



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES
IFN γ e *INFGR1* ASSOCIADOS À TUBERCULOSE NO
ESTADO DO PARÁ**

Klezzer de Oliveira Carneiro

BELÉM – PA
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES
IFN γ e *INFGR1* ASSOCIADOS À TUBERCULOSE NO
ESTADO DO PARÁ**

Autor: Klezzer de Oliveira Carneiro

Orientador: Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção

Orientador: Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

BELÉM - PA
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Carneiro, Klezzer de Oliveira, 1984-

Investigação de polimorfismos nos genes *ifn* e *infgr1* associados à tuberculose no estado do Pará /
Klezzer de Oliveira Carneiro. - 2015.

Orientador: Paulo Pimentel Assumpção;

Coorientador: Ney Pereira Carneiro Santos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Núcleo de Pesquisa em
Oncologia, Programa de Pós-Graduação em
Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 2015.

1. Tuberculose Pulmonar. 2. Polimorfismo
Genético. 3. *mycobacterium tuberculosis*. I.
Título.

CDD 23. ed. 616.995098115

Klezzer de Oliveira Carneiro
Investigação de polimorfismos nos genes *IFN γ* e *IFNGR1* associados à
tuberculose no estado do Pará

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Oncologia e
Ciências Médicas do Núcleo de
Pesquisas em Oncologia da
Universidade Federal do Pará.
Área de concentração: Medicina I

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof^a. Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção (orientador)

Instituição: Universidade Federal do Pará Assinatura: _____

Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos (orientador)

Instituição: Universidade Federal do Pará Assinatura: _____

Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos

Instituição: Universidade Federal do Pará Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos

Instituição: Universidade Federal do Pará Assinatura: _____

Prof. Dr. André Salim Khayat

Instituição: Universidade Federal do Pará Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Samia Demachki(suplente)

Instituição: Universidade Federal do Pará Assinatura: _____

*Dedico este trabalho a
Francelino Lima Carneiro (Pai) e Mariana Fatima Alves de Oliveira (mãe), pela
trajetória de vida repleta de ensinamentos e superando dificuldades assim
culminando na educação familiar que tenho hoje. Obrigado meus amados pais
por terem me colocado neste caminho...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me ilumina a cada dia me dando coragem e resignação para perseguir as metas traçadas nesta jornada.

A minha amada filha Kamily Vitória, que pela sua simples existência, me estimula a evoluir, tornando-me um ser humano melhor.

A minha querida esposa Jozinele, pelo estímulo e compreensão permanente.

Aos meus familiares, em especial minha tia Cláudia, pelo carinho e torcida constante, sempre ajudando da forma que lhe é possível.

Aos meus orientadores Paulo Pimentel de Assumpção e Ney Pereira Carneiro dos Santos, que, por suas infinitas competências e compromisso, contribuíram de forma decisiva na realização deste projeto.

A Débora Christina Ricardo de Oliveira Fernandes, pela ajuda determinante na realização e finalização deste projeto.

A Taíssa Thomaz Araújo pelo empenho constante em me ajudar em todos os aspectos necessários para a conclusão deste projeto.

RESUMO

INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *IFN γ* e *INFR1* ASSOCIADOS À TUBERCULOSE NO ESTADO DO PARÁ

Tuberculose pulmonar é uma doença infectocontagiosa de transmissão por via aérea, que segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), infecta cerca de dois bilhões de pessoas ao redor do mundo. É a principal causa de morte por doença infecciosa em adultos nos países em desenvolvimento, representando um grave problema de saúde pública, devido principalmente, a não aderência ao tratamento, ao diagnóstico tardio e subdiagnóstico e ao não controle de contatos, o que faz com que a população continue suscetível à infecção. No presente estudo se objetivou investigar associações de três polimorfismos genéticos nos genes *IFN γ* e *INFR1*, responsáveis pela suscetibilidade à tuberculose em pacientes acometidos pela doença; avaliar se ocorrem diferenças nas frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos nos genes *IFN γ* ^{871A>T}, *INFR1*^{611(C>T)} e *INFR1*^{-56(A>G)} entre indivíduos com tuberculose e indivíduos sem tuberculose da população de Belém. O controle de efeito de subestruturação foi realizado pelo emprego de um painel de 48 Marcadores Informativos de Ancestralidade Genética, tanto na amostra de pacientes como na amostra de controle. Para realização deste estudo nos utilizamos amostras de sangue periférico de 148 pacientes diagnosticados com tuberculose, e 125 indivíduos sem tuberculose (controles) residentes no Estado do Pará, Brasil, atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) durante o período de 2006 a 2012. De cada indivíduo foram obtidos 5mL de sangue venoso colhido de veia periférica. A extração de DNA foi realizada segundo método descrito por Sambrook *et al.*, (1989). A genotipagem dos polimorfismos para os genes *IFN γ* (rs1130562) e *INFR1* (rs1327474, rs2234711) foi realizada por técnica de PCR em tempo real (RTq-PCR) utilizando-se o sistema TaqMan. As análises estatísticas foram realizadas nos softwares SPSS 17.0, usando o teste de Mann-Whitney, considerando como significantes valores de $p < 0,05$. Os resultados obtidos não demonstraram significância dos polimorfismos investigados em relação à suscetibilidade para tuberculose.

Palavras-chave: Tuberculose; *mycobacterium tuberculosis*; *IFN γ* e *INFR1*.

ABSTRACT

POLYMORPHISMS INVESTIGATION OF GENES *IFN γ* and *IFNGR1* ASSOCIATED WITH TUBERCULOSIS IN PARA STATE

Pulmonary tuberculosis is an infectious disease transmission by air, which according to the World Health Organization (WHO), infects about two billion people around the world. It is the leading cause of death from infectious disease in adults in developing countries, representing a serious public health problem, mainly due to non-adherence to treatment, late diagnosis and underdiagnosis and no control contacts, which makes our population susceptible to infection. The present study aimed to investigate associations three genetic polymorphisms in *IFN γ* and *IFNGR1* genes responsible for susceptibility to tuberculosis in patients affected by the disease; evaluate if there are differences in allelic and genotypic frequencies of polymorphisms in genes *IFN γ* 871A> T, *IFNGR1* 611 (C> T) and *IFNGR1* -56 (A> G) among individuals with TB and those without TB population of Bethlehem. The control substructures effect was carried out by the use of 48 markers Informational Genetic Ancestry panel in both patient sample and the control sample. For this study we used peripheral blood samples from 148 patients diagnosed with tuberculosis, and 125 individuals without tuberculosis (controls) resident in the State of Pará, Brazil, attended at University Hospital João de Barros Barreto (HUJBB) during the period from 2006 to 2012. each specimen was obtained 5 ml of venous blood collected from a peripheral vein. DNA extraction was performed according to the method described by Sambrook et al., (1989). Genotyping for polymorphisms *IFN γ* gene (rs1130562) and *IFNGR1* (rs1327474, rs2234711) was performed by PCR in real time (RTQ-PCR) using the TaqMan system. Statistical analyzes were performed in SPSS 17.0 software, using the Mann-Whitney test, with significance set at $p < 0.05$. The results did not show significance of the polymorphisms investigated in relation to susceptibility to tuberculosis.

Key words: Tuberculosis; *mycobacterium tuberculosis*; *IFN γ* and *IFNGR1*

FIGURAS

Figura 1. Taxa de incidência dos casos notificados de tuberculose no ano de 2007, nos estados do Brasil	18
Figura 2. Ilustração do bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
Figura 3. Localização do gene <i>IFNγ</i> no Cromossomo 12 na posição q15.....	23
Figura 4. Ilustração esquemática de ativação de <i>IFNγ</i> a partir do macrófago infectado.....	25
Figura 5. Localização do gene <i>IFNγR1</i> no Cromossomo 6 na posição q23.3.	26
Figura 6. Representação esquemática dos receptores de <i>IFNγ</i> : <i>INFR1</i> (<i>IFNγ-Rα</i>) e <i>INFR2</i> (<i>IFNγ-Rβ</i>).....	27
Figura 7. Distribuição de estimativa individual. Os vértices do triângulo representam as populações parentais. Os círculos em cores ao centro do triângulo descrevem os indivíduos com e sem tuberculose.....	39

TABELAS

Tabela1. Estimativa da taxa de tuberculose em diferentes países	17
Tabela2. As características clínicas fatores de risco para portadores de tuberculose (casos) e seus controles	38
Tabela 3. Distribuição de frequências alélicas e genotípicas para polimorfismos investigados em portadores (pacientes) de TB	40

LISTA DE SIGLAS

BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
BK	bacilo de Koch
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>IFNγ</i>	Interferon gamma
<i>IFNGR1</i>	Interferon gamma receptor 1
INDEL	sistemas bialélicos de inserção e deleção
INH	Isoniazida
MDR-TB	multi-droga resistente
MIA	marcadores informativos de ancestralidade
MS	Ministério da Saúde do Brasil
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
nk	células naturais assassinas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PSA	alelos população-específicos
RMP	rifampicina
S	Streptomicina
SIDA/HIV	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNP	polimorfismo em nucleotídeo único
TB	Tuberculose
TEP	Tuberculose Extrapulmonar
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Considerações gerais.....	10
1.2 Clínica da Tuberculose.....	12
1.1.1 Tuberculose Pulmonar	12
1.1.2 Tuberculose Extrapulmonar (TEP)	13
1.2 Diagnóstico da Tuberculose	13
1.3 Epidemiologia da Tuberculose	14
2 SUSCETIBILIDADE a TUBERCULOSE.....	18
2.1 Fatores de Risco	18
2.2 Agente Etiológico	19
2.3 Interferon gamma (<i>INF-γ</i>).....	22
2.4 Interferon Gamma receptor 1(<i>IFNGR1</i>).....	25
3 APLICABILIDADE	28
4 CONTROLE GENÔMICO DA ANCESTRALIDADE	29
5 OBJETIVOS	33
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
6.1 Amostras	34
6.2 Aspectos éticos	34
6.3 Obtenção das amostras e extração de DNA	35
6.4 Quantificação do DNA	35
6.5 Genotipagem dos Polimorfismos.....	35
6.6 Análise da Ancestralidade	36
6.7 Análise Estatística	36
7 RESULTADOS	37
8 DISCUSSÃO	41
9 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS.....	4

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Tuberculose pulmonar é uma doença infectocontagiosa de transmissão por via aérea que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), infecta cerca 02 bilhões de pessoas ao redor do mundo. É a principal causa de morte por doença infecciosa em adultos nos países em desenvolvimento, representando um grave problema de saúde pública, devido, principalmente, a não aderência ao tratamento, ao diagnóstico tardio e subdiagnóstico e ao não controle de contatos, o que faz com que a população continue susceptível à infecção (Fernandes, 2014).

A tuberculose é uma das doenças infecciosas mais prevalentes a nível mundial. São estimados anualmente 8,9 milhões de novos casos e 1,3 milhões de mortes no mundo (Duarte, 2013).

A tuberculose (TB) é uma patologia que pode apresentar uma evolução grave, causada por uma micobactéria (*Mycobacterium tuberculosis*), que se apresenta na forma de bastonetes (bacilo álcool ácido resistente – BAAR). A tuberculose se transmite predominantemente através das vias aéreas e acomete tanto o homem como animais. A presença do bacilo da tuberculose no hospedeiro induz a uma reação tissular que provoca a formação de tubérculos típicos (granulomas celulares epitelióides), advindo daí o nome da nosologia (Leão, 2004).

A tuberculose associada a outras enfermidades, como SIDA/HIV (Síndrome da Imunodeficiência Humana/Vírus da Imunodeficiência Humana), é a segunda maior causa de morte, sendo responsável pela morte anual de cerca de 1,8 milhões de pessoas, em diferentes partes do mundo (Frothingham *et al.*, 2005).

É conhecido o fato de que muitos indivíduos que chegam a ter contato com o bacilo causador de tuberculose não manifestam os sintomas clínicos da doença (Leão, 2004).

Estima-se que um terço da população mundial apresenta formas latentes da tuberculose. Entende-se por forma latente aquela em que o indivíduo é portador do bacilo, mas não tem manifestação clínica da doença (Raviglione, 1995). De forma inversa, em muitos casos os indivíduos chegam a desenvolver manifestações clínicas graves decorrentes da infecção pelo bacilo da tuberculose, apresentando uma evolução clínica gradualmente crônica que, se não tratada convenientemente, pode evoluir para o óbito (Leão, 2004).

Apesar de apresentar ocorrência mundial, a distribuição geográfica da prevalência de tuberculose é grandemente influenciada pela situação socioeconômica das diferentes áreas do globo. Assim é que nos países desenvolvidos, onde os padrões de vida são elevados e as condições de saneamento e de saúde pública são controladas a contento, a incidência da tuberculose e a mortalidade diminuíram de forma significativa. O mesmo não acontece em países menos desenvolvidos (ou mesmo em países em desenvolvimento) onde apenas a mortalidade mostrou nítido declínio, em função do progresso da quimioterapia (administração de fármacos). Nesses países, a condição inadequada de saneamento básico e de acesso à saúde pública de qualidade não permitem a redução da taxa de incidência da tuberculose (World Health Organization-WHO, Global tuberculosis control, 2009).

Existem achados a respeito das manifestações clínicas da tuberculose, em grupos populacionais ancestrais. Relatos arqueológicos encontraram evidências de tuberculose óssea em esqueletos que datam de 8.000 anos A.C. e de 5.000 anos A.C encontrados em um cemitério neolítico próximo a Heidelberg, na Alemanha. A tuberculose foi descrita por diferentes filósofos e pensadores ao longo da história da humanidade, como Homero (900 A.C.), Heródoto (450 A.C.) e Hipócrates (400 A.C.) (Leão, 2004).

Acredita-se que o bacilo da tuberculose tenha chegado ao Brasil trazido por colonizadores e jesuítas, no período logo após o descobrimento (Sant'Anna, 1985).

Até as primeiras décadas do século XX, a mortalidade de pacientes portadores de tuberculose era muito elevada por todo o mundo. Na segunda metade desse século após o advento dos quimioterápicos, com a introdução da

Estreptomicina (S) em 1940, e da Isoniazida (INH) em 1950, foi possível consolidar uma base moderna de quimioterapia, o que reduziu consideravelmente a mortalidade por tuberculose (Davies e Nuernberger, 2008; Wirth *et al.*, 2008).

Dados retirados de publicações da Organização Mundial de Saúde relatam o aparecimento, somente no ano de 2007, de 9,27 milhões de novos casos da doença, em 196 diferentes países. Estima-se que neste mesmo ano a tuberculose foi responsável por cerca de 1,8 milhões de mortes no mundo. O Brasil faz parte de um grupo de 22 países que contribui com cerca de 80% de todos os casos de tuberculose do mundo (WHO, 2009). O Ministério da Saúde do Brasil (MS) estima que cerca de 50 milhões de brasileiros sejam portadores do bacilo da tuberculose, tanto na sua forma infecciosa como em sua forma latente. A média anual de casos novos de tuberculose notificados no Brasil é da ordem de 90 mil casos. Dentro do continente americano dentre os 22 citados no mundo, somente o Brasil e o Peru são participantes, os dois juntos sendo responsáveis por cerca de 50% de todos os casos conhecidos de tuberculose no continente americano (MS, 2008).

1.2. Clínica da Tuberculose

Existem diversos tipos de tuberculose, definidos em função dos diferentes órgãos que os bacilos afetam, sendo que cada uma destas infecções apresenta um grupo de manifestações clínicas que podem ser muito diferentes entre si (Fundação Nacional de Saúde - FUNASA, 2002).

1.1.1. Tuberculose Pulmonar

A tuberculose pulmonar é a forma mais frequente tanto entre adultos (90% de todos os casos) quanto nas crianças (75% dos casos). Esta doença apresenta manifestações clínicas que evoluem gradativamente com o tempo.

Em fases mais avançadas é possível identificar um conjunto de manifestações clínicas que envolvem desde febre diária, tosse, dor torácica, dispnéia, sudorese, hemólise, além de emagrecimento, astenia e hipóxia (Leão, 2004).

1.1.2. Tuberculose Extrapulmonar (TEP)

A forma dita extrapulmonar da tuberculose é caracterizada pela infecção que afeta isoladamente um órgão em particular, sem disseminação para outros órgãos ou sistemas, apesar da infecção ter como “porta de entrada”, quase sempre, os pulmões. As formas mais frequentes de tuberculose extrapulmonar são: tuberculose pleural, tuberculose ganglionar, tuberculose meníngea e tuberculose osteoarticular. A forma de tuberculose miliar é caracterizada por ser extrapulmonar, entretanto apresenta disseminação do bacilo pelo organismo (FUNASA, 2002).

1.2. Diagnóstico da Tuberculose

Além do diagnóstico clínico, diferentes exames laboratoriais podem auxiliar na identificação da infecção pelo bacilo da tuberculose. Os principais exames laboratoriais utilizados para diagnosticar a tuberculose são: bacteriológico radiológico; prova tuberculínica; histopatológico; e exames específicos complementares (FUNASA, 2002).

A pesquisa bacteriológica é considerada fundamental, tanto para o diagnóstico como para o controle de tratamento. A investigação bacteriológica envolve, entre outros exames: 1- O exame microscópico direto do escarro, que é um método fundamental e que deve ser empregado em todos os casos de suspeita de tuberculose pulmonar; 2- cultura para micobactéria. Este tipo de cultura é indicado para os suspeitos de tuberculose pulmonar persistente, que se mostram negativos ao exame direto e para o diagnóstico de formas

extrapulmonares, como meningoencefálica, renal, pleural, óssea ou ganglionar. A cultura também é indicada nos casos de suspeita de resistência bacteriana aos fármacos, seguida do teste de sensibilidade; 3- exames radiológicos, 4- prova tuberculínica; 5- exames histopatológicos; 6- hemocultura, 7- teste da detecção da produção de CO₂; 8- detecção de consumo de O₂; 9- testes sorológicos e 10-técnicas de biologia molecular (FUNASA, 2002).

1.3 Epidemiologia da Tuberculose

A tuberculose é uma das doenças infecciosas mais prevalentes a nível mundial. São estimados anualmente 8,9 milhões de novos casos e 1,3 milhões de mortes no mundo (Duarte, 2013).

A Organização Mundial de Saúde (2009) apresentou dados sobre a incidência da tuberculose em 196 países entre os anos de 1990 a 2007. Os dados apontam para a existência de cerca de 13,7 milhões de casos em todo o mundo. Destes, mais de 9,6 milhões tinham diagnóstico concluído através do teste de escarro positivo para BAAR. O número estimado de mortes causadas pela tuberculose em todo mundo é muito elevado, em torno de dois milhões por ano (WHO, 2009).

A Tabela 1 apresenta dados numéricos que definem a epidemiologia da tuberculose levando em consideração pacientes diagnosticados com o método do escarro positivo, comparando com pacientes HIV positivo e HIV negativo como fator de risco para desenvolvimento da tuberculose nos vinte e dois países que são considerados responsáveis por cerca de 80% de todos os casos de tuberculose (WHO, 2009). De uma maneira geral, três países asiáticos (Índia, China e Indonésia) e dois países africanos (Nigéria e África do Sul) são os que apresentam os piores indicadores epidemiológicos da tuberculose. Esses indicadores incluem: o número total de casos, a taxa de incidência (por 100.000 indivíduos da população), o número de indivíduos afetados por todas as formas de tuberculose, a taxa de prevalência (por

100.000 habitantes) e a mortalidade.

O Ministério da Saúde estima que cerca de 50 milhões de brasileiros sejam portadores de tuberculose, considerando tanto indivíduos portadores da tuberculose na forma latente, quanto na forma ativa causadora da doença (MS, 2002).

De todo o continente americano, o Brasil é o único que faz parte do grupo de 22 países que concentram 80% dos casos de tuberculose (ver Tabela 1). Devido ao elevado número populacional, o Brasil apresenta o maior índice de casos de tuberculose de toda a América do Sul (114 mil casos em 2007; média de 90 mil casos novos por ano). Entretanto, seus indicadores relativos (levando em conta o tamanho populacional) são os menores em relação aos outros países sul-americanos (WHO, 2009).

Tabela1. Estimativa da taxa de tuberculose no ano de 2007 em diferentes países.

	Incidência					Prevalência		Mortalidade				
	Todas as formas		Escarro - Positivo		Taxa por 100.000 pop.	Todas as formas		HIV - Negativo		HIV - Positivo		Prevalência de incidência de casos de TB %
	População 1000s	Nº 1000s	Taxa por 100.000 pop.	Nº 1000s		Nº 1000s	Taxa por 100.000 pop.	Nº 1000s	Taxa por 100.000 pop.	Nº 1000s	Taxa por 100.000 pop.	
Índia	1169 016	1962	168	873	75	3 305	283	302	26	30	2.5	5.3
China	1328 630	1 306	98	585	44	2 582	194	194	15	6.8	0.5	1.9
Indonésia	231 627	528	228	236	102	566	244	86	37	5.4	2.4	3
Nigéria	148 093	460	311	195	131	772	521	79	53	59	40	27
África do Sul	48 577	461	948	174	358	336	692	18	38	94	193	73
Bangladesh	158 665	353	223	159	100	614	387	70	44	0.4	0.3	0.3
Etiópia	83 099	314	378	135	163	481	579	53	64	23	28	19
Paquistão	163 902	297	181	133	81	365	223	46	28	1.4	0.9	2.1
Filipinas	87 960	255	290	115	130	440	500	36	41	0.3	0.3	0.3
RD do Congo	62 636	245	392	109	174	417	666	45	72	6	10	5.9
Federação da Rússia	142 499	157	110	68	48	164	112	20	14	5.1	3.9	16
Vietnam	87 375	150	171	66	76	192	220	18	20	3.1	3.5	8.1
Kenya	37 538	132	353	53	142	120	319	10	26	15	39	48
Brasil	191 791	92	48	49	26	114	60	5.9	3.1	2.5	1.3	14
Tanzânia	40 454	120	297	49	120	136	337	12	29	20	49	47
Uganda	30 884	102	330	42	136	132	426	13	41	16	52	39
Zimbábue	13 349	104	782	40	298	95	714	6.9	52	28	213	69
Tailândia	63 884	91	142	39	62	123	192	10	15	3.9	6	17
Moçambique	21 397	92	431	37	174	108	504	10	45	17	82	47
Myanmar	48 798	83	171	37	75	79	162	5.4	11	0.9	1.9	11
Camboja	14 444	72	495	32	219	96	664	11	77	1.8	13	7.9
Afganistão	27 145	46	168	21	76	65	238	8.2	30	0	0	0
Taxa Países	4 201 761	7 423	177	3 245	77	11301	269	1 058	25	339	8.1	14

Fonte: Global tuberculosis control, report 2009-WHO.

A incidência de tuberculose notificada no Brasil, entre os estados brasileiros demonstra uma distribuição irregular da doença mesmo dentro das diferentes regiões geográficas (Figura 1). A região Norte apresenta maior taxa de incidência da tuberculose no Brasil, seguido das regiões Sudeste, Nordeste, Sul e Centro-Oeste (MS, 2007).

Especificamente na região Norte, o Ministério da Saúde registrou durante o ano de 2007 um total de 45 novos casos para cada 100.000 habitantes. Desses, o estado do Pará manteve a taxa de incidência da região;

de 45,7 novos casos por 100.000 habitantes. A região Norte apresenta taxa de incidência de tuberculose superior a média brasileira que é de 38,2 para cada 100.000 habitantes, este fato evidencia a importância da implementação de políticas específicas de saúde pública nesta região, visando conter o avanço da tuberculose (MS, 2007).

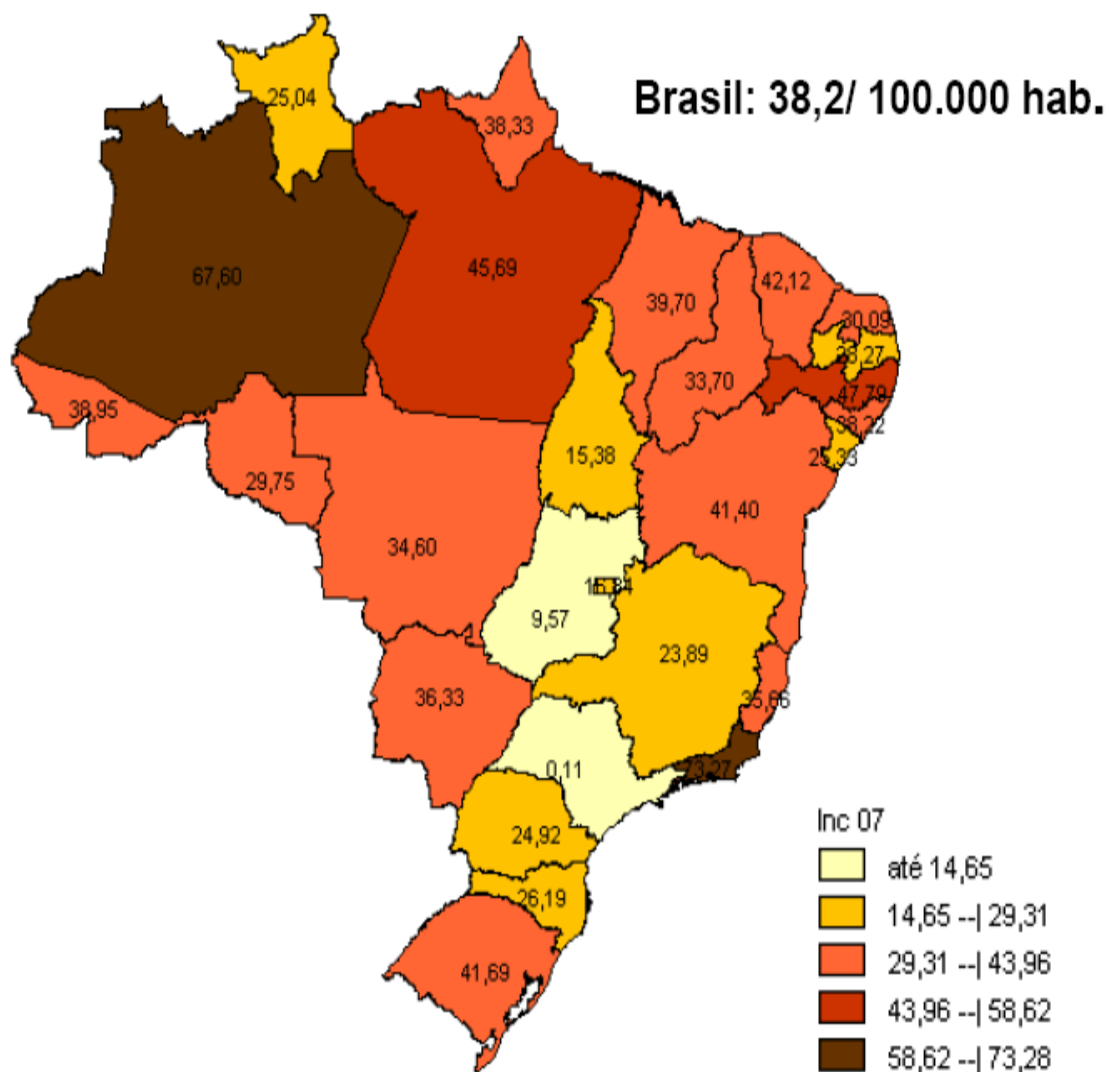


FIGURA 1. Taxa de incidência dos casos notificados de tuberculose no ano de 2007, nos estados do Brasil.

Fonte: MS, SVS, SINAN e IBGE, 2007.

2SUSCETIBILIDADE À TUBERCULOSE

2.1 Fatores de Risco

Os indivíduos que convivem com o paciente eliminador de bacilos, principalmente em domicílio, são suscetíveis à doença, sendo considerados comunicantes ou contactantes (WHO, 2011). Entretanto, a maioria dos indivíduos apresenta-se resistente à infecção em função da resposta imune adequada contra o bacilo da tuberculose (WHO, 2013).

Dos indivíduos expostos ao *Mycobacterium tuberculosis*, 10% a 30% são infectados e em 5% a 10% a doença avança, tornando-se ativa. O pulmão é o principal órgão afetado, exclusivamente, em 85% dos indivíduos imunocompetentes suscetíveis e, nos imunocomprometidos, a tuberculose pode ser disseminada e com mais frequência, ter localização extrapulmonar (Mazurek *et al.*, 2010).

Fatores ambientais associados às características do hospedeiro e à linhagem do *Mycobacterium tuberculosis* predispõem à doença. A suscetibilidade está também relacionada a fatores sociais como pobreza, desnutrição, estresse, superpopulação e à exposição às micobactérias ambientais (Moonet *al.*, 2011).

Evidências apontam que a predisposição genética, a idade, o estado imunológico, doenças associadas e outros fatores de resistência do hospedeiro relacionam-se ao adoecimento (Mazurek *et al.*, 2010; Moonet *al.*, 2011).

A identificação e o estudo das propriedades biológicas (virulência e patogenicidade) da linhagem do *Mycobacterium tuberculosis* têm se mostrado útil nas investigações epidemiológicas, por permitir entender a dinâmica da transmissão e a identificação de fatores de risco em uma comunidade, possibilitando intervenção e a adoção de medidas de preventivas (Moran-Mendoza *et al.*, 2010).

2.2 O Agente Etiológico

O *Mycobacterium tuberculosis* é altamente infectante, mas tem pequena capacidade de desenvolver doença clínica, só 10% dos infectados adoece (Santos *et al.*, 2007).



FIGURA 2. Ilustração do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*.
Fonte: www.nature.com (2010)

Descrito pelo bacteriologista alemão Robert Koch em 1882, foi denominado bacilo de Koch (BK) em sua homenagem (Rosemberg *et al.*, 2008). A sua identificação como agente etiológico da tuberculose foi fundamental para o conhecimento da doença e contribuiu para fortalecer a teoria da transmissibilidade em que um indivíduo é capaz de transmitir ao outro (FIOCRUZ).

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae*, sub-ordem *Corynebacteriaceae*, ordem *Actinomycetales*. O gênero *Mycobacterium* compreende 83 espécies, a maioria saprófita de vida livre. O *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *canetti*, isolado na África e Europa, e

M. tuberculosis subsp. caprae, isolado principalmente de caprinos, foram incluídos como sub-espécies dentro deste complexo (Campos, 2006).

O *Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo reto ou ligeiramente curvo, imóvel, não esporulado, não encapsulado (Pandolfi *et al.*, 2007), que mede de 1 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura, sendo a propriedade morfológica da álcool-ácido resistência a mais importante. Ao ser corado a quente com fucsina fenicada de Ziehl ou a frio com auramina, retém os corantes após lavagens com soluções de álcool e ácido (Campos, 2006).

A parede celular do BK tem alto conteúdo lipídico, que está relacionado com a indução da formação de granuloma (Pandolfi *et al.*, 2007; Campos, 2006). É constituída principalmente por ácidos micólicos, formando uma barreira hidrofóbica que confere resistência à dessecação, à descoloração por álcool e ácido e a diversos agentes químicos e antibióticos. São considerados como bacilos Gram positivos pelas características da sua parede celular (Campos, 2006).

As bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* são classificadas como micobactérias não pigmentadas de crescimento lento (Pandolfi *et al.*, 2007). O agrupamento dos bacilos em forma de ramos alongados e tortuosos, conhecidos como cordas, quando observado à baciloscopia, indica que se trata de bactéria do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Campos, 2006).

O bacilo da tuberculose é um patógeno intracelular aeróbico, que necessita de oxigênio para crescer e se multiplicar. É considerado um microrganismo intracelular facultativo por sobreviver e multiplicar-se dentro das células fagocitárias, de virulência variável, com tempo de geração em torno de 14 a 20 horas, dependendo do meio de cultura empregado para seu crescimento (Campos, 2006; Rosenberg *et al.*, 2008).

Dentro do macrófago multiplica-se, geralmente, a cada 25-32 horas. É resistente à ação de agentes químicos e é sensível à ação de agentes físicos, como o calor e a radiação ultravioleta (Campos, 2006).

O genoma do bacilo de Kock foi decifrado em 1998, contendo 4.000 genes, aproximadamente (Rosemberg *et al.*, 2008). Cerca de 170 genes codificam famílias de proteínas envolvidas em sua variação antigênica, enquanto 200 outros genes codificam enzimas para o metabolismo de ácidos graxos. Essa especialização genética está relacionada, provavelmente, com a capacidade de crescimento do BK nos tecidos do hospedeiro, onde os ácidos graxos podem ser a principal fonte de carbono(Campos, 2006).

Com o objetivo de identificar os genes responsáveis pela patogenicidade do BK, tem sido utilizados métodos para aferir a virulência do mesmo, como a cultura de tecidos usando macrófagos, células dendríticas e pneumócitos, ou em modelos animais (Campos, 2006).

Aspectos genéticos são observados em BK quanto ao seu mecanismo de ação para desenvolvimento da tuberculose através de dois grupamentos de genes, correspondendo a 10% do genoma do BK, seriam responsáveis por mecanismos de escape das respostas imunes do hospedeiro, determinando a agressividade do bacilo. Um grupo está relacionado com determinadas características da parede do BK e com o controle da latência e da virulência do bacilo pela modulação de mecanismos que interferem na ação do macrófago sobre ele. Outro grupamento de genes seria responsável pelo metabolismo do BK e pela codificação de proteínas, lipídeos e carboidratos em sua parede, modulando, assim, sua virulência(Campos, 2006).

A emergência e disseminação de linhagem de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente, que se caracteriza pela resistência à rifampicina (RMP) e à isoniazida (INH), ameaçam o controle da tuberculose (Santos *et al.*, 2007; Bang *et al.*, 2006).

A falta de novos remédios para o tratamento da tuberculose multi-droga resistente (MDR-TB) e a necessidade de métodos moleculares rápidos e eficientes estimulam o estudo das bases moleculares da resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas(Santos *et al.*, 2007).

Devido a carência de diagnósticos rápidos e precisos, e a falta de novos remédios para o tratamento da tuberculose multidroga resistente, a uma necessidade de mais estudos moleculares para melhor controlar a tuberculose, com isso nesse estudo será realizado uma investigação em três polimorfismos ($IFN\gamma^{871(A>T)}$, $IFNGR1^{611(C>T)}$ e $IFNGR1^{-56(A>G)}$) que podem estar diretamente ligados a suscetibilidade ao desenvolvimento da doença, e através dos resultados obtidos facilitar o entendimento dos mecanismos envolvidos na tuberculose.

2.3 Interferon gamma ($IFN\gamma$)

O $IFN\gamma$, localizado no cromossomo 12q15 (Figura 3) é produzido por linfócitos ativado por antígenos ou mitógenos específicos. Além de ter atividade antiviral, tem funções imuno-reguladoras importantes. É um potente ativador de macrófagos, tem efeitos antiproliferativos em células transformadas e pode potencializar os efeitos antivirais e antitumorais de interferon. (Genecards, 2015).

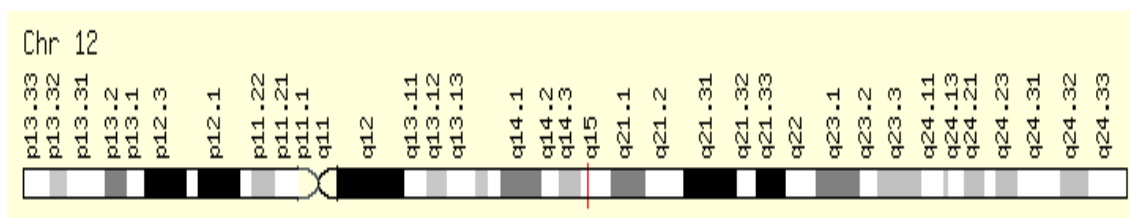


Figura 3 - Localização do gene $IFN\gamma$ no Cromossomo 12 na posição q15. Fonte: www.genecards.org (2015).

A literatura tem demonstrado que o *IFN γ* tem uma importante atuação na proteção contra o *Mycobacterium tuberculosis*, sendo considerado um elemento chave na defesa contra micobactérias em geral. O *IFN γ* é encontrado no sangue circulante de pacientes tuberculosos em associação inversa com o grau de severidade das lesões na tuberculose experimental em animais e humanos (Cooper *et al.*, 1993; Sodhi *et al.*, 1997; Fine, 2000).

Em complemento Jaffe *et al.* (1991); Holand *et al.* (1994); Condos *et al.* (1997) verificaram que o gene *IFN γ* foi associado com a melhor resposta ao tratamento da tuberculose. Em alguns pacientes, as respostas clínicas foram favoráveis constituindo-se *IFN γ* um bom adjuvante no tratamento da tuberculose multirresistente. Ele impede a dispersão dos bacilos fagocitados pelos leucócitos nucleares e participa na formação do granuloma, é potente ativador das células Th1 e Th2 (Schulger & Romet *et al.*, 1998; Boom *et al.*, 1996). Animais que não expressam *IFN γ* (por mutação do gene codificador) sofrem facilmente processos disseminados por *Mycobacterium tuberculosis* e outras micobactérias (Murray *et al.*, 1998).

Em uma série de estudos Cooper *et al.* (2002); Flynn *et al.* (1993); Roche *et al.* (1995) notou no início de seus estudos em modelo experimental, sugeriu que o *IFN γ* é um fator chave para a ativação de macrófagos e que indivíduos incapazes de produzir *IFN γ* possuem suscetibilidade extrema de desenvolver tuberculose.

Flynn *et al.* (1993); Jouanguy *et al.* (1999) verificaram níveis elevados de citocinas que desempenham um papel importante na orquestração da resposta imune que pode desencadear tuberculose. *IFN γ* derivado de células Th1 ativadas desempenha uma função de pivô na imunidade micobacteriana. As citocinas que afetam a funcionalidade do *IFN γ* tornam o hospedeiro suscetível ao desenvolvimento da doença na forma grave (Rossouw *et al.*, 2003).

Devido à complexidade das interações imunes que determinam a suscetibilidade à tuberculose e sua gravidade, combinações multi-gênicas podem dar informações significativas do que a análise de um único SNP (polimorfismo em nucleotídeo único) para determinar a evolução da doença (Velez *et al.*, 2009; Moller *et al.*, 2010).

Adam *et al.* (1993) observaram em seu estudo que o mediador chave da imunidade antituberculose é *IFN* γ . Os macrófagos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* liberam IL-12 e IL-18, que, por sua vez, ativa as células T para produzir *IFN* γ (Figura 4). Em complemento, Cooper. (1997) constatou que enquanto *Mycobacterium tuberculosis* pode replicar-se no interior dos macrófagos “ingênuos”, *IFN* γ ativa a síntese de óxido nítrico induzível em macrófagos para matar de forma intracelular a *Mycobacterium tuberculosis*. Mashruwala *et al.* (2011) em seu estudo observou que Camundongos *IFN* γ “knock-out” são, portanto, hiper-suscetíveis à desenvolver tuberculose.

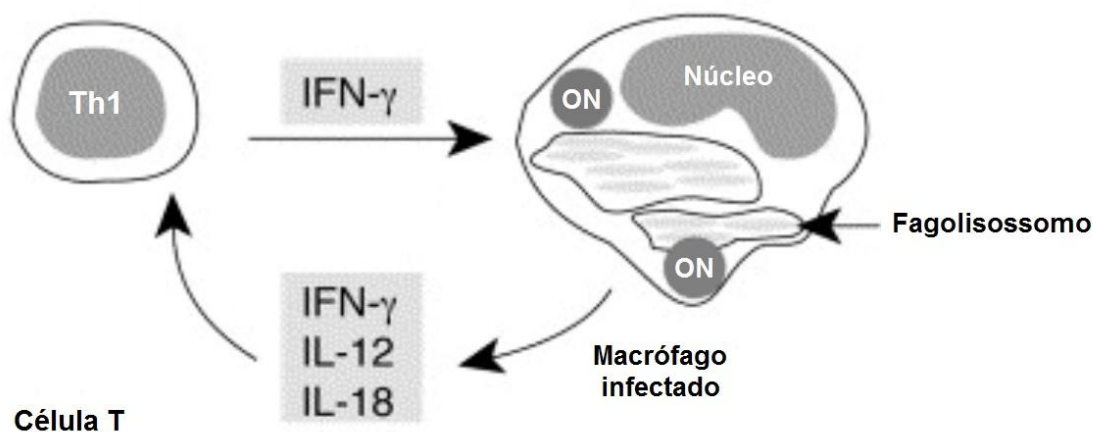


Figura 4 – Ilustração esquemática de ativação de *IFN* γ a partir do macrófago infectado Fonte: [www.cell.com/trends/microbiology\(2015\)](http://www.cell.com/trends/microbiology(2015)).

IFN γ atua como chave de células T auxiliar (Th) tipo 1, citocina produzida principalmente por células naturais assassinas (nk) e células T. A sua produção desempenha um papel central em macrófagos com sua ativação para controlar a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Collinset *al.*, 2001).

Sinalizações de *IFN* γ são mediadas através da ligação ao seu receptor *IFNGR1*. O controle dos níveis de expressão de *IFNGR1* é um dos mecanismos pelos quais as células modulam a potência de sinalização de *IFN* γ (Zhou *et al.*, 2009).

2.4 Interferon Gamma receptor 1 (*IFNGR1*)

IFNGR1 localizado no cromossomo 6q23.3 (Figura 5), codifica a cadeia de ligação (alfa) do receptor de *IFN* γ . O receptor de *IFN* γ humano é um heterodímero de *IFNGR1* e *IFNGR2* (GensCard, 2015). Uma variação genética em *IFNGR1* está associada à suscetibilidade a infecção por *Helicobacter pylori*. Além disso, os defeitos de *IFNGR1* são uma das causas de suscetibilidade mendeliana a doença micobacteriana, também conhecido como infecção familiar disseminada por micobactérias atípicas (J. He *et al.*, 2010).

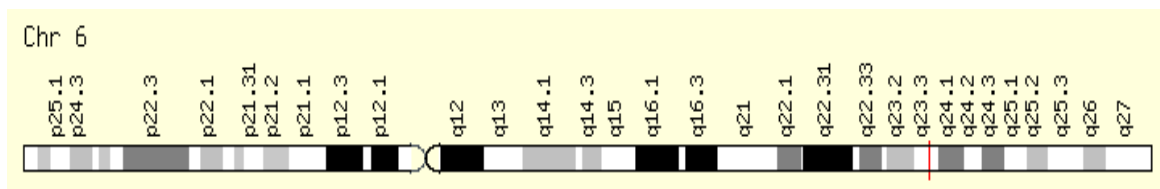


Figura 5 - Localização do gene *IFNGR1* no Cromossomo 6 na posição q23.3. Fonte: www.genecards.org (2015).

O complexo do receptor de *IFN* γ é constituído por duas proteínas transmembranares do tipo I, *IFNGR1* (*IFN*-gama R alfa) e *IFNGR2* (*IFN*-gama R beta). Ambas as proteínas são membros da família de receptores de citocinas de tipo II. *IFNGR1* é a subunidade de ligação a *IFN* γ que é necessário e suficiente para a internalização do receptor. *IFNGR2* é necessária para a sinalização de *IFN* γ , mas não se liga a *IFN* γ por si só (Figura 6).

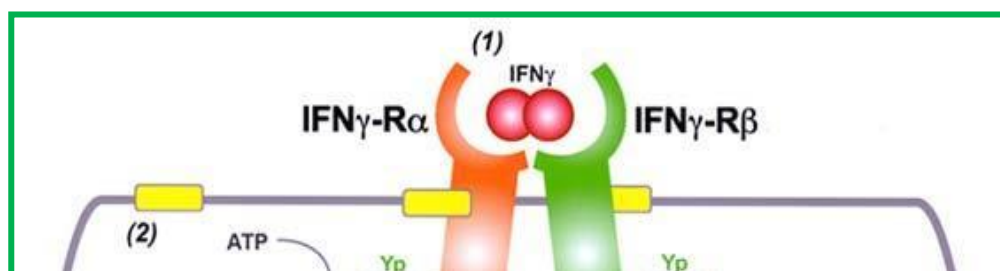


Figura 6 - Representação esquemática dos receptores de *INF* γ : *IFNGR1*(*INF* γ -R α) e *IFNGR2* (*INF* γ -R β). Fonte: www.scielo.br

Fatores de suscetibilidade genética em *IFNGR1* têm sido mostrados para desempenhar papéis críticos na suscetibilidade a infecções por micobactérias. Mutações no receptor de *IFNGR1* (Dorman *et al.*, 2000; Casanova *et al.*, 2002), mutações em *IFNGR1* são as mais prevalentes. No entanto, menos de 50% de indivíduos com infecções micobacterianas disseminadas têm um defeito genético subjacente identificado. Ambas as mutações intrônicas e exônicas foram descritas em *IFNGR1*; a maioria dos quais levam a supressão da expressão da proteína (mutações nonsense hereditária recessiva) ou níveis normais de expressão de proteínas disfuncionais (mutações missense hereditária recessiva). (Jouanguy *et al.*, 1999). Um grupo distinto de mutações nonsense dominante herdado que resultam em superacumulação de um *IFNGR1* truncado. Portanto, o nível de expressão *IFNGR1* provavelmente desempenha um papel crítico na resposta de *INF* γ (Jouanguy *et al.*, 1999).

É concebível que a seleção natural pode favorecer os diferentes níveis de expressão *IFNGR1*, dependendo do tipo dos agentes infecciosos a que a população está exposta (He *et al.*, 2010). O SNP *IFNGR1*^{-56(A>T)} está localizado na região de 5'-UTR do gene *IFNGR1*, que codifica o receptor de interferon gama de ligação ao seu receptor da célula humana, de cadeia alfa. É também o local de ligação de fatores de transcrição. A menor frequência do alelo de SNP *IFNGR1*^{-56(A>T)} varia em diferentes áreas, que vão de 0% em populações europeias para 60% em populações afro-americanas. Além disso, observou-se que o haplótipo *IFNGR1*^{-56(A>T)} também contribuiu com um aumento significativo do risco de tuberculose.

Velez *et al.*, (2009) observou em sua pesquisa onde investigou a influência das interações gênicas quanto a susceptibilidade a várias doenças dentre elas tuberculose, entre os genes *NOS2A* rs2248814 e *IFNGR1* rs1327474 e *NOS2A* rs944722. *NOS2A* interagiu com *IFNGR1*^(611C>T)

rs1327474 e nenhuma associação significativa foi observada em caucasianos, entretanto esses resultados sugerem que as variantes *NOS2A* pode contribuir para a suscetibilidade a tuberculose, particularmente em indivíduos de ascendência Africana, e pode agir sinergicamente com *IFNGR1*.

Vários SNPs em *IFNGR1* têm sido investigados em casos de malária falciparum e controles. As frequências de *IFNGR1* e polimorfismos no promotor *IFNGR1*^{611(C>T)} e *IFNGR1*^{-56(A>G)} em pacientes e controles de tuberculose são significativamente diferentes. Em estudos em que o SNP afeta a transcrição e expressão do gene *IFNGR1* não conferiram suscetibilidade à doença em doentes de Croácia (Bulat-Kardum *et al.*, 2006).

As doenças infecciosas como tuberculose e malária resultam da exposição do hospedeiro a micróbios patogênicos. Os fatores genéticos são determinantes e importantes da suscetibilidade do hospedeiro. Os resultados obtidos até o momento confirmam, em parte, a suscetibilidade genética já conhecida, mas também apontam para novos e inesperados mecanismos de suscetibilidade que se estendem desde a imunidade inata e adquirida clássica a deficiências na resistência a doenças infecciosas (Laurent Abelet *et al.*, 2014).

3 APLICABILIDADE

A tuberculose ainda hoje constitui um problema grave de saúde pública, sendo considerada doença endêmica mundial.

No Brasil, a tuberculose é sério problema da saúde pública, com profundas raízes sociais. A cada ano, são notificados aproximadamente 70 mil casos novos e ocorrem 4,6 mil mortes em decorrência da doença. O Brasil ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo.

Além dos fatores relacionados ao sistema imunológico de cada pessoa, o adoecimento por tuberculose, muitas vezes, está ligado à pobreza e à má distribuição de renda. Adicionado a este caráter, alguns grupos populacionais possuem maior vulnerabilidade à infecção e resposta a tuberculose, quando submetidos às condições de saúde e de vida a que estão expostos.

Considerando o aspecto citado, a investigação de polimorfismos genéticos torna-se importante para identificar mecanismos fisiopatológicos da doença e do risco individual. Assim como sugerir novos alvos terapêuticos. A investigação tem, ainda, o potencial de prever o risco de adquirir a doença pulmonar ou o prognóstico do indivíduo já doente, o que tem estimulado pesquisadores a investigar diferentes tipos de polimorfismos genéticos associados a genes de resposta imunológica e à agressão do agente etiológico, como é o caso da tuberculose.

Polimorfismos nos genes *IFN γ* (rs1130562) e *INFR1* (rs1327474, rs2234711) têm sido amplamente estudados, no que diz respeito a sua aplicação como marcador de suscetibilidade às doenças infecciosas. A análise molecular dos genes *IFN γ* e *INFR1* pode auxiliar a esclarecer os perfis de desenvolvimento da tuberculose nos indivíduos infectados pela *Mycobacterium tuberculosis*.

4.CONTROLE GENÔMICO DA ANCESTRALIDADE NOS PACIENTES PORTADORES DA TUBERCULOSE (INDEL)

Historicamente, características como “cor da pele”, “raça” ou “etnia” foram utilizados para realizar inferências sobre a estrutura das populações humanas (Cooper, 1994; Aspinall, 1998). Diferentes interpretações para esses resultados sugeriram que os dados disponíveis eram insuficientes para justificar as inferências feitas (Risch *et al.*, 2002).

O grande desafio para decifrar aspectos evolutivos da história humana é utilizar a pequena quantidade de diferenciação genética entre populações para inferir a história das migrações. Os padrões de estrutura das populações humanas modernas poderão ser utilizados para guiar a construção de modelos históricos de migração e miscigenação que poderão ser úteis para inferências sobre a história genética humana, assim como a associação com doenças.

A idéia de que marcadores genéticos existam em uma população e não em outra foi inicialmente apresentada por Neel (1973), que se referiu a esses marcadores como “privados” e os utilizou para estimar taxa de mutação. Chakraborty *et al.*, (1991) designaram as variantes que são encontradas em apenas uma população como “alelos únicos” sugerindo a utilização dos mesmos para estimativas de fluxo gênico. Mais recentemente, Schriver *et al.*, (1997) usaram a designação “alelos população-específicos” (PSA) ou “marcadores informativos de ancestralidade” (MIA) para descrever os marcadores genéticos com grandes diferenciais de frequências alélicas entre os grupos humanos. De acordo com esses autores essas diferenças (δ) deveriam ser maiores que 50% entre duas populações étnica ou geograficamente definidas para um marcador ser considerado informativo de ancestralidade.

A maneira mais eficiente para estudar doenças infecciosas são os estudos do tipo caso-controle utilizando-se genes candidatos, que podem ter sido identificados na base de conhecimento prévio ou em varreduras (screens) genômicas com marcadores polimórficos. Os estudos do tipo caso-controle apresentam uma série de vantagens: são mais fáceis de executar e menos dispendiosos que estudos de coortes e apresentam maior poder do que estes últimos para eventos menos comuns (maioria dos fenótipos). Assim eles tornaram-se padrão para estudos epidemiológicos de identificação de genes envolvidos em fenótipos.

Por outro lado, estudos de caso-controle apresentam a distinta desvantagem de serem notoriamente suscetíveis a vieses de subestruturação de populações. Em geral, a formação de subpopulações (também chamada estratificação) ocorre porque a população não é panmítica, mas composta de inúmeros grupos reprodutivos, muitas vezes não randômicos. Isto é especialmente significativo em populações formadas por mistura de duas ou mais populações ancestrais, como sabemos ser o caso da população brasileira que é uma mistura principalmente de populações fundadoras ameríndias, européias e africanas (com uma pequena contribuição asiática mais recente). Neste caso, as proporções relativas de ancestralidade de cada indivíduo variam. Se o risco de uma doença ou a predisposição a um fenótipo varia com as proporções de miscigenação (ou seja, se há diferenças entre as populações ancestrais) isto levará à confusão de associações do fenótipo com o genótipo em qualquer locus no qual as frequências alélicas diferem entre as populações ancestrais.

Em geral, a estratificação populacional existe quando a população em questão é constituída pela mistura de diferentes grupos de populações (europeus e africanos, por exemplo) que normalmente são denominadas de subpopulações e quando a proporção de mistura, definida como a proporção do genoma que teve origem em cada subpopulação, varia entre indivíduos (Kittles *et al.*, 2002). Um dos exemplos mais conhecidos de associação espúria foi o da associação do câncer de próstata com o polimorfismo *CYP3A4*, entre negros americanos (Kittles *et al.*, 2002).

Uma importante consequência de associações espúrias é a inadequação da extrapolação livre de dados colhidos em populações relativamente homogêneas como as dos países industrializados, nos quais se produz a maioria dos medicamentos de uso clínico para populações altamente miscigenadas, como é o caso do Brasil.

Uma maneira de lidar com o problema é usar métodos que usam controles das próprias famílias dos afetados, tais como o método de desequilíbrio de transmissão e suas variantes. Esta estratégia é muito poderosa, mas de implementação complexa, já que envolve a coleta de amostras de DNA de pais e irmãos dos probandos, o que é difícil,

especialmente tratando-se de pacientes adultos. Além disso, o uso de controles familiares esbarra em objeções de cunho ético.

Outra estratégia, hoje considerada a mais custo-eficiente é a de “controles genômicos”, que se baseia na idéia que se existe estratificação, a mesma causará associações espúrias não só com o gene candidato, mas também com outros genes que não são geneticamente ligados a ele. Vamos imaginar a situação em que tenha sido observada uma estatística de associação significativa entre um fenótipo farmacológico e um gene candidato, por exemplo, um valor nominalmente elevado de qui-quadrado (χ^2). Para verificar se esta estatística elevada significa realmente a presença de associação, repetimos o teste com inúmeros outros marcadores em diferentes cromossomos que agem como “controles genômicos”. Caso o valor do qui-quadrado seja muito mais elevado com o gene candidato do que com os outros marcadores, temos uma forte indicação que o gene candidato é responsável pelo fenótipo ou está em desequilíbrio de ligação com o gene ou genes responsáveis pela associação. Por outro lado, se o valor de qui-quadrado do candidato não for muito diferente daquele dos outros marcadores, poder-se-á concluir que a associação putativa pode ser devida apenas à estratificação. Esta estratégia foi delineada por vários autores entre os quais Reich e Goldstein (2001), os quais mostraram que se dividirmos o valor do qui-quadrado do gene candidato pelo valor médio de χ^2 dos outros marcadores, podemos obter um χ^2 corrigido que elimina os efeitos da presença de estratificação.

O número de marcadores exigidos para estimar o efeito da subestruturação populacional depende de dois fatores principais: do painel de marcadores escolhidos (quanto esses marcadores diferem nas subpopulações ancestrais); e da associação do traço e/ou doença investigado com uma, ou mais, das subpopulações (quanto esta característica é mais comum em um determinado grupo ancestral).

Cálculos que empregam análises de máxima verossimilhança sobre as estimativas de mistura individual mostraram que em populações formadas pela mistura de duas subpopulações aproximadamente 40 marcadores bialélicos, com média de valores de delta (δ) (diferenças das frequências alélicas nas

populações ancestrais) em torno de 60%, são requeridos para medir com precisão a proporção de mistura de cada indivíduo.

Os sistemas bialélicos de inserção e deleção (INDEL) são mais fáceis de investigar, principalmente na forma de sistemas multiplex. Como as inserções podem apresentar tamanhos muito diferentes (de um até dezenas de nucleotídeos) é possível combinar o tamanho do amplicon em função do tamanho da inserção e ajustar ambos com os diferentes tipos de fluorocromos de forma a genotipar com relativa facilidade até quinze marcadores simultaneamente.

Para atingir o objetivo proposto, o presente trabalho utilizará 48 INDEL (inserção/deleção) marcadores informativos de ancestralidade previamente desenvolvidos capazes de se estimar com precisão a mistura individual e global Inter étnica em populações miscigenadas com diferentes grupos étnicos. Estes marcadores de ancestralidade foram desenvolvidos para este fim e estão descritos no artigo de Santos *et al.*, (2010).

5.OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Investigar três polimorfismos genéticos nos genes *IFN γ* e *INFG1* que podem estar associados a suscetibilidade à tuberculose em uma amostra de pacientes do Hospital Universitário João de Barros Barreto, Belém/PA.

5.2 Objetivos Específicos

- Investigar as frequências dos polimorfismos dos genes *IFN γ* e *INFG1* em pacientes com tuberculose na população do Pará.
- Avaliar se ocorrem diferenças nas frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos *IFN γ* ^(871A>T) e *INFG1*^{611(C>T)} e *INFG1*^{-56(A>G)} entre indivíduos com e sem tuberculose na população de Belém.
- Investigar um painel de 48 Marcadores Informativos de Ancestralidade Genética, tanto na amostra de pacientes como na amostra de indivíduos sem tuberculose, de forma a controlar os possíveis efeitos da subestruturação populacional.

6.MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Amostra

Para realização deste estudo nos utilizamos amostras de sangue periférico de 273 indivíduos da população de Belém, divididos em dois grupos:

(1) Grupo 1: 148 pacientes diagnosticados com tuberculose, residentes no Estado do Pará, Brasil, atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB).

(2) Grupo 2: 125 indivíduos sem tuberculose da população de Belém, residentes no Estado do Pará, Brasil.

A coleta do material biológico ocorreu durante o período de 2006 a 2012. Os indivíduos portadores de tuberculose foram selecionados, depois da confirmação da infecção pelo bacilo da *Mycobacterium tuberculosis* (realizada através dos exames clínicos, bacteriológico, radiológico, prova tuberculínica, histopatológico e específico complementares) (FUNASA, 2002).

6.2 Aspectos Éticos

Os indivíduos foram devidamente esclarecidos a respeito da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o qual permite o uso de suas alíquotas de sangue e de seus dados clínicos, em nível de prontuário. O presente estudo foi aprovado no Comitê de Ética do Hospital Universitário João de Barros Barreto sob protocolo nº 350507.

6.3 Obtenção das amostras e extração de DNA

De cada indivíduo foi obtido 5mL de sangue venoso colhido de veia periférica, em sistema de coleta a vácuo, utilizando EDTA como anticoagulante. A extração de DNA foi realizada segundo método descrito por Sambrook *et al.*, (1989).

6.4 Quantificação do DNA

A concentração do DNA das amostras foi calculado pelo índice de absorbância (A) das bases a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific). Posteriormente, o DNA foi armazenado no freezer - 80°C.

6.5 Genotipagem dos Polimorfismos

A genotipagem dos polimorfismos para os genes *IFN γ* (rs1130562) e *INFR1* (rs1327474, rs2234711) foi realizada por técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) utilizando-se o sistema TaqMan® (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA), que utiliza uma sonda fluorescente para possibilitar a detecção de um produto específico da PCR conforme esse se acumula durante os ciclos da reação.

6.6 Análise da Ancestralidade

A análise da ancestralidade das amostras foi realizada de acordo com Santos *et al.* (2010), utilizando 48 marcadores informativos de ancestralidade autossômica (AIMS). Foram realizadas três reações de PCR multiplex, cada uma com 16 marcadores. Os amplicons de PCR foram analisados por eletroforese usando o sequenciador ABI *Prism 3130* e o software *GeneMapper* ID v.3.2. As proporções individuais de ancestralidade genética Europeia, Africana e Ameríndia foram estimadas usando o software *Structure* V.2.3.3, assumindo três populações parentais (europeia, africana e ameríndia) (CARVALHO *et al.*, 2015).

6.7 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas nos softwares SPSS 17.0, usando o teste de Mann-Whitney, considerando como significantes valores de $p < 0,05$ (SPSS Ins. Chicago, IL, USA).

7 RESULTADOS

Fatores de risco para a tuberculose

Foram analisados 148 pacientes com *M. tuberculosis* e 125 indivíduos não portadores de tuberculose, controlada por diferentes fatores que podem estar envolvidos com uma maior suscetibilidade a esta patologia, tais como HIV - nenhum dos participantes transportado o vírus. O controle Genômico é particularmente importante nas amostras estudadas, devido à presença de subestruturação nas populações que habitam a região norte do Brasil, o que justifica o uso desse controle em estudos de associação com doenças.

A Tabela 2 apresenta fatores de risco para o desenvolvimento de TB. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação às variáveis: comorbidades ($p = 0,000$), idade ($p = 0,000$), ancestralidade africana ($p = 0,000$), europeia ($p = 0,000$) e ameríndia ($p = 0,001$). No grupo de pacientes (homens e mulheres), as médias de idade foram $48,86 \pm 17,51$ anos e $23,09 \pm 4,62$ anos para os casos e controles, respectivamente. O gênero feminino foi predominante em ambos os grupos analisados.

Os resultados da Tabela 2 mostram que, comorbidades, idade e etnia apresentam distribuições distintas nestas amostras em relação ao desenvolvimento de TB, considerando-se $p \leq 0,05$. Deste modo, existe uma necessidade de corrigir tais fatores de interferência na análise de associação entre os polimorfismos genéticos e risco de desenvolver TB.

Os valores de distribuição global de mistura interétnica para casos e controles de TB estão na Tabela 2. Entre os pacientes, observou-se 25% de contribuição africana, 40% de europeia e 35% de ameríndia. No grupo controle, os valores foram de 20% de contribuição africana, 51% de europeia e 29% de

ameríndia. Quando comparamos casos e controles, os três grupos, africano ($p = 0,0001$), europeu ($p = 0,000$) e do nativo americano ($p = 0,000$), apresentaram subestruturação da população.

Tabela 2 – Características clínicas e fatores de risco para portadores de tuberculose (casos) e seus controles.

	Casos	Controles	p
	N =148 (%)	N =125 (%)	
Gênero (Masculino / Feminino) ^a	67/81	55/70	0.903
Comorbidade ^d	31 (23.0)	0 (0)	0.000
Idade ^b	48.86 ± 17.51	23.09 ± 4.62	0.000
Africanos ^c	0,25999	0,20376	0.001
Europeus ^c	0,40044	0,50541	0.000
Índios ^c	0,33958	0,29083	0.000

^aTeste exato de Fisher; ^bStudent t de teste; ^cMann-Whitney; ^dcomorbidades encontradas: Hepatoblastoma, leucemia, Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), asma, tumores de laringe, diabetes tipo 2 e tipo 1, Nefropatia, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), hipotireoidismo, doença mental, bronquiectasia, cardiopatia, Gastrite, Insuficiência Renal, colecistite, úlcera, cirrose e artrose.

A Figura 5 representa a contribuição étnica individual dos indivíduos do grupo caso (com tuberculose) e grupo controle (sem tuberculose) estimado por meio de 48 marcadores informativos de ancestralidade.

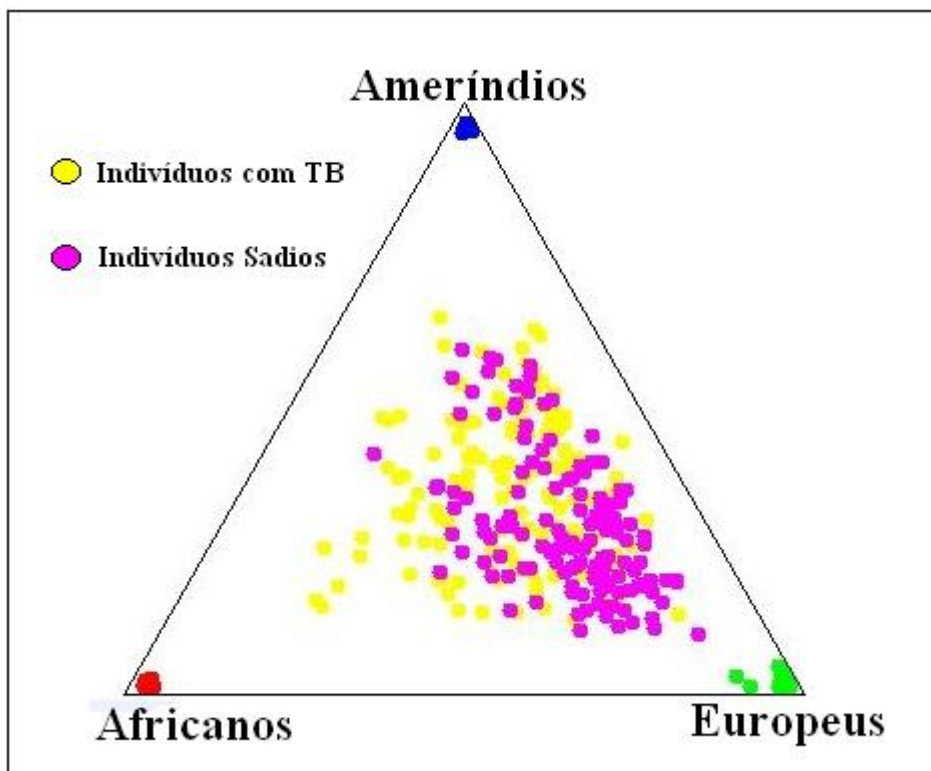


Figura 5 – Distribuição de estimativa individual. Os vértices do triângulo representam as populações parentais. Os círculos em cores ao centro do triângulo descrevem os indivíduos com e sem tuberculose.

A Tabela 3 apresenta a distribuição de frequências alélicas e genotípicas para todos os polimorfismos investigados e os seus riscos relativos estimados. Proporções genotípicas observadas estão de acordo com o esperado por Hardy-Weinberg, em todos os grupos analisados. Os resultados indicam que os três polimorfismos estudados $INF\gamma^{871(A>T)}$, $INFNGR1^{611(C>T)}$ e $INFNGR1^{-56(A>G)}$ não mostraram qualquer associação com a suscetibilidade à tuberculose.

Tabela 3 – Distribuição de frequências alélicas e genóticas para polimorfismos investigados nos pacientes de TB.

Genótipo	Casos N (%)	Controle N (%)	P	OR (CI95%)
<i>IFNG871 A>T</i>	<i>N=146</i>	<i>N=116</i>		
AA	80 (54.4)	67 (57.8)		1
AT	59 (40.4)	41 (35.3)		
TT	7 (4.8)	8 (6.9)	0,856	1.215 (0.147 – 10.043)
AT + TT ^a	66 (45.2)	54 (42.2)	0,163	2.165 (0.731 – 6.413)
Allele A	0.75	0.75		
Allele T	0.25	0.25		
<i>IFNGR1 611C>T</i>	<i>N=94</i>	<i>N=115</i>		
CC	56 (59.6)	56 (48.7)		1
CT	33 (35.1)	44 (38.3)		
TT	15 (13)	5 (5.3)	0.378	0.375 (0.42 – 3.321)
CC + CT ^a	38 (40.4)	59 (51.3)	0.542	1.558 (0.375 – 6.469)
Allele C	0.77	0.68		
Allele T	0.23	0.32		
<i>IFNGR1 56 A>G</i>	<i>N=133</i>	<i>N=114</i>		
AA	56 (42.1)	43 (37.7)		1
AG	51 (38.3)	50 (43.9)		
GG	77 (19.5)	21 (18.4)	0.533	0.585 (0.109 – 3.153)
AA + AG ^a	128 (57.8)	71 (62.3)	0.783	1.177 (0.370 – 3.741)
Allele A	0.61	0.60		
Allele G	0.39	0.40		
^a Modelo de dominância do alelo mutante em que é considerado o genótipo homozigoto recessivo mais genótipo heterozigoto.				

8 DISCUSSÃO

A tuberculose é uma das doenças mais importantes na história da humanidade devido ao seu impacto na saúde pública. A TB apresenta picos de incidência elevada em resposta às situações de crise ao longo do tempo, como a revolução industrial, as guerras e outras epidemias, como a AIDS. Embora seja estudada há séculos, ainda é responsável por mais mortes do que qualquer outra doença infecciosa. Em 1993, a Organização Mundial da Saúde declarou como uma emergência de saúde pública global (Möller *et al.*; 2010). De acordo com dados da OMS (WHO), no ano de 2008, a taxa global de mortalidade relacionada à tuberculose foi de 21/100.000 habitantes e no Brasil chegou a 3,8/100.000 habitantes.

O Brasil faz parte do grupo de 22 países relacionados com 80% das ocorrências globais de tuberculose (MS, 2002). Perante este cenário, as investigações que podem caracterizar populações de risco para o desenvolvimento de tuberculose são de grande importância para o controle desta patologia.

Diferentes estudos no mundo relatam a importância de controlar aspectos de associação das variáveis alélicas em relação à patologia (Hinds *et al.*, 2004; Keene *et al.*, 2008). No presente estudo utilizou-se um painel de 48 MIA capaz de identificar erros de subestruturação populacional. Este controle de ancestralidade genômica foi de fundamental importância para a consolidação e análise de associação de polimorfismos genéticos *INFγ*^{871(A>T)}, *INFNGR1*^{611(C>T)} e *INFNGR1*^{-56(A>G)} no desenvolvimento da TB.

Dados relacionados à ancestralidade mostraram uma contribuição significativa ($p = 0,000$) entre os indivíduos com tuberculose e controle em relação à contribuição africana (25% x 20%), europeia (40% x 51%) e ameríndia (33% x 29%). Estes resultados mostram uma perda da contribuição europeia e um aumento das contribuições africanas e de nativos americanos no grupo de

indivíduos com TB, sobre a estimativa encontrada na população controle investigada (Santos *et al.*, 2010).

O modelo proposto para explicar esta observação é uma seleção direcional para grupos étnicos de maior contribuição africana e de nativo americano com base nas características desta patologia. Considerando os dados do Ministério da Saúde (MS, 2004), a ocorrência global da distribuição geográfica da prevalência da TB apresenta importante influenciada situação econômica e social em diferentes áreas do globo. De acordo com a ONU (Organização das Nações Unidas), apresentam fortes indicadores para países menos desenvolvidos em saúde e nutrição, que aliados ao saneamento inadequado e as condições de acesso à saúde pública, contribuem para a ocorrência de novos casos de TB. Adicionalmente, dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), em 2003 indicam uma grande disparidade da pobreza entre as populações nativas americanas e africanas (IBGE, 2003).

A evolução clínica da infecção por TB varia substancialmente entre os indivíduos (Girardi *et al.*, 2000). Fatores do hospedeiro podem estar envolvidos na suscetibilidade ou resistência, as várias fases da infecção ou da doença (van Helden *et al.*, 2006). Estudos anteriores eram sempre focados em reatividade imunológica em pessoas com doença, mas a atenção está agora voltada para a razão pela qual a maioria das pessoas infectadas permanecem saudáveis. Neste contexto, é importante determinar se aqueles que permanecem saudáveis têm um alto nível de resistência genética à TB; ou se a resistência é afetada pelos fatores ambientais, exógenos; ou ambas situações estão relacionadas (Lange *et al.*, 2014; Abul *et al.*, 2012; Davies e Grange, 2001).

Na maioria dos indivíduos, vias imunológicas inatas e T auxiliares 1 (Th1), a imunidade mediada por células são ativadas resultando na lise da bactéria. Certas citocinas, incluindo INF γ , principalmente produzidas por células Th1, desempenha um papel importante na célula imunomediada por resposta a patógenos intracelulares e auto-imunidade (Abbas *et al.*, 1996). Estudos experimentais em ratos “knockout” com o bem como a

observação clínica em infecções por micobactérias graves em pacientes com defeitos de sinalização *INF*γ provaram seu essencial papel no controle de infecções por *M.tuberculosis* (Cooper et al, 1993; Filipe-Santos et al., 2006; van de Vosse et al., 2004). Fato pelo qual demonstra haver diferenças nos diversos estudos consultados quanto à suscetibilidade a tuberculose, pois inúmeros fatores podem estar relacionados à significância de resultados estatísticos.

Nossos resultados mostraram que os genes *INF*γ^{871 (A>T)}, *INFNGR1*^{611 (C>T)} e *INFNGR1*^{-56(A>G)} não foram significantes para o aumento da suscetibilidade à TB na população investigada, talvez pelo pequeno tamanho amostral, tendo em vista que a tuberculose no Brasil apresenta o maior índice de casos de toda a América do Sul, cerca de 114 mil casos em 2007; média de 90 mil casos novos por ano (WHO, 2009). E em especial no estado do Pará são 46,69/100.000 casos por habitantes, o segundo maior índice de tuberculose do norte do Brasil ficando atrás apenas do estado do Amazonas. Em função dos resultados obtidos, seria necessário uma investigação mais ampla, para obter resultados com um maior grau de confiabilidade (MS, SVS, SINAN E IBGE, 2007).

Jieqiong Lü., et al. (2014) em seu estudo caso-controle, genotiparam seis SNPs dos genes *INF*γ/*INFNGR1* em um grupo da população chinesa e indicaram que os polimorfismos genéticos rs2234711 (*INFNGR1*^{-56 (A>G)}), rs1327475 e rs7749390 estavam associados com risco à TB. Para o SNP rs2234711, indivíduos portadores do alelo A>G observou-se uma diminuição do risco. Enquanto para rs1327475, o alelo A>C estava relacionado com um aumento do risco. Para rs7749390, o modelo dominante mostrou uma diminuição em 20% do risco entre os indivíduos com genótipos variantes (AG/AA). Além disso, observou-se que o haplótipo rs2234711T/rs3799488C também contribuiu a um aumento significativo no risco da doença.

Polimorfismos nos genes *IFN*γ e *IFNGR1* já foram associados a sintomas e a gravidade de malária *P.falciparum* em estudos de populações africanas e

asiática (Driss *et al.*, 2011). Entretanto, Sortica *et al.*, (2012) analisaram 33 polimorfismos associados a suscetibilidade ao desenvolvimento de malária, dentre estes o *INFR1* - 56 (A>G) rs 2234711 (gene também analisado no presente estudo quanto a suscetibilidade a tuberculose), os resultados obtidos pelos autores não observaram nenhuma associação com a malária causada por *P. Vivax*. Nesta investigação os autores também realizaram o controle de ancestralidade genômica com Europeus, Africanos e Ameríndios. Os resultados observados por Sortica *et al.*, (2012) corroboram os do presente estudo onde o polimorfismo *INFR1* -56(A>G) que também não foi associado com a suscetibilidade a tuberculose. Desta forma, fica evidente e ressalta-se a importância de estudos de ancestralidade que controlem a presença de subestruturação populacional, principalmente em países como o Brasil, para obtenção de resultados mais coesos quanto a polimorfismos que predispõe a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças infecciosas, como exemplo a tuberculose.

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. No entanto, numerosos estudos mostram que apenas 10% dos indivíduos expostos às bactérias desenvolvem a patologia. Deste modo, pode ser considerada uma doença poligênica e multifatorial que resulta da interação do genoma do hospedeiro, as características do patógeno e condições ambientais incluindo os fatores sociais e econômicos (Notonet *al.*, 2014; Möller *et al.*, 2010; North *et al.*, 2004).

Os componentes genéticos que contribuem para uma suscetibilidade e resistência à tuberculose provavelmente envolve uma interação entre múltiplos alelos localizados em diferentes cromossomos e genes. Por isso, os alelos analisados citados nos resultados deste trabalho, quanto a possível suscetibilidade a tuberculose não apresentam significância. As discordâncias observadas entre este estudo e outros da literatura mundial, citados durante o desenvolvimento do presente trabalho, podem ser decorrente da composição étnica diferente nas populações analisadas que originam subestruturas populacionais, pode ser em função do tamanho amostral, pode ser em função

da interação com fatores ambientais, ou pode ser em função de todas as hipóteses.

Mais trabalhos são necessários para fornecer modelos sobre a expressão de *INF/INFNGR1* e os genes vizinhos que também podem estar relacionados a suscetibilidade a tuberculose e assim vim a favorecer a abordagens mais proveitosa para compreender os mecanismos em que estas vias e suas variações influenciam no risco a TB. São necessárias repetições em populações maiores para conclusivamente confirmar ou rejeitar os resultados achados.

Desde o ano de 2003, a Organização Mundial de Saúde vem tentando erradicar esta infecção a nível mundial com a meta de erradicação até o ano atual (2015), de modo que devemos olhar para populações com alto risco a desenvolver a patologia. Assim, as investigações que considerem o efeito de marcadores genéticos para uma maior suscetibilidade à TB são de grande importância para medidas públicas voltadas a esta doença.

9 CONCLUSÕES

Neste estudo, observou-se que a distribuição dos polimorfismos *INF γ* ^{871(A>T)}, *INFNGR1*^{611(C>T)} e *INFNGR1*^{-56(A>G)} entre indivíduos com tuberculose e controles da população de Belém não apresentaram diferenças significativamente no que diz respeito à suscetibilidade à doença.

REFERÊNCIAS

Abbas, AK., Murphy, KM., Sher, A., Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature** 383, 787–793, 1996.

Abul K. Azad,a Wolfgang Sadee,b and Larry S. Schlesinger, Innate Immune Gene Polymorphisms in Tuberculosis, **IAI** , 10:80, 2012.

Adams, LB., Fukutomi, Y., Krahenbuhl, JL., Regulation of murine macrophage effector functions by lipoarabinomannan from mycobacterial strains with different degrees of virulence. **Infect Immun**, v.61 p.4173– 4181,1993.

Albuquerque, AC., Rocha, L Q., Morais Batista, AH ., Teixeira, AB., dos Santos ,DB and Nogueira N. A. P. Association of polymorphism +874 A/T of interferon- γ and susceptibility to the development of tuberculosis: meta-analysis, **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** v.31p.2887–2895 ,2012.

Bang, D., Andersen, Å B., Thomsen, V., Rapid Genotypic Detection of Rifampin- and Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Directly in Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, no. 7., p. 2605–2608, 2006.

Barreiro, LB., Neyrolles, O., Babb, CL *et al.*. Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS Med* 2006;3:e20.
Bulat-Kardum L., Etokebe G. E., Knezevic J., Balen S., Matakovic-Mileusnicy N., Zaputovic L., Pavelic J., Beg-Zecy Z and Dembic Z. Interferon-g Receptor-1 Gene Promoter Polymorphisms (G-611A; T-56C) and Susceptibility to Tuberculosis. **Scandinavian Journal of Immunology** v.63, p.142– 150,2006.

Boom, WH. The role of T-cell subjects in Mycobacterium tuberculosis infection. **Infect Agents Dis**, v. 5, p. 73, 1996.

Campos, HS. **Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas Pulmão RJ** v.15 (1) p.29-35,2006.

Darlen C. Carvalho, Alayde V. Wanderley, Marcos A.T. Amador, Marianne R. Fernandes, Giovanna C. Cavalcante, Karla B.C.C. Pantoja, Fernando A.R. Mello, Paulo P. de Assumpção, André S. Khayat, Ândrea Ribeiro-dos-Santos, Sidney Santos, Ney P.C. dos Santos. Amerindian genetic ancestry and INDEL polymorphisms associated with susceptibility of childhood B-cell Leukemia in an admixed population from the Brazilian Amazon. **Leuk Res.** **15** (2015) S0145-2126.

Casanova, J.L., Abel, L., Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model, *Annu. Rev. Immunol.* v.20, p.581– 620, 2002.

Chen Shen., Wei-Wei Jiao., Wei-Xing Feng ., Xi-Rong Wu., Jing Xiao ., Qing Miao., Lin Sun ., Bin-Bin Wang ., Jing Wang ., Fang Liu ., Dan Shen • A-Dong Shen, IFNG polymorphisms are associated with tuberculosis in Han Chinese pediatric female population, *Springer Science+Business Media Dordrecht* v.40p.5477–5482, 2013

Collins, H.L., Kaufmann, S.H., The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology*; v.103, p.1- 9, 2001.

Condos, R.W.N., Rom, W.N., Schluger W., *et al.* Treatment of multidrug resistant pulmonary tuberculosis with interferon gamma via aerosol. *Lancet*, v.349, p.1513, 1997.

Condos, R., Rom, W.N., Liu, Y.M., Schluger, N.W. Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* v.157, p. 729– 735, 1998.

Cooper, R.S. A case study in the use of race and ethnicity in public health surveillance. *Publ Health Rep* v.109, p. 46-52.

Cooper, A.M., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Griffin, J.P., Russell, D.G., Orme, I.M., 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *Journal of Experimental Medicine* 178, 2243–2247.

Davies, G R and Nuremberg, E.L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of anti-tuberculosis drugs. *Tuberculosis* v.88, p.S65-S74, 2008.

Davies, P.D., Grange, J.M., 2001. Factors affecting susceptibility and resistance to tuberculosis. *Thorax* 56 (Suppl. 2), ii23–ii29.

Dorman, S.E., Holland, S.M., Interferon-g and interleukin-12 pathway defects and human disease, *Cytokine Growth Factor*, v.11 p. 321– 333, 2000.

Driss A., Hibbert J.M., Wilson N.O., Iqbal S.A., Adamkiewicz T.V., Stiles J.K., Genetic polymorphisms linked to susceptibility to malaria. *Malar J*, 10:271, 2011.

Duarte, R; Diniz, A. Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose - Ponto da situação epidemiológica e de desempenho. Lisboa: **DGS**; 2013.

Fernandes *et al.* Desafios Enfrentados no Manejo da Tuberculose Pulmonar em Unidade de Saúde da Família: um Relato de Experiência. *Blucher Medical Proceedings March*, vol. 1, num. 2, 2014.

Filipe-Santos, O., Bustamante, J., Chappier, A., Vogt, G., de Beaucoudrey, L., Feinberg, J., Jouanguy, E., Boisson-Dupuis, S., Fieschi, C., Picard, C., Casanova, J.L., 2006. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. **Seminars in Immunology** **18**, 347–361.

Fine, PA., Cameiro, IAM., Milstein, J., Clements, CJ. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes. A discussion document. WHO/V&B/99.23, Geneva: **World Health Organization**, 1999.

FIOCRUZ. Histórico. <http://www.coc.fiocruz.br/tuberculose/index.htm>

Flynn, JL., Chan, J., Triebold, KJ., Dalton, DK., Stewart, TA., Bloom, BR. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. **J Exp Med**, v.178, p.2249–2254, 1993.

Frothingham, R., Stout, JE and Hamilton CD. Current issues in global tuberculosis control. **International Journal of Infectious Diseases**, v.9 p. 297–311, 2005.

Genecards. Histórico. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IFNG&search=0711b05dfc293e5ef0462a1a765460fc>

Girardi, E., Raviglione, M.C., Antonucci, G., Godfrey-Faussett, P., Ippolito, G., 2000. Impact of the HIV epidemic on the spread of other diseases: the case of tuberculosis. **AIDS** **14** (Suppl. 3), S47–S56.

Global tuberculosis control: key findings from the December 2009 WHO report. **Wkly Epidemiol Rec** 2010, 85(9):69–80.

Gutierrez, RS., Santos, BR., Espina, CAA., Azambuja, HCP and Silva L.C.C. Tuberculose (2001) In: Silva, L.C.C. Condutas em Pneumologia. Rio de Janeiro. Livraria e Editora Revinter LTDA. II Diretrizes Brasileiras para Tuberculose **J Pneumol** v. 30, p. 412–444, 2004.

Hinds DA, Stokowski RP, Patil N, Konvicka K, Kershenovich D, Cox DR, Ballinger DG. Matching strategies for genetic association studies in structured populations. **Am J Hum Genet** **2004**; 74: 317–325, 2004.

He, J., Wang, J., Lei, D., Ding, S., Analysis of functional SNP in ifng/*IFNGR1* in Chinese Han population with tuberculosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.71, p. 452–458, 2010.

Holand, SME., Eisenstein, DB., Kuhns, ML., et al. Treatment of refractory, disseminated mycobacterial infection with interferon gamma. **N Eng J Med**, v.330, p.1348, 1994.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios**, v. 24, 2003.

Jaffe, HAR., Buhal, A., Mastrangeli, KJ, *et al.* Organ Specific Cytokine therapy local activation of mononuclear phagocytes by delivery of an aerosol of recombinant interferon gamma to the human lung. **J Clin Invest**, v. 88, p. 297-1991.

J. He, J. Wang, D. Lei, S. Ding, Analysis of Functional SNP in *Ifng/Ifngr1* in Chinese Han Population with Tuberculosis. **Clinical immunology**, v 71, 452–458, 2010.

Jouanguy, E., Lamhamedi-Cherradi, S., Lammas, D., Dorman, S.E., Fondaneche, M.C., Dupuis, S., Doffinger, R., Altare, F., Girdlestone, J., Emile, J.F., Ducoulombier, H., Edgar, D., Clarke, J., Oxelius, V.A., Brai, M., Novelli, V., Heyne, K., Fischer, A., Holland, S.M., Kumararatne, D.S., Schreiber, R.D., Casanova, J.L.,. A human *IFNGR1* small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. **Nature Genetics**, v. 21, p. 370 – 378, 1999.

Keene KL, Mychaleckyj JC, Smith SG, Leak TS, Perlegas PS, Langefeld CD, Freedman BI, Rich SS, Bowden DW, Sale MM. Association of the distal region of the ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1 (ENPP1) gene with type 2 diabetes in an African American Population enriched for nephropathy. **Diabetes** 2008; 57(4):1057-1062.

Kim, K., Cho, S.K., Sestak, A., Namjou, B., Kang, C., Bae, S.C., Interferon gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 1247 50- 69, 2010.

Lange, C., *et al.* Management of patients with multidrug-resistant/ extensively drug-resistant tuberculosis in Europe, **TBNET consensus statement**, 44:23-63, 2014.

Leão, RNQ. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. In: Doenças Causadas por Bactérias. Belém: CEJUP: UEPA: **Instituto Evandro Chagas**, p.886, 2004.

Mashruwala, M.A., Smith, A.K., Lindsey, D.R., Moczygemba, M., Wetsel, R., Klein, J.R., Actor, J.K., and Jagannath C. A defect in the synthesis of Interferon- γ by the T cells of Complement-C5 deficient mice leads to enhanced susceptibility for tuberculosis. **NIH Public Access, Tuberculosis**. December v. 91(Suppl 1): S82–S89, 2011.

Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K: Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect mycobacterium tuberculosis infection - United States, 2010. **MMWR** 2010, 59(RR-5):1–25.

McKinney,JD., Honer Zu Bentrup, K ., Munoz-Elias, EJ *et al.* Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. **Nature**, v.406 p.735–8, 2003.

McMicking, JD. , Taylor GA, McKinney, JD. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47.**Science**; v.24:p.654–9, 2003.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes Brasília**, 13 de julho,2009.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose: **Guia da Vigilância Epidemiológica**. DF: Brasília; 2004.

Ministério da Saúde. Manual Técnico para o Controle da Tuberculose. Cadernos de Atenção Básica Nº6 Série A. **Normas e Manuais Técnicos Nº148**. 1st ed. DF: Brasília; 2002.

Moller, M., Nebel,A ., Van Helden, PD., Schreiber, S., Hoal, EG. Analysis of eight genes modulating interferon gamma and human genetic susceptibility to tuberculosis: a case–control association study. **BMC Infect Dis** v.10,p.154,2010.

Moon H, Lee J: Korean Guidelines for Tuberculosis. Korea: Joint Committee for the Development of Korean **Guidelines for Tuberculosis**; 2011.

Moran-Mendoza O, Marion SA, Elwood K, Patrick D, FitzGerald JM: Risk factors for developing tuberculosis: a 12-year follow-up of contacts of tuberculosis cases. **Int J Tuberc Lung Dis**2010, 14(9):1112–1119.

Möller M, Wit E, Hoal EG.Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis.**FEMS Immunol Med Microbiol** 2010; 58: 3-26.

Murray, PJ. Defining The requirements for immunologicas control of mycobacterial infections. **Trends Mycrobiology**,v.7,p. 366,1997.

North Jung, YJ. Immunity to Tuberculosis.**Immunol**,v.22,p. 599- 623, 2004.

Noton K., Dutta,aPetros C., Karakousisa,b., Latent Tuberculosis Infection: Myths, Models, and Molecular Mechanisms,**MMBR**, 3:78, 2014.

N.P. Santos, E.M. Ribeiro-Rodrigues, A.K. Ribeiro-Dos-Santos, R. Pereira, L.Gusmão, A. Amorim, J.F. Guerreiro, et al., Assessing individual interethnicadmixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL)ancestry-informative marker (AIM) panel, **Hum. Mutat.** 31 (2010) 184–190.

Pandolfi, JR ., Malaspina, AC., Santos, ACB ., Suffys, PN., Oelmann, MAC., Valentini, SR and Leite CQF Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Ciênc.Farm. Básica Apl.**, v. ,2007.

Roche,PW ., Triccas, JA ., Winter, N. BCG vaccination against tuberculosis: past disappointments and future hopes. **Trends Microbiol**, v.3,p.397–401,1995.

Rosemberg, J., Tarantino AB and Sobreiro MC .**Tuberculose**. In: Tarantino AB Doenças Pulmonares. 6ed. Rio de Janeiro. Ed Guanabara Koogan, p. 266–330,2008.

Rossouw, M., Nel, HJ., Cooke, GS., Van Helden, PD., Hoal EG. Association between tuberculosis, and a polymorphic NF kappa B binding site in the interferon gamma gene.**Lancet**,v.361p.1871– 2, 2003.

Sant'Anna, CC. Tuberculose na Infância e na Adolescência. **Editora Atheneu**, p.227,1985.

Santos L.C., Kipnis, APJ.and Kipnis, A .Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. **Patologia Tropical**, v. 36 (1),p.1-15,2007.

Santos NPC, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-Santos AKC, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SEB. Assessing Individual Interethnic Admixture and Population Substructure Using a 48–Insertion-Deletion (INSEL) Ancestry-Informative Marker (AIM) **Panel. Human Mutation 2010**; 31(2): 184-190.

Schulger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis.**Am J Respir Crit Care Med**; v.154,p.679, 1998.

Shih-Wei Lee., Tzu-Yi Chuang., Hsiu-Han Huang., Kuei-Fang Lee., Tina Tu-Wen Chen., Yung-Hsi., Kao, Lawrence., Shih-Hsin Wu. Interferon gamma polymorphisms associated with susceptibility to tuberculosis in a Han Taiwanese population,**Journal of Microbiology, Immunology and Infection**xx, p.1- 5,2013

Sodhi, A., Gong, J., Silva, C., Qian, D., Barnes, PF. Clinical correlates of interferon gamma production in patients with tuberculosis. **Clin Infect Dis**,v. 617,p.20- 25, 1997.

Sortica, VA., Maristela G Cunha., Maria Deise O Ohnishi., Jose M Souza., Ândrea KC Ribeiro-dos-Santos., Ney PC Santos., Sídia M Callegari-Jacques., Sidney EB Santos and Mara H Hutz, IL1B, IL4R, IL12RB1 and TNF gene polymorphisms are associated with *Plasmodium vivax* malaria in Brazil. **Malaria Journal**, 11:409, 2012.

Teixeira, HC., Abramo, C and Munk, ME. Diagnóstico imunológico da Tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **J Bras Pneumol**v.33(3),p.323-334, 2007.

Van de Vosse, E., Hoeve,M.A., Ottenhoff, T.H., 2004. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infectious Diseases* 4, 739–749.

van Helden, P.D., Moller, M., Babb, C., Warren, R., Walzl, G., Uys, P., Hoal, E., 2006. TB epidemiology and human genetics.**Novartis Foundation Symposium** 279, 17–31 (discussion 31–41, 216–9).

Vannberg, FO., Chapman, SJ., Khor, CC *et al.* CD209 genetic polymorphism and tuberculosis disease. **PLoS ONE** v.3,p.1388, 2008.

Velez, DR., Hulme,Wf., Myers, JL *et al.* NOS2A, TLR4, and *IFNGR1* interactions influence pulmonary tuberculosis susceptibility in African-Americans. **Hum Genet** v.126,p.643– 53,2009.

Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Be´guec, C., Wo lbeling, F., Kubica, T.,Kremer, K., van Soolingen D, Rsch-Gerdes S, Locht C, Brisse S *et al*/Origin, Spread and Demography of the Mycobacterium tuberculosis Complex. **PLoS Pathogv.** 4: e1000160,2008.

World Health Organization.Tuberculosis.**Fact sheet N°104**; 2010.

World Health Organization Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing.**WHO report**,2009.

World Health Organization (2013) Global Tuberculosis Report 2013.Geneva.

World Health Organization (2011) Towards the universal access to diagnosis

Yates, RM., Hermetter, A., Talor, GA., Russel DG. Macrophage activation down-regulates the degradative capacity of the phagosome. **Traffic**,v.8:241–50,2008.

Yu Yang., Xiangwei Li., Wei Cui., Ling Guan., Fei Shen., Jinsheng Xu., Feng Zhou., Mufei Li., Cong Gao., Qi Jin., Jianmin Liu and Lei Gao. Potential association of pulmonary tuberculosis with genetic polymorphisms of toll-like receptor 9 and interferon-gamma in a Chinese population, **BMC Infectious Diseases**, v.13,p.511,2013.

Zhou, J., Chen, D.Q., Poon, V.K., Zeng, Y., Ng, F., Lu, L., Huang, J.D., Yuen, K.Y., Zheng, B.J. A regulatory polymorphism in interferon-gamma receptor 1 promoter is associated with the susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. **Immunogenetics**v.61, p.423– 430,2009.