na capacidade variável de apresentação do antígeno, modulação e regulação da resposta imunológica frente ao agente infeccioso (SANCHEZ-MAZAS, 2020). Portanto, a investigação de SNV colabora na compreensão de diferentes respostas do sistema imunológico do hospedeiro frente ao patógeno, aprimorando a compreensão na complexa relação patógeno-hospedeiro (MARTIN et al., 2003; BOCHUD et al., 2007).

2.6.1 Estudos imunogenéticos na tuberculose

No contexto da TB, sabe-se que fatores socioeconômicos, ambientais e os relacionados ao hospedeiro têm sido associados com risco de desenvolvimento de TB. Entre

os fatores relacionados ao hospedeiro têm-se os fatores genéticos que inclui o SNV. Neste seguimento, diferentes estudos de caso-controle, gene candidato e de associação dos genoma (GWAS) são investigadas pela comunidade científica e assim contribuem para uma melhor compreensão da variabilidade genética do hospedeiro a resposta imune na TB (HARISHANKAR et al., 2018).

Inúmeros estudos sobre SNV em diferentes genes envolvidos na resposta imune a TB foram realizados (PONTILLO et al. 2013; LAI et al. 2016; SINGH et al. 2018; CHEN; MA, 2020; FERNANDES et al., 2020; FIGUEIRA et al., 2021). Essas pesquisas também têm sido conduzidas no estado do Amazonas com o intuito de compreender o motivo de coeficientes tão elevados na presente região. Boechat et al. (2013), por exemplo, demonstraram que a variante rs2476601 no gene *PTPN22*, codifica uma proteína que é expressa em células do sistema imunológico, não foi associado a resistência a TB na população amazônica. Neste mesmo estudo, ao realizarem um estudo de meta-análise com este mesmo gene, os resultados encontrados sugeriram uma associação do alelo T com proteção a TB.

Por outro lado, Souza de Lima et al. (2016) constataram que SNV em genes que codificam para inflamações que são componentes-chaves da resposta imune inata foram associados a TB visto que o SNV rs10754558 no gene *NLRP3*, o alelo G foi associado a proteção no desenvolvimento da TB e o alelo G no gene *P2X7* (rs2230911) foi associado ao aumento do risco ao desenvolvimento de TB pulmonar ativa. Outro estudo realizado pelo mesmo autor no gene *SIGLEC1/CD169* rs3859664, o alelo A foi associado ao risco de desenvolvimento de TB ativa, possivelmente, devido a menor produção de IL-1 β pelos pacientes (SOUZA DE LIMA et al., 2017).

O SNV rs5743618 no gene *TLRI* foi associado a predisposição a TB multibacilar (BARLETTA-NAVECA et al., 2018). Similarmente, os resultados obtidos por essas pesquisas evidenciam que o fator genético do hospedeiro, principalmente em genes do sistema imune, influencia no desfecho da infecção (ALAM et al., 2021).

Em relação a variantes genéticas no sistema HLA na TB, alguns estudos foram conduzidos. Em relação as moléculas de HLA consideradas não-clássicas e na forma extrapulmonar mais investigações precisam ser realizadas na TB (**Tabela 3**).

Tabela 3: Estudos de variantes genéticas no sistema HLA na TB.

Gene	ID SNV/ alelos	Tipo de variante	População estudada	Tipo de TB	Associação encontrada	Referências
Entre <i>HLA-DQA1</i> e <i>HLA-DRB1</i>	rs557011 C>T	Intergênica	Europeia Chinesa	Pulmonar	Risco (Alelo T)	Sveinbjornsson et al., 2016; Zheng et al., 2018
	rs9271378 A>G	Intron	Europeia Chinesa	Pulmonar	Proteção (Alelo G)	Sveinbjornsson et al., 2016; Zheng et al., 2018
<i>HLA-DQA1</i>	rs9272785 G>A	Exon nsSNV Missense	Europeia	Pulmonar	Risco (Alelo A)	Sveinbjornsson et al., 2016
	rs9272461 G>A	Intron	Chinesa	Pulmonar	Proteção (Alelo A)	Miao et al., 2018
	rs9271300 C>A	Intergência	Chinesa	Pulmonar	Não associado	Miao et al., 2018
<i>HLA-DQB2</i>	rs7453920 A>G	3'UTR	Chinesa	Pulmonar	Risco (Alelo G)	Wang et al., 2019
<i>HLA-DPA1</i>	rs3077 T>G	3'UTR	Chinesa	Pulmonar	Não associado	Wang et al., 2019
<i>HLA-DPBI</i>	rs9277535 A>G	3'UTR	Chinesa	Pulmonar	Não associado	Wang et al., 2019
<i>TNF</i>	rs1800629 G>A	Intron	Iraniana	Pulmonar	Risco (Alelo A)	Merza1 et al., 2009; Jafari et al., 2016
	rs1799724 C>T	Região regulatória	Iraniana	Pulmonar	Risco (Alelo T)	Anoosheh et al., 2011

Legenda: ID SNV: identificação da variante de nucleotídeo único; nsSNV:nonsynonymous; TB: tuberculose

Diante do exposto, as moléculas HLA clássicas desempenham papéis fundamentais na apresentação de vários antígenos ao sistema imunológico e as moléculas não-clássicas apresentam funções importantes na regulação e imunovigilância na patogenia de diferentes doenças. Variantes genéticas nestas moléculas podem alterar a apresentação do antígeno influenciando a expressão do mRNA do HLA e assim a apresentação do antígeno pode não ser realizada de forma adequada bem como alterar o resultado da infecção (AKGÖLLÜ et al., 2019).

Estudos que envolvam SNV em genes do sistema HLA na TB ainda precisam ser mais explorados e investigados, principalmente quando envolvem variantes em moléculas HLA não-clássicas (MOSAAD et al., 2015; SANCHEZ-MAZAS, 2020). Essas pesquisas destacam a importância dos estudos imunogenéticos no sistema HLA na infecção pelo *M. tuberculosis* e que estudos moleculares e funcionais são necessários para esclarecer o impacto dessas moléculas na imunopatogenia da TB, bem como a influência de SNV em genes do sistema HLA na TB.

3 JUSTIFICATIVA

Considerando que o Amazonas (84,1 casos/100 mil habitantes) bem como a capital Manaus (115,8 casos/100 mil habitantes) continuam registrando os maiores coeficientes de incidência de TB do país (BRASIL, 2023) combinado aos fatores genéticos do hospedeiro que constituem os principais colaboradores para diferentes desfechos da doença, o sistema HLA representa uma importante região do genoma humano que abriga uma variedade de genes com papéis essenciais nas respostas imunes inata e adaptativa (KLEIN et al., 2000), bem como na regulação e imunovigilância na infecção a diversos patógenos (CHOO, 2007). Sendo assim, tornando-o um alvo promissor de investigação na TB.

Segundo Horton et al. (2004) diferentes pesquisas têm apontado que a região do sistema HLA é constituída de genes que codificam proteínas associados as mais variadas doenças, em comparação com qualquer outra região do genoma humano, devido as extensas variantes e variabilidade alélica.

Inegavelmente, com os avanços tecnológicos na pesquisa imunogenética na minuciosa interação patógeno-hospedeiro têm contribuído para uma melhor compreensão dos determinantes genéticos e moleculares envolvidos no desfecho da doença (PHILIPS; ERNST, 2012). Além disso, a investigação de SNV em genes localizados no sistema HLA é fundamental e não podem ser subestimados, principalmente, pelas funções que estes genes exercem na resposta imunológica e, em relação aos genes que codificam para moléculas de HLA-não clássicas, pelos diversos campos a serem explorados tanto na TB quanto em outras doenças infecciosas (MATZARAKI et al., 2017; HARISHANKAR et al., 2018; SANCHEZ-MAZAS et al., 2020).

Portanto, a contribuição da genética do hospedeiro na progressão para TB é, certamente, um dos principais fatores determinantes para explorar e investigar na infecção pelo *M. tuberculosis* (ABEL et al., 2014). O esclarecimento de componentes genéticos do hospedeiro em direcionar a definição dos fenótipos de infecção e resistência a TB também devem ser avaliadas com prioridade, pois o mesmo pode beneficiar e auxiliar na prevenção, diagnóstico, tratamento da TB, futuras estratégias de vacinação bem como elucidar as lacunas existentes na patogênese da TB (MOLLER et al., 2018).

Assim, a hipótese do presente estudo foi que variantes de nucleotídeo único (SNV) em genes do sistema HLA podem estar associados à suscetibilidade ou proteção no

desenvolvimento de TB. Por estas razões, o objetivo do presente estudo foi avaliar SNV em genes localizados no sistema HLA, *HLA-II* (rs9271300), *HLA-G* (rs1049033 e rs1632937) e *MICA* (rs1051792), em pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar, pois estes genes codificam importantes componentes relacionados à resposta imune na TB.

Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar as variantes de nucleotídeo único (SNV) em genes do sistema HLA em pacientes com TB.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar as frequências alélicas e genotípicas das variantes nos genes *HLA-II* (rs9271300), *HLA-G* (rs1049033 e rs1632937) e *MICA* (rs1051792) do sistema HLA, em pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar, comparadas com as frequências do grupo controle.
- Avaliar se existe associação dos SNV selecionados em genes do sistema HLA quanto a suscetibilidade ou proteção para o desenvolvimento de TB.
- Avaliar os haplótipos dos SNV dos genes selecionados quanto ao desenvolvimento de TB.
- Analisar se há interação entre os genes selecionados.
- Verificar a concentração de IL-6, IL-1 β , IFN- γ e TNF- α em pacientes com TB e controles e se estes estão relacionados com os genótipos dos SNV selecionados para o estudo.

Metodologia

5 MÉTODOS

5.1 Fluxograma das atividades

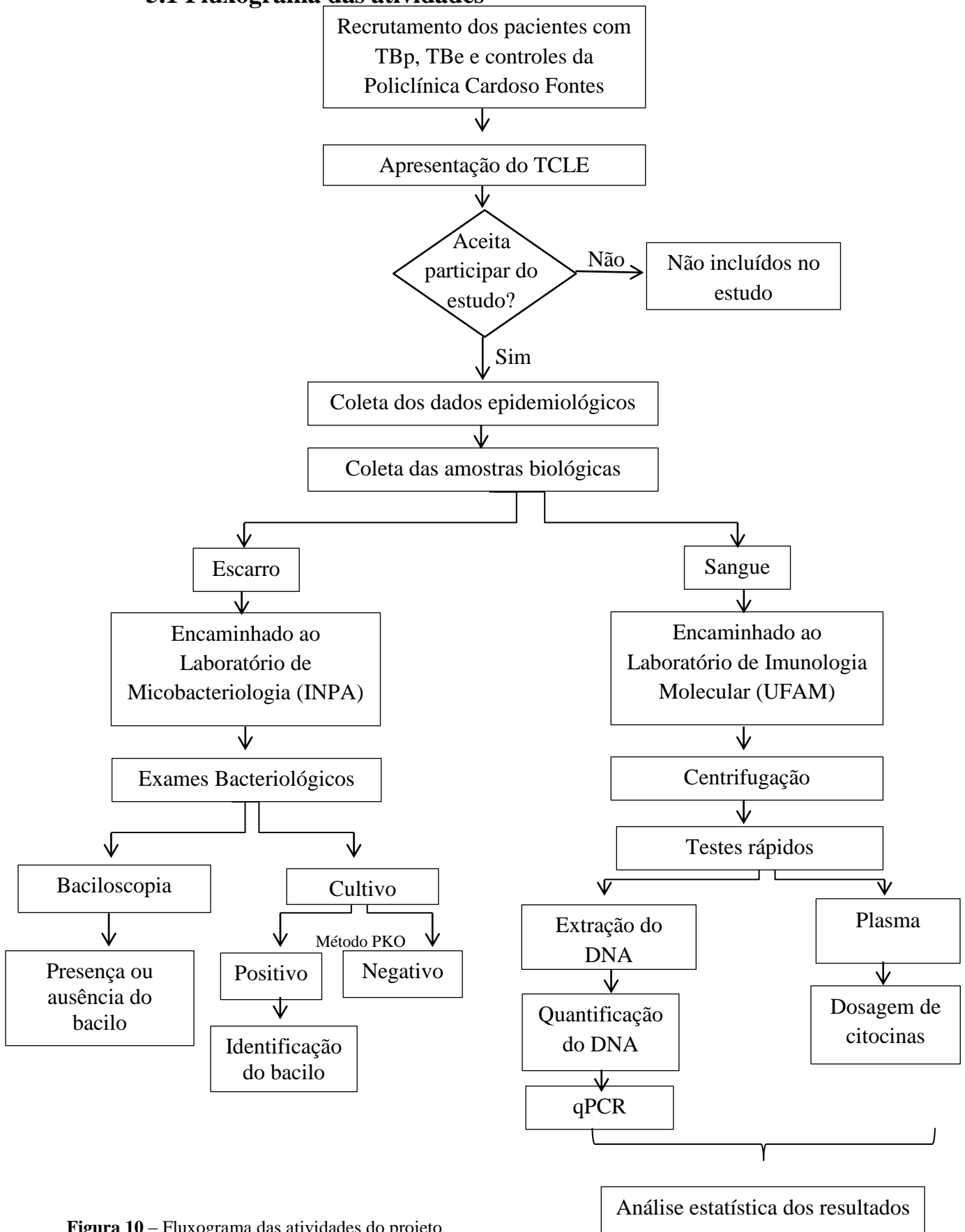


Figura 10 – Fluxograma das atividades do projeto

5.2 Aspectos éticos

Esta pesquisa pertence ao projeto maior intitulado “Avaliação de polimorfismos genéticos relacionados à resposta imunológica na tuberculose”, submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (via Plataforma Brasil/CEP-UFAM) de acordo com as determinações da resolução 466/2012 que contempla as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, sob responsabilidade da professora Aya Sadahiro. O parecer consubstanciado foi emitido em 25 de agosto de 2019, sob o número do parecer 3.530.854 e CAAE: 19021519.9.0000.5020 (Anexo I).

5.3 Tipo de estudo

O estudo é caso-controle para avaliar as variantes de nucleotídeo único (SNV) em genes do sistema HLA em pacientes com tuberculose pulmonar (TBp), extrapulmonar (TBe) e controles.

5.4 Local de estudo

Os pacientes foram recrutados da Policlínica Cardoso Fontes da Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas (SES-AM), centro de referência em pneumologia do estado do Amazonas, localizada na cidade de Manaus. A Policlínica Cardoso Fontes oferece serviços relacionados às doenças crônicas pulmonares, sendo referência secundária e terciária para Tuberculose no Estado do Amazonas. A policlínica atende os 62 municípios e instituições não governamentais que atuam nesta atividade, uma vez que as ações de tuberculose estão descentralizadas para todos os serviços de saúde (SES, 2023).

5.5 População de estudo

A população de estudo foi composta por indivíduos procedentes dos estados da região norte de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos. Os pacientes com TBp, TBe e os controles foram recrutados da Policlínica Cardoso Fontes.

5.6 Grupos estudados e critérios de inclusão

Os grupos estudados foram constituídos de pacientes com TB pulmonar (TBp), TB extrapulmonar (TBe) e os controles que são os indivíduos não diagnosticados com TB, ou seja, que convivem próximos aos pacientes com TB, mas não desenvolveram a doença.

5.6.1 Critérios de inclusão

5.6.1.1 Pacientes com TB pulmonar (TBp):

Os pacientes com TBp foram os sintomáticos respiratórios que apresentarem resultados positivos “*Mycobacterium tuberculosis* detectável” para o Teste Rápido Molecular (TRM, GeneXpert MTB/RIF); ou pacientes que obtiverem uma ou duas baciloscopias de escarro positivas e/ou cultivo do escarro com isolamento de *M. tuberculosis*; ou pacientes com baciloscopia e cultivo do escarro com resultados negativos, mas que iniciaram o tratamento para TB por possuírem imagem pulmonar compatível com os aspectos clínicos da TB através de raios-x ou tomografia.

5.6.1.2 Pacientes com TB extrapulmonar (TBe):

Nesse grupo foram incluídos os pacientes diagnosticados para TBe para as análises dos SNV segundo os critérios abaixo:

- Pacientes suspeitos clinicamente de TBe, de qualquer topografia, com diagnóstico de tuberculose extrapulmonar baseado em resultado positivo de cultivo de amostra biológica para *Mycobacterium tuberculosis*, e/ou por exame molecular positivo para complexo *M. tuberculosis* ou para região gênica específica de *M. tuberculosis*, em tratamento ou já tratados para TB.
- Pacientes suspeitos clinicamente de TBe, de 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 e de bacilos álcool-ácido resistentes, em tratamento ou já tratados para TB.
- Pacientes suspeitos clinicamente de TBe, de qualquer topografia, sem diagnóstico por método microbiológico, molecular e/ou histopatológico, mas que tenham sido submetidos à

prova terapêutica por mais de três meses com drogas antituberculosas, tendo ou não já finalizado o esquema terapêutico.

5.6.1.3 Controles de pacientes com TB (contatos):

Os controles foram os indivíduos que convivem com os pacientes com TB ou que acompanham os mesmos por ocasião do diagnóstico laboratorial ou tratamento na referida policlínica, sem parentesco consanguíneo, bem como os profissionais de saúde que fazem o atendimento aos pacientes de TB. Os controles foram negativos para *M. tuberculosis* nos exames diagnósticos.

5.7 Critérios de exclusão

- Indivíduos com TB que apresentaram as seguintes comorbidades: câncer, Aids, hepatites e doenças autoimunes assim como gestantes, transplantados ou que estiverem fazendo uso de algum imunorregulador não foram incluídos no projeto.

- Pacientes cujo isolamento e identificação de micobactérias não foi causadoras de TB (NTM). Além disso, os pacientes com TBe que no decorrer do projeto não responderam aos medicamentos para o tratamento da TB.

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

- Amostras que não amplificaram nos ensaios de genotipagem por qPCR (PCR Quantitativa em Tempo Real) e portanto, não foi possível realizar a discriminação alélica/genotípica.

5.8 Recrutamento e coleta de dados dos pacientes e controles

O recrutamento dos pacientes com TBp, TBe e controles foi realizado na Policlínica Cardoso Fontes. Nesta policlínica ocorre o primeiro atendimento no setor denominado “Aprazamento 1” por parte de um funcionário da policlínica. O Aprazamento 1 é um local reservado e livre de interferências externas onde são fornecidas as orientações sobre tratamento e as autorizações para liberação dos medicamentos. Neste mesmo local, após a orientação fornecida pelos profissionais de saúde da policlínica, os pacientes e controles foram convidados a participar do projeto pelo funcionário da Policlínica e aqueles cujo consentimento for aceito foi realizada a explicação, leitura e esclarecimentos sobre a pesquisa.

Se o paciente aceitar, o mesmo assina o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Após o aceite por parte dos participantes, são coletados os dados epidemiológicos dos mesmos. Posteriormente, as amostras de sangue e escarros foram coletadas em ambientes adequados para cada procedimento e sempre com a autorização dos participantes.

Em relação aos pacientes com TBe, que finalizaram o tratamento para TB, são orientados/contatados pelo funcionário da Policlínica Cardosos Fontes a comparecerem à Policlínica para realizarem o exame de escarro e o RX de tórax (ou outro exame de imagem) para avaliar alta. Neste momento, foram convidados a participarem do estudo.

As amostras utilizadas no presente estudo foram referentes a coleta dos anos de 2017 a 2023. Durante este período, em março de 2020 houve suspensão das atividades na UFAM em decorrência da pandemia da COVID-19, portanto, não foram realizadas as coletas neste período. Devido a esta situação, foi utilizada amostras do biorrepositório previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa. O retorno das coletas iniciou em janeiro de 2023. A partir do retorno das coletas, informações sobre a COVID-19 fazem parte da ficha de cadastro dos pacientes.

5.9 Seleção dos pacientes e controles

Os pacientes com TBp, TBe e controles foram incluídos no estudo através da técnica de amostragem aleatória sistemática, determinada por um intervalo de tempo. Na policlínica, o setor de Aprazamento 1 realiza diariamente o atendimento das 07:00 às 17:00 horas de segunda a sexta-feira. O intervalo da entrevista foi de aproximadamente 30 minutos. Neste sentido, o critério adotado foi entrevistar o primeiro paciente da fila no qual foi convidado a participar da pesquisa, e o próximo paciente foi atendido após intervalo de tempo.

5.10 Cálculo amostral

Para definição do tamanho da amostra da pesquisa, foi realizado um cálculo aproximado baseado nas frequências das variantes genéticas de aproximadamente 10%. O programa Gpower versão 3.1 foi utilizado e adotou-se o valor de $\alpha = 0,05$ (5%), $\beta = 0,1$ (10%), poder da amostra de 0,95. O resultado do número amostral foi de 404 indivíduos com TBp, 404 para TBe e 404 controles.

5.11 Critérios de seleção dos SNV

Os SNV para os genes do sistema HLA selecionados para este projeto foi realizada conforme as recomendações de Marques et al. (2016) com adaptações. Desta forma, foi feita uma pesquisa em bancos de dados públicos disponibilizado no NCBI (HapMap ou 1000Genome) de modo que foi considerado os seguintes critérios: estudos com SNV que codificam para genes do sistema HLA publicados, principalmente relacionados com TB ou descritos para outras doenças infecciosas, e com MAF (Frequência do alelo menor) superior a 10 % na população global.

5.12 Amostras biológicas de sangue total e escarro

Nesta pesquisa, as amostras biológicas dos pacientes e controles foram escarro e sangue total (volume total coletado foi de 5 mL), coletados em local ou sala apropriados para cada tipo de amostra clínica, respectivamente, da Policlínica Cardoso Fontes. Na policlínica, as amostras foram analisadas por exames rotineiros como a Baciloscopia direta e/ou TRM (GeneXpert MTB/Rif). No entanto, para esta pesquisa foi solicitada também ao paciente a coleta de amostra de escarro, quando eles tiveram condições físicas de realizar o procedimento de coleta após a assinatura do TCLE. As amostras de escarro e sangue foram armazenadas e transportadas em recipientes adequados. Posteriormente, as amostras de escarro foram encaminhadas ao laboratório de Micobacteriologia do Instituto de Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e, as amostras de sangue, foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia Molecular (LIM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas.

No LIM, as amostras de sangue total foram registradas e codificadas na forma de sequência numérica com a finalidade de preservar o sigilo dos participantes do estudo. Além disso, no LIM, as amostras foram processadas e foram realizados testes rápidos sorológicos para HIV (vírus da Imunodeficiência Humana), HCV (vírus da hepatite C), HbSAg (Antígeno de superfície da Hepatite B) e para sífilis.

5.13 Exames micobacteriológicos nas amostras de escarro

No Laboratório de Micobacteriologia do INPA, as amostras de escarros foram registradas e identificadas com código numérico e data da coleta. As amostras de escarros foram processadas e submetidas aos exames de microscopia e cultivo. Para a microscopia do

escarro foi utilizada a técnica de baciloscopia direta (BRASIL, 2001; BRASIL, 2008a; BRASIL, 2023) e baciloscopia pós-concentração (SALEM et al., 1990), com coloração da lâmina pela técnica de Kinyoun (KENT; KUBICA, 1985) e visualização em microscópio óptico em objetiva de imersão no aumento de 1000X. O cultivo foi realizado, segundo a metodologia de SALEM et al. (2007), pelo método PKO (iniciais em homenagem a Petroff, Kudoh e Ogawa). As micobactérias que se desenvolvem no meio de cultivo foram identificadas como *M. tuberculosis* por PCR, utilizando primers específicos para o elemento de inserção IS6110 (HERMANS et al., 1990; VAN EMBDEN et al., 1993).

5.14 Extração de DNA das amostras de sangue

A técnica de extração de DNA em amostras de sangue foi feita pela metodologia descrita por Gustincich et al. (1991) com modificações, baseada na precipitação do DNA por sais de brometo de tetrametilamônio (DTAB/CTAB). Posteriormente a extração, as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro de luz UV, diluídas na concentração de 50ng/uL e armazenadas no freezer -20°C, devidamente codificados e datados até o momento do uso.

5.15 Genotipagem dos SNV por qPCR - Ensaio TaqMan

O ensaio de PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) utilizando sondas TaqMan foi realizado para a genotipagem das variantes selecionadas dos genes do sistema HLA através do equipamento QuantStudio 3 Real-Time PCR da *Applied System*. Essa técnica baseia-se no uso de sondas fluorescentes de hidrólise contendo as sequências alelo-específicas no qual é possível caracterizar os alelos para um SNV particular de cada indivíduo.

As reações para cada SNV do gene selecionado foram realizadas em uma microplaca de 96 poços. Na reação conterá os reagentes TaqMan Genotyping Master mix, sondas TaqMan específicas para cada variante pesquisada, DNA e água ultrapura para completar o volume final de 11 µL na concentração e quantidades fornecidas no **quadro 1**, segundo as recomendações do fabricante. O reagente Master mix otimizado é uma mistura constituída de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), tampão, a enzima DNA polimerase e o ROX (Referência passiva). Este último refere-se uma referência interna necessária para corrigir as variações de fluorescência devido a mudanças de concentração ou volume (variação da pipetagem).

Quadro 1 - Condições de reação de qPCR que foram usadas para cada sondas dos SNV selecionados

Reagentes	Concentração utilizada	Quantidade utilizada para 1 reação (µL)
TaqMan Genotyping Master Mix 2X	1X	5
Sonda 20X	0,5X	0,5
DNA	50ng/µL	1
H ₂ O ultrapura	1X	4,5
Volume final	---	11,0

Para cada microplaca de reação foi incluída um controle negativo e três controles positivos. O controle negativo foi composto dos reagentes descritos anteriormente, com exceção do DNA, para garantir que não houve contaminação das amostras testes. Os controles positivos foram três DNA previamente analisados sendo uma amostra referente ao homozigoto para o alelo referência, uma amostra heterozigoto e uma amostra homozigoto para o alelo variante e, assim, possibilitar uma maior confiabilidade dos resultados.

As características das sondas alelos-específicas sintetizadas pela *Thermo Fisher Scientific* que foram utilizadas para os ensaios de genotipagem por qPCR (**Quadro 2**) e as condições de amplificação são apresentadas no **Quadro 3**.

Quadro 2: Características gerais das sondas alelos-específicas do experimento

Gene	ID SNV	Localização cromossômica	Sequência da sonda 5'-[VIC/FAM]-3'	Alelo REF> Alelo VAR	Tipo de variante	ID ensaio	AA observado	MAF global
<i>HLA II</i>	rs9271300	6: 32613805	TGAAACTCCTTGCTTTTGT ATGAA[C/G]CAGTAGTTGG AAAAGTGTGTACAC	C>G	Intergênica	C__42974913_20	_	C: 0,48
<i>HLA-G</i>	rs1049033	6: 29829862	TCCCCATCATGGGTATCGTT GCTGG[C/T]CTGGTTGTCTT TGCAGCTGTAGTCA	C>T	Sinônimos	C__26543931_10	Glicina por glicina	T: 0,23
	rs1632937	6: 29829776	ACCTTTAACAGGGTCGGTG GTGAGG[C/G]CTGGGGGTC AGAGACCCTCACCTTC	G>C	Intron	C__2437888_10	_	G: 0,46
<i>MICA</i>	rs1051792	6: 31411200	AAACCTGGGAGACTGAGGAA TGGACA[G/A]TGCCCCAGTC CTCCAGAGCTCAGAC	G>A	Missense	C_175674726_10	Valina por metionina	A: 0,36

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

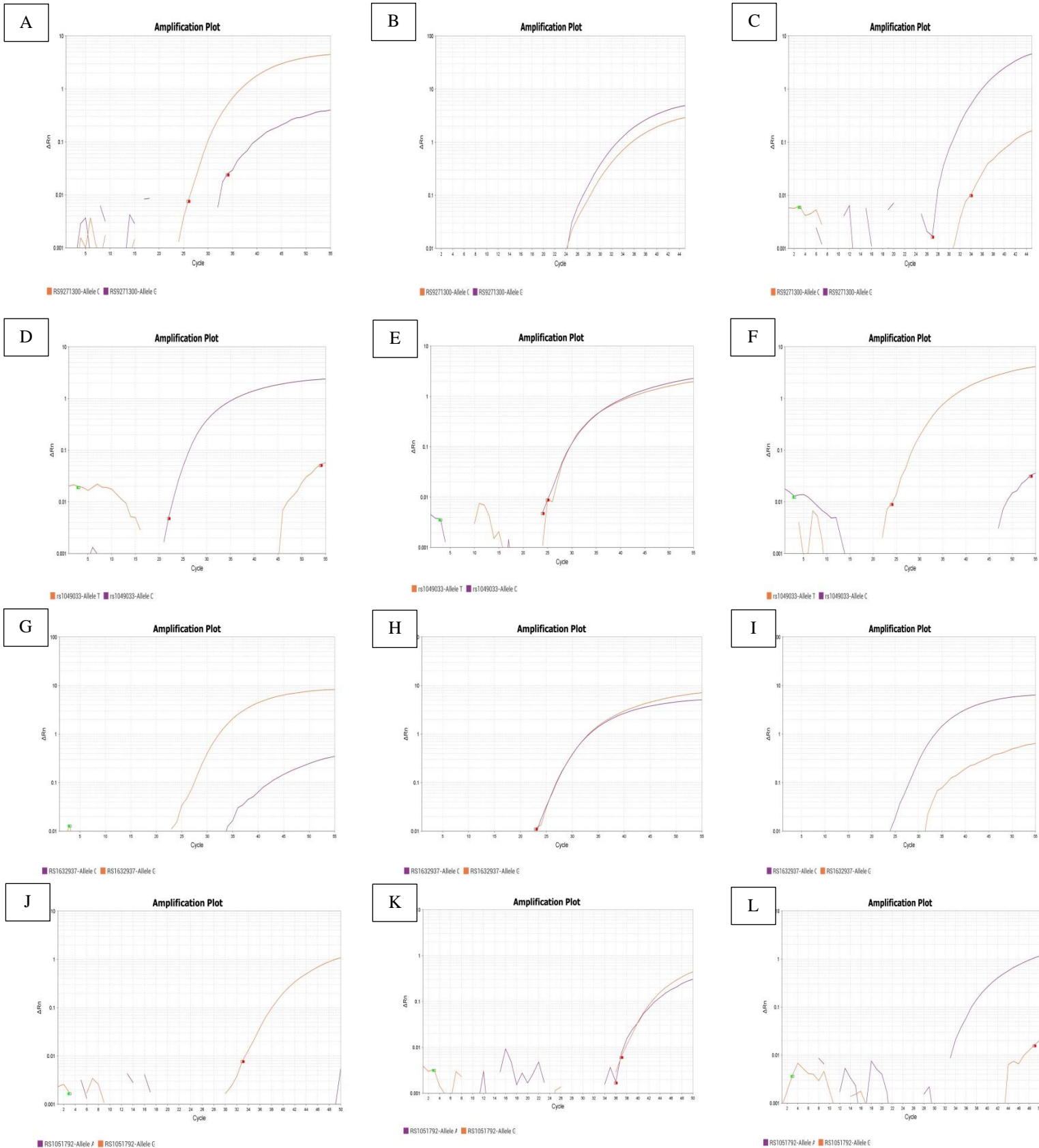
Quadro 3: Condições de termociclagem que serão utilizadas no experimento

	Termociclagem	
Hold stage	95°C – 10':00"	1 ciclo
PCR stage	95°C – 00':15"	50 ciclos
PCR stage	60°C – 01':00"	
Post-read stage	60°C – 00':30"	1 ciclo

O software QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.0 foi utilizado na interpretação dos resultados conforme a curva de amplificação gerada, e assim, permitir a identificação dos genótipos. O genótipo resultante de cada amostra foi classificado em homocigoto para o alelo referência, homocigoto para o alelo variante ou heterocigoto.

Exemplos de algumas placas demonstrando os resultados da curva de amplificação obtidos a partir das genotipagens por qPCR para o SNV rs9271300 no gene *HLA-II*, para os SNV no gene *HLA-G* rs1049033 e rs1632937 e rs1051792 no gene *MICA* encontram-se disponíveis nas **Figuras 11**.

Figura 11: Curva de amplificação gerada para cada SNV selecionado no estudo.



Legenda: (A-C) refere-se ao SNV rs9271300 no gene *HLA-II*. A: Homozigoto referência (CC), B: heterozigoto (CG), C: homozigoto variante (GG); (D-F) refere-se ao SNV rs1049033 no gene *HLA-G*. D: Homozigoto referência (CC), E: heterozigoto (CT), F: homozigoto variante (TT); (G-I) refere-se ao SNV rs1632937 no gene *HLA-G*. G: Homozigoto referência (GG), H: heterozigoto (CG), I: homozigoto variante (CC); (J-L) refere-se ao SNV rs1051792 no gene *MICA*. J: Homozigoto referência (GG), K: heterozigoto (GA), L: homozigoto variante (AA).

5.16 Quantificação das citocinas IL-6, IL-1 β , IFN- γ e TNF- α por ELISA

As citocinas IL-6 e IL-1 β foram mensuradas pela técnica ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) em amostras de plasma previamente armazenadas no freezer -20°C de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. O kit comercial foi da BioLegend's ELISA MAX™ Deluxe Sets da R&D system. O espectrofotômetro de placas da BioRad com filtro de 450 nm foi usado para a leitura das amostras. Os resultados foram fornecidos em densidade ótica (DO) e convertidos em pg/mL com base na curva padrão das citocinas.

Para a quantificação de IFN- γ foi utilizado o kit comercial Quantiferon-TB Gold (Cellestis Inc. USA). Um total de 3 mL de sangue periférico coletado foi distribuído em 3 tubos fornecidos pelo kit sendo 1 mL para o tubo Nil que não contém estímulos (controle negativo), 1 mL para o tubo teste que com antígenos específicos de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10 e TB7.7) e 1 mL para o tubo com mitógeno para avaliar a capacidade funcional das células T (controle positivo). Os tubos foram incubados por 24 horas em estufa a 37°C. Posteriormente, coletou-se o sobrenadante (plasma) para mensurar a citocina por ELISA. A quantificação de TNF- α foi feita a partir do sobrenadante (plasma) obtido pelo kit Quantiferon-TB Gold através de ELISA.

Os resultados para o IFN- γ foram fornecidos em densidade ótica (DO) e convertidos em UI/mL com base na curva padrão das citocinas. Para a citocina TNF- α , as DO foram convertidas em Log neperiano a partir das concentrações em pg/mL para melhor visualização dos dados.

5.17 Análises estatística

Primeiramente, foi realizada a estatística descritiva dos dados obtidos nos grupos de TBp, TBe e controles a partir das informações epidemiológicas obtidas considerando, principalmente, as seguintes variáveis: sexo, idade, vacinação por BCG, tabagismo e alcoolismo. As variantes genéticas foram testadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e as análises de associação de genótipos na população avaliada através do software estatístico R, versão 3.4.3, (www.r-project.org) junto o pacote "SNPassoc", versão 1.9-2. O programa Haploview foi utilizado para avaliar a frequência, análise de associações de haplótipos e desequilíbrio de ligação (BARRETT et al., 2005). Para a análise alélica foi realizado pelo teste do qui quadrado (χ^2) através programa GrahPadPrism® (versão 8.0). Adicionalmente,

para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos foi realizada uma regressão logística multivariada através do software estatístico MedCalc (versão 22.014).

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

Para a análise da concentração de citocinas *versus* genótipos (ensaio de funcionalidade) foi utilizado o teste de ANOVA (paramétrico ou não paramétrico) empregando o programa GraphPadPrism® (versão 8.0). O nível de significância adotado para todas as análises descritas foi de $p < 0,05$, com o intervalo de confiança de 95%.

5.18 Apoio Financeiro

Este projeto teve apoio financeiro do Laboratório de Imunologia Molecular (LIM), Laboratório de Micobacteriologia do INPA, do Laboratório de Imunogenética da USP, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da UFAM (PPGIBA/UFAM).

Resultados e discussão

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Descrição geral da população estudada

Um total de 1304 amostras foi coletado para o estudo. Destas, 1275 amostras foram incluídas e 29 não se enquadraram nos critérios de inclusão estabelecidos no projeto. Em relação as 29 amostras, estas foram referentes ao grupo de pacientes com tuberculose (TB) (24 pacientes apresentaram outras comorbidades além da TB e 05 pacientes foram diagnosticados com NTM). Portanto, para as análises foram consideradas 1275 amostras.

Das 1275 amostras, 150 correspondem a pacientes com tuberculose extrapulmonar (TBe), 531 pacientes com tuberculose pulmonar (TBp) e 594 controles. Sobre a extração de DNA das amostras coletadas, o rendimento obtido foi de 100,0%. As variáveis consideradas no estudo foram sexo, idade, naturalidade, vacinação por BCG (*Bacilo de Calmette e Guérin*), tabagismo e alcoolismo. Os resultados encontrados para as variáveis sexo, idade e naturalidade encontram-se disponíveis na **Tabela 4** e vacinação por BCG, tabagismo e alcoolismo na **Tabela 5**.

Tabela 4: Descrição geral da população recrutada para estudo: controles, pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar nos grupos estudados

Variáveis	Tuberculose extrapulmonar n=150	Tuberculose pulmonar n=531	Controles n=594	TBe vs Cont. Valor-p OR (IC95%)	TBp vs Cont. Valor-p OR (IC95%)	TBe vs TBp Valor-p OR (IC95%)
Sexo						
Masculino, n (%)	95 (63,33%)	325 (61,21%)	320 (53,87%)	0,0463	0,0154	0,7052
Feminino, n (%)	55 (36,67%)	206 (38,79%)	274 (46,13%)	1,47 (1,02-2,13)	1,35 (1,06-1,71)	1,09 (0,75-1,60)
Idade (anos), (M ^a e SD ^b)	34,89±12,91	39,80±14,84	32,99±12,48	0,1170	<0,0001	0,0004
Naturalidade	n=150	n=437	n=388			
Manaus (%)	92 (61,33%)	236 (44,44%)	254 (42,76%)			
Outros municípios do AM (%)	42 (28,00%)	140 (26,37%)	78 (13,13%)	NA	NA	NA
Outros Estados (%)	16 (10,67%)	61(11,49%)	56 (9,43%)			

Legenda: Para as análises de associação do sexo entre os grupos estudados foi aplicado o teste de χ^2 com correção de Yates. Para análise de idade foi utilizado teste t student não paramétrico. TBe: tuberculose extrapulmonar; TBp: tuberculose pulmonar; Cont: controles; M^a = Média; SD^b=Standard deviation; AM=Amazonas; NA=não avaliado. Valores $p < 0,05$ foram considerados significativos e destacados em negrito, odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Quanto à variável sexo, no grupo de pacientes com TBe (63,33%), TBp (61,21%) e controles (53,87%), a maioria foi do sexo masculino. Na análise de associação quanto a variável sexo entre os grupos de pacientes e controles foi encontrado associações estatisticamente significativas em dois grupos estudados. Semelhantemente, os grupos de TBp

vs Controles ($p=0,0154$) e TBe vs Controles ($p=0,0463$) foi encontrado uma associação estatisticamente significativa com aumento do risco de desenvolvimento de TB em homens demonstrando que o sexo é um importante fator epidemiológico a ser considerado nesta doença. O grupo de TBe vs TBp não resultou em valores estatisticamente significativos ($p=0,7052$) (**Tabela 4**).

Segundo pesquisas publicadas, sabe-se que a TB ocorre, principalmente, em indivíduos do sexo masculino (DONALD et al., 2010; DODD et al., 2016; FERNANDES et al., 2018; BRASIL, 2023; WHO, 2023). Segundo o boletim epidemiológico de TB no Brasil informou que 70% dos casos novos de TB ocorreram em pessoas do sexo masculino (BRASIL, 2023). Recentemente, no mundo, 55% das pessoas que desenvolveram TB eram homens, 33% eram mulheres e 12% eram crianças (WHO, 2023). Esses resultados corroboram com os encontrados no presente estudo.

Quanto a variável idade, a média encontrada foi de aproximadamente 35,0 anos para pacientes com TBe; 40,0 anos para pacientes com TBp e 33,0 anos para controles. Nos grupos de TBp vs Controles ($p<0,0001$) e TBe vs TBp ($p=0,0004$) houve diferença significativa. A TB acomete mais a população referente a uma faixa de idade que corresponde a uma elevada produtividade no trabalho, maneira pelo qual estes podem estar entrando em contato com maior número de pessoas e, conseqüentemente, maior número de afecções incluindo a TB. Além disso, fatores como tabagismo e alcoolismo conjuntamente também podem contribuir para tal fato (LEE et al., 1993; DODD et al., 2016; FERNANDES et al., 2016).

Quanto ao aspecto naturalidade, a maioria das pessoas recrutadas foi do estado do Amazonas, principalmente da cidade de Manaus tanto para controles quanto pacientes. Esses resultados também refletem o cenário da nossa região visto que o estado do Amazonas bem como a capital Manaus apresenta anualmente coeficientes de incidência de TB elevados (BRASIL, 2023).

Em relação ao aspecto vacinação por BCG observou-se que a maioria dos pacientes com TBe (86,29%), TBp (83,92%) e controles (91,69%) foram vacinados. Após análise dos dados de vacinação, observou-se que houve associação estatisticamente significativa para proteção no grupo TBp vs Controles ($p=0,0120$; $OR=0,51$) (**Tabela 5**). Mundialmente, a vacinação por BCG é considerada a mais comumente administrada em comparação com as demais (RITZ et al., 2008). No Brasil, a vacinação por BCG é obrigatória nos primeiros

meses de vida desde 1976 e está disponível no SUS (Sistema Único de Saúde), possibilitando acesso a toda população (BRASIL, 2008b; BRASIL, 2013; WHO, 2018).

Estudos apontam que a imunização com BCG protege cerca de 80% contra as formas mais graves e disseminadas da TB (meningite tuberculosa, TB miliar) em crianças e apresenta redução do risco em torno de 50% da TB em adultos (BREWER, 2000; WALKER et al., 2006).

O estudo realizado por Berg et al. (2020) ao comparar os países em que a vacinação por BCG é obrigatória com os países sem este encargo (ou sem esta obrigatoriedade), os autores constataram que nos países no qual a vacina era obrigatória houve uma diminuição da curva na disseminação da COVID-19. Desta forma, sugerindo que esta imunização resulta em efeitos benéficos não somente em relação a TB, mas também contra outras infecções pulmonares incluindo a COVID-19.

Neste contexto, atualmente, tem se falado bastante em imunidade treinada (NETEA et al., 2011). Este conceito é definido como uma propriedade da imunidade inata de conferir memória imunológica induzida após uma infecção primária ou por meio da vacinação resultando em proteção a uma infecção secundária, seja após a exposição ao mesmo ou outro agente patogênico, através de mecanismos independentes das respostas adaptativas (NETEA et al., 2020; OCHANDO et al., 2023). Em particular, pesquisas têm demonstrado que a vacinação por BCG tem despertado interesse pela sua capacidade de induzir imunidade treinada (KLEINNIJENHUIS et al., 2012; DEBISARUN et al., 2023).

Tabela 5: Aspectos gerais da população recrutada referente aos controles, pacientes com TB pulmonar (TBp) e extrapulmonar (TBe) quanto as variáveis vacinação BCG, tabagismo e alcoolismo

Variáveis	Tuberculose extrapulmonar	Tuberculose pulmonar	Controles	TBe vs. Cont.			TBp vs. Cont.			TBe vs. TBp		
				OR	IC95%	Valor-p	OR	IC95%	Valor-p	OR	IC95%	Valor-p
Vacina BCG	n=124	n=367	n=409									
Sim, n (%)	107 (86,29%)	308 (83,92%)	375 (91,69%)									
Não, n (%)	15 (12,10%)	45 (12,26%)	27 (6,60%)	0,52	0,27-0,99	0,0814	0,51	0,31-0,85	0,0120	1,01	0,56-1,95	0,9123
Não sabe, n (%)	02 (1,61%)	14 (3,81%)	07 (1,71%)									
Tabagismo	n=110	n=370	n=377									
Sim, n (%)	23 (20,91%)	82 (22,16%)	37 (9,81%)									
Não, n (%)	87 (79,09%)	288 (77,84%)	340 (90,19%)	2,42	1,34-4,32	0,0032	2,61	1,73-3,96	<0,0001	0,92	0,55-1,56	0,8825
Alcoolismo	n=107	n=271	n=345									
Sim, n (%)	29 (27,10%)	95 (35,06%)	54 (15,65%)									
Não, n (%)	78 (72,90%)	176 (64,94%)	291 (84,35%)	2,00	1,20-3,31	0,0114	2,90	1,96-4,23	<0,0001	0,68	0,42-1,11	0,1732

Legenda: Para as análises de associação a BCG, tabagismo e alcoolismo entre os grupos estudados foi aplicado o teste de χ^2 com correção de Yates. TBp: tuberculose pulmonar; TBe: tuberculose extrapulmonar; Cont: controles. Valores $p < 0,05$ foram considerados significativos e destacados em negrito, *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Quanto ao tabagismo, a maioria dos pacientes com TBe (79,09%), TBp (77,84%) e controles (90,19%) não consumiam cigarros ou qualquer outra substância constituída de tabaco (**Tabela 5**). Neste item, observou-se uma associação para aumento do risco no grupo de TBp vs Controles ($p < 0,0001$) visto que a frequência de pacientes que fumavam foi maior no grupo de TBp (22,16%) quando comparadas ao grupo controle (9,81%). No grupo de TBe vs Controles ($p = 0,0032$) também foi encontrada associação para aumento do risco de TB. Da mesma forma, a maioria dos pacientes com TBe e TBp (72,90%; 64,94%, respectivamente) e controles (84,35%) não consumiam álcool (**Tabela 5**). Na comparação feita no grupo de pacientes com TBp vs Controles e TBe vs Controle foi encontrada associação para aumento do risco de TBp ($p < 0,0001$; OR=2,90) e TBe ($p = 0,0114$; OR=2,00) para esta variável.

Num estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, tanto as variáveis tabagismo quanto alcoolismo foram associadas a um risco aumentado para TB (BARLETTA-NAVECA et al., 2018). Nossos resultados são similares a de outros estudos que associam tabagismo (DAVIES et al., 2006; LEUNG et al., 2010; WEN et al., 2010) e alcoolismo (LÖNNROTH et al., 2008; REHM et al., 2009) como fatores de risco consolidados para desenvolvimento de TB. Estudos sugerem que a associação existente entre TB e tabagismo envolva a diminuição de TNF- α no pulmão favorecendo a reativação da TB latente visto que os macrófagos expressam altos números de receptores nicotínicos de acetilcolina. A nicotina se liga nesses receptores e o resultado é a diminuição da produção dessa importante citocina no controle da infecção (DAVIES et al., 2006; SHANG et al., 2011; CHAN et al., 2014).

Quanto as formas clínicas da TBe, a maioria das amostras coletadas tratava-se de TB pleural (64,67%), seguida da ganglionar (19,33%) e outras formas (16,00%) (**Tabela 6**). Outras formas incluem a TBe cutânea (n=3), ocular (n=2), mediastino (n=2), neuronal (n=2), intestinal (n=1), genitourinária (n=1) e nasal (n=1). Os resultados encontrados no estudo são comparáveis aos de outras pesquisas visto que a forma extrapulmonar mais frequente é a pleural (BRASIL, 2019) e de acordo com os dados disponíveis pelo banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) referente ao estado do Amazonas.

Tabela 6: Formas clínicas da TB extrapulmonar (TBe) recrutadas no estudo.

Formas clínicas TBe	n=150 n (%)
Pleural	97 (64,67%)
Ganglionar	29 (19,33%)
Mamária	06 (4,00%)
Miliar	03 (2,00%)
Óssea	03 (2,00%)
Outras	12 (8,00%)

Conjuntamente, esses resultados certificam cada vez mais que as características epidemiológicas como sexo, idade, vacinação por BCG, tabagismo, alcoolismo e outros podem influenciar no desfecho da infecção causada por *M. tuberculosis*, sendo, portanto, importantes fatores a serem analisados juntamente com as variantes genéticas selecionadas.

6.2 Resultados das análises de associação dos SNV selecionados

Do total de 1275 amostras coletadas, aproximadamente 10% das amostras testadas não amplificaram nos ensaios realizados, sendo, portanto, excluídas das análises de associação, provavelmente devido algum inibidor presente nas amostras. É importante ressaltar que para este trabalho estava previsto apresentar os resultados das frequências alélicas e genotípicas referentes ao SNV rs1264457 no gene *HLA-E*. No entanto, após os ensaios de qPCR, observou-se que 95% das amostras testadas não foi possível realizar a discriminação alélica. Após inúmeras tentativas para esclarecer o motivo do ensaio para esse SNV não funcionar, solicitou-se a empresa fornecedora dos insumos a reposição da sonda. Portanto, os resultados deste SNV não foram apresentados.

No que diz respeito a análise de associação genética, os resultados apresentados envolvem a comparação entre pacientes com TBe vs Controles, TBp vs Controles e TBe vs TBp dos seguintes SNV: rs9271300 localizado no gene *HLA-II*; rs1049033 e rs1632937, ambos localizados no gene *HLA-G* e rs1051792 no gene *MICA*. As frequências genotípicas e alélicas bem como os principais resultados das análises de associação dos SNV selecionados no melhor modelo genético e após ajustes de sexo e idade estão compilados na **Tabela 7**.

Tabela 7: Frequências genotípicas e alélicas e resultados da análise de associação dos SNV selecionados no melhor modelo genético e após os ajustes com as variáveis sexo e idade.

Gene ID SNV	Genótipos Alelos n, %	TBe n, %	TBp n, %	Controles n, %	TBe vs. Cont.				TBp vs. Cont.				TBe vs. TBp				
					Valor-p (mod)	OR (95%IC)	p adj (mod)	OR adj (95%IC)	Valor-p (mod)	OR (95%IC)	p adj (mod)	OR adj (95%IC)	Valor-p (mod)	OR (95%IC)	p adj (mod)	OR adj (95%IC)	
HLA-II rs9271300		N=86	N=317	N=384													
	CC	30 (0,35)	106 (0,33)	105 (0,27)	0,0264 (O)	0,59 (0,37- 0,94)	0,0191 (O)	0,55 (0,34- 0,91)	0,0669 (LogAdd)	0,81 (0,65-1,02)	0,1246 (D)	0,73 (0,50-1,09)	0,0596 (R)	1,77 (0,99- 3,15)	0,0307 (O)	0,54 (0,31-0,95)	
	CG	35 (0,41)	162 (0,51)	207 (0,54)													
GG	21 (0,24)	49 (0,15)	72 (0,19)														
	C	95 (0,55)	374 (0,59)	417 (0,54)	<i>p</i> -EHW=0,4569				<i>p</i> -EHW=0,0658				<i>p</i> -EHW=1,000				
	G	77 (0,45)	260 (0,41)	351 (0,46)													
HLA-G rs1049033		N=83	N=284	N=372													
	CC	53(0,64)	167 (0,59)	215 (0,58)	0,1350 (R)	0,37 (0,09- 1,62)	0,0743 (LAdd)	0,67 (0,43-1,05)	0,1801 (R)	0,61 (0,29-1,28)	0,0870 (R)	0,47 (0,19- 1,14)	0,3487 (LAdd)	0,81 (0,52-1,27)	0,2279 (LAdd)	0,73 (0,44- 1,22)	
	CT	28 (0,34)	106 (0,37)	134 (0,36)													
TT	02 (0,02)	11 (0,04)	23 (0,06)														
	C	134 (0,81)	440 (0,77)	564 (0,76)	<i>p</i> -EHW=0,8962				<i>p</i> -EHW=0,7443				<i>p</i> -EHW=0,220				
	T	32 (0,19)	128 (0,23)	180 (0,24)													

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

Continuação da Tabela 7: Frequências genóticas e alélicas e resultados da análise de associação dos SNV selecionados no melhor modelo genético e após os ajustes com as variáveis sexo e idade.

Gene ID SNV	Genótipos Alelos n, %	TBe n, %	TBp n, %	Controles n, %	TBe vs. Cont.				TBp vs. Cont.				TBe vs. TBp				
					Valor-p (mod)	OR (95%IC)	p adj (mod)	OR adj (95%IC)	Valor-p (mod)	OR (95%IC)	p adj (mod)	OR adj (95%IC)	Valor-p (mod)	OR (95%IC)	p adj (mod)	OR adj (95%IC)	
HLA-G rs1632937		N=84	N=315	N=405													
	GG	24 (0,29)	81 (0,26)	112 (0,28)	0,3519 (R)	0,76 (0,43-1,36)	0,294 (L _{Add})	0,83 (0,58-1,18)	0,2150 (O)	1,20 (0,90-1,62)	0,5592 (R)	0,88 (0,58-1,34)	0,5687 (L _{Add})	0,90 (0,64-1,28)	0,2766 (R)	0,67 (0,33- 1,39)	
	CG	43 (0,51)	164 (0,52)	192 (0,47)													
	CC	17 (0,20)	70 (0,22)	101 (0,25)													
G	91 (0,54)	326 (0,52)	416 (0,51)	p-EHW=0,4154				p-EHW=0,8229				p-EHW=0,4825					
C	77 (0,46)	304 (0,48)	394 (0,49)														
MICA rs1051792		N=125	N=451	N=500													
	GG	32 (0,26)	191 (0,42)	202 (0,40)	0,0017 (D)	1,97 (1,27- 3,06)	0,0069 (D)	1,85 (1,17-2,91)	0,4713 (O)	0,91 (0,70-1,18)	0,3782 (D)	0,88 (0,65-1,17)	0,0005 (D)	2,13 (1,37-3,32)	3,904e⁻⁵ (D)	2,90 (1,70- 4,94)	
	GA	71 (0,57)	188 (0,42)	220 (0,44)													
	AA	22 (0,17)	72 (0,16)	78 (0,16)													
G	135 (0,54)	570 (0,63)	624 (0,62)	p-EHW=0,5575				p-EHW=0,0124				p-EHW=0,219					
A	115 (0,46)	332 (0,37)	376 (0,38)														

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

Os quatro SNV avaliados rs9271300 no gene *HLA-II*, rs1049033 e rs1632937 no gene *HLA-G* e rs1051792 no gene *MICA* encontraram-se distribuídos em equilíbrio de Hardy-Weinberg (p -EHW) nos grupos avaliados TBe vs Controles, TBp vs Controles e TBe vs TBp, com exceção do SNV rs1051792 no gene *MICA* no grupo de TBp vs Controles (p -EHW=0,0124) (**Tabela 7**).

Adicionalmente, um importante dado fornecido por estudos de avaliação de associação genética são as frequências do alelo menor (MAF, do inglês: *Minor allele frequency*), pois essas informações permitem diferenciar as variantes comuns e raras numa determinada população. O MAF corresponde a frequência do segundo alelo mais comum para um determinado SNV na população avaliada (NCBI, 2023).

Em relação ao MAF para o SNV rs9271300 na população caso, tanto para TBe e TBp, e controle foi o alelo G, para o SNV rs1049033 foi o alelo T, para rs1632937 foi o alelo C e para o SNV rs1051792 foi o alelo A (**Tabela 7**). Em razão do fato de que os bancos de dados públicos da *Ensembl Genomes*, as frequências disponíveis para os SNV são referentes à população em geral, ou seja, não havendo distinção entre população caso com TB e controle, os resultados da MAF encontrados neste estudo foram comparados com a população controle mostrados na **Tabela 8**.

Tabela 8: Comparação entre as frequências da população controle em relação às outras populações globais disponíveis nos bancos da *Ensembl*.

Gene ID SNV	Valor p -EHW	Alelos	População do estudo	Populações globais					
			Controles	Global	África	América	Leste Asiático	Europa	Sul Asiático
<i>HLA-II</i> rs9271300	0,100	C	0,54	0,48	0,41	0,46	0,56	0,45	0,51
		G	0,46	0,52	0,59	0,54	0,44	0,55	0,49
<i>HLA-G</i> rs1049033	0,777	C	0,76	0,77	0,75	0,76	0,89	0,74	0,70
		T	0,24	0,23	0,25	0,24	0,11	0,26	0,30
<i>HLA-G</i> rs1632937	0,320	G	0,51	0,46	0,49	0,53	0,40	0,57	0,30
		C	0,49	0,54	0,51	0,47	0,60	0,43	0,70
<i>MICA</i> rs1051792	0,181	G	0,62	0,64	0,52	0,59	0,70	0,69	0,70
		A	0,38	0,36	0,48	0,41	0,30	0,31	0,30

Legenda: ID SNV: identificação da variante de nucleotídeo único; valor p -EHW: valor do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A MAF para o SNV rs9271300 (alelo G) na população controle foi de 0,46. Essa frequência foi semelhante a população do sul asiático (MAF=0,49), especificamente a

subpopulação Telangana (MAF G=0,48). Ao avaliar as frequências globais, a MAF é o alelo C com 0,48.

Para o SNV rs1049033 que foi o alelo T com MAF de 0,24, esta frequência foi similar a população americana (0,24) sendo a subpopulação colombiana (0,22) comparável a encontrada no estudo. Globalmente, o alelo T é o alelo de frequência menor (0,23), semelhante a encontrada no presente estudo. Da mesma forma, para o SNV rs1632937 foi o alelo C com frequência de 0,49, semelhante a população americana (0,47) e subpopulação mexicana (0,49). Para o SNV rs1051792, a MAF foi o alelo A (0,38) semelhante a população europeia e subpopulação da Filândia (0,39).

Dentre os SNV selecionados somente o rs9271300 foi estudado em pacientes com TB pulmonar na população chinesa (MIAO et al., 2018). Neste estudo, a MAF da população controle e paciente foi o alelo C com 0,49 para a população com TBp.

Em relação aos SNV rs1049033, rs1632937 e rs1051792 ainda não foram estudados em pacientes com TB. A partir desses resultados, é possível observar que essa análise de frequência difere nas populações e trata-se de uma importante avaliação na genética de populações.

Após a análise das frequências alélicas, realizou-se a análise de associação dos SNV selecionados considerando apenas a presença da variante na população caso com TBe, TBp e controles e padronizou-se considerar como variáveis de ajuste sexo e idade para cada SNV, apresentados a seguir.

6.2.1 Análise de associação do SNV rs9271300 no gene *HLA-II*

Para a variante rs9271300 localizada no gene *HLA-II* não foi observado associação estatisticamente significativa com suscetibilidade ou proteção a TB no grupo TBp vs Controles e nem no grupo TBe vs TBp em nenhum modelo genético avaliado (codominante, dominante, recessivo, overdominate e Log-Additive). Na análise do grupo TBp vs Controles, é possível observar que o modelo que mais se aproximou foi o Log-Additive ($p=0,069$) (**Tabela 9**).

Em relação a distribuição das frequências genotípicas, ambos os grupos avaliados, o genótipo heterozigoto CG foi mais frequente (TBe=0,41; TBp=0,51; Controles=0,54), seguido do genótipo homozigoto para o alelo referência C (TBe= 0,35; TBp=0,33; Controles=0,27). O genótipo menos frequente foi o correspondente ao homozigoto para o alelo variante G (TBe= 0,24; TBp=0,15; Controles=0,19) (**Tabela 9**).

Tabela 9: Análise do SNV rs9271300 entre o grupo de pacientes com TBe, TBp e Controles nos modelos genéticos

Gene <i>HLA-II</i> (rs9271300)				TBe vs. Cont		TBp vs. Cont		TBe vs. TBp	
Genótipo Alelo n, %	TBe n, %	TBp n, %	Controles n, %	Mod: valor- <i>p</i>	OR (IC95%)	Mod: valor- <i>p</i>	OR (IC95%)	Mod: valor- <i>p</i>	OR (IC95%)
	N=86	N=317	N=384	C: 0,0851	0,59 (0,34-1,02)	C: 0,1745	0,78 (0,55-1,09)	C: 0,1063	0,76 (0,44- 1,32)
CC	30 (0,35)	106 (0,33)	105 (0,27)	D: 0,1686	1,02 (0,54-1,92)	D: 0,0803	0,67 (0,43-1,06)	D: 0,8018	1,51 (0,79-2,91)
CG	35 (0,41)	162 (0,51)	207 (0,54)	R: 0,2426	0,70 (0,43-1,15)	R: 0,2494	0,75 (0,54-1,04)	R: 0,0596	0,94 (0,57-1,55)
GG	21 (0,24)	49 (0,15)	72 (0,19)	O: 0,0264	1,40 (0,80-2,44)	O: 0,4595	0,79 (0,53-1,18)	O: 0,085	1,77 (0,99-3,15)
				L_{Add}:0,8202	0,59 (0,37-0,94)	L_{Add}:0,069	0,89 (0,66-1,20)	L_{Add}:0,373	0,66 (0,40-1,06)
C	95 (0,55)	374 (0,59)	417 (0,54)	<i>p</i> -EHW=0,4154		<i>p</i> -EHW=0,0658		<i>p</i> -EHW=0,482	
G	77 (0,45)	260 (0,41)	351 (0,46)						

Legenda: TBe: tuberculose extrapulmonar; TBp: tuberculose pulmonar; valor *p*-EHW: valor do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Mod=Modelos genéticos C: codominante, D: dominante, R: recessivo, O: overdominante; L_{Add}: Log-Additive. Valores *p*<0,05 foram considerados significativos e destacados em negrito, *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Ao comparar o grupo TBe vs Controles verificou-se uma associação estatisticamente significativa com proteção a TBe no modelo genético overdominante (*p*=0,026; OR=0,59) (Tabela 9). Após o ajuste para sexo e idade, a associação permaneceu no modelo overdominante (*p*=0,0191; OR=0,55) (Tabela 10).

Tabela 10: Análise do SNV rs9271300 após os ajustes por sexo e idade em grupo de pacientes com TBe vs. Controles nos modelos genéticos

<i>HLA II</i> Modelo genético	TBe n, %	Controles n, %	Valor p_{adj}	OR _{adj.} (IC95%)	AIC
Codominante	N=86	N=384			
CC	30 (0,35)	105 (0,27)	0,0590	0,52 (0,29-0,92)	402.4
CG	35 (0,41)	207 (0,54)		0,87 (0,45-1,69)	
GG	21 (0,24)	72 (0,19)			
Dominante					
CC	30 (0,35)	105 (0,27)	0,0741	0,62 (0,36-1,04)	402.8
CG-GG	56 (0,65)	279 (0,73)			
Recessivo					
CC-CG	65 (0,76)	312 (0,81)	0,3914	1,29 (0,72-2,30)	405.3
GG	21 (0,24)	72 (0,19)			
Overdominante					
CC-GG	51(0,59)	177 (0,46)	0,0191	0,55 (0,34-0,91)	400.5
CG	35 (0,41)	207 (0,54)			
Log-Additive 0,1,2	86 (0,18)	384 (0,82)	0,5113	0,89 (0,62-1,26)	405.6

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

No modelo overdominante, o genótipo heterozigoto CG foi mais frequente em controles (0,52) em comparação com o grupo de TBp (0,41) (**Tabela 10**), sugerindo que este genótipo parece apresentar um baixo risco de desenvolvimento de TBe (OR=0,59;OR_{adj}=0,55.).

Ao estratificar para avaliar qual sexo no modelo overdominante estava influenciando, observou-se que para o sexo masculino no grupo controle, a frequência do genótipo CG foi maior (0,57) em comparação com os pacientes com TBe (0,36) ($p=0,0035$; OR=0,40; IC95%=0,22-0,75). Para o sexo feminino, não houve associação estatisticamente significativa nas distribuições das frequências caso TBe e controles ($p=0,9312$; OR=1,04; IC95%=0,44-2,44) (**Tabela 11**).

Tabela 11: Resultado da análise de associação do SNV rs9271300 após os ajustes por sexo e idade em grupo de pacientes com TBe vs. Controles nos modelo overdominante

Genótipo	TBe	Controles	Valor- <i>p</i>	OR (95% CI)	Valor <i>p</i> _{adj}	OR _{adj.} (IC95%)
Overdominante	n= 86	n=384				
CC-GG	51(0,59)	177 (0,46)	0,0264	0,59 (0,37-0,94)	0,0191	0,55 (0,34-0,91)
CG	35 (0,41)	207 (0,54)				
MASCULINO						
	n=61	n=175				
CC-GG	39 (0,64)	75 (0,43)	0,0072	0,42 (0,23-0,76)	0,0035	0,40 (0,22-0,75)
CG	22 (0,36)	100 (0,57)				
FEMININO						
	n=25	n=209				
CC-GG	12 (0,48)	102 (0,49)	0,8921	1,03 (0,44-2,45)	0,9312	1,04 (0,44-2,44)
CG	13 (0,52)	107 (0,51)				

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

A variante rs9271300 está localizada numa região intergênica próxima ao *HLA-DRB1*, descrita por Moffatt et al. (2010) num estudo de associação genômica com asma. No entanto, no estudo destes autores não foi observado associações desta variante com asma. Essa mesma variante foi avaliada em pacientes com TBp na população chinesa, no entanto não foi observada associação significativa na análise geral ($p=0,281$) e nem após os ajustes para sexo e idade ($p=0,273$) (MIAO et al., 2018). Por outro lado, no presente estudo, os resultados foram diferentes do encontrado pelos autores Miao et al. (2018), principalmente em relação a forma clínica TBe, até então, pouco estudada em comparação com a forma de TB pulmonar.

6.2.2 Análise de associação dos SNV rs1049033 e rs1632937 no gene *HLA-G*

Para o gene *HLA-G*, foram analisados dois SNV: rs1049033 e rs1632937. A variante rs1049033 é sinônima e a rs1632937, localiza-se na região intrônica do gene. Para o SNV rs1049033, os resultados das frequências genotípicas e alélicas como também as análises de associação entre o grupo TBe vs Controles, TBp vs Controles e TBe vs TBp estão demonstrados na **Tabela 12**.

Tabela 12: Análise do SNV rs1049033 entre o grupo de pacientes com TBe, TBp e Controles nos modelos genéticos

Gene <i>HLA-G</i> (rs1049033)				TBe vs. Cont		TBp vs. Cont		TBe vs. TBp	
Genótipo Alelo n, %	TBe n, %	TBp n, %	Controles n, %	Mod: valor- <i>p</i>	OR (IC95%)	Mod: valor- <i>p</i>	OR (IC95%)	Mod: valor- <i>p</i>	OR (IC95%)
	N=86	N=284	N=372	C: 0,2661	0,85 (0,51-1,41)	C: 0,4047	1,02 (0,74 -1,41)	C:0,6298	0,83 (0,50-1,40)
CC	30 (0,35)	167 (0,59)	215 (0,58)	D: 0,3076	0,35 (0,08-1,54)	D: 0,7954	0,62 (0,29-1,30)	D: 0,4065	0,57 (0,12-2,67)
CT	35 (0,41)	106 (0,37)	134 (0,36)	R: 0,1350	0,78 (0,47-1,27)	R: 0,1801	0,96 (0,70-1,31)	R: 0,5078	0,81 (0,49-1,34)
TT	21 (0,24)	11 (0,04)	23 (0,06)	O: 0,6931	0,37 (0,09-1,62)	O: 0,7315	0,61 (0,29-1,28)	O:0,5486	0,61 (0,13-2,82)
				L _{add} :0,1686	0,90 (0,55-1,49)	L _{add} :0,477 9	1,06 (0,77-1,46)	L _{add} :0,348 7	0,85 (0,51-1,43)
C	134 (0,81)	440 (0,77)	564 (0,76)	<i>p</i> -EHW=0,8962		<i>p</i> -EHW=0,7443		<i>p</i> -EHW=0,220	
T	32 (0,19)	128 (0,23)	180 (0,24)						

Legenda: TBe: tuberculose extrapulmonar; TBp: tuberculose pulmonar; valor *p*-EHW: valor do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Mod=modelos genéticos C: codominante, D: dominante, R: recessivo, O: overdominante; L_{add}: Log-Additive. Valores *p*<0,05 foram considerados significativos, odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Para esta variante, não foi observada uma associação estatisticamente significativa em nenhum dos cinco modelos analisados (**tabela 12**). Quanto a frequência genotípica, viu-se que o genótipo referente CC foi mais frequente tanto na população controle (0,58) quanto pacientes com TBe (0,35) e TBp (0,59), seguido do genótipo heterozigoto CT. Para este SNV, a frequência do genótipo variante TT foi baixa comparada o genótipo CC e CT. A frequência do genótipo TT na população com TBp (0,04) e controles (0,06) foi inferior do que em pacientes com TBe (0,24).

Para o SNV rs1049033 também foi realizado a análise considerando os ajustes por sexo e idade (dados não mostrados), mas não resultou em associação estatisticamente significativa nos grupos estudados em nenhum modelo genético, sugerindo que esse SNV pode não estar associado a suscetibilidade ou proteção a TB.

Da mesma forma, para o SNV rs1632937 não observou-se associação estatisticamente significativa no grupo de pacientes com TBe, TBp e controles em nenhum dos modelos testados (**Tabela 13**). Ao avaliar a distribuição genotípica, observou-se que o genótipo heterozigoto GC foi mais frequentes nas populações caso e controles. O segundo genótipo mais frequente foi o GG, seguido do genótipo variante CC (**Tabela 13**). Após a correção por sexo e idade também não foi observado associação estatisticamente significativa nos grupos estudados (dados não mostrados).

Tabela 13: Análise do SNV rs1632937 entre o grupo de pacientes com TBe, TBp e Controles nos modelos genéticos

Gene <i>HLA-G</i> (rs1632937)				TBe vs. Cont		TBp vs. Cont		TBe vs. TBp	
Genótipo Alelo n, %	TBe n, %	TBp n, %	Controles n, %	Mod: valor- <i>p</i>	OR (IC95%)	Mod: valor- <i>p</i>	OR (IC95%)	Mod: valor- <i>p</i>	OR (IC95%)
					1,05 (0,60-1,81)		.1,18 (0,83-1,68)		0,88 (0,50-1,56)
GG	N=84 24 (0,29)	N=315 81 (0,26)	N=405 112 (0,28)	C: 0,6404	0,79 (0,40-1,55)	C: 0,4545	0,96 (0,63-1,46)	C: 0,8465	0,82 (0,41-1,65)
CG	43 (0,51)	164 (0,52)	192 (0,47)	D: 0,8647	0,96 (0,57-1,61)	D: 0,5594	1,10 (0,79-1,54)	D: 0,5995	0,87 (0,51-1,48)
CC	17 (0,20)	70 (0,22)	101 (0,25)	R: 0,3519	0,76 (0,43-1,36)	R: 0,3946	0,86 (0,61-1,22)	R: 0,6936	0,89 (0,49-1,61)
				O: 0,5278	1,16 (0,73-1,86)	O: 0,2150	1,20 (0,90-1,62)	O: 0,8868	0,97 (0,60-1,56)
				L _{add} : 0,5147	0,90 (0,65-1,24)	L _{add} : 0,884 3	0,98 (0,80-1,21)	L _{add} : 0,568 7	0,90 (0,64-1,28)
G	91 (0,54)	326 (0,52)	416 (0,51)	<i>p</i> -EHW=0,4154		<i>p</i> -EHW=0,8229		<i>p</i> -EHW=0,4825	
C	77 (0,46)	304 (0,48)	394 (0,49)						

Legenda: TBe: tuberculose extrapulmonar; TBp: tuberculose pulmonar; valor *p*-EHW: valor do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Mod=Modelos genéticos C: codominante, D: dominante, R: recessivo, O: overdominante; L_{add}: Log-Additive. Valores *p*<0,05 foram considerados significativos, odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Em relação a pesquisas desses SNV no gene *HLA-G* (rs1049033 e rs1632937) na TB até o presente momento ainda não tinham sido descritas. Al-Tamimi et al. (2022) publicaram a associação da variante rs66554220 (14-bp Ins/Del) localizada no gene *HLA-G* com suscetibilidade a TBp na população iraquiana (*p*=0,044; OR=9,26). Neste mesmo estudo, outro SNV rs1063320 (+3142G>C) não resultou em diferenças significativas entre a população caso e controle. Além disso, os níveis séricos de *HLA-G* solúvel foram significativamente maiores em pacientes com TBp do que em controles, sugerindo um papel desta proteína no desenvolvimento da doença (AL-TAMIMI et al., 2022).

Dos genes *HLA* não-clássicos de classe I, o *HLA-G* é o que tem sido mais estudados devido seu papel na imunorregulador (CASTELLI et al., 2014). Como na TB poucos estudos têm sido descritos sobre o papel da molécula e SNV neste gene, o presente trabalho pode contribuir com os resultados das frequências alélicas e genóticas desses SNV na TB na população amazonense.

6.2.3 Análise de associação do SNV rs1051792 no gene *MICA*

Para o SNV rs1051792, os resultados das frequências genotípicas e alélicas como também as análises de associação entre o grupo TBe vs Controles, TBp vs Controles e TBe vs TBp estão na **Tabela 14**. De maneira geral, observou-se que o genótipo GA foi o mais frequente na população caso e controles, seguido do genótipo GG e AA, sendo este último o genótipo variante (**Tabela 14**).

Tabela 14: Análise do SNV rs1051792 entre o grupo de pacientes com TBe, TBp e Controles nos modelos genéticos

Genótipo Alelo n, %	Gene <i>MICA</i> (rs1051792)			TBe vs. Cont		TBp vs. Cont		TBe vs. TBp	
	TBe n, %	TBp n, %	Controles n, %	Mod: valor- <i>p</i>	OR (IC95%)	Mod: valor- <i>p</i>	OR (IC95%)	Mod: valor- <i>p</i>	OR (IC95%)
					2,04 (1,29-3,22)		0,90 (0,68-1,19)		2,25 (1,42-3,58)
	N=125	N=451	N=500	C: 0,0067	1,78 (0,97-3,25)	C: 0,7654	0,98 (0,67-1,42)	C: 0,0017	1,82 (0,99-3,35)
GG	32 (0,26)	191 (0,42)	202 (0,40)	D: 0,0017	1,97 (1,27-3,06)	D: 0,5419	0,92 (0,71-1,19)	D: 0,0005	2,13 (1,37-3,32)
GA	71 (0,57)	188 (0,42)	220 (0,44)	R: 0,5889	1,16 0,69-1,94	R: 0,8776	1,03 (0,72-1,46)	R: 0,6638	1,12 (0,67-1,90)
AA	22 (0,17)	72 (0,16)	78 (0,16)	O: 0,0103	1,67 (1,13-2,49)	O: 0,4713	0,91 (0,70-1,18)	O: 0,0027	1,84 (1,23-2,74)
				L_{add}:0,0167	1,40 (1,06-1,85)	L_{add}:0,7312	0,97 (0,81-1,16)	L_{add}:0,0105	1,44 (1,09-1,90)
G	135 (0,54)	570 (0,63)	624 (0,62)	<i>p</i> -EHW=0,5575		<i>p</i> -EHW=0,0124		<i>p</i> -EHW=0,219	
A	115 (0,46)	332 (0,37)	376 (0,38)						

Legenda: TBe: tuberculose extrapulmonar; TBp: tuberculose pulmonar; valor *p*-EHW: valor do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Mod=Modelos genéticos C: codominante, D: dominante, R: recessivo, O: overdominante; L_{Add}: Log-Additive. Valores *p*<0,05 foram considerados significativos e destacados em negrito, *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Para esta variante, foi observada uma associação estatisticamente significativa nos grupos de TBe vs Controles e TBe vs TBp na análise univariada e permanecendo após os ajustes por sexo e idade (**Tabela 15** e **Tabela 17**, respectivamente). No grupo TBp vs Controles, as frequências alélicas apresentaram desvio do EHW (*p*-EHW=0,0124), um importante parâmetro de controle de qualidade a ser considerado na análises de associação. Sendo assim, estudos adicionais nesse grupo faz-se necessário dar continuidade para avaliar os resultados obtidos.

Na análise univariada de associação no grupo TBe vs Controles, notou-se associação estatisticamente significativa com suscetibilidade a TBe nos modelos genéticos codominante (*p*=0,0067; OR=2,04), dominante (*p*=0,0017; OR=1,97), overdominante (*p*=0,0103;

OR=1,67) e Log-Additive ($p=0,0167$; OR=1,40). A associação permaneceu ao comparar TBe vs TBp (**Tabela 14**). Dentre estes, o melhor modelo genético foi o dominante (GG vs GA-AA: $p=0,0017$; AIC=619.7) (**Tabela 14**).

Com o intuito de avaliar se o sexo e idade estariam influenciando nesta associação foi feito os ajustes por sexo e idade. Os resultados obtidos após os ajustes permaneceram nos quatro modelos genéticos, com exceção do modelo recessivo ($p=0,9024$), reforçando que o sexo e idade são variáveis importantes na TB (**Tabela 15**).

Tabela 15: Análise do SNV rs1051792 após os ajustes por sexo e idade em grupo de pacientes com TBe vs. Controles nos modelos genéticos

<i>MICA</i> Modelo genético	TBe n, %	Controles n, %	Valor p_{adj}	OR _{adj.} (IC95%)	AIC
Codominante	N=125	N=500			
GG	32 (0,26)	202 (0,40)	0,0189	1,96 (1,21-3,16) 1,55 (0,83-2,91)	550.7
GA	71 (0,57)	220 (0,44)			
AA	22 (0,17)	78 (0,16)			
Dominante					
GG	32 (0,26)	202 (0,40)	0,0069	1,85 (1,17-2,91)	549.3
GA-AA	93 (0,74)	298 (0,60)			
Recessivo					
GG-AG	103 (0,83)	422 (0,84)	0,9024	1,03 (0,60-1,79)	556.6
AA	22 (0,17)	78 (0,16)			
Overdominante					
GG-AA	54 (0,43)	280 (0,56)	0,0136	1,68 (1,11-2,55)	550.5
GA	71 (0,57)	220 (0,44)			
Log-Additive 0,1,2	125 (0,20)	500 (0,80)	0,0607	1,32 (0,99-1,77)	553.1

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

Após a estratificação, observou-se que o sexo masculino que estava influenciando na associação visto que a frequência GA-AA foi maior em pacientes com TBe (0,76) em comparação com os controles (0,59) ($p_{adj}=0,0142$; OR_{adj}=2,06; IC95%=1,14-3,73). Para o sexo feminino, não houve associação estatisticamente significativa nas distribuições das frequências TBe e controles ($p=0,1869$) (**Tabela 16**).

Tabela 16: Resultado da análise de associação do SNV rs1051792 após os ajustes por sexo e idade em grupo de pacientes com TBe vs. Controles no modelo dominante

Genótipo	TBe	Controles	Valor- <i>p</i>	OR (IC95%)	Valor <i>p</i> _{adj}	OR _{adj.} (IC95%)
Dominante	n=125	n=500				
GG	32 (0,26)	202 (0,40)	0,0017	1,97 (1,27-3,06)	0,0069	1,85 (1,17-2,91)
GA-AA	93 (0,74)	298 (0,60)				
MASCULINO						
	N=78	N=278				
GG	19 (0,24)	115 (0,41)	0,0091	2,19 (1,22-3,86)	0,0142	2,06 (1,14-3,73)
GA-AA	59 (0,76)	163 (0,59)				
FEMININO						
	N=47	N=222				
GG	13 (0,28)	87 (0,39)	0,2662	1,58 (0,76-3,16)	0,1869	1,60 (0,78-3,28)
GA-AA	34 (0,72)	135 (0,61)				

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

A análise de associação do SNV rs1051792 após os ajustes por sexo e idade no grupo de pacientes com TBe vs TBp estão demonstrados na **Tabela 17** nos cinco diferentes modelos genéticos. Neste caso, o melhor modelo genético também foi o dominante (GG vs GA-AA: $p=3,9048e-05$; AIC=591.1) e os resultados da estratificação por sexo e idade no modelo dominante são mostrados na **Tabela 18**, permanecendo o sexo masculino.

Tabela 17: Análise do SNV rs1051792 após os ajustes por sexo e idade em grupo de pacientes com TBe vs TBp nos modelos genéticos

<i>MICA</i> Modelo genético	TBe n, %	TBp n, %	Valor p_{adj}	OR _{adj.} (IC95%)	AIC
Codominante	N=125	N=451			
GG	32 (0,26)	191 (0,42)	1,7332e-04	3,06 (1,75-5,34) 2,48 (1,20-5,11)	592.7
GA	71 (0,57)	188 (0,42)			
AA	22 (0,17)	72 (0,16)			
Dominante					
GG	32 (0,26)	191 (0,42)	3,9048e-05	2,90 (1,70-4,94)	591.1
GA-AA	93 (0,74)	260 (0,58)			
Recessivo					
GG-AG	103 (0,83)	379 (0,84)	4,6706e-01	1,26 (0,68-2,33)	607.5
AA	22 (0,17)	72 (0,16)			
Overdominante					
GG-AA	54 (0,43)	263 (0,58)	7,7325e-04	2,23 (1,39-3,59)	596.7
GA	71 (0,57)	188 (0,42)			
Log-Additive					
0,1,2	125 (0,22)	451 (0,78)	1,5484e-03	1,71 (1,22-2,40)	598.0

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

Tabela 18: Resultado da análise de associação do SNV rs1051792 após os ajustes por sexo e idade em grupo de pacientes com TBe vs. TBp no modelo dominante

Genótipo	TBe n=125	TBp n=451	Valor- p	OR (95% CI)	Valor p_{adj}	OR _{adj.} (IC95%)
GG	32 (0,26)	191 (0,42)	0,0005	2,13 (1,37-3,32)	3,9048e-05	2,90 (1,70-4,94)
GA-AA	93 (0,74)	260 (0,58)				
MASCULINO						
	N=78	N=268				
GG	19 (0,24)	115 (0,43)	0,0047	2,33 (1,30-4,13)	0,0009	3,15 (1,55-6,40)
GA-AA	59 (0,76)	153 (0,57)				
FEMININO						
	N=47	N=183				
GG	13 (0,28)	76 (0,42)	0,1156	1,85 (0,91-3,71)	0,068	2,31 (0,91-5,85)
GA-AA	34 (0,72)	107 (0,58)				

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

Assim, sugere-se que o SNV rs1051792 está associado ao aumento do risco para TBe, principalmente em relação ao sexo masculino. Levando em consideração que das formas clínicas de TBe no presente estudo, cerca de 64,67% referem-se a forma pleural e após análises de associação considerando apenas a forma pleural vs Controles no modelo dominante (GG vs GA-AA: $p=0,0021$; $OR(IC95\%)=2,25(1,31-3,87)$ e $p_{adj}=0,0055$; $OR_{adj}(IC95\%)=2,13(1,22-3,73)$), os resultados foram significativos. Assim, este SNV pode aumentar o risco para TBe pleural no sexo masculino (dados não mostrados).

Como visto, a proteína MICA interage com receptores NKG2D presentes em células NK, linfócitos T $\gamma\delta$ e T CD8+ resultando na eliminação das células que expressam MICA (BARANWAL; MEHRA, 2017). A expressão da molécula MICA é induzida em condições de estresse celular como no câncer, doenças autoimunes e infecções. Além disso, a interação de MICA-NKG2D resulta na ativação de células que produzem principalmente IFN- γ para eliminar as células infectadas (TCHACROME et al., 2022).

O SNV rs1051792 é uma variante localizada no gene *MICA* conhecida também como MICA-129, Val129Met e V129M. Esta variante é do tipo transição G>A no resíduo 129 do gene *MICA* e variante não-sinônima *missense* visto que resulta na troca da sequência do aminoácido valina por metionina na posição 129 no domínio $\alpha 2$ da proteína MICA (STEINLE et al., 2001).

Pesquisas têm demonstrado as consequências funcionais desta variante de modo que as isoformas de MICA contendo metionina na posição 129 interagem com o receptor NKG2D com alta afinidade, enquanto aquelas com valina com baixa afinidade. Este fato pode afetar a iniciação das células NK e o limiar regulatório das células T (ISERNHAGEN et al., 2016; TCHACROME et al., 2022).

Adicionalmente, estudos com esse SNV mostram que o efeito biológico pode mudar de acordo com a intensidade da expressão do MICA (ISERNHAGEN et al., 2016), o que pode ser alvo de estudos futuros em pacientes com TB. Ademais, outras variantes do gene *MICA* (rs2596542) podem afetar as concentrações de sMICA no soro de pacientes, afetando a transcrição no qual deve-se avaliar sMICA para esta variante (rs1051792) também (KUMAR et al., 2012; TONG et al., 2013).

Em particular, essa variante é pouco estudada em doenças infecciosas, principalmente no que diz respeito à TB. Além disso, pesquisas enfatizam que as associações podem

depender da população estudada e que há necessidade de compreender a função desta variante para prever as consequências na fisiopatologia de doenças em diferentes populações. Assim, é importante outras pesquisas complementares neste SNV do presente estudo como também em outras regiões do gene *MICA* para elucidar o papel desta variante genética nas doenças infecciosas, especialmente na TB (ISERNHAGEN et al., 2016).

6.2.4 Análise de associação dos SNV por regressão logística multivariada

A análise de regressão logística multivariada foi realizada para confirmar os resultados obtidos sendo considerado o melhor modelo de herança genético e encontram-se disponíveis na **Tabela 19**. A partir dessa análise, confirmou-se os resultados obtidos anteriormente para o SNV rs1051792 no gene *MICA* nos grupos de TBe vs Controles e TBe vs TBp, sugerindo que este SNV está associado com o aumento do risco para TBe. Curiosamente, para o SNV rs9271300 apareceu uma associação estatisticamente significativa sugestiva de proteção para TBp ($p=0,0110$; OR=0,55), possivelmente melhor evidenciado com o aumento do número amostral.

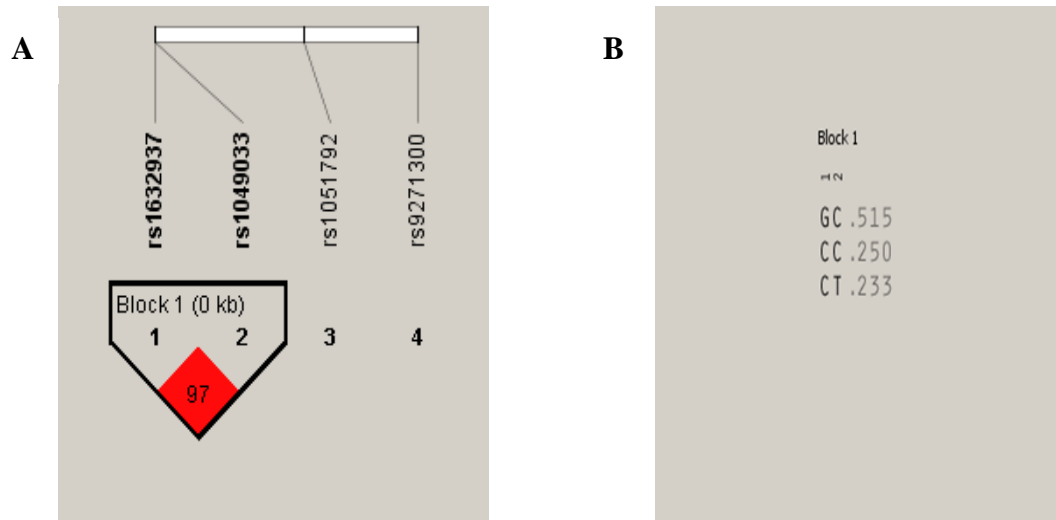
Tabela 19: Resultados da análise de regressão logística multivariada nos grupos estudados após ajustes por sexo e idade considerando o melhor modelo de herança genético.

SNV	TBe vs. Cont		TBp vs. Cont		TBe vs TBp	
	Mod: valor- <i>p</i>	OR(IC95%)	Mod: valor- <i>p</i>	OR(IC95%)	Mod: valor- <i>p</i>	OR(IC95%)
rs9271300	O: 0,0553	0,53(0,28-1,01)	D: 0,0110	0,55(0,35-0,87)	R: 0,6464	0,93(0,38-2,24)
rs1049033	R: 0,6606	0,66(0,10-4,06)	R: 0,7580	0,84(0,29-2,45)	D: 0,0500	1,20(0,54-2,62)
rs1632937	R: 0,9351	0,96(0,42-2,18)	O: 0,5834	1,12 (0,74-1,70)	D: 0,7076	1,17(0,51-2,67)
rs1051792	D: 0,0211	2,37(1,13-4,96)	O: 0,7205	1,07(0,71-1,62)	D: 0,0003	2,90(1,80-4,95)

Legenda: TBe: tuberculose extrapulmonar; TBp: tuberculose pulmonar; valor *p*-EHW: valor do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Mod=Modelos genéticos D: dominante, R: recessivo, O: overdominante. Valores $p<0,05$ foram considerados significativos, odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%). Valor da AUC (área sob a curva) foi de 0,70.

Além disso, ao realizar a análise de desequilíbrio de ligação (DL) foi observado um DL entre os SNV rs1632937 e rs1049033 na população avaliada ($r^2=0.298$; $D'=0.973$; LOD=40.06), mas não em relação aos SNV rs9271300 e rs1051792 (**Figura 12**).

Figura 12: Desequilíbrio de ligação da população de pacientes com TB e controles avaliados para as quatro variantes em genes do sistema HLA.



Legenda: As quatro variantes analisadas localizam-se na parte superior da figura dispostas verticalmente. A: Diagrama do desequilíbrio de ligação com seus respectivos blocos gerado. B: Frequências dos blocos de haplótipos (Block 1).

6.3 Análise de Haplótipos

Um haplótipo é definido como um grupo/combinção de alelos ou de SNV em regiões próximas ao longo do mesmo cromossomo em um único gene ou em vários genes, que tendem a serem herdados em unidades (blocos) para os descendentes (NHGRI- *National Human Genome Research Institute*) sendo utilizados para investigar a influência dos genes nas diferentes doenças humanas estudadas (CRAWFORD; NICKERSON et al., 2005). Em relação a análise de haplótipo no presente estudo (**Tabela 20**), não foi observada associação estatisticamente significativa dos haplótipos com TB.

Tabela 20: Resultados da análise de haplótipos no grupo de TB vs Controles nos SNV.

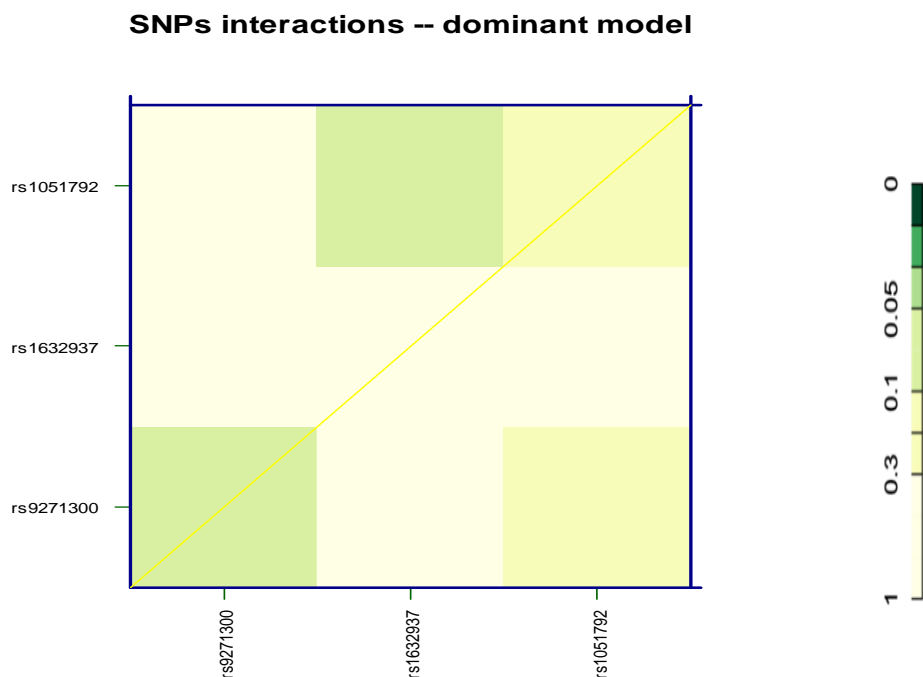
Haplótipos rs9271300-rs1049033-rs1632937-rs1051792	Frequência Caso/controle	Valor-p	OR (95% CI)
CCGG*	0,18/0,18		1,00
CCCG	0,10/0,08	0,5882	1,20 (0,61-2,36)
CCGA	0,12/0,12	0,5121	0,83 (0,47-1,45)
CTCG	0,06/0,08	0,5422	0,82 (0,43-1,56)
GCCG	0,06/0,08	0,3404	0,71 (0,35-1,44)
GCGA	0,09/0,07	0,7245	1,11 (0,62-1,98)
GCGG	0,11/0,12	0,0502	0,51 (0,26-1,00)
GTCG	0,07/0,07	0,5958	0,85 (0,46-1,55)
Geno.raro	0,16/0,07	0,0893	0,60 (0,33-1,08)

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

6.4 Análise de interação gênica

Na análise de interação entre os SNV selecionados não foi observada associação estatisticamente significativa nos quatro modelos de herança genéticos analisados entre pacientes com TB e controles no modelo dominante e nem após os ajustes por sexo e idade (dados não mostrados). Apesar de não ter sido significativo, o que mais se aproximou foi o SNV rs1632937 com o SNV rs1051792 ($p=0,078$) (**Figura 13**).

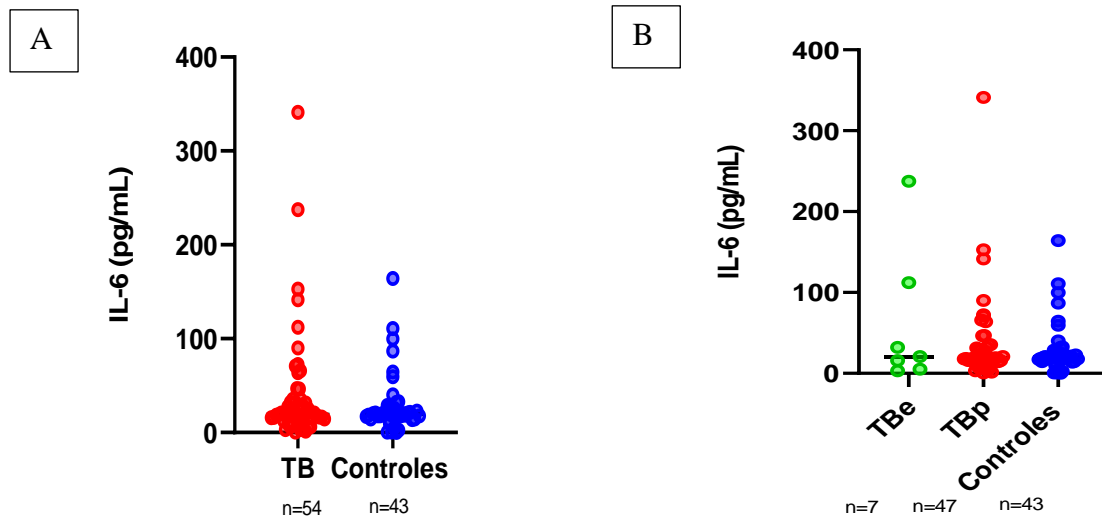
Figura 13: Gráfico da análise de interação gênica dos SNV selecionados no modelo dominante.



6.5 Análise da quantificação de IL-6

Para a determinação de IL-6 foi analisada em 97 amostras, sendo 07 amostras de pacientes com TB extrapulmonar (TBe), 47 amostras de pacientes com TB pulmonar (TBp) e 43 indivíduos do grupo controle (**Figura 14**). Após as análises realizadas observou-se que entre os grupos de pacientes (TBe+TBp) e controles (**Figura 14A**) e estratificando a população caso nas formas clínicas de TB (**Figura 14B**) não houve diferenças estatisticamente significativas nas condições testadas.

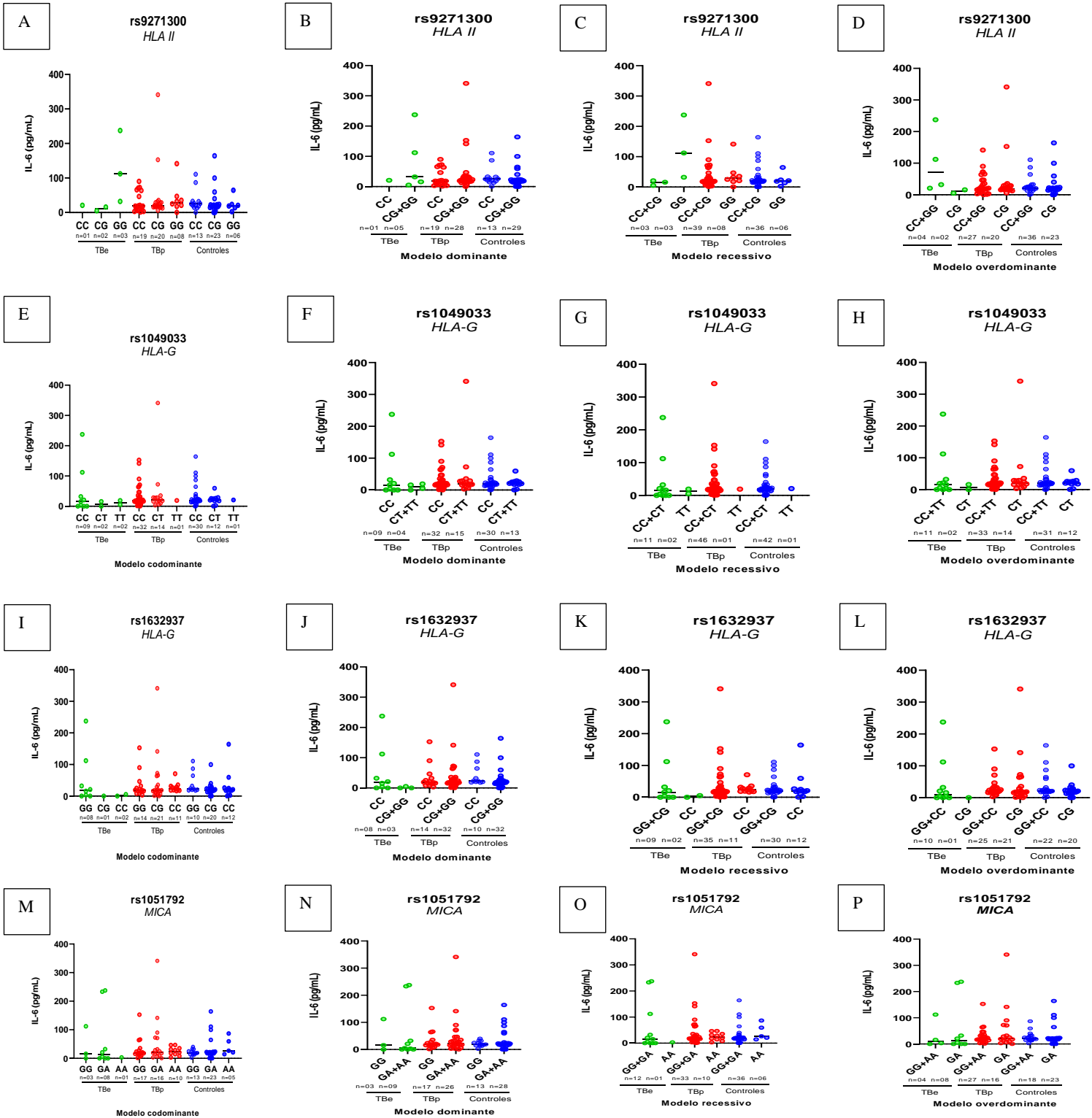
Figura 14: Concentração de IL-6 nos grupos pacientes e controles.



Legenda: (A) Comparação da concentração da citocina nos controles e pacientes com TBe e TBp através do teste não paramétrico Mann Whitney. (B) Comparação da concentração da citocina nos controles, TBp e TBe através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

Além disso, foi feito a análise dos genótipos dos quatro SNV selecionados para avaliar se tinha correlação com a concentração de IL-6 (**Figura 15**). Após os resultados obtidos também não houve diferenças estatisticamente significativas.

Figura 15: Concentração da citocina IL-6 entre os genótipos dos SNV estudados em TBe, TBp vs Controles.



Legenda: A-D: rs9271300; E-H: rs1049033; I-L: rs1632937; M-P: rs1051792. Comparação da concentração da citocina nos controles vs pacientes através do teste ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis.

Os resultados encontrados no presente estudo foram similares ao de Kaushik et al. (2023) no qual os níveis séricos de IL-6 de pacientes com TB ativa foram semelhantes aos de

controles. Por outro lado, Kumar et al. (2019) ao avaliar os níveis de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com TB ativa na população indiana, a IL-6 foi significativamente maior nos pacientes.

Recentemente, Vivekanandan et al. (2023) também constataram concentrações plasmáticas de IL-6 elevadas em pacientes com TB. Segundo os autores, diante das diferentes citocinas analisadas, a IL-6 foi a mais promissora em discriminar pacientes com TB e contatos (VIVEKANANDAN et al., 2023). No entanto, outros estudos observaram proporções elevadas significativas quando avaliaram a combinação IL-6/IL-10 e IL-6/TNF- α nos pacientes com TB (HARLING et al., 2018; KAUSHIK et al., 2023).

Diante das pesquisas publicadas, nota-se que a função da IL-6 na TB em humanos ainda é controversa (LINGE et al., 2022). Sabe-se que para o sistema imunológico eliminar o patógeno, a regulação entre os eventos e componentes envolvidos na resposta como citocinas pró-inflamatórias são cruciais para evitar a doença. Neste contexto, a IL-6 é uma importante citocina pleiotrópica implicada nas respostas imunes protetoras à TB por ser fundamental na geração de respostas TH1 (RITTER et al., 2020).

Ladel et al. (1997) demonstraram experimentalmente a importância da IL-6 na infecção por TB visto que camundongos *knockout* para IL-6 tiveram tuberculose fatal. Outros estudos demonstraram que a produção de IL-6 é regulada pelo patógeno da TB resultando em inibição da sinalização do interferon tipo I e consequente desenvolvimento da doença (MARTINEZ et al., 2013). Além disso, outras funções exercidas pela IL-6 têm sido descritas como intermediadora do equilíbrio TH17/Treg, pois a IL-6 juntamente TGF- β medeiam a indução de células T *naive* em células TH17 e a citocina pode inibir a diferenciação de Treg (KIMURA; KISHIMOTO et al. 2010).

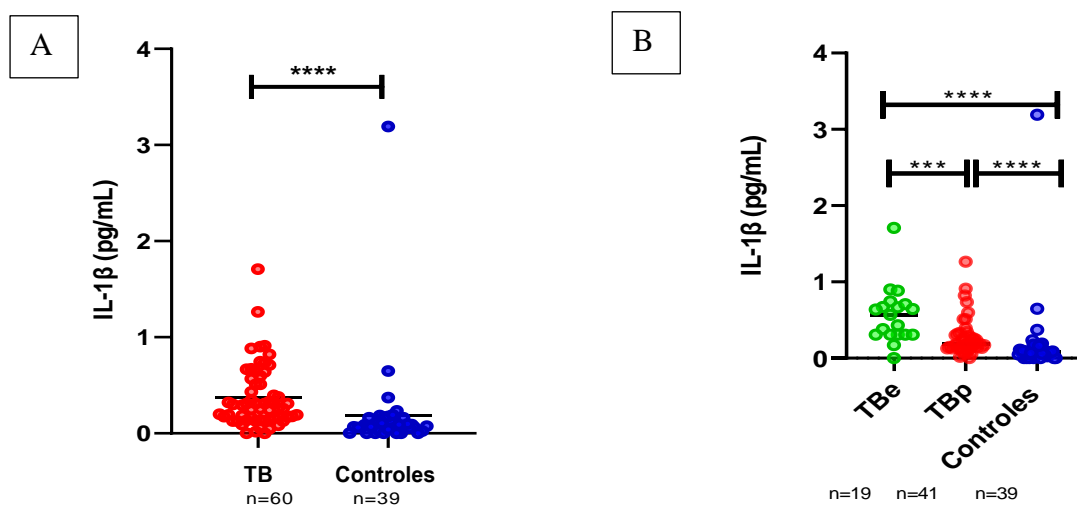
Rambaran et al. (2021) observaram que embora o aumento da expressão de IL-6 na TB ativa foi associada a uma rápida eliminação bacteriana, níveis elevados de IL-6 e IL-1RA no plasma também foram associadas com a cavitação pulmonar, condição característica de TBp. Em conjunto, esses dados enfatizam que o equilíbrio da resposta imunológica é essencial para se obter a eliminação eficiente do patógeno e evitar o agravamento da doença. Portanto, dependendo da magnitude dos níveis de IL-6 produzidas no organismo na presença do patógeno, seja de forma equilibrada ou desregulada, podem culminar na imunidade protetora ou na gravidade da doença, respectivamente.

6.6 Análise da quantificação de IL-1 β

Em relação a determinação de IL-1 β , esta foi analisada em 99 amostras, sendo 19 amostras de pacientes com TB extrapulmonar (TBe), 41 amostras de pacientes com TB pulmonar (TBp) e 39 indivíduos do grupo controle (**Figura 16**). Após as análises, observou-se que entre os grupos de pacientes (TBe+TBp) e controles (**Figura 16A**) e estratificando a população caso nas formas clínicas de TB (**Figura 16B**) houve diferenças estatisticamente significativas.

Nota-se que ao comparar a concentração da IL-1 β considerando os pacientes com TB (TBe e TBp) e controles, as concentrações da citocina foram mais elevadas nos pacientes que na população controle (**Figura 16A**). Ao estratificar a população de pacientes segundo a forma clínica, os pacientes com TBe apresentaram concentrações mais elevadas que os pacientes com TBp (**Figura 16B**).

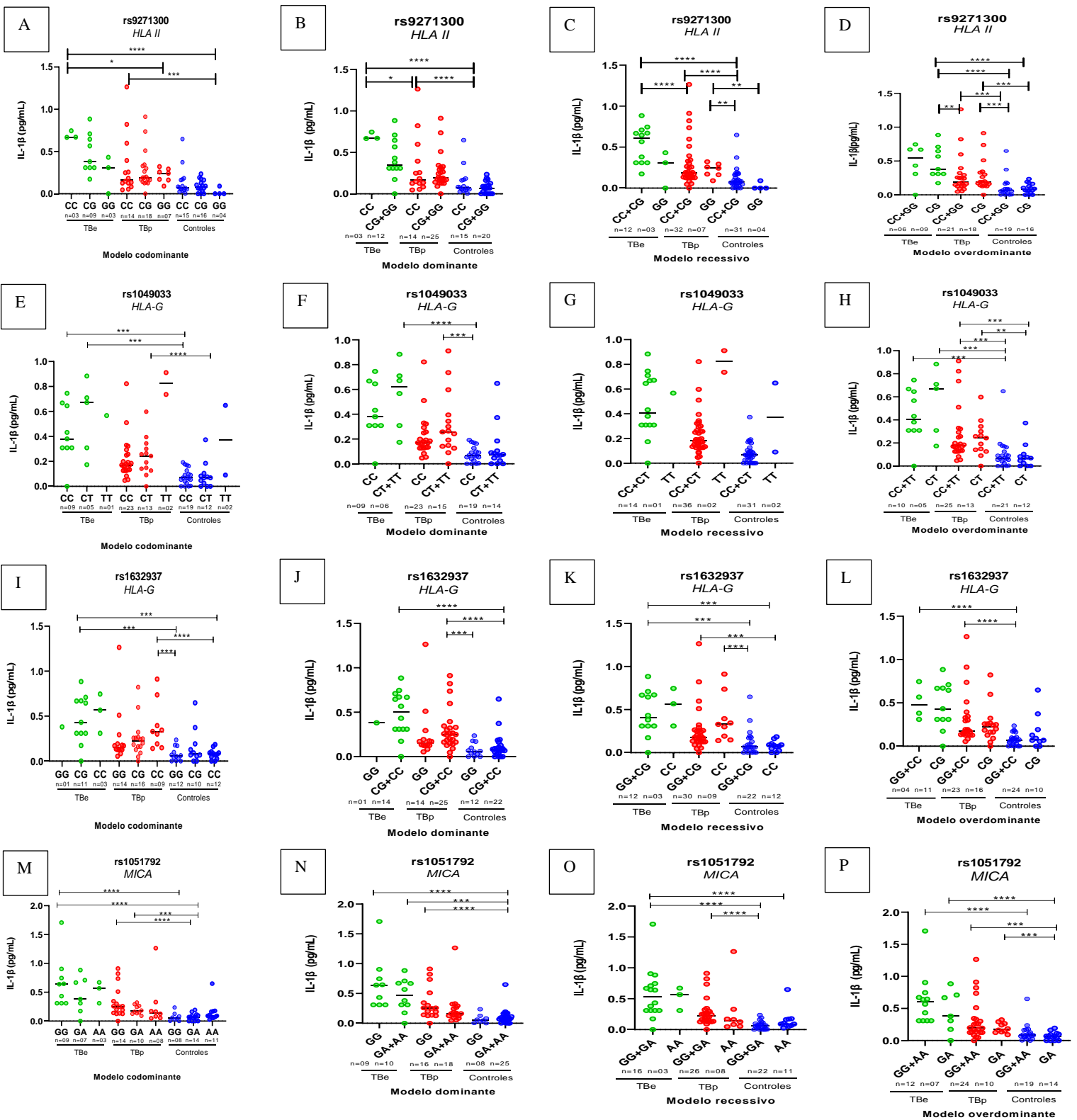
Figura 16: Concentração de IL-1 β nos grupos de pacientes com TB vs Controles.



Legenda: (A) Comparação da concentração da citocina nos controles e pacientes com TB através do teste não paramétrico Mann Whitney $p < 0.0001$. (B) Comparação da concentração da citocina nos controles vs pacientes com TBp e TBe através do teste ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis. **** alto nível de significância.

No que diz respeito a análise dos genótipos dos quatro SNV selecionados e a concentração com a citocina também houve diferenças estatisticamente significativas (**Figura 17**).

Figura 17: Concentração da citocina IL-1 β entre os genótipos dos SNV estudados em TBe, TBp vs Controles.



Legenda: A-D: rs9271300; E-H: rs1049033; I-L: rs1632937; M-P: rs1051792. Comparação da concentração da citocina nos controles vs pacientes com TBe e TBp através do teste ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Em relação ao SNV rs9271300 no gene *HLA-II*, embora não tenha sido observada diferenças significativas entre os genótipos dos indivíduos com TBp, há 4 indivíduos com alelo variante GG e 3 com alelo CG que se destacaram em relação aos demais, pois produziram altas concentrações de IL-1beta. Por outro lado, os pacientes com TBe que carregam o genótipo referência CC apresentam concentrações mais elevadas de IL-1 β (**Figura 17A**). Para o SNV rs1049033, embora o número amostral do genótipo variante TT ser pequeno, nota-se que os pacientes com TBp que carregam este genótipo TT parecem produzir níveis mais elevados da citocina (**Figura 17E**).

O outro SNV localizado no gene *HLA-G*, rs1632937, o genótipo variante CC dos pacientes com TBp apresentam concentrações maiores de IL-1 β do que o genótipo CC dos controles assim como o genótipo CG, respectivamente (**Figura 17I**). Ao considerar o modelo dominante, as concentrações permanecem elevadas do CG+CC dos pacientes com TBp comparada aos controles ($p < 0,0001$) (**Figura 17J**).

Para o SNV rs1051792 localizada no gene *MICA*, a concentração de IL-1 β do genótipo variante AA nos pacientes com TBp foram similares aos controles e mais baixas do que o genótipo AA dos pacientes de TBe. Além disso, não se observa diferenças de concentrações entre o genótipo GA e AA entre os pacientes com TBp. Contudo, o genótipo referência GG dos pacientes com TBp, as concentrações da citocina são mais altas do que os controles (**Figura 17M**).

Para esta citocina, o fato do número de amostras para o genótipo variante ter sido pequeno, principalmente para pacientes com TBe, dificultou a precisão dos resultados. Entretanto, com os resultados apresentados é possível observar concentrações da citocina diferentes entre as formas clínicas na população de pacientes e nos genótipos para o SNV em questão.

A IL-1 β é uma importante citocina envolvida na defesa contra o patógeno causador da TB (SOUZA DE LIMA et al., 2020; SILVERIO et al., 2021). Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a importância da IL-1 β no controle da infecção por *M. tuberculosis* visto que camundongos *knockout* para IL-1R ou para MyD88 foram mais suscetíveis à infecção (FREMOND et al., 2007; MAYER-BARBER et al., 2011).

Em resposta ao patógeno, a IL-1 β pode ser produzida pela ativação dos inflamassomas, principalmente NLRP3 e AIM2, como mostram os estudos *in vitro*, mas esta

não é uma via dependente (WAWROCKI et al., 2017). Pesquisas mostram que a citocina pode ser produzida mesmo na ausência de caspase-1, envolvida no processamento e maturação da IL-1 β (AFONINA et al., 2015), indicando que a mesma pode ser originada por outras vias durante a infecção por *M. tuberculosis* in vivo (RASTOGI; BRIKEN, 2022). No entanto, aspectos sobre expressão e processamento de IL-1 β bem como outras populações celulares além dos macrófagos alveolares produtores da citocina e vias relacionadas no contexto da TB ainda não são totalmente esclarecidas (MAYER-BARBER et al., 2011).

No presente estudo, as concentrações de IL-1 β foram significativamente mais elevadas em pacientes do que controles ($p < 0,0001$). Após estratificar a população caso nas formas clínicas, observou-se que a concentração da citocina em pacientes com TBe ($p < 0,001$) foi mais elevada em comparação com os pacientes de TBp (**Figura 16**). Estudos em relação a TBe e correlacionando as concentrações da IL-1 β com os genótipos dos SNV selecionados são escassos.

Nossos resultados foram semelhantes aos estudos descritos por Wang et al. (2015) no qual as concentrações séricas de IL-1 β de pacientes com TBp, especialmente os pacientes com TB multirresistente, foi maior que nos controles e correlacionada com a gravidade radiográfica. Por outro lado, Kaushik et al. (2023), descreveram que os níveis de IL-1 β bem como IL-2, IL-6 e TNF- α foram comparáveis entre pacientes com TB e controles.

Sousa et al. (2020) ao avaliarem a modulação da imunidade do hospedeiro à TB utilizando isolados clínicos de *M. tuberculosis* geneticamente distintos de pacientes com diferentes gravidades de TB, os autores constataram que os isolados recuperados de pacientes com doença leve de TB induziram consistentemente elevados níveis de IL-1 β em PBMCs humanas enquanto os com doença moderada a grave, produziram concentrações mais baixas na citocina. Segundo as análises transcriptômicas realizadas pelos autores, as baixas concentrações de citocina seriam decorrentes do bloqueio da ativação do inflamassoma, cGAs e outras vias de sinalização intracelular no qual resultaria em respostas diminuídas de IL-1 e, conseqüentemente, a progressão e gravidade à TB. Assim, os autores relataram que respostas diminuídas de IL-1 β estão associadas a TB mais grave.

Diferente dos resultados encontrados neste estudo, segundo Llibre et al. (2022) pacientes com TB ativa apresentaram respostas da citocina IL-1 α e IL-1 β mais baixas, mostrando que a sinalização da IL-1 β é fortemente alterada na TB ativa, mas que a resposta é restaurada após tratamento bem-sucedido (LLIBRE et al., 2022). Deve-se mencionar que as

condições de experimento de Llibre et al. (2022) foram diferentes do presente estudo visto que os autores utilizaram sangue periférico estimulado com antígenos de *M. tuberculosis*, circunstâncias que podem influenciar nas diferenças observadas.

Existem inúmeras variáveis que podem determinar a produção de citocinas nos diferentes estágios da doença como a carga de bacilos viáveis exposta ao hospedeiro, características próprias do hospedeiro e da cepa infectante de *M. tuberculosis* (SILVERIO et al., 2021). Neste contexto, algumas pesquisas têm apontado que o próprio microrganismo desenvolve estratégias para driblar as respostas da IL-1 do hospedeiro para seu próprio benefício (SILVERIO et al., 2021).

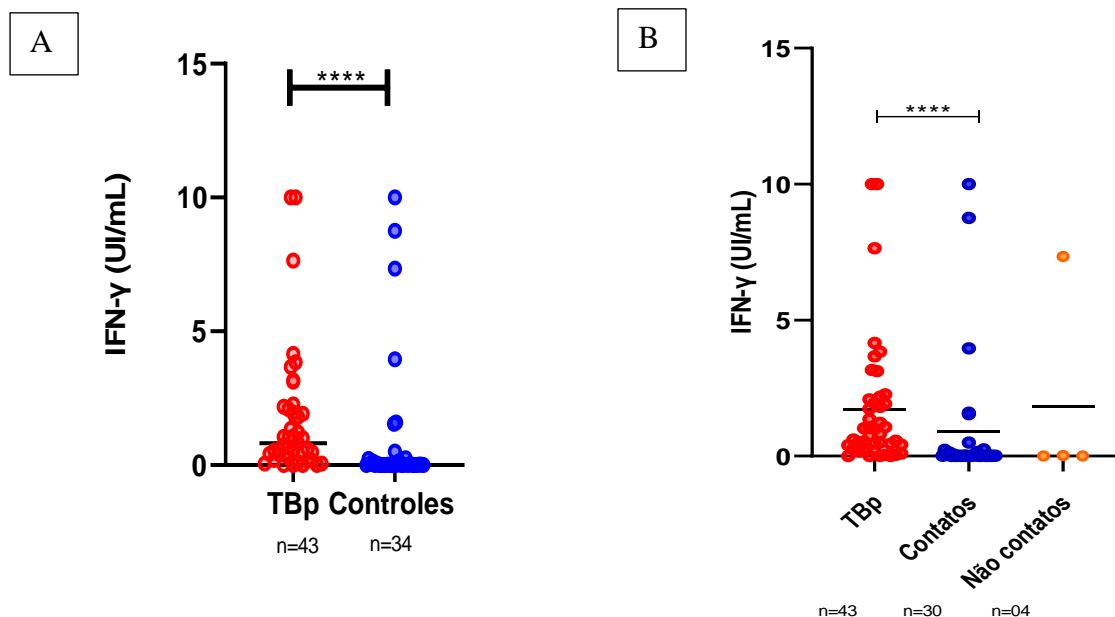
Outro ponto a ser considerado é que na TB, as respostas exercidas pela IL-1 necessitam de rigorosa regulação para promover resistência do hospedeiro à infecção ao passo que se evite a imunopatologia. Existem fatores que regulam a sinalização pela IL-1 β e dentre eles têm-se transcricionais, pós-transcricionais e de transdução de sinal e os mecanismos que interferem na ativação do inflamassoma podem modular a secreção de IL-1 β (MANTOVANI et al., 2019).

Tendo em vista as funções descritas da IL-1 β na TB, estas parecem ser dinâmicas e complexas uma vez que a sua produção é essencial nas respostas iniciais para a resistência do hospedeiro à infecção e o excesso de produção nas respostas tardias pode resultar em dano tecidual para o hospedeiro (ORME et al., 2015; RASTOGI, BRIKEN, 2022).

6.7 Análise da quantificação de IFN- γ

Para a determinação de IFN- γ analisou-se 77 amostras. Destas, 43 amostras pertenciam ao grupo de pacientes com TB pulmonar (TBp) e 34 indivíduos do grupo controle (**Figura 18A**). Em relação ao grupo controle, 30 indivíduos eram contatos diretos dos pacientes com TBp e 4 não contatos (**Figura 18B**). Na comparação de TBp vs Controles, observou-se uma associação estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Curiosamente, os pacientes com TBp produziram concentrações mais elevadas de IFN- γ em comparação com os controles (**Figura 18A**).

Figura 18: Concentração de IFN- γ nos grupos de TBp vs Controles (contatos e não-contatos).

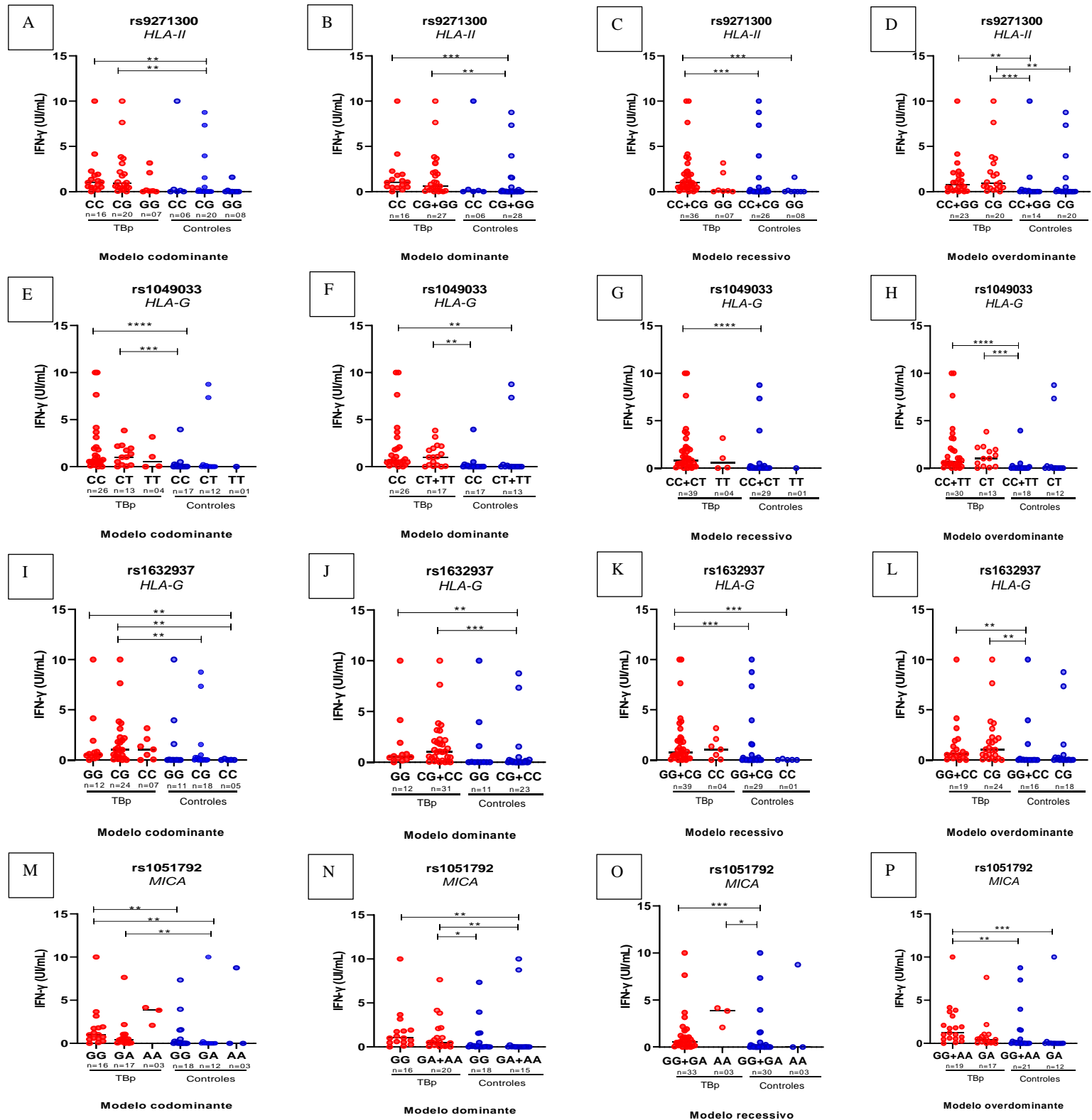


Legenda: (A) Comparação da concentração da citocina nos controles e pacientes com TBp através do teste não paramétrico Mann Whitney $p < 0.0001$. (B) Comparação da concentração da citocina nos controles contatos e não contatos vs pacientes com TBp através do teste ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis. **** alto nível de significância.

Do total de 43 pacientes com TBp, 32 foram positivos para liberação da citocina. Destes 32 pacientes com TBp, 18 produziram níveis mais elevados ($>1,05$ UI/mL), 09 níveis baixos (0,35 a 0,70UI/mL) e 05 níveis médios (0,71 a 1,05UI/mL). Observou-se também que alguns pacientes com TBp ($n=11/43$) foram negativos para o ensaio de liberação do IFN- γ ($<0,35$). Além disso, a maioria do grupo controle eram contatos ($n=30/34$) dos pacientes com TBp. Destes, 28 contatos foram negativos para IFN- γ e 06 positivos, sendo cinco com concentrações elevadas da citocina ($>1,05$ UI/mL).

Embora os SNV estudados não tenham sido associados a proteção ou suscetibilidade a TBp no presente estudo (**Tabela 7**), avaliou-se a concentração de IFN- γ em relação aos genótipos dos quatro SNV estudados nos modelos de herança genética codominante, dominante, recessivo e overdominante (**Figura 19**).

Figura 19: Concentração da citocina IFN- γ entre os genótipos dos SNV estudados em TBp vs Controles.



Legenda: A-D: rs9271300; E-H: rs1049033; I-L: rs1632937; M-P: rs1051792. Comparação da concentração da citocina nos controles vs pacientes com TBp através do teste ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Observou-se que para o SNV rs9271300 no gene *HLA-II*, a concentração da citocina no genótipo CC foi maior em comparação com o genótipo CG e GG em pacientes com TBp no modelo codominante (**Figura 19A**). Neste modelo, foi encontrada uma associação estatisticamente significativa para o genótipo CG ($p < 0,001$), ou seja, pacientes com TBp que carregavam o SNV em heterozigose CG apresentaram níveis mais elevados da citocina em comparação com o grupo controle (**Figura 19A e 19D**). No modelo dominante, CG-GG dos pacientes com TBp foi maior que o CG-GG dos controles (**Figura 19B**). O genótipo para o alelo variante G (GG) não apresentou diferenças estatísticas na população caso e controle da concentração de IFN- γ (**Figura 19C**).

Para o SNV rs1049033 no gene *HLA-G* (**Figura 19E-H**), devido ao número limitado de amostras para o genótipo variante TT, não foi possível comparar quanto a concentração da citocina. Por outro lado, para o SNV rs1632937 no gene *HLA-G* (**Figura 19I-L**), os pacientes com TBp com genótipo CG e CC parecem produzir níveis de IFN- γ semelhantes (**Figura 19I**). Ao comparar com os controles, os pacientes TBe com genótipo CG produzem níveis mais elevados de citocina do que os controles (**Figura 19L**).

Diferentemente, o SNV rs1051792 no gene *MICA* (**Figura 19M-P**), embora não tenha resultado em associação estatisticamente significativa na análise de associação com TBp vs Controles e número amostral limitado na análise de citocinas, nota-se que os pacientes com TBp que carregam o SNV para homozigose do alelo variante (AA) parecem produzir concentrações mais elevadas de IFN- γ em comparação com o genótipo GG e GA no modelo codominante (**Figura 19M**). Ao avaliar no modelo dominante (**Figura 19N**), houve associação entre os genótipos GA+AA de pacientes com TBp e GA+AA de controles ($p < 0,01$).

De modo geral, embora os pacientes com TBp apresentaram concentrações mais altas de IFN- γ em relação ao grupo controle, este fato não evitou o desenvolvimento da doença. Deve-se levar em consideração que a imunopatogênese da TB é multifatorial e complexa e diferentes mecanismos podem estar envolvidos além da resposta predominante TH1 (CARDONA et al., 2018; BERNS et al., 2022). Outro fator para considerar é que o IFN- γ por si só não é único componente envolvido na imunidade do hospedeiro contra a TB (LALVANI; MILLINGTON, 2008).

Em relação aos pacientes que tiveram resultados negativos para o ensaio de liberação do IFN- γ , alguns fatores possivelmente podem estar relacionados a isso, além dos fatores

genéticos do hospedeiro não totalmente elucidado. Fatores como desequilíbrio na resposta principal TH1 bem como desbalanço nas respostas TH1/TH17, idade, concentração baixa de linfócitos e a própria condição patológica pode resultar em diferentes níveis de citocina (CAVALCANTI et al., 2012; KAUSHIK et al., 2023).

O IFN- γ certamente é uma citocina crucial na defesa contra a TB, mas dependendo da concentração produzida pode influenciar no desfecho da doença (SHANMUGANATHAN et al., 2022). Diferentes estudos demonstram a importância desta citocina visto que camundongos *knockout* para IFN- γ foram mais suscetíveis à infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e deficiências apresentadas tanto no gene *IFN- γ* quanto no receptor da citocina apresentam maior suscetibilidade a infecções micobacterianas (FLYNN et al., 1993; OTTENHOFF et al., 1998; KERNER et al., 2020).

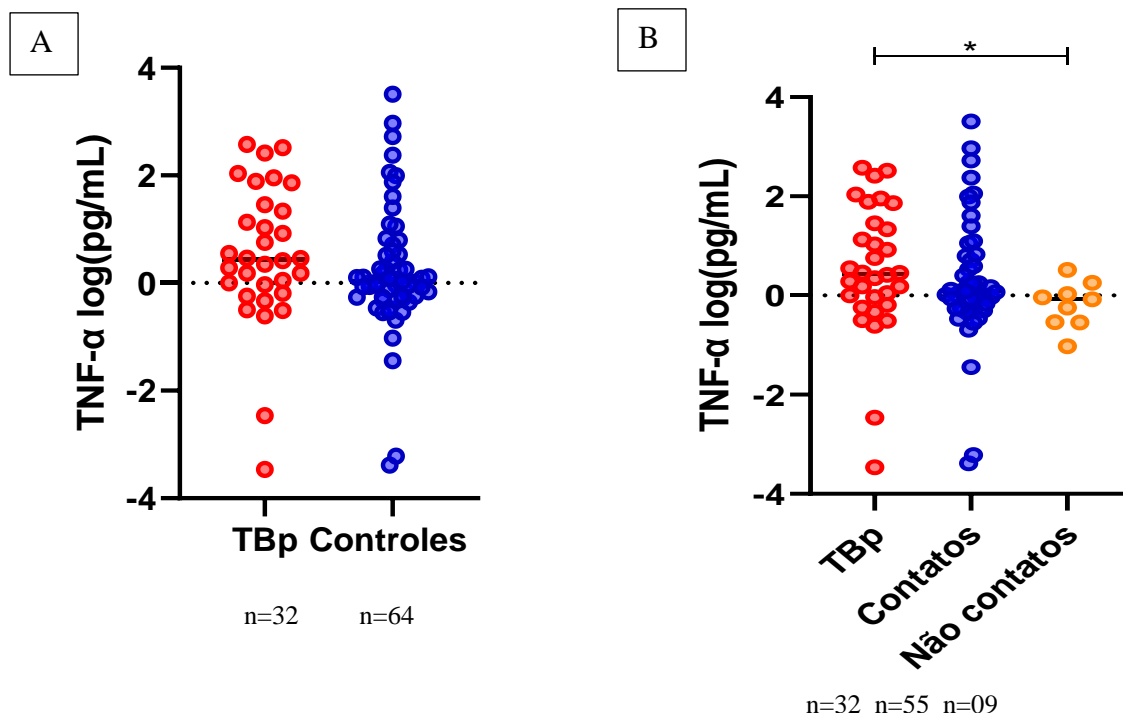
Além disso, um importante componente que contribui para uma resposta eficiente pelo sistema imunológico é a homeostasia entre a complexa rede de citocinas e mediadores envolvidos na resposta visto que produzir quantidades baixas de citocina pode resultar em respostas inadequadas e as concentrações demasiadamente elevadas em dano tecidual (MARTINO et al., 2019). Adicionalmente, observou-se variações nas concentrações de IFN- γ entre alguns pacientes com TBp (**Figura 18**), pois cada indivíduo pode responder de forma diferente na presença do bacilo (LU et al., 2019).

Os resultados da concentração da citocina analisados neste estudo nos diferentes genótipos dos SNV selecionados nos genes *HLA-II*, *HLA-G* e *MICA* podem contribuir com outras pesquisas para elucidar mecanismos ainda desconhecidos sobre a patogênese da TB.

6.8 Análise da quantificação de TNF- α

Para a determinação de TNF- α analisou-se 96 amostras. Destas, 32 amostras pertenciam ao grupo de pacientes com TB pulmonar (TBp) e 64 indivíduos do grupo controle (**Figura 20A**). Em relação ao grupo controle, 55 indivíduos eram contatos diretos dos pacientes e 09 não contatos (**Figura 20B**). Em relação ao grupo TBp vs Controles, não foi observada associação estatisticamente significativa. Ao estratificar o grupo controle em contatos e não-contatos, uma associação estatisticamente significativa apareceu entre TBp e os não-contatos ($p < 0,05$). Não houve diferença nos níveis de produção da citocina entre contatos e não contatos (**Figura 20**).

Figura 20: Concentração de TNF- α nos grupos de TBp vs Controles (contatos e não-contatos).



Legenda: (A) Comparação da concentração da citocina nos controles e pacientes com TBp através do teste não paramétrico Mann Whitney. (B) Comparação da concentração da citocina nos controles contatos e não contatos vs pacientes com TBp através do teste ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$

Os níveis de TNF- α no grupo de pacientes com TBp e controles (contatos e não-contatos) foram similares (**Figura 20A**). Notavelmente, observa-se que os pacientes com TBp apresentaram níveis mais elevados da citocina em comparação aos controles não contatos (**Figura 20B**). Tendo em vista que o grupo não-contato são os indivíduos que não convivem com os pacientes de TB, não consanguíneos, sem sintomatologia e histórico de TB, espera-se níveis baixos da citocina visto que estes não têm a doença. Além disso, observa-se que alguns pacientes com TBp apresentam variações nas concentrações da citocina ao passo que alguns produzem níveis mais baixos e outros mais elevados.

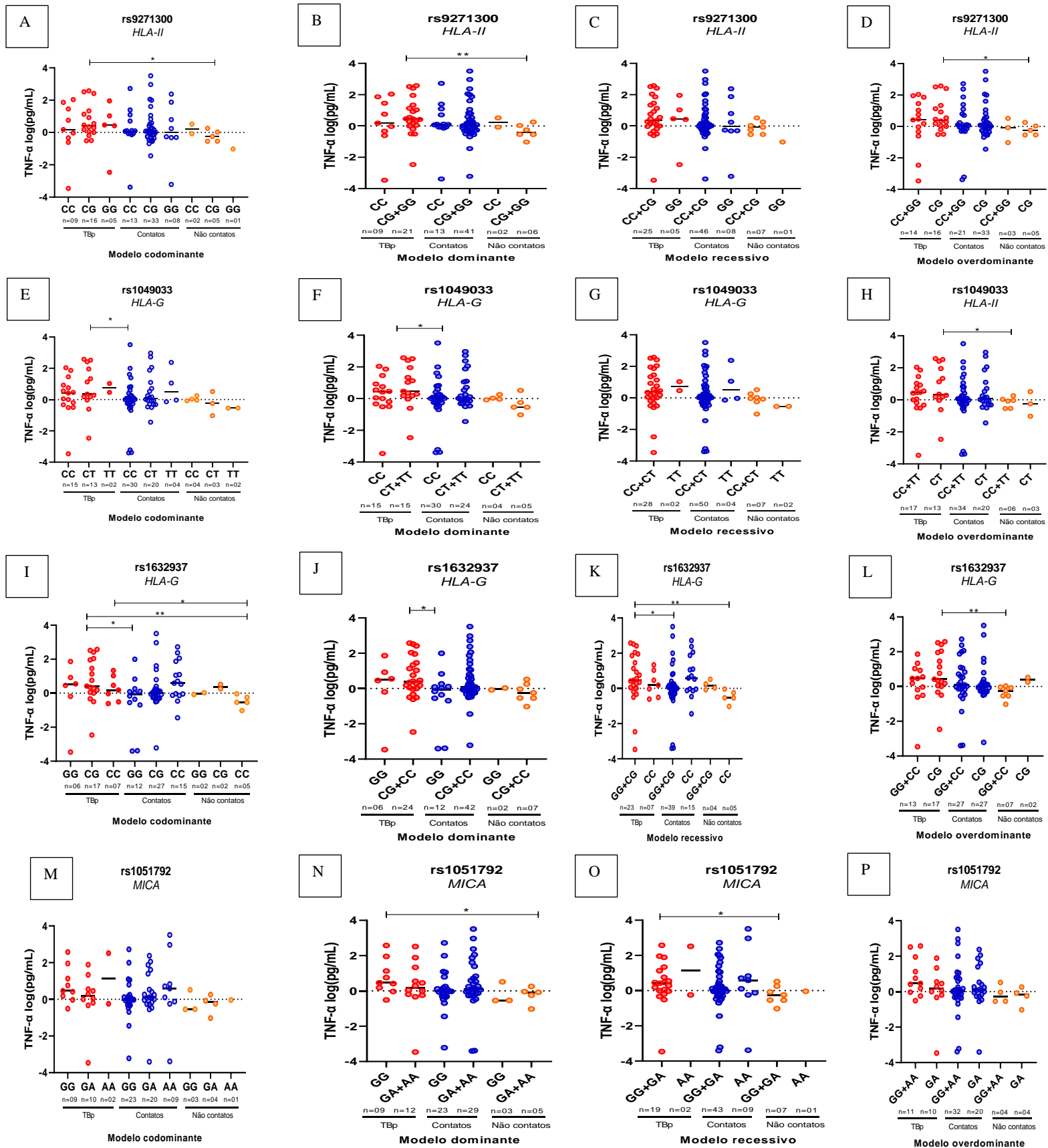
Nas análises dos genótipos dos SNV em relação as concentrações de TNF- α , algumas associações foram visualizadas (**Figura 21**). Para o SNV rs9271300, o genótipo CG dos pacientes com TBp apresentaram níveis maiores da citocina em relação não contatos e comparáveis ao contatos (**Figura 21A**). No modelo dominante, CG+GG de pacientes com TBp foi maior a concentração do que CG+GG dos não contatos ($p < 0,01$) (**Figura 21B**). Para o SNV rs1049033, o genótipo do alelo variante TT em pacientes com TBp parece ser mais elevado do que os não contatos, embora o número amostral seja pequeno (**Figura 21E**).

Semelhantemente, para o SNV rs1632937, os níveis de TNF- α do genótipo do alelo variante (CC) do grupo de TBp é maior do que os não contatos ($p < 0,05$) (**Figura 21I**). Finalmente, para o SNV rs1051792 no gene *MICA*, o GG+GA é mais elevado em pacientes com TBp do que não contatos ($p < 0,05$) (**Figura 21O**).

Em concordância com os resultados encontrados neste estudo, Mirzaei et al. (2018) avaliaram a produção de TNF- α em pacientes com tuberculose em comparação com pessoas saudáveis e constataram que esta citocina foi significativamente mais elevada em pacientes com TBp do que controles, revertendo os níveis após o tratamento. Outros estudos publicados foram condizentes com os resultados encontrados no presente estudo no qual também encontraram níveis mais elevados da citocina em pacientes (LUO et al., 2019; KUMAR et al., 2019).

Juntamente com IL-1 β e IFN- γ , o TNF- α é uma importante citocina envolvida no controle da infecção ao patógeno da TB (ROACH et al., 2002). O TNF- α aumenta as respostas das células T visto que promovem a fusão fagolisossomal dos macrófagos, aumenta a capacidade fagocítica dos macrófagos, estimula a apoptose dos macrófagos e contribui para a formação de granuloma com intuito de controlar a progressão da doença. Da mesma forma que algumas citocinas, o TNF- α atua na defesa contra *M. tuberculosis* como também na imunopatologia da tuberculose (CAVALCANTI et al., 2012).

Figura 21: Concentração da citocina TNF- α entre os genótipos dos SNV estudados em TBp vs Controles (contatos e não contatos).



Legenda: A-D:rs9271300;E-H:rs1049033;I-L:rs1632937;M-P:rs1051792.Comparação da concentração da citocina nos controles vs pacientes com TBp através do teste ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis. * $p<0,05$ ** $p<0,01$.

Em conjunto, observou-se que o número amostral para o genótipo raro foi pequeno e possivelmente devido a isso a diferença estatística entre os genótipos e a concentração da citocina não foi evidenciado. Além disso, sabe-se que a patogênese da TB é complexa, heterogênea e multifatorial, o que nos leva a pensar que há outros fatores combinados a esses genes bem como outras citocinas envolvidas que podem estar influenciando nos resultados obtidos.

Sabe-se que diferentes pesquisas têm avaliado o efeito das respostas de citocinas plasmáticas solúveis na TB. Entre as citocinas envolvidas na TB, o $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, $IL-1\beta$ e a $IL-6$ têm sido associadas ao desfecho da doença (RAMBARAN et al., 2021). É importante salientar que os estudos têm mostrado que a concentrações de citocinas variam durante os diferentes estágios da infecção pelo *M. tuberculosis* (LUO et al., 2018).

Adicionalmente, têm sido sustentado que para se obter uma resposta imune protetora é necessário o equilíbrio em conjunto das citocinas chaves tanto pró inflamatórias quanto anti-inflamatórias envolvidas na TB, ou seja, a produção dessas citocinas na proporção, fase, tempo e combinação adequada (NEVES et al., 2022). Assim, as citocinas pró-inflamatórias podem ser responsáveis tanto pela proteção quanto pela patogênese da TB (AL-ATTIYAH et al., 2012; KUMAR et al., 2019).

Diante disso, é importante avaliá-las quanto aos genótipos dos diferentes SNV que podem estar associados a resposta imune à TB e, certamente, esses estudos aprimorarão nosso entendimento sobre essa complexa resposta imune. É digno de nota que os estudos sobre SNV em genes que codificam para moléculas envolvidas na imunopatogênese da TB, principalmente em relação à TBe, são escassos e bastante limitados bem como correlação com a concentração de citocinas.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. As frequências alélicas para os SNV rs9271300 (C/G) no gene *HLA-II*, rs1049033 (C/T) e rs1632937 (C/G) no gene *HLA-G* e rs1051792 (G/A) no gene *MICA* foram maiores que 10% na população caso e controle. Semelhantemente, as frequências genótípicas para estes SNV também foram superiores a 10%, exceto para o genótipo TT do SNV rs1049033 tanto na população caso quanto controle que foi inferior a 10%.
2. O SNV rs9271300 no gene *HLA-II* foi associado para proteção à TBe no modelo overdominante e a proteção à TBp no modelo dominante.
3. Para os SNV rs1049033 e rs1632937 no gene *HLA-G* não foram observadas associações genéticas com a proteção ou suscetibilidade à TB nos grupos investigados.
4. O genótipo AA do SNV rs1051792 no gene *MICA* foi associado com o aumento do risco para o sexo masculino quanto a TBe de acordo com o modelo de herança dominante.
5. Não foi observada associação estatisticamente significativa dos haplótipos com desenvolvimento de TB.
6. Não houve interação gênica entre os SNV estudados.
7. A concentração da citocina IL-6 entre pacientes com TB e controles bem como nos diferentes genótipos dos SNV estudados foram semelhantes.
8. De maneira geral, houve uma maior produção das citocinas IL-1 β , IFN- γ e TNF- α nos pacientes com TB do que controles. Na análise com os genótipos do gene *MICA*, SNV rs1051792, os pacientes com TB que carregam o genótipo para o alelo variante (AA) parecem produzir maior concentração de IFN- γ e TNF- α no modelo codominante.

Considerações gerais

Com esse estudo foi possível determinar as frequências alélicas e genotípicas para SNV em genes do sistema HLA, principalmente em regiões pouco estudadas; associações relacionadas à proteção ou suscetibilidade na TB em nossa população amazonense. Diante disso, os achados encontrados no presente estudo reforçam a importância e valiosidade das pesquisas envolvendo imunogenética, especialmente na complexa doença TB.

Cronograma

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividades	Meses do ano de 2019										Ano de 2020	
	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02
Revisão bibliográfica	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Escrita do projeto para submissão no comitê de ética	R	R	R									
Submissão do projeto ao Comitê de ética da UFAM (CEP/UFAM)				R								
Disciplinas obrigatórias e optativas exigidas pelo programa	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Participação de congressos								R				
Escrita do artigo científico					R	R	R	R	R	R	R	R
Seleção das sondas	R	R	R									
Aceite do projeto no CEP/UFAM						R						
Pedido das sondas							R					
Coleta, transporte e processamento das amostras clínicas (exames bacteriológicos e extração de DNA).							R	R	R	R	R	R
Elaboração da planilha e inserção dos dados epidemiológicos, clínicos e genéticos.									R	R	R	R
Testes de Genotipagem por qPCR									R	R	R	R

Legenda: R= realizado.

Atividades	Meses do ano de 2020										Ano de 2021	
	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02
Revisão bibliográfica	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Disciplinas obrigatórias e optativas exigidas pelo programa	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Participação de palestras e eventos online	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Escrita do artigo científico	R	R	R	R	R	R						
Submissão do artigo científico							R					
Correções do artigo sugeridas pelos revisores								R	R	R	R	R
Organização da planilha e inserção dos dados epidemiológicos, clínicos e genéticos.	R	R	R	R	R							
Análise dos resultados						R	R	R	R	R		
Escrita do manuscrito de doutorado para posterior qualificação				R	R	R	R	R	R	R	R	R

Legenda: R= realizado.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividades	Meses do ano de 2021										Ano de 2022								
	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09
Realização das disciplinas optativas					R	R	R	R	R	R									
Participação de palestras e eventos online	R	R	R	R															
Preparação da aula de qualificação		R	R																
Exame de qualificação				R															
Coleta, transporte e processamento das amostras clínicas (exames bacteriológicos e extração de DNA).						R	R	R	R	R	R	R							
Elaboração e organização da planilha e inserção dos dados epidemiológicos, clínicos e genéticos.						R	R	R	R	R	R	R							
Revisão bibliográfica													R	R	R	R	R	R	R

Legenda: R= realizado.

Atividades	Ano 2022			Ano de 2023											
	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Revisão bibliográfica	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Coleta, transporte e processamento das amostras clínicas (exames bacteriológicos e extração de DNA).						R	R	R	R	R					
Testes de Genotipagem por qPCR											R	R	R		
Elaboração da planilha e inserção dos dados epidemiológicos, clínicos e genéticos.						R	R	R	R	R	R	R			
Análise dos resultados													R	R	
Elaboração definitiva do manuscrito da tese											R	R	R	R	R
Preparação da aula de defesa															R
Exame de Defesa															R

Legenda: R= realizado.

Equipe de Pesquisa

EQUIPE DE PESQUISA

Ordem	Nome	Título	Instituição	Contribuição no projeto
1	Mariana Brasil de Andrade Figueira	Mestre	PPGIBA/ UFAM	Executora das atividades propostas no cronograma do projeto
2	Aya Sadahiro	Doutor	PPGIBA/ UFAM	Orientadora
3	Mauricio Morishi Ogusku	Doutor	INPA	Coorientador Colaboração nos exames baciloscópicos, cultivo e nos ensaios de Biologia molecular
4	Alessandra Pontillo	Doutor	USP	Coorientador Forneceu assessoria nos ensaios de seleção e genotipagem dos genes
5	Dhêmerson Souza de Lima	Doutor	University of Vermont	Colaboração nas análises estatísticas
6	Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes	Doutor	PPGIBA/ UFAM	Colaboração nas análises estatísticas
7	Joycenea da Silva Matsuda	Mestre	Policlínica Cardoso Fontes-SES	Colaboração para avaliar os dados clínicos dos pacientes com Tuberculose.
8	Irineide Assumpção Antunes	Mestre	Policlínica Cardosos Fontes-SES	Colaboração para avaliar os dados clínicos dos pacientes com Tuberculose.
9	Maisa Porto dos Santos	Mestre	INPA	Colaboração nas análises de baciloscopia e ensaios de PCR
10	Alliny Almeida Queiroz	Mestranda	PPGIBA/ UFAM	Colaboração na extração de DNA
11	Marcos Henrique Gurgel Rodrigues	Doutorando	PPGIBA/ UFAM	Colaboração na extração de DNA
12	Laianne Lopes Rocha	Doutoranda	PPGIBA/ UFAM	Colaboração na extração de DNA

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

Referências

REFERÊNCIAS

- ABEL, Brian et al. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *The Journal of Immunology*, v. 169, n. 6, p. 3155-3162, 2002.
- ABEL, Laurent et al. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 369, n. 1645, p. 20130428, 2014.
- AFONINA, Inna S. et al. Proteolytic processing of interleukin-1 family cytokines: variations on a common theme. *Immunity*, v. 42, n. 6, p. 991-1004, 2015.
- AKGÖLLÜ, Ersin. Assessment of HLADP gene rs3128917 and rs9380343 polymorphisms in chronic HBV infection. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, v. 30, n. 7, p. 616, 2019.
- ALAM, Aftab et al. Human gene expression profiling identifies key therapeutic targets in tuberculosis infection: A systematic network meta-analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 87, p. 104649, 2021.
- ALBERTS, B. et al. *Molecular cell biology*. New York: Garland Science, 2008.
- ALCAIS, Alexandre et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin- α allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nature genetics*, v. 39, n. 4, p. 517-522, 2007.
- ALFONSO, Christopher; KARLSSON, Lars. Nonclassical MHC class II molecules. *Annual review of immunology*, v. 18, n. 1, p. 113-142, 2000.
- ALLEUDOERFER, Ruth; DEEPE, George S. Blockade of endogenous TNF- α exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms. *The Journal of Immunology*, v. 160, n. 12, p. 6072-6082, 1998.
- ALLIE, Nasiema et al. Limited role for lymphotoxin α in the host immune response to Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Immunology*, v. 185, n. 7, p. 4292-4301, 2010.
- AL-TAMIMI, J.; QASIM, S. Al-Mayah, Hadeel S. Abd-Alwahab. Study of HLA-G gene polymorphism and serum level of soluble HLA-G in patients infected with Mycobacterium tuberculosis. *Revist Bionatura*, v. 7, n. 3, 2010, 2022.
- ALTET, Neus et al. Assessment of the influence of direct tobacco smoke on infection and active TB management. *PloS one*, v. 12, n. 8, p. e0182998, 2017.
- AMIOT, Laurence; VU, Nicolas; SAMSON, Michel. Immunomodulatory properties of HLA-G in infectious diseases. *Journal of immunology research*, v. 2014, 2014.
- AMORAS, Ednelza da Silva Graça. Association of Cytokine Gene Polymorphisms and Their Impact on Active and Latent Tuberculosis in Brazil's Amazon Region. *Biomolecules*, v. 13, n. 10, p. 1541, 2023.
- ANOOSHEH, S.; FARNIA, P.; KARGAR, M. Association between TNF-alpha (-857) gene polymorphism and susceptibility to tuberculosis. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, v. 13, n. 4, p. 243, 2011.

ANURADHA, Rajamanickam et al. Malnutrition is associated with diminished baseline and mycobacterial antigen–Stimulated chemokine responses in latent tuberculosis infection. *Journal of Infection*, v. 77, n. 5, p. 410-416, 2018.

ARMSTRONG, A. M. et al. Tumour necrosis factor and inflammatory bowel disease. *British journal of surgery*, v. 84, n. 8, p. 1051-1058, 1997.

AZAD, Abul K.; SADEE, Wolfgang; SCHLESINGER, Larry S. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infection and immunity*, v. 80, n. 10, p. 3343-3359, 2012.

BAFICA, Andre et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Experimental Medicine*, v. 202, n. 12, p. 1715-1724, 2005.

BAHRAM, Seiamak et al. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 91, n. 14, p. 6259-6263, 1994.

BAHRAM, Seiamak et al. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics*, v. 44, n. 1, p. 80-81, 1996.

BAHRAM, Seiamak et al. MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Current opinion in immunology*, v. 17, n. 5, p. 505-509, 2005.

BARANWAL, Ajay Kumar; MEHRA, Narinder K. Major histocompatibility complex class I chain-related A (MICA) molecules: relevance in solid organ transplantation. *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 182, 2017.

BARDESKAR, N. S.; MANIA-PRAMANIK, J. HIV and host immunogenetics: unraveling the role of HLA-C. *Hla., India*, v. 88, n. 5, p. 221-231, november 2016.

BARLETTA-NAVECA, Raphaela Honorato et al. Toll-like receptor-1 single-nucleotide polymorphism 1805T/G is associated with predisposition to multibacillary tuberculosis. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 1455, 2018.

BARRETT, J. C. et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, v. 21, n. 2, p. 263–265, 2005

BAUER, Stefan et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, v. 285, n. 5428, p. 727-729, 1999.

BEAN, Andrew GD et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *The Journal of Immunology*, v. 162, n. 6, p. 3504-3511, 1999.

BEHAR, Samuel M. et al. Orchestration of pulmonary T cell immunity during *Mycobacterium tuberculosis* infection: immunity interruptus. In: *Seminars in immunology*. Academic Press, p. 559-577, 2014

BEKKER, Linda-Gail et al. TNF- α controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways. *The Journal of Immunology*, v. 166, n. 11, p. 6728-6734, 2001.

BEN AYED, H. et al. Extrapulmonary tuberculosis: update on the epidemiology, risk factors and prevention strategies. *Int J Trop Dis*, v. 1, n. 006, 2018.

BERGER, Herbert W.; MEJIA, Ervido. Tuberculous pleurisy. *Chest*, v. 63, n. 1, p. 88-92, 1973.

BERG, Martha K. et al. Mandated Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination predicts flattened curves for the spread of COVID-19. *Science Advances*, v. 6, n. 32, p. eabc1463, 2020.

BERNS, Svetlana A.; ISAKOVA, Julia A.; PEKHTEREVA, Polina I. Therapeutic potential of interferon-gamma in tuberculosis. *ADMET and DMPK*, v. 10, n. 1, p. 63-73, 2022.

BHATT, Kamlesh; SALGAME, Padmini. Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Journal of clinical immunology*, v. 27, n. 4, p. 347-362, 2007.

BLACKWELL, Jenefer M.; JAMIESON, Sarra E.; BURGNER, David. HLA and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, v. 22, n. 2, p. 370-385, 2009.

BOBADILLA, Karen et al. Human phagosome processing of Mycobacterium tuberculosis antigens is modulated by interferon- γ and interleukin-10. *Immunology*, v. 138, n. 1, p. 34-46, 2013.

BOCHUD, Pierre-Yves et al. Innate immunogenetics: a tool for exploring new frontiers of host defence. *The Lancet infectious diseases*, v. 7, n. 8, p. 531-542, 2007.

BODMER, W. F. The HLA system: structure and function. *Journal of clinical pathology*, v. 40, n. 9, p. 948-958, 1987.

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

BOOM, W. Henry et al. Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis*, v. 83, n. 1-3, p. 98-106, 2003.

BORGAONKAR, D. S.; BIAS, W. B. HL-A loci and chromosome 6. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 13, n. 1-2, p. 67-68, 1974.

BOTHA, Tania; RYFFEL, Bernhard. Reactivation of latent tuberculosis infection in TNF-deficient mice. *The Journal of Immunology*, v. 171, n. 6, p. 3110-3118, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Tuberculose. Diagnóstico Laboratorial Baciloscopia. Ministério da Saúde, v. 1, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras microbactérias. Ministério da Saúde, v. 1, p. 434, 2008a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 2008b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde, v. 1, p.58-76, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. PORTARIA Nº 1.498, DE 19 DE JULHO DE 2013. Redefine o Calendário Nacional de Vacinação, o Calendário Nacional de Vacinação dos Povos Indígenas e as Campanhas Nacionais de Vacinação, no âmbito do Programa Nacional de Imunizações (PNI), em todo o território nacional. Brasília, 2013.

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 edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Boletim Epidemiológico de Tuberculose. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Boletim Epidemiológico Tuberculose 2021. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

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, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Boletim Epidemiológico de Tuberculose. Brasília: Ministério da Saúde, 2023.

BRAUD, Veronique M. et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, v. 391, n. 6669, p. 795-799, 1998.

BREMER, Edwin. Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy. *International Scholarly Research Notices*, v. 2013, 2013.

BREWER, Timothy F. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, v. 31, n. Supplement_3, p. S64-S67, 2000.

BROMBERG, Yana; ROST, Burkhard. SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic acids research*, v. 35, n. 11, p. 3823-3835, 2007.

BROWNING, Jeffrey L. et al. Lymphotoxin β , a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell*, v. 72, n. 6, p. 847-856, 1993.

CACCAMO, Nadia et al. Human CD8 T lymphocytes recognize Mycobacterium tuberculosis antigens presented by HLA-E during active tuberculosis and express type 2 cytokines. *European journal of immunology*, v. 45, n. 4, p. 1069-1081, 2015.

CADENA, Anthony M.; FORTUNE, Sarah M.; FLYNN, JoAnne L. Heterogeneity in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, v. 17, n. 11, p. 691-702, 2017.

- CAGLIANI, Rachele; SIRONI, Manuela. Pathogen-driven selection in the human genome. *International journal of evolutionary biology*, v. 2013, 2013.
- CALMON-HAMATY, Flavia et al. Lymphotoxin α revisited: general features and implications in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, v. 13, n. 4, p. 1-5, 2011.
- CARDONA, Pere-Joan; IVANYI, Juraj. The secret trumps, impelling the pathogenicity of tubercle bacilli. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, v. 29, p. 14-19, 2011.
- CARDONA, Pere-Joan. Patogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, v. 36, n. 1, p. 38-46, 2018.
- CAROSELLA, Edgardo D. et al. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood*, v. 111, n. 10, p. 4862-4870, 2008.
- CASTAÑOS-VELEZ, Esmeralda et al. Trypanosoma cruzi infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. *Infection and immunity*, v. 66, n. 6, p. 2960-2968, 1998.
- CAVALCANTI, Yone Vila Nova et al. Role of TNF- α , IFN- γ , and IL-10 in the development of pulmonary tuberculosis. *Pulmonary medicine*, v. 2012, 2012.
- CHACKERIAN, Alissa A. et al. Dissemination of Mycobacterium tuberculosis is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infection and immunity*, v. 70, n. 8, p. 4501-4509, 2002.
- CHAI, Qiyao et al. New insights into the evasion of host innate immunity by Mycobacterium tuberculosis. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 17, n. 9, p. 901-913, 2020.
- CHAKRAVARTI, Aravinda. Single base differences between human genomes underlie differences in susceptibility to, or protection from, a host of diseases. Hence the great potential of such information in medicine. *Nature*, v. 409, p. 822-3, 2001.
- CHAN, Edward D. et al. Tobacco exposure and susceptibility to tuberculosis: is there a smoking gun?. *Tuberculosis*, v. 94, n. 6, p. 544-550, 2014.
- CHEN, En et al. Positive association between MIC gene polymorphism and tuberculosis in Chinese population. *Immunology letters*, v. 213, p. 62-69, 2019.
- CHEN, Guoqing; GOEDDEL, David V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, v. 296, n. 5573, p. 1634-1635, 2002.
- CHEN, Jun; MA, Aiwen. Associations of polymorphisms in interleukins with tuberculosis: Evidence from a meta-analysis. *Immunology letters*, v. 217, p. 1-6, 2020.
- CHEN, Lieping; FLIES, Dallas B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 4, p. 227-242, 2013.
- CHIARADIA, Laura et al. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.
- CHOO, Sung Yoon. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei medical journal*, v. 48, n. 1, p. 11-23, 2007.
- CIRULLI, Vincenzo et al. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes*, v. 55, n. 5, p. 1214-1222, 2006.

COHEN, Nadia R.; GARG, Salil; BRENNER, Michael B. Antigen presentation by CD1: lipids, T cells, and NKT cells in microbial immunity. *Advances in immunology*, v. 102, p. 1-94, 2009.

CORRAH, Tumena W. et al. Reappraisal of the relationship between the HIV-1-protective single-nucleotide polymorphism 35 kilobases upstream of the HLA-C gene and surface HLA-C expression. *J Virol.*, United Kingdom, v. 85, n. 7, p. 3367-3374, January 2011

COOPER, Andrea M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual review of immunology*, v. 27, p. 393-422, 2009.

CRAWFORD, Dana C.; NICKERSON, Deborah A. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu. Rev. Med.*, v. 56, p. 303-320, 2005.

CROFT, Michael. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 4, p. 271-285, 2009.

CRUZ, Andrea et al. Cutting edge: IFN- γ regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 3, p. 1416-1420, 2006.

CRUZ-KNIGHT, Wanda; BLAKE-GUMBS, Lyla. Tuberculosis: an overview. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, v. 40, n. 3, p. 743-756, 2013.

CUFF, Carolyn A. et al. Lymphotoxin $\alpha 3$ induces chemokines and adhesion molecules: insight into the role of LT α in inflammation and lymphoid organ development. *The Journal of Immunology*, v. 161, n. 12, p. 6853-6860, 1998.

DAS, Hiranmoy et al. MICA engagement by human V γ 2V δ 2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*, v. 15, n. 1, p. 83-93, 2001.

DAUSSET, J. The birth of MAC. *Vox sanguinis*, v. 46, n. 4, p. 235-237, 1984.

DAUSSET, J. The HLA adventure. In: *Transplantation proceedings*. 1999. p. 22-24.

DAVIES, P. D. O. et al. Smoking and tuberculosis: the epidemiological association and immunopathogenesis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 100, n. 4, p. 291-298, 2006.

DEBISARUN, Priya A. et al. The impact of BCG dose and revaccination on trained immunity. *Clinical Immunology*, v. 246, p. 109208, 2023.

DEN DUNNEN, J. T. et al. Tascher PEM on behalf of the Human Genome Variation Society (HGVS), the Human Variome Project (HVP), and the Human Genome Organisation (HUGO). HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum Mutat*, v. 37, n. 6, p. 564-9, 2016.

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

DE LIMA, Dhemerson S. et al. Polymorphisms in SIGLEC1 contribute to susceptibility to pulmonary active tuberculosis possibly through the modulation of IL-1 β . *Infection, Genetics and Evolution*, v. 55, p. 313-317, 2017.

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

DENIS, Michel. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *Journal of leukocyte biology*, v. 49, n. 4, p. 380-387, 1991.

DENDROU, Calliope A. et al. HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol.*, Austrália, v. 18, p. 325–339, may 2018

DETTOGNI, Raquel Spinassé et al. Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons. *Human immunology*, v. 76, n. 10, p. 717-723, 2015.

DODD, Peter J. et al. Age-and sex-specific social contact patterns and incidence of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *American journal of epidemiology*, v. 183, n. 2, p. 156-166, 2016.

DONALD, Peter R.; MARAIS, Ben J.; BARRY, Clifton E. Age and the epidemiology and pathogenesis of tuberculosis. *The Lancet*, v. 375, n. 9729, p. 1852-1854, 2010.

DONADI, Eduardo A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cellular and molecular life sciences*, v. 68, n. 3, p. 369-395, 2011.

DONAGHY, Ludovic et al. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 147, n. 2, p. 236-240, 2007.

DOOLEY, Kelly E.; CHAISSON, Richard E. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. *The Lancet infectious diseases*, v. 9, n. 12, p. 737-746, 2009.

DRAGE, Michael G. et al. TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular immunology*, v. 258, n. 1, p. 29-37, 2009.

DRUTSKAYA, Marina S. et al. Tumor necrosis factor, lymphotoxin and cancer. *IUBMB life*, v. 62, n. 4, p. 283-289, 2010.

DU, T. et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *Journal of viral hepatitis*, v. 13, n. 9, p. 618-624, 2006.

DUARTE, R. et al. Tuberculosis, social determinants and co-morbidities (including HIV). *Pulmonology*, v. 24, n. 2, p. 115-119, 2018.

DUGGAL, Priya et al. Genome-wide association study of spontaneous resolution of hepatitis C virus infection: data from multiple cohorts. *Annals of internal medicine*, v. 158, n. 4, p. 235-245, 2013.

EHLERS, Stefan et al. The lymphotoxin β receptor is critically involved in controlling infections with the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Immunology*, v. 170, n. 10, p. 5210-5218, 2003.

ELLIS, S. A. et al. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology*, v. 59, n. 4, p. 595, 1986.

ENDRES, Robert et al. Listeriosis in p47phox^{-/-} and TRp55^{-/-} mice: protection despite absence of ROI and susceptibility despite presence of RNI. *Immunity*, v. 7, n. 3, p. 419-432, 1997.

ENGWERDA, Christian R. et al. Locally up-regulated lymphotoxin α , not systemic tumor necrosis factor α , is the principle mediator of murine cerebral malaria. *The Journal of experimental medicine*, v. 195, n. 10, p. 1371-1377, 2002.

ENGWERDA, Christian R. et al. Distinct roles for lymphotoxin- α and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania donovani* infection. *The American journal of pathology*, v. 165, n. 6, p. 2123-2133, 2004.

ERNST, Joel D. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 8, p. 581-591, 2012.

Ensembl Genomes. YATES, Andrew D. et al. Ensembl 2020. *Nucleic acids research*, v. 48, n. D1, p. D682-D688, 2020.

ETEMADI, Nima et al. Lymphotoxin α induces apoptosis, necroptosis and inflammatory signals with the same potency as tumour necrosis factor. *The FEBS journal*, v. 280, n. 21, p. 5283-5297, 2013.

ETNA, Marilena Paola et al. Pro-and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: a two-edged sword in TB pathogenesis. In: *Seminars in immunology*. Academic Press, p. 543-551, 2014.

ETTINGER, Rachel et al. A critical role for lymphotoxin- β receptor in the development of diabetes in nonobese diabetic mice. *The Journal of experimental medicine*, v. 193, n. 11, p. 1333-1340, 2001.

FAINARDI, E., Castellazzi, M., Stignani, M., Morandi, F., Sana, G., Gonzalez, R., Pistoia, V., Baricordi, O.R., Sokal, E., Pena, J. Emerging topics and new perspectives on HLA-G. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 433-451, 2011.

FEDRIZZI, Tarcisio et al. Genomic characterization of nontuberculous mycobacteria. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

FELLAY, Jacques et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *science*, v. 317, n. 5840, p. 944-947, 2007.

FENG, Carl G. et al. Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to *Mycobacterium avium* infection not exhibited by Toll-like receptor 2 (TLR2)-and TLR4-deficient animals. *The Journal of immunology*, v. 171, n. 9, p. 4758-4764, 2003.

FERNANDES, Fernanda Pereira et al. Inflammasome genetics and complex diseases: a comprehensive review. *European Journal of Human Genetics*, v. 28, n. 10, p. 1307-1321, 2020.

FERNANDES, P. et al. Sex and age differences in *Mycobacterium tuberculosis* infection in Brazil. *Epidemiology & Infection*, v. 146, n. 12, p. 1503-1510, 2018.

FIGUEIRA, Mariana Brasil de Andrade et al. Single-Nucleotide Variants in the AIM2–Absent in Melanoma 2 Gene (rs1103577) Associated With Protection for Tuberculosis. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 824, 2021.

FLYNN, Joanne L. et al. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, n. 24, p. 12013-12017, 1992.

FLYNN, JoAnne L. et al. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of experimental medicine*, v. 178, n. 6, p. 2249-2254, 1993.

FLYNN, JoAnne L. et al. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*, v. 2, n. 6, p. 561-572, 1995.

FLYNN, JoAnne L.; CHAN, John. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infection and immunity*, v. 69, n. 7, p. 4195-4201, 2001.

FODIL, Nassima et al. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics*, v. 44, n. 5, p. 351-357, 1996.

FONTANILLA, Jose-Mario; BARNES, Arti; VON REYN, C. Fordham. Current diagnosis and management of peripheral tuberculous lymphadenitis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 53, n. 6, p. 555-562, 2011.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.

FRANCKE, Uta; PELLEGRINO, Michele A. Assignment of the major histocompatibility complex to a region of the short arm of human chromosome 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 3, p. 1147-1151, 1977.

FREMOND, CM et al. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of Immunology*, v. 179, n. 2, p. 1178-1189, 2007.

FU, Yang-Xin; CHAPLIN, David D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annual review of immunology*, v. 17, n. 1, p. 399-433, 1999.

GAGNEUX, Sebastien. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 4, p. 202, 2018.

GHODKE, Yogita et al. HLA and disease. *European journal of epidemiology*, v. 20, n. 6, p. 475-488, 2005.

GAMBHIR, Harvir S. et al. Tobacco smoking-associated risk for tuberculosis: a case-control study. *International health*, v. 2, n. 3, p. 216-222, 2010.

GARCIA, André et al. Association of HLA-G 3' UTR polymorphisms with response to malaria infection: a first insight. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 16, p. 263-269, 2013.

GRAY, Ian C.; CAMPBELL, David A.; SPURR, Nigel K. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Human molecular genetics*, v. 9, n. 16, p. 2403-2408, 2000.

GREEN, Angela M.; DIFAZIO, Robert; FLYNN, JoAnne L. IFN- γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 1, p. 270-277, 2013.

GRIFFITH, David E. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 175, n. 4, p. 367-416, 2007.

GRIFFITH, David E. Nontuberculous mycobacterial lung disease. *Current opinion in infectious diseases*, v. 23, n. 2, p. 185-190, 2010.

GROTZKE, Jeff E. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome is a HLA-I processing competent organelle. *PLoS Pathog*, v. 5, n. 4, p. e1000374, 2009.

GOLDBERG, Anna Carla; RIZZO, Luiz Vicente. MHC structure and function—antigen presentation. Part 1. *Einstein (Sao Paulo)*, v. 13, n. 1, p. 153-156, 2015.

GOLDEN, Marjorie P.; VIKRAM, Holenarasipur R. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *American family physician*, v. 72, n. 9, p. 1761-1768, 2005.

GOMMERMAN, Jennifer L.; BROWNING, Jeffrey L. Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, n. 8, p. 642-655, 2003.

GUERMONPREZ, Pierre et al. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, v. 425, n. 6956, p. 397-402, 2003.

GUO, Xiuchan et al. Strong influence of HLA-DP gene variants on development of persistent chronic HBV carriers in the Han Chinese population. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, v. 53, n. 2, p. 422, 2011

GUSTINCICH, S. et al. Fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1993.

HACKMON, Rinat et al. HLA-G antigen and parturition: maternal serum, fetal serum and amniotic fluid levels during pregnancy. *Fetal diagnosis and therapy*, v. 19, n. 5, p. 404-409, 2004.

HANDUNNETTHI, Lahiru et al. Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression, genetic variation and disease. *Genes & Immunity*, v. 11, n. 2, p. 99-112, 2010.

HAMMAMI, Fatma et al. The association between vitamin D deficiency and extrapulmonary tuberculosis: Case-control study. *Tuberculosis*, v. 126, p. 102034, 2021.

HARISHANKAR, Murugesan; SELVARAJ, Paramasivam; BETHUNAICKAN, Ramalingam. Influence of genetic polymorphism towards pulmonary tuberculosis susceptibility. *Frontiers in medicine*, v. 5, p. 213, 2018.

HARLING, Kirstin et al. Constitutive STAT3 phosphorylation and IL-6/IL-10 co-expression are associated with impaired T-cell function in tuberculosis patients. *Cellular & molecular immunology*, v. 16, n. 3, p. 275-287, 2019.

HEHLGANS, Thomas; PFEFFER, Klaus. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, v. 115, n. 1, p. 1-20, 2005.

HEINZEL, Amy S. et al. HLA-E-dependent presentation of Mtb-derived antigen to human CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine*, v. 196, n. 11, p. 1473-1481, 2002.

HERMANS, P. W. et al. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, v. 28, n. 9, p. 2051-2058, 1990.

HILL, Adrian VS. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annual review of immunology*, v. 16, n. 1, p. 593-617, 1998.

HIROSE, Tomohiro et al. The role of lymphotoxin- α in rheumatoid arthritis. *Inflammation Research*, v. 67, n. 6, p. 495-501, 2018.

HOUDE, Mathieu et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*, v. 425, n. 6956, p. 402-406, 2003.

HORTON, Roger et al. Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics*, v. 5, n. 12, p. 889-899, 2004.

HOSSAIN, Mahabub et al. Rice biodiversity in Bangladesh: adoption, diffusion and disappearance of varieties: a statistical report from farm survey in 2005. 2013.

HU, Zhibin et al. New loci associated with chronic hepatitis B virus infection in Han Chinese. *Nature genetics*, v. 45, n. 12, p. 1499-1503, 2013.

HULTGREN, Olof et al. TNF/lymphotoxin- α double-mutant mice resist septic arthritis but display increased mortality in response to *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology*, v. 161, n. 11, p. 5937-5942, 1998.

HUNT, Ryan et al. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them?. *Single nucleotide polymorphisms*, p. 23-39, 2009.

IPD-IMGT/HLA - International ImMunoGeneTics Project. The HLA Informatics Group of the Anthony Nolan Research Institute in close collaboration with the European Bioinformatics Institute. Release 3.43.0, 2021-01-18. Hinxton, Cambridgeshire, 2021.

IMTIAZ, Sameer et al. Alcohol consumption as a risk factor for tuberculosis: meta-analyses and burden of disease. *European Respiratory Journal*, v. 50, n. 1, 2017.

ISERNHAGEN, Antje et al. Impact of the MICA-129Met/Val Dimorphism on NKG2D-Mediated Biological Functions and Disease Risks. *Frontiers in Immunology*, v. 7, p. 588, 2016.

JAFARI, Mohammad et al. The NRAMP1, VDR, TNF- α , ICAM1, TLR2 and TLR4 gene polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis: A case-control study. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 39, p. 92-98, 2016.

JANKUTE, Monika et al. Assembly of the mycobacterial cell wall. *Annual review of microbiology*, v. 69, p. 405-423, 2015.

JASENOSKY, Luke D. et al. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunological reviews*, v. 264, n. 1, p. 74-87, 2015.

JEE, BaBBan. Understanding the early host immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Central-European Journal of Immunology*, v. 45, n. 1, p. 99, 2020.

JEON, Christie Y.; MURRAY, Megan B. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies. *PLoS med*, v. 5, n. 7, p. e152, 2008.

JOOSTEN, Simone A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* peptides presented by HLA-E molecules are targets for human CD8+ T-cells with cytotoxic as well as regulatory activity. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 2, p. e1000782, 2010.

JOOSTEN, Simone A.; SULLIVAN, Lucy C.; OTTENHOFF, Tom HM. Characteristics of HLA-E restricted T-cell responses and their role in infectious diseases. *Journal of immunology research*, v. 2016, 2016.

JØRGENSEN, Pernille B. et al. Epstein-Barr virus peptide presented by HLA-E is predominantly recognized by CD8 bright cells in multiple sclerosis patients. *PLoS One*, v. 7, n. 9, p. e46120, 2012.

KAMATANI, Yoichiro et al. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nature genetics*, v. 41, n. 5, p. 591-595, 2009.

KANAI, TAKAO et al. Human leukocyte antigen-G-expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 45, n. 2, p. 94-99, 2001.

KAUSHIK, Sandeep R. et al. Low circulatory Fe and Se levels with a higher IL-6/IL-10 ratio provide nutritional immunity in tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 985538, 2023.

KENT, P.T et al. *Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III Laboratory*. U.S.Department of Health Education and Welfare, Technical Report, 1985.

KERNER, Gaspard et al. Inherited human IFN- γ deficiency underlies mycobacterial disease. *The Journal of clinical investigation*, v. 130, n. 6, p. 3158-3171, 2020.

KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. TLR signaling. *Cell Death & Differentiation*, v. 13, n. 5, p. 816-825, 2006.

KAUFMANN, Stefan HE et al. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *The Journal of experimental medicine*, v. 201, n. 11, p. 1693, 2005.

KHADER, Shabaana A. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature immunology*, v. 8, n. 4, p. 369-377, 2007.

KHALIL, Nasr H.; RAMADAN, Ramadan A. Study of risk factors for pulmonary tuberculosis among diabetes mellitus patients. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*, v. 65, n. 4, p. 817-823, 2016.

KHOR, Chiea Chuen et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for dengue shock syndrome at MICB and PLCE1. *Nature genetics*, v. 43, n. 11, p. 1139, 2011.

KIMURA, Akihiro; KISHIMOTO, Tadimitsu. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *European journal of immunology*, v. 40, n. 7, p. 1830-1835, 2010.

KIRIK, Fatma Esin et al. Association of cytokine gene polymorphisms with susceptibility to cutaneous leishmaniasis in a Turkish population. *Parasite Immunology*, v. 42, n. 11, p. e12775, 2020.

KLEIN, J. A. N.; SATO, Akie. The HLA system. First of two parts. *New England Journal of Medicine*, v. 343, n. 10, p. 702-709, 2000.

KLEIN, J. A. N.; SATO, Akie. The HLA system. Second of two parts. *New England Journal of Medicine*, v. 343, n. 11, p. 782-786, 2000b.

KLEINNIJENHUIS, Johanneke. et al. Innate Immune Recognition of Mycobacterium tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2011, p. 1–12, 2011

KLEINNIJENHUIS, Johanneke et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 43, p. 17537-17542, 2012.

KOCH, Robert. "The etiology of tuberculosis." *Berl Klin Wochenschr* 15 (1882): 221-30.

KOLLS, Jay K.; LINDÉN, Anders. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, v. 21, n. 4, p. 467-476, 2004.

KOVATS, Susan et al. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*, v. 248, n. 4952, p. 220-223, 1990.

KRAUSE-KYORA, Ben et al. Ancient DNA study reveals HLA susceptibility locus for leprosy in medieval Europeans. *Nature communications*, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2018.

KUMAR, Ashwani et al. Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control?. *Expert reviews in molecular medicine*, v. 13, 2011.

KUMAR, Himanshu; KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, v. 30, n. 1, p. 16-34, 2011.

KUMAR, Nathella Pavan et al. Plasma proinflammatory cytokines are markers of disease severity and bacterial burden in pulmonary tuberculosis. *Open forum infectious diseases*. Oxford University Press, 2019.

KUMAR, Vinod et al. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. 2012.

LADEL, Christoph H. et al. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infection and immunity*, v. 65, n. 11, p. 4843-4849, 1997.

LAI, Yung-Fa et al. Functional polymorphisms of the TLR7 and TLR8 genes contribute to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis*, v. 98, p. 125-131, 2016.

LALVANI, Ajit; MILLINGTON, Kerry A. T cells and tuberculosis: beyond interferon- γ . *The Journal of infectious diseases*, v. 197, n. 7, p. 941-943, 2008.

LANGE, U.; TEICHMANN, J.; STRACKE, H. Correlation between plasma TNF-alpha, IGF-1, biochemical markers of bone metabolism, markers of inflammation/disease activity, and clinical manifestations in ankylosing spondylitis. *European journal of medical research*, v. 5, n. 12, p. 507-511, 2000.

LANIER, Lewis L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 23, p. 225-274, 2005.

LEE, Ni et al. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 9, p. 5199-5204, 1998.

LE DISCORDE, Magali et al. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Human immunology*, v. 64, n. 11, p. 1039-1044, 2003.

LEE et al. Interferon gamma polymorphisms associated with susceptibility to tuberculosis in a Han Taiwanese population. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 48, p.376-380, 2015.

LEE, Kyung Soo et al. Adult-Onset Pulmonary Tuberculosis: Findings on Chest Radiographs and CT Scans . *AJR. American Journal of Roentgenology* , v. 160, n. 4, pág. 753-758, 1993.

LEISH, G. E. N. C. Wellcome Trust Case Control C, Fakiola M, Strange A, Cordell HJ, et al.(2013) Common variants in the HLA-DRB1-HLA-DQA1 HLA class II region are associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. *Nat Genet*, v. 45, p. 208-213.

LEMAOULT, J. et al. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. *Tissue antigens*, v. 62, n. 4, p. 273-284, 2003.

LERNER, Thomas R.; BOREL, Sophie; GUTIERREZ, Maximiliano G. The innate immune response in human tuberculosis. *Cellular microbiology*, v. 17, n. 9, p. 1277-1285, 2015.

LEUNG, Chi C. et al. Passive smoking and tuberculosis. *Archives of internal medicine*, v. 170, n. 3, p. 287-292, 2010.

LEWINSOHN, David M. et al. Secreted proteins from *Mycobacterium tuberculosis* gain access to the cytosolic MHC class-I antigen-processing pathway. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 1, p. 437-442, 2006.

LEWINSOHN, Deborah A. et al. Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. *PLOS pathog*, v. 3, n. 9, p. e127, 2007.

LI, Jianfeng et al. Induction of TCR V β -specific CD8⁺ CTLs by TCR V β -derived peptides bound to HLA-E. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 7, p. 3800-3808, 2001.

LIN, Philana Ling et al. Tumor necrosis factor and tuberculosis. In: *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Elsevier, 2007. p. 22-25.

- LINGE, Irina et al. Pleiotropic Effect of IL-6 produced by B-lymphocytes during early phases of adaptive immune responses against TB infection. *Frontiers in immunology*, v. 13, p. 750068, 2022.
- LIU, Hong et al. Discovery of six new susceptibility loci and analysis of pleiotropic effects in leprosy. *Nature genetics*, v. 47, n. 3, p. 267-271, 2015.
- LIU, Cui Hua; LIU, Haiying; GE, Baoxue. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cellular & molecular immunology*, v. 14, n. 12, p. 963-975, 2017.
- LLIBRE, Alba et al. Tuberculosis alters immune-metabolic pathways resulting in perturbed IL-1 responses. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 897193, 2022.
- LOCKSLEY, Richard M.; KILLEEN, Nigel; LENARDO, Michael J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, v. 104, n. 4, p. 487-501, 2001.
- LÖNNROTH, Knut et al. A consistent log-linear relationship between tuberculosis incidence and body mass index. *International journal of epidemiology*, v. 39, n. 1, p. 149-155, 2010.
- LÖNNROTH, Knut et al. Alcohol use as a risk factor for tuberculosis—a systematic review. *BMC public health*, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2008.
- LU, Theresa T.; BROWNING, Jeffrey L. Role of the lymphotoxin/LIGHT system in the development and maintenance of reticular networks and vasculature in lymphoid tissues. *Frontiers in immunology*, v. 5, p. 47, 2014.
- LU, Lenette L. et al. IFN- γ -independent immune markers of *Mycobacterium tuberculosis* exposure. *Nature medicine*, v. 25, n. 6, p. 977-987, 2019.
- LUO, Jie et al. Diagnostic performance of plasma cytokine biosignature combination and MCP-1 as individual biomarkers for differentiating stages *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Infection*, v. 78, n. 4, p. 281-291, 2019.
- MACEWAN, David J. TNF ligands and receptors—a matter of life and death. *British journal of pharmacology*, v. 135, n. 4, p. 855-875, 2002.
- MAEDA, M. et al. Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, v. 14, n. 3, p. 451-461, 1992.
- MAGIRA, Eleni E. et al. HLA-A and HLA-DRB1 amino acid polymorphisms are associated with susceptibility and protection to pulmonary tuberculosis in a Greek population. *Human immunology*, v. 73, n. 6, p. 641-646, 2012.
- MALLET, Valérie et al. HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83+ dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. *International immunology*, v. 11, n. 6, p. 889-898, 1999.
- MANGAN, Paul R. et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH 17 lineage. *Nature*, v. 441, n. 7090, p. 231-234, 2006.
- MANTOVANI, Alberto et al. Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity. *Immunity*, v. 50, n. 4, p. 778-795, 2019.
- MARAKALALA, Mohlopheni J. et al. Macrophage heterogeneity in the immunopathogenesis of tuberculosis. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 1028, 2018.

- MARCHINI, Jonathan; DONNELLY, Peter; CARDON, Lon R. Genome-wide strategies for detecting multiple loci that influence complex diseases. *Nature genetics*, v. 37, n. 4, p. 413-417, 2005.
- MARQUES, Herlander et al. Methodology for single nucleotide polymorphism selection in promoter regions for clinical use. An example of its applicability. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, v. 7, n. 3, p. 126, 2016.
- MARTIN, A.-M. et al. Population frequencies of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in immuno-modulatory genes. *Human heredity*, v. 55, n. 4, p. 171-178, 2003.
- MARTINEZ, Alejandra N.; MEHRA, Smriti; KAUSHAL, Deepak. Role of interleukin 6 in innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of infectious diseases*, v. 207, n. 8, p. 1253-1261, 2013.
- MATSUNO, H. et al. The role of TNF- α in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology*, v. 41, n. 3, p. 329-337, 2002.
- MATZARAKI, Vasiliki et al. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome biology*, v. 18, n. 1, p. 1-21, 2017.
- MAYER-BARBER, Katrin D. 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*, v. 35, n. 6, p. 1023-1034, 2011.
- MBAREK, Hamdi et al. A genome-wide association study of chronic hepatitis B identified novel risk locus in a Japanese population. *Human molecular genetics*, v. 20, n. 19, p. 3884-3892, 2011.
- MCGUIRE, William et al. Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*, v. 371, n. 6497, p. 508-511, 1994.
- MCMURTREY, Curtis et al. T cell recognition of *Mycobacterium tuberculosis* peptides presented by HLA-E derived from infected human cells. *PLoS One*, v. 12, n. 11, p. e0188288, 2017.
- MEDLER, Juliane; WAJANT, Harald. Tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2): an overview of an emerging drug target. *Expert opinion on therapeutic targets*, v. 23, n. 4, p. 295-307, 2019.
- MENIER, Catherine et al. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood*, v. 104, n. 10, p. 3153-3160, 2004.
- MERT, Ali et al. Miliary tuberculosis: clinical manifestations, diagnosis and outcome in 38 adults. *Respirology*, v. 6, n. 3, p. 217-224, 2001.
- MERT, Ali et al. Miliary tuberculosis: Epidemiological and clinical analysis of large-case series from moderate to low tuberculosis endemic Country. *Medicine*, v. 96, n. 5, 2017.
- MERZA, Muayad et al. The NRAMPI, VDR and TNF- α gene polymorphisms in Iranian tuberculosis patients: the study on host susceptibility. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 13, n. 4, p. 252-256, 2009.

MEYER, Christian G.; THYE, Thorsten. Host genetic studies in adult pulmonary tuberculosis. In: *Seminars in immunology*. Academic Press, 2014. p. 445-453.

MEYER, Diogo et al. A genomic perspective on HLA evolution. *Immunogenetics*, v. 70, n. 1, p. 5-27, 2018.

MIAO, Ruifen et al. An HLA class II locus, previously identified by a genome-wide association study, is also associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in a Chinese population. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 64, p. 164-167, 2018.

MIKI, Daiki et al. HLA-DQB1* 03 confers susceptibility to chronic hepatitis C in Japanese: a genome-wide association study. *PloS one*, v. 8, n. 12, p. e84226, 2013.

MIRZAEI, Arezou; MAHMOUDI, Hassan. Evaluation of TNF- α cytokine production in patients with tuberculosis compared to healthy people. *GMS Hygiene and Infection Control*, v. 13, 2018.

MOFFATT, Miriam F. et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *New England Journal of Medicine*, v. 363, n. 13, p. 1211-1221, 2010.

MOHAN, Vellore P. et al. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infection and immunity*, v. 69, n. 3, p. 1847-1855, 2001.

MOLINERO, Luciana Lorena et al. Intracellular expression of MICA in activated CD4 T lymphocytes and protection from NK cell-mediated MICA-dependent cytotoxicity. *Human immunology*, v. 67, n. 3, p. 170-182, 2006.

MÖLLER, Marlo; DE WIT, Erika; HOAL, Eileen G. Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 58, n. 1, p. 3-26, 2010.

MONTGOMERY, Robert A. et al. HLA in transplantation. *Nature Reviews Nephrology*, v. 14, n. 9, p. 558-570, 2018.

MORANDI, Fabio et al. Recent advances in our understanding of HLA-G biology: lessons from a wide spectrum of human diseases. *Journal of immunology research*, v. 2016, 2016.

MORTAZ, Esmail et al. Interaction of pattern recognition receptors with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical immunology*, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2015.

MOSAAD, Y. M. Clinical role of human leukocyte antigen in health and disease. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 82, n. 4, p. 283-306, 2015.

NAKANE, A. K. I. O.; MINAGAWA, TOMONORI; KATO, KAZUYUKI. Endogenous tumor necrosis factor (cachectin) is essential to host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and immunity*, v. 56, n. 10, p. 2563-2569, 1988.

NETEA, Mihai G.; QUINTIN, Jessica; VAN DER MEER, Jos WM. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell host & microbe*, v. 9, n. 5, p. 355-361, 2011.

NETEA, Mihai G. et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 20, n. 6, p. 375-388, 2020.

NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/docs/rs_attributes.html>. Acessado em: 13 de novembro de 2023.

CORREIA-NEVES, Margarida et al. Immunological hyporesponsiveness in tuberculosis: The role of mycobacterial glycolipids. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 1035122, 2022.

NHGRI- National Human Genome Research Institute. Disponível em: <<http://www.genome.gov>>. Acessado em: 15 de outubro de 2023.

NG, Pauline C.; HENIKOFF, Steven. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, v. 7, p. 61-80, 2006.

NISHIDA, Nao et al. Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. *Scientific reports*, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2016.

NNOAHAM, Kelechi E.; CLARKE, Aileen. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *International journal of epidemiology*, v. 37, n. 1, p. 113-119, 2008.

NGUYEN-LEFEBVRE, Anh Thu et al. Mouse models for studies of HLA-G functions in basic science and pre-clinical research. *Human immunology*, v. 77, n. 9, p. 711-719, 2016.

O'BRIEN, T. R. et al. Risk alleles for chronic hepatitis B are associated with decreased mRNA expression of HLA-DPA1 and HLA-DPB1 in normal human liver. *Genes & Immunity*, v. 12, n. 6, p. 428-433, 2011.

O'CALLAGHAN, Christopher A.; BELL, John I. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunological reviews*, v. 163, n. 1, p. 129-138, 1998.

OCHANDO, Jordi et al. Trained immunity—basic concepts and contributions to immunopathology. *Nature Reviews Nephrology*, v. 19, n. 1, p. 23-37, 2023.

O'GARRA, Anne et al. The immune response in tuberculosis. *Annual review of immunology*, v. 31, p. 475-527, 2013.

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

ORLOVA, Marianna; SCHURR, Erwin. Human genomics of *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Current genetic medicine reports*, v. 5, n. 3, p. 125-131, 2017.

ORME, Ian M.; ROBINSON, Richard T.; COOPER, Andrea M. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nature immunology*, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2015.

OTTENHOFF, Tom HM; KUMARARATNE, Dinakantha; CASANOVA, Jean-Laurent. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunology today*, v. 19, n. 11, p. 491-494, 1998.

PAI, M. et al. Nature reviews disease primers. *Tuberculosis*, v. 2, p. 16076, 2016.

PAUL, Pascale et al. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5,-G6, and-G7 transcripts in human transfected cells. *Human immunology*, v. 61, n. 11, p. 1138-1149, 2000.

PELAK, K. et al. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Center for HIV. AIDS Vaccine Immunology (CHAVI). Host determinants of HIV-1 control in African Americans. *J Infect Dis.*, United States of America, v. 201, n. 8, p. 1141-9, 2010.

PEREZ, Ana B. et al. Tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Human immunology*, v. 71, n. 11, p. 1135-1140, 2010.

PFEIFER, John D. et al. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature*, v. 361, n. 6410, p. 359-362, 1993.

PFEFFER, Klaus et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*, v. 73, n. 3, p. 457-467, 1993.

PFYFFER, Gaby E.; VINCENT, Véronique. *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *Mycobacterium leprae*, and Other Slow-Growing Mycobacteria. Topley & Wilson's *Microbiology and Microbial Infections*, 2010.

PHILIPS, Jennifer A.; ERNST, Joel D. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 7, p. 353-384, 2012.

PIETRA, Gabriella et al. The analysis of the natural killer-like activity of human cytolytic T lymphocytes revealed HLA-E as a novel target for TCR α/β -mediated recognition. *European journal of immunology*, v. 31, n. 12, p. 3687-3693, 2001.

PIETRA, Gabriella et al. HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8⁺ cytolytic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 19, p. 10896-10901, 2003.

POBER, Jordan S. et al. Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *The Journal of Immunology*, v. 138, n. 10, p. 3319-3324, 1987.

PONTILLO, Alessandra et al. Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection in HIV-positive patients is associated with CARD8 genetic variant. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 63, n. 2, p. 147-151, 2013.

PREZZEMOLO, Teresa et al. Detailed characterization of human *Mycobacterium tuberculosis* specific HLA-E restricted CD8⁺ T cells. *European journal of immunology*, v. 48, n. 2, p. 293-305, 2018.

RAMBARAN, Santhuri et al. Effect of Inflammatory Cytokines/chemokines on pulmonary tuberculosis culture conversion and disease severity in HIV-infected and-uninfected individuals from South Africa. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 641065, 2021.

RAHMAN, Sayma et al. Compartmentalization of immune responses in human tuberculosis: few CD8⁺ effector T cells but elevated levels of FoxP3⁺ regulatory t cells in the granulomatous lesions. *The American journal of pathology*, v. 174, n. 6, p. 2211-2224, 2009.

RAJA, Alamelu. Immunology of tuberculosis. *Indian Journal of Medical Research*, v. 120, n. Oct, p. 213-232, 2004

RAMACHANDRA, Lakshmi et al. Processing of Mycobacterium tuberculosis antigen 85B involves intraphagosomal formation of peptide–major histocompatibility complex II complexes and is inhibited by live bacilli that decrease phagosome maturation. *The Journal of experimental medicine*, v. 194, n. 10, p. 1421-1432, 2001.

RAMAKRISHNAN, Lalita. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 5, p. 352-366, 2012.

RAMIREZ-LAPAUSA, M.; MENENDEZ-SALDANA, A.; NOGUERADO-ASENSIO, A. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Rev Esp Sanid Penit*, v. 17, n. 1, p. 3-11, 2015.

RASTOGI, N.; LEGRAND, E.; SOLA, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, v. 20, n. 1, p. 21-54, 2001.

RASTOGI, S.; BRIKEN, V. Interaction of mycobacteria with host cell inflammasomes. *Front Immunol* 13: 791136. 2022.

RAVIKUMAR, M. et al. Associations of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 alleles with pulmonary tuberculosis in south India. *Tubercle and Lung Disease*, v. 79, n. 5, p. 309-317, 1999.

REHM, Jürgen et al. The association between alcohol use, alcohol use disorders and tuberculosis (TB). A systematic review. *BMC public health*, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2009.

REMOUCHAMPS, Caroline et al. Biology and signal transduction pathways of the Lymphotoxin- α / β /LT β R system. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 22, n. 5-6, p. 301-310, 2011.

RIBEIRO-RODRIGUES, R. et al. A role for CD4⁺ CD25⁺ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 144, n. 1, p. 25-34, 2006.

RICHARDS, Sue et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*, v. 17, n. 5, p. 405-423, 2015.

RITTER, Kristina; ROUSSEAU, Jasmin; HÖLSCHER, Christoph. O papel das citocinas gp130 na tuberculose. *Células*, v. 9, n. 12, pág. 2695, 2020.

RITZ, Nicole et al. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. *FEMS microbiology reviews*, v. 32, n. 5, p. 821-841, 2008.

RIZZO, Roberta et al. The role of HLA-class Ib molecules in immune-related diseases, tumors, and infections 2016. 2017.

ROACH, Daniel R. et al. Secreted lymphotoxin- α is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *Journal of Experimental Medicine*, v. 193, n. 2, p. 239-246, 2001.

ROACH, Daniel R. et al. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *The Journal of immunology*, v. 168, n. 9, p. 4620-4627, 2002.

ROACH, Daniel R. et al. Independent protective effects for tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha in the host response to *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and immunity*, v. 73, n. 8, p. 4787-4792, 2005.

ROCHE, Paul A.; FURUTA, Kazuyuki. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 4, p. 203-216, 2015.

ROMAGNANI, Chiara et al. HLA-E-restricted recognition of human cytomegalovirus by a subset of cytolytic T lymphocytes. *Human immunology*, v. 65, n. 5, p. 437-445, 2004.

ROTHER, Joachim et al. Phenotypic analysis of TNFR1-deficient mice and characterization of TNFR1-deficient fibroblasts in vitro. *Circulatory shock*, v. 44, n. 2, p. 51-56, 1994.

RUDDLE, Nancy H. Lymphotoxin and TNF: how it all began—a tribute to the travelers. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 25, n. 2, p. 83-89, 2014.

SABBAGH, A. et al. Association of HLA-G 3' untranslated region polymorphisms with antibody response against *Plasmodium falciparum* antigens: preliminary results. *Tissue antigens*, v. 82, n. 1, p. 53-58, 2013.

SALERNO-GONÇALVES, Rosângela et al. Identification of a human HLA-E-restricted CD8+ T cell subset in volunteers immunized with *Salmonella enterica* serovar Typhi strain Ty21a typhoid vaccine. *The Journal of Immunology*, v. 173, n. 9, p. 5852-5862, 2004.

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

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

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

SANTOS, Josemir Belo dos et al. Cutaneous tuberculosis: epidemiologic, etiopathogenic and clinical aspects-part I. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 89, n. 2, p. 219-228, 2014.

SAUNDERS, Bernadette M.; BRITTON, Warwick J. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunology and cell biology*, v. 85, n. 2, p. 103-111, 2007.

SAURABH, Abhinav et al. Differential expression of HLA-G and ILT-2 receptor in human tuberculosis: Localized versus disseminated disease. *Human immunology*, v. 77, n. 9, p. 746-753, 2016.

SAURABH, Abhinav et al. Inhibiting HLA-G restores IFN- γ and TNF- α producing T cell in pleural tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 109, p. 69-79, 2018.

- SCHAEFER, C. et al. Disease-related mutations predicted to impact protein function. Disease-related mutations predicted to impact protein function. BMC Genomics, v. 13.
- SCHRAMBACH, Stéphanie et al. In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. PloS one, v. 2, n. 6, p. e518, 2007.
- SCHULTE, Daniela et al. The HLA-ER/HLA-ER Genotype Affects the Natural Course of Hepatitis C Virus (HCV) Infection and Is Associated with HLA-E–Restricted Recognition of an HCV-Derived Peptide by Interferon- γ –Secreting Human CD8+ T Cells. The Journal of infectious diseases, v. 200, n. 9, p. 1397-1401, 2009.
- SCHLÜTER, Dirk et al. Both lymphotoxin- α and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. The Journal of Immunology, v. 170, n. 12, p. 6172-6182, 2003.
- SCHNEIDER, Kirsten; POTTER, Karen G.; WARE, Carl F. Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. Immunological reviews, v. 202, n. 1, p. 49-66, 2004.
- SCOTT-BROWNE, James P. et al. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. The Journal of experimental medicine, v. 204, n. 9, p. 2159-2169, 2007.
- SCRIBA, Thomas J. et al. Distinct, specific IL-17-and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. The Journal of Immunology, v. 180, n. 3, p. 1962-1970, 2008.
- SES - Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas. Disponível em: <<https://www.saude.am.gov.br/unidades-de-saude/policlinica-cardoso-fontes/>>. Acesso em: novembro de 2023.
- SESHADRI, Chetan et al. A polymorphism in human MR1 is associated with mRNA expression and susceptibility to tuberculosis. Genes & Immunity, v. 18, n. 1, p. 8-14, 2017.
- SHALER, C. R. et al. Understanding delayed T-cell priming, lung recruitment, and airway luminal T-cell responses in host defense against pulmonary tuberculosis. Clinical and Developmental Immunology, v. 2012, p. 1-13, 2012
- SHALER, Christopher Ryan et al. Within the Enemy's Camp: contribution of the granuloma to the dissemination, persistence and transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. Frontiers in immunology, v. 4, p. 30, 2013.
- SHANKARKUMAR, Umapathy. The human leukocyte antigen (HLA) system. International Journal of Human Genetics, v. 4, n. 2, p. 91-103, 2004.
- SHANG, Shaobin et al. Cigarette smoke increases susceptibility to tuberculosis—evidence from in vivo and in vitro models. Journal of Infectious Diseases, v. 203, n. 9, p. 1240-1248, 2011.
- SHANMUGANATHAN, Gaithri et al. Role of Interferons in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Clinics and Practice, v. 12, n. 5, p. 788-796, 2022.
- SHEN, Jian; SHI, Shiyuan; LAI, Zhen. Identification of HLA-DQA1 as a susceptibility gene for spinal tuberculosis by exome sequencing. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, v. 24, p. 3442, 2018.

SHI, G. L. et al. Association of HLA-DRB alleles and pulmonary tuberculosis in North Chinese patients. *Genet Mol Res*, v. 10, n. 3, p. 1331-1336, 2011.

SHIINA, T.; INOKO, H.; KULSKI, J. K. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue antigens*, v. 64, n. 6, p. 631-649, 2004.

SHIINA, Takashi et al. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *Journal of human genetics*, v. 54, n. 1, p. 15-39, 2009.

SHIROISHI, Mitsunori et al. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 15, p. 8856-8861, 2003.

SIA, Jonathan Kevin; GEORGIEVA, Maria; RENGARAJAN, Jyothi. Innate immune defenses in human tuberculosis: an overview of the interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and innate immune cells. *Journal of immunology research*, v. 2015, 2015.

SILVA, Denise Rossato et al. Risk factors for tuberculosis: diabetes, smoking, alcohol use, and the use of other drugs. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 44, n. 2, p. 145-152, 2018.

SILVÉRIO, Diogo et al. Advances on the Role and Applications of Interleukin-1 in Tuberculosis. *MBio*, v. 12, n. 6, p. e03134-21, 2021.

SINAN-Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan. Tuberculose - Casos de Tuberculose - Desde 2001. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/tubercam.def>>. Acessado em: 01 de novembro de 2023.

SINGH, Paras et al. Significance of CCL2 (-2518A/G), CCR2 (190G/A) and TLR4 polymorphisms (896 A/G and 1196C/T) in tuberculosis risk in Indian population. *Meta Gene*, v. 18, p. 184-190, 2018.

SOLOVIC, Ivan et al. The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. 2010.

SONON, Paulin et al. Human leukocyte antigen-G 3' untranslated region polymorphism+3142G/C (rs1063320) and haplotypes are associated with manifestations of the American Tegumentary Leishmaniasis in a Northeastern Brazilian population. *Human immunology*, v. 80, n. 11, p. 908-916, 2019.

SOURIANT, Shanti et al. Tuberculosis exacerbates HIV-1 infection through IL-10/STAT3-dependent tunneling nanotube formation in macrophages. *Cell reports*, v. 26, n. 13, p. 3586-3599. e7, 2019.

SOUSA, Alexandra O. et al. Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 8, p. 4204-4208, 2000.

SOUSA, Jeremy et al. *Mycobacterium tuberculosis* associated with severe tuberculosis evades cytosolic surveillance systems and modulates IL-1 β production. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 1949, 2020.

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

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

SOUZA DE LIMA, Dhêmerson et al. Combining host genetics and functional analysis to depict Inflammasome contribution in tuberculosis susceptibility and outcome in endemic areas. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 550624, 2020.

SPÍNOLA, Hélder. HLA loci and respiratory infectious diseases. *Journal of Respiratory Research*, v. 2, p. 56-66, 2016.

STEINLE, Alexander et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*, v. 53, p. 279-287, 2001.

STROMINGER, Jack L. Structure of class I and class II HLA antigens. *British medical bulletin*, v. 43, n. 1, p. 81-93, 1987.

SUNYAEV, Shamil; RAMENSKY, Vasily; BORK, Peer. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends in Genetics*, v. 16, n. 5, p. 198-200, 2000.

SVEINBJORNSSON, Gardar et al. HLA class II sequence variants influence tuberculosis risk in populations of European ancestry. *Nature genetics*, v. 48, n. 3, p. 318-322, 2016.

TALAT, Najeeha et al. Vitamin D deficiency and tuberculosis progression. *Emerging infectious diseases*, v. 16, n. 5, p. 853, 2010.

TALAAT, Roba M. et al. Tumor necrosis factor-alpha-308G/A polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-infected patients. *Chinese journal of cancer*, v. 31, n. 1, p. 29, 2012.

TAMORI, Akihiro; KAWADA, Norifumi. HLA class II associated with outcomes of hepatitis B and C infections. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 19, n. 33, p. 5395, 2013.

TCHACROME, Imane et al. Associação de doenças com a cadeia a relacionada do complexo polimórfico de histocompatibilidade principal de classe I: gene MICA. *Imunologia de Transplantes*, pág. 101665, 2022.

TENG, Michelle S. et al. A human TAPBP (TAPASIN)-related gene, TAPBP-R. *European journal of immunology*, v. 32, n. 4, p. 1059-1068, 2002.

THARWAT, Ebram et al. Impact of IL-27p28 (rs153109) and TNF- α (rs1800629) genetic polymorphisms on the progression of HCV infection in Egyptian patients. *Immunological investigations*, v. 48, n. 3, p. 255-267, 2019.

THORSBY, Erik. A short history of HLA. *Tissue antigens*, v. 74, n. 2, p. 101-116, 2009.

TIENCHEU, Leopold D. et al. Immunological consequences of strain variation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *European journal of immunology*, v. 47, n. 3, p. 432-445, 2017.

TING, Jenny Pan-Yun; TROWSDALE, John. Genetic control of MHC class II expression. *Cell*, v. 109, n. 2, p. S21-S33, 2002.

TOGBE, Dieudonné et al. Both functional LT β receptor and TNF receptor 2 are required for the development of experimental cerebral malaria. *PLoS One*, v. 3, n. 7, p. e2608, 2008.

TONG, H. V. et al. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: functional roles of MICA variants. *Journal of viral hepatitis*, v. 20, n. 10, p. 687-698, 2013.

TRAHERNE, J. A. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *International journal of immunogenetics*, v. 35, n. 3, p. 179-192, 2008.

TROWSDALE, John. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity*, v. 15, n. 3, p. 363-374, 2001.

TROWSDALE, John; KNIGHT, Julian C. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annual review of genomics and human genetics*, v. 14, p. 301-323, 2013.

TURNER, Richard D. et al. Tuberculosis infectiousness and host susceptibility. *The Journal of infectious diseases*, v. 216, n. suppl_6, p. S636-S643, 2017.

ULBRECHT, Matthias et al. Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 10, p. 5019-5022, 2000.

ULRICHS, Timo; KAUFMANN, Stefan HE. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, v. 208, n. 2, p. 261-269, 2006.

UPADHYAY, Vaibhav; FU, Yang-Xin. Lymphotoxin signalling in immune homeostasis and the control of microorganisms. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 4, p. 270-279, 2013.

URVASHI, Tiwari et al. Osteoarticular tuberculosis: clinical complexity, laboratory challenges, immunological intrigue. *International Journal of Medical and Health Sciences*, v. 7, n. 2, p. 84-91, 2018.

VAN KAER, L. Major histocompatibility complex class I-restricted antigen processing and presentation. *Tissue antigens*, v. 60, n. 1, p. 1-9, 2002.

VANKAYALAPATI, Ramakrishna; BARNES, Peter F. Innate and adaptive immune responses to human *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis*, v. 89, p. S77-S80, 2009.

VAN EMBDEN, J. D. A. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993.

VAN LETTOW, Monique et al. Malnutrition and the severity of lung disease in adults with pulmonary tuberculosis in Malawi. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, v. 8, n. 2, p. 211-217, 2004.

VAN LITH, Marcel; MCEWEN-SMITH, Rosanna M.; BENHAM, Adam M. HLA-DP, HLA-DQ, and HLA-DR have different requirements for invariant chain and HLA-DM. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 52, p. 40800-40808, 2010.

VAN MEIJGAARDEN, Krista E. et al. Human CD8⁺ T-cells recognizing peptides from *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) presented by HLA-E have an unorthodox Th2-like, multifunctional, Mtb inhibitory phenotype and represent a novel human T-cell subset. *PLoS Pathog*, v. 11, n. 3, p. e1004671, 2015.

VAN PINXTEREN, Laurens AH et al. Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells. *European journal of immunology*, v. 30, n. 12, p. 3689-3698, 2000.

VASANTHI, Pallinti; NALINI, Ganesan; RAJASEKHAR, G. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. *APLAR Journal of Rheumatology*, v. 10, n. 4, p. 270-274, 2007.

VELDHOEN, Marc et al. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, v. 24, n. 2, p. 179-189, 2006.

VERRALL, Ayesha J. et al. Early clearance of Mycobacterium tuberculosis is associated with increased innate immune responses. *The Journal of infectious diseases*, v. 221, n. 8, p. 1342-1350, 2020.

VIEIRA, Leda Q. et al. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *The Journal of Immunology*, v. 157, n. 2, p. 827-835, 1996.

VINCENT, Antony T. et al. The mycobacterial cell envelope: a relict from the past or the result of recent evolution?. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 2341, 2018.

VIVEKANANDAN, Monika M. et al. Plasma cytokine levels characterize disease pathogenesis and treatment response in tuberculosis patients. *Infection*, v. 51, n. 1, p. 169-179, 2023.

VOLLMER, Waldemar; BLANOT, Didier; DE PEDRO, Miguel A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS microbiology reviews*, v. 32, n. 2, p. 149-167, 2008.

WADA, Haruka et al. The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *European journal of immunology*, v. 34, n. 1, p. 81-90, 2004.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation*, v. 10, n. 1, p. 45-65, 2003.

WAJANT, Harald; SIEGMUND, Daniela. TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and death balance of macrophages. *Frontiers in cell and developmental biology*, v. 7, p. 91, 2019.

WALKER, V.; SELBY, G.; WACOGNE, I. Does neonatal BCG vaccination protect against tuberculous meningitis?. *Archives of disease in childhood*, v. 91, n. 9, p. 789-791, 2006.

WANG, Li et al. Evaluation of genetic susceptibility loci for chronic hepatitis B in Chinese: two independent case-control studies. *PLoS One*, v. 6, n. 3, p. e17608, 2011.

WANG, Xue et al. Association of human leukocyte antigens-DQB2/DPA1/DPB1 polymorphism and pulmonary tuberculosis in the Chinese Uygur population. *Molecular genetics & genomic medicine*, v. 7, n. 3, p. e544, 2019.

WANG, Yanli et al. Serum IL-1 β and IL-18 correlate with ESR and CRP in multidrug-resistant tuberculosis patients. *Journal of Biomedical Research*, v. 29, n. 5, p. 426, 2015.

WANG, Zhen; MOULT, John. SNPs, protein structure, and disease. *Human mutation*, v. 17, n. 4, p. 263-270, 2001.

WARD, Lucas D.; KELLIS, Manolis. Interpreting noncoding genetic variation in complex traits and human disease. *Nature biotechnology*, v. 30, n. 11, p. 1095-1106, 2012.

WARE, Carl F. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 23, p. 787-819, 2005.

WARE, Carl F. Targeting lymphocyte activation through the lymphotoxin and LIGHT pathways. *Immunological reviews*, v. 223, n. 1, p. 186-201, 2008.

WARES, Fraser et al. Extrapulmonary tuberculosis: management and control. *Tuberculosis control in India*. New Delhi: Ministry of Health and Family Welfare, p. 95-114, 2005.

WAWROCKI, Sebastian; DRUSZCZYNSKA, Magdalena. Inflammasomes in Mycobacterium tuberculosis-driven immunity. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, v. 2017, 2017.

WEN, Chi-Pang et al. The reduction of tuberculosis risks by smoking cessation. *BMC infectious diseases*, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2010.

WHITEHORN, James et al. Genetic variants of MICB and PLCE1 and associations with non-severe dengue. *PloS one*, v. 8, n. 3, p. e59067, 2013.

WHO, Organização Mundial de Saúde. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2020. Disponível em http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acessado em novembro de 2020.

WHO, Organização Mundial de Saúde. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021. Disponível em http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acessado em novembro de 2023.

WHO, Organização Mundial de Saúde. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2022. Disponível em http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acessado em novembro de 2023.

WHO, Organização Mundial de Saúde. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2023. Disponível em http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acessado em novembro de 2023.

WILLIAMS, Thomas M. Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *The journal of molecular diagnostics*, v. 3, n. 3, p. 98-104, 2001.

WONG, Sunny H. et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 7, p. e1000979, 2010.

WONG, Danny Ka-Ho et al. Role of HLA-DP polymorphisms on chronicity and disease activity of hepatitis B infection in Southern Chinese. *PLoS One*, v. 8, n. 6, p. e66920, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. BCG vaccine: WHO position paper, February 2018–recommendations. *Vaccine*, v. 36, n. 24, p. 3408-3410, 2018.

XU, Xiaodong et al. Genetic variants in human leukocyte antigen-DP influence both hepatitis C virus persistence and hepatitis C virus F protein generation in the Chinese Han population. *International journal of molecular sciences*, v. 15, n. 6, p. 9826-9843, 2014.

XU, Yang et al. Functional Detection of TNF Receptor Family Members by Affinity-Labeled Ligands. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2017.

ZACHARIAH, R. et al. Moderate to severe malnutrition associated with early death in patients with tuberculosis is a risk factor. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 96, p. 291-294, 2002.

ZHAO, Y. L. et al. Study of the expression profile of immunogenesis associated genes in tuberculosis by microarray. *Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*, v. 28, n. 5, p. 301-304, 2005.

ZHENG, Ruijuan et al. Genome-wide association study identifies two risk loci for tuberculosis in Han Chinese. *Nature communications*, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2018.

ZHU, Meng et al. Fine mapping the MHC region identified four independent variants modifying susceptibility to chronic hepatitis B in Han Chinese. *Human molecular genetics*, v. 25, n. 6, p. 1225-1232, 2016.

ZONDERVAN, Krina T.; CARDON, Lon R. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nature Reviews Genetics*, v. 5, n. 2, p. 89-100, 2004.

ZUBER, Benoît et al. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *Journal of bacteriology*, v. 190, n. 16, p. 5672-5680, 2008.

ZUNIGA, Joaquin et al. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2012, 2012.

ZWIRNER, Norberto W.; FERNÁNDEZ-VIÑA, Marcelo A.; STASTNY, Peter. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics*, v. 47, n. 2, p. 139-148, 1997.

ZWIRNER, Norberto W.; DOLE, Karyn; STASTNY, Peter. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Human immunology*, v. 60, n. 4, p. 323-330, 1999.

ANEXO

ANEXO I - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP - COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Aya Sadahiro

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 19021519.9.0000.5020

Instituição Proponente: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.530.854

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo caso-controle, prospectivo para avaliar os polimorfismos genéticos e a expressão de genes e citocinas relacionados à resposta imune em pacientes com tuberculose (TB) e controles saudáveis. População de estudo: A população de estudo será constituída por indivíduos residentes e/ou oriundos dos estados da região norte, de ambos os sexos e idade entre 18 e 60 anos.