

1
2 Universidade Federal do Rio Grande do Sul
3 Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul
4 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
5
6
7
8
9
10
11
12

13
14 **Influência de Polimorfismos em Genes de Citocinas Pró-**
15 **e Anti-inflamatórias na Imunogênese da Tuberculose**
16 **Pulmonar em Adultos**
17
18
19
20
21
22

23 Tese de Doutorado

24 Mariana Milano Rodrigues
25
26
27
28
29

30 Porto Alegre, Novembro de 2015.

31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia do Rio Grande do sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Influência de Polimorfismos em Genes de Citocinas Pró-
e Anti-inflamatórias na Imunogênese da Tuberculose
Pulmonar em Adultos**

Tese Submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular da UFRGS como Requisito
Parcial para Obtenção do Grau de

Orientadora: Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti
Co-orientadora: Dra. Elis Regina Dalla Costa (FEPPS/CDCT)

Porto Alegre, Novembro 2015.

62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91

Instituições e Fontes Finciadoras

Este trabalho foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (FEPPS-RS) com a colaboração do Hospital Sanatório Partenon e Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul.

Fontes Financiadoras:

CAPES (Brasil) Bolsa de Doutorado.
CDCT/FEPPS-RS.

92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família que amo tanto, Mãe, Pai, Leonardo, Júlia, Lucas, Maria Fernanda, Luciano, Vó Manoela e Vó Alda, Vó Lalá e Glaci, minha segunda mãe.

124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154

Agradecimentos

Ao longo destes quatro anos de doutorado tive o apoio e o carinho de diversas pessoas que contribuíram de alguma forma para a concretização desse trabalho. Gostaria de agradecer...

À minha mãe, Fernanda, que não está mais aqui, mas que sempre foi uma incentivadora incondicional e incansável dos meus sonhos. Obrigada mãe por sempre acreditar em mim e sempre me fazer acreditar em mim também. Obrigada por todo amor, carinho, dedicação e apoio emocional que foram a base para o meu amadurecimento. Obrigada por ter sido a melhor mãe do mundo!

Ao meu pai, Humberto, pelo amor, carinho, incentivo e apoio nos momentos mais importantes, isso tem sido o meu porto seguro. Obrigada pelo respeito e cumplicidade de sempre. Obrigada pelos sábios conselhos, muitos dos quais eu não segui, porque sou igualzinha a ti e sigo sempre no que acredito.

À minha irmã, Júlia, que tem um coração gigante e de perto ou de longe é sempre a minha melhor amiga. Obrigada por todo amor, carinho e compreensão incondicionais.

Aos meus afilhados, Lucas e Maria Fernanda, vocês são a luz da minha vida! Obrigada por sempre me proporcionarem momentos de pura alegria e descontração juntos.

Ao meu noivo, namorado, marido Leonardo, obrigada pelo carinho e incentivo ao longo desses sete anos, entre mestrado e doutorado, juntos. Obrigada pela compreensão por tantas ausências e momentos de frustração e raiva. Obrigada pela cumplicidade e dedicação incancondicionais. E principalmente, obrigada pelas palavras certas nos momentos em que tudo parecia dar errado.

Às minhas Avós Manoela e Lalá por todo apoio desde minha vinda para Porto Alegre até a conclusão do doutorado. Obrigada pelo carinho e dedicação.

À Glaci pela excelente companhia, pelo bom papo, por sempre cuidar de mim com tanto carinho e pelos demorados cafezinhos durante um intervalo e outro escrevendo artigo e tese nesses longos cinco meses.

155 `As amigas de todos os momentos Tatiane, Karen, Raquel, Martinha e
156 Regina por compartilhar nossas experiências de vida e científicas seja no
157 laboratório ou nas nossas jantinhas.

158 A todos os colegas de laboratório, Serginho, Laura, Paulo, Rúbia, Marish,
159 Carolina, Cíntia, Tarci, Vico e Lucas pelo agradável ambiente de trabalho.

160 Ao carinho, ajuda e extrema dedicação dos estagiários Gabriel e Helen.

161 Ao amigo Rodrigo por todo carinho, dedicação e paciência nos
162 ensinamentos de padronização e análises de genotipagem e também pela
163 companhia de sempre nas pausas para os longos cafezinhos na copa.

164 Aos amigos Melaine, Adriano, Daniela, Jay, Meghan e Nicole pela
165 excelente recepção, companhia, ensinamentos e amizade verdadeira em
166 Berkeley.

167 Ao Dr. Milton Moraes e Carolina Carvalho pelos ensinamentos, paciência e
168 toda a ajuda com as análises estatísticas.

169 `A dedicada médica responsável pelo atendimento dos pacientes com
170 tuberculose, nossa colaboradora, Dra. Gisela. Obrigada pela parceria, pelos
171 ensinamentos, pela disponibilidade e atenção conosco sempre.

172 `A Marta Osório e a Simone do Laboratório de Micobactérias do Lacen,
173 sempre atenciosas e dedicadas. Obrigadas pelo carinho e ensinamentos.

174 Aos funcionários do Hospital Sanatório Partenon e Hemocentro do Estado
175 do Rio Grande do Sul pela receptividade e ajuda nas coletas.

176 Aos secretários do Programa de Pós-Graduação Luciano e Silvinha pelo
177 sempre bem-humorado atendimento e dedicação com os alunos.

178 `A minha orientadora, Dra. Maria Lucia Rossetti, pela oportunidade de me
179 receber em seu laboratório e pela confiança em me aceitar como aluna de
180 doutorado em um Programa de Pós-Graduação de excelência como o PPGBCM.
181 Obrigada por sempre acreditar no meu trabalho!

182 `A minha co-orientadora, Dra. Elis Regina, que mesmo sempre fazendo mil
183 coisas ao mesmo tempo consegue um tempinho para dizer uma palavra de
184 incentivo, apoio e carinho. Obrigada por ouvir meus desabafos e reclamações,
185 muitas vezes exagerado, sempre com bom humor.

186

187	Sumário	
188		
189	Lista de Abreviaturas	8
190	Resumo	10
191	Abstract	12
192	Introdução	14
193	1.1 Epidemiologia da Tuberculose	14
194	1.2 A Tuberculose e o bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
195	1.3 Curso Natural da Infecção por <i>M. tuberculosis</i>	18
196	1.3.1 Tuberculose Progressiva Primária	19
197	1.3.2 ILTB e Reativação da Infecção Latente.....	20
198	1.3 Imunopatogênese da Tuberculose.....	21
199	1.3.1 Forma de Contágio da TB	21
200	1.3.2 A Resposta Imune e a Formação do Granuloma na Infecção por <i>M. tuberculosis</i>	
201	21
202	1. 4 As Citocinas Alvos do Estudo e a Tuberculose	25
203	1.4.1 Interferon Gama	25
204	1.4.2 Fator de Necrose Tumoral Alfa	26
205	1.4.3 Interleucina 2	27
206	1.4. 4 Interleucina 4	29
207	1.4.5 Interleucina 6	30
208	1.4.6 Interleucina 10	31
209	1.4.7 Interleucina 17A	32
210	1. 5 Bases Genéticas da Tuberculose	33
211	Objetivos	36
212	2.1 Objetivo Geral.....	36
213	2.2. Objetivos Específicos.....	36
214	Resultados	37
215	Single Nucleotide Polymorphisms in IL17A and IL6 are Associated with Decreased Risk	
216	for Pulmonary Tuberculosis in Southern Brazilian Population	37
217	Discussão Geral	65
218	Conclusões	71
219	Perspectivas	72
220	Referências	73
221	Apêndices	89
222	Curriculum Vitae Resumido	96
223		
224		
225		

226 **Lista de Abreviaturas**

227

228 BCG Bacilo Calmette-Guérin

229 DC Células dendríticas

230 DC-SIGN *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-*
231 *integrin*

232 FDR *False discovery rate*

233 GWA *Genome-wide association*

234 HIV/AIDS Vírus da imunodeficiência humana/síndrome da imunodeficiência
235 humana adquirida

236 HLA *Human leukocyte antigen*

237 *IFNG* Interferon gama, símbolo oficial do gene

238 IFN- γ Interferon gama, proteína

239 IL- Interleucina

240 ILTB Infecção latente da tuberculose

241 MDR Multidroga-resistentes

242 MHC *Major histocompatibility complex*

243 NK Natural killer

244 NKT Célula T Natural killer

245 NRAMP1 *Natural resistance associated macrophage protein 1*

246 OMS Organização Mundial da Saúde

247 ROS *Reactive oxygen species*

248 SNP *Single-nucleotide polymorphism*

249 STAT *Signal transducer and activator of transcription*

250 TB Tuberculose

251 TB- MDR Tuberculose multidroga resistente

252 TBP Tuberculose pulmonar

253 TB-XDR Tuberculose extensivamente-resistente

254 TGF β *Transforming growth factor beta*

255 Th T *helper*

256 TNF Fator de Necrose Tumoral alfa, símbolo do gene

257 TNF- α Fator de Necrose Tumoral alfa, proteína
258 T_{reg}T reguladora
259 XDR extensivamente-resistente
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286

288 A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo
289 *Mycobacterium tuberculosis*, a qual ocupa a segunda posição mundial entre
290 causas de mortes por um único agente infeccioso. O desenvolvimento da
291 imunidade protetora e o controle da infecção por *M. tuberculosis* são amplamente
292 atribuídos a função desempenhada por citocinas pró e anti-inflamatórias. No
293 entanto, 90-95% dos indivíduos infectados com o bacilo conseguem conter ou
294 eliminar a infecção enquanto o restante desenvolve a TB ativa. As razões pelas
295 quais 5-10% dos indivíduos com competência imunológica completa são
296 suscetíveis à TB ainda permanecem desconhecidas. Porém, nas últimas
297 décadas, estudos epidemiológicos têm trazido fortes evidências de que
298 componentes genéticos humanos contribuem significativamente para essa
299 interindividual variabilidade na suscetibilidade à TB. Assim, o objetivo deste
300 trabalho foi avaliar a influência dos polimorfismos *IL2* -330 T>G (rs2069762); *IL4* -
301 590 C>T (rs2243250); *IL6* -174 G>C (rs1800795); *IL10* -592 A>C (rs1800872);
302 *IL10* -1082 G>G (rs1800896); *IL17A* -692 C>T (rs8193036); *IL17A* -197 G>A
303 (rs2275913); *TNF* -238 G>A (rs361525); *TNF* -308 G>A (rs1800629) e *IFNG* +874
304 T>A (rs2430561) localizados em genes de citocinas na suscetibilidade ao
305 desenvolvimento da tuberculose pulmonar (TBP) em uma população de adultos
306 do sul do Brasil. Os resultados obtidos sugerem fortemente um papel protetor para
307 os polimorfismo *IL17A* -197G>A (rs2275913) e *IL6*-174 G>C (rs1800795) no
308 desenvolvimento da TBP nessa população. O efeito protetor foi atribuído ao alelo
309 *IL17A*-197A (OR=0.29; p=0.04), genótipo AA (OR=0.12; p=0.04) e portadores do
310 alelo A (AG/AA) (OR=0.29; p=0.004). Da mesma forma, o polimorfismo *IL6*-
311 174G>C mostrou ter um efeito protetor no desenvolvimento da TBP em
312 portadores do alelo C (CC/CG) (OR= 0.46; p=0.04). Ambos os polimorfismos
313 mantiveram a significância estatística após a correção usando o teste FDR. Os
314 demais polimorfismos avaliados não mostraram evidências que suportem
315 associação ao desenvolvimento da TBP em adultos nesta população. Os
316 polimorfismos *IL17A* -692 C>T (rs8193036) e *IFNG* +874 T>A (rs2430561) foram

317 excluídos das análises porque não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em
318 conclusão, este trabalho identificou pela primeira vez na população do sul do
319 Brasil um efeito protetor dos polimorfismo *IL17A* -197 G>A e *IL6* -174 G>C no
320 desenvolvimento da TBP em adultos. Esses resultados indicam o papel
321 importante para as citocinas pro-inflamatórias *IL17A* e *IL6* na imunofisiologia da
322 TB.

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

Abstract

339

340 Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium*
341 *tuberculosis* bacillus, which ranks second worldwide position among causes of
342 deaths from a single infectious agent. The development of protective immunity and
343 control of infection by *M. tuberculosis* are largely attributed to the role of pro and
344 anti-inflammatory cytokines. However, 90-95% of individuals infected with bacillus
345 can contain or eliminate the infection while the remainders develop active TB. The
346 reasons why 5-10% of individuals with full immune competence are susceptible to
347 TB remain unknown. However, in recent decades, epidemiological studies have
348 brought strong evidence that human genetic components contribute significantly to
349 this interindividual variability in susceptibility to TB. Thus the aim of this work was
350 to evaluate the influence of polymorphisms *IL2* -330 T>G (rs2069762); *IL4* -590
351 C>T (rs2243250); *IL6* -174 G>C (rs1800795); *IL10* -592 A>C (rs1800872); *IL10* -
352 1082 A>G (rs1800896); *IL17A* -692 C>T (rs8193036); *IL17A* -197 G>A
353 (rs2275913); TNF -238 G>A (rs361525); TNF -308 G>A (rs1800629) and *IFNG*
354 +874 T>A (rs2430561) located in cytokine candidates genes in the susceptibility to
355 development of pulmonary tuberculosis in south Brazil population. The results
356 strongly suggest a protective role for the *IL17A* -197G > A (rs2275913) and *IL6*-
357 174 G>C polymorphism (rs1800795) in the development of pulmonary
358 tuberculosis in this population. The protective effect was attributed to *IL17A* -197
359 allele A (OR = 0.29; p = 0.04), AA genotype (OR = 0.12; p = 0.04) and carriers of
360 the A allele (AG / AA) (OR = 0.29; p = 0.004). Likewise, the *IL6* -174G>C shows
361 an association for C carriers (CC/CG) (OR= 0.46; p=0.04). Both polymorphisms
362 maintained the statistical significance after correction using FDR test. However, no
363 evidence of association was identified for any other polymorphism studied in this
364 population. *IL17A* polymorphisms -692 C>T (rs8193036) and *IFNG* +874 T>A
365 (rs2430561) polymorphisms were excluded from the analysis because they were
366 not in Hardy-Weinberg equilibrium. In conclusion, our results identified for the first
367 time in Southern Brazil population a protective role for *IL17A* -197 G>A and *IL6* -
368 174 G>C polymorphisms in adult pulmonary tuberculosis development. These

369 results indicate an important role for IL-17A and IL-6 pro-inflammatory cytokines in
370 immunophysiology of tuberculosis.

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382 **1.1 Epidemiologia da Tuberculose**

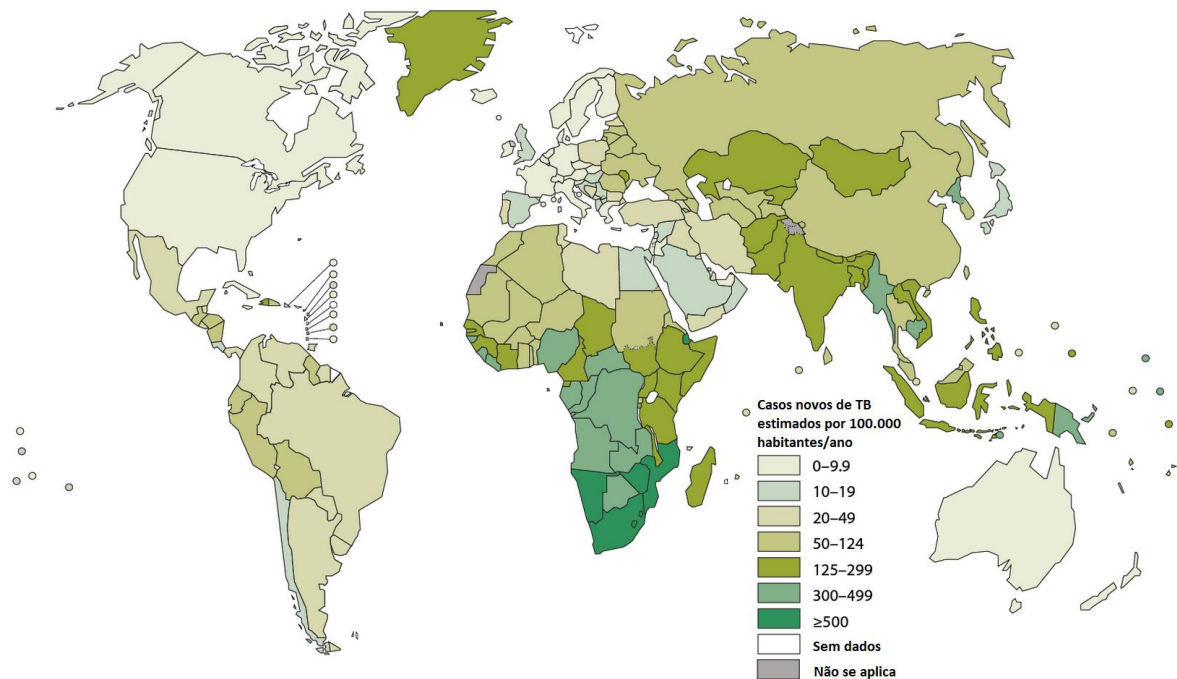
383

384 A TB ainda é um importante problema de saúde pública atingindo 9
385 milhões de indivíduos no mundo anualmente (WHO, 2015). Os dados reportados
386 anualmente pela OMS sobre a TB destacam a emergência da coinfeção com o
387 HIV, o surgimento e a propagação de cepas MDR e XDR e a indisponibilidade de
388 uma vacina eficaz como sinais preocupantes ao adequado controle da TB no
389 mundo (ABEL *et al.*, 2014; WHO, 2015). Caracteristicamente, esses dados
390 epidemiológicos mostram que a TB afeta principalmente grupos de indivíduos
391 mais vulneráveis, com 95% das mortes reportadas em países em
392 desenvolvimento econômico (WHO, 2015). Globalmente, observa-se uma maior
393 incidência da doença entre os indivíduos do sexo masculino e destaca-se a forma
394 pulmonar com mais de 85% dos casos notificados da TB (WHO, 2015). Não
395 surpreendentemente, a forma de apresentação clínica mais comumente
396 observada, a TBP, está diretamente associada ao modo de contágio e
397 propagação do bacilo da TB.

398 Em 2014, foi estimado que 1,5 milhão de pessoas morreram em
399 decorrência da TB no mundo (WHO, 2015). No mesmo período, 1,1 milhão dos
400 novos casos de TB foram relatados em indivíduos HIV/ AIDS e do total de novos
401 casos, 480 mil foram diagnosticados com TB-MDR, sendo que estimativas
402 mostram que 9% dos indivíduos com TB-MDR têm TB-XDR (WHO, 2015).
403 Mundialmente, a maior incidência de TB está no Sudeste da Ásia e Regiões do
404 Pacífico Ocidental (Figura 1), representando 58% dos novos casos da doença no
405 mundo (WHO, 2015). Cerca de 80% dos relatos de TB ocorreram em 22 países
406 prioritários. Alguns destes vêm exibindo um progressivo declínio nos casos da
407 doença, enquanto em outros os números estão reduzindo mais lentamente (WHO,
408 2015).

409 O Brasil está entre esses 22 países com maior carga de TB, no entanto
410 vem apresentando uma redução progressiva nos casos da doença nos últimos

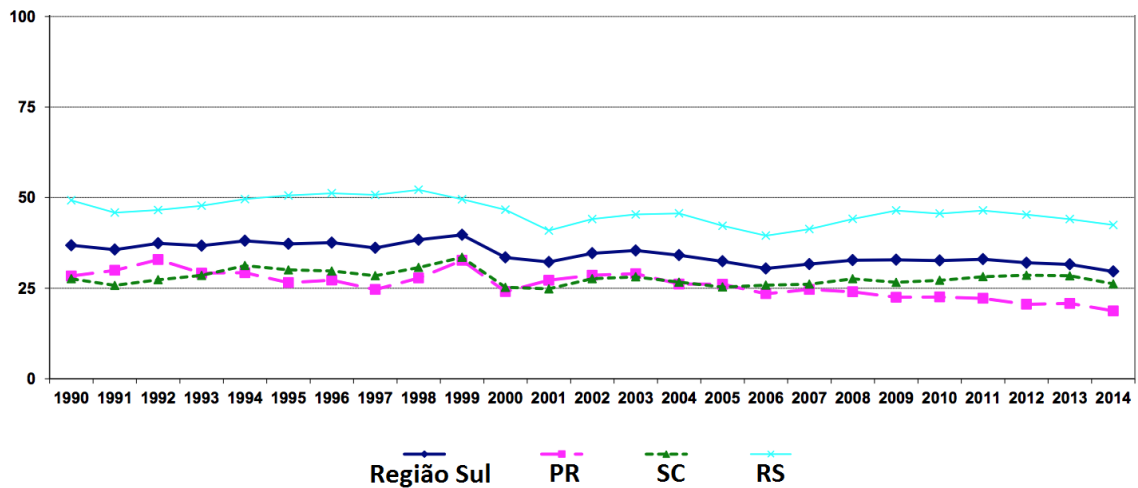
411 anos (WHO, 2015). A taxa de incidência da TB no Brasil ainda é considerada alta
412 e está estimada em 33.5/100.000 habitantes (WHO, 2015). O estado do Rio
413 Grande do Sul (RS) apresenta a taxa de incidência de 42,4/100.000 habitantes, a
414 qual se mantém como a maior da região sul do Brasil nos últimos 24 anos
415 (BRASIL, 2015), (Figura 2). A capital do estado do RS, Porto Alegre,
416 preocupantemente é a Capital com o maior coeficiente de incidência da TB,
417 estimada em 99.3/100.000 habitantes (Figura 3), (BRASIL, 2015) se aproximando
418 de índices observados para alguns países africanos e asiáticos.
419
420



421

422 Figura 1. Taxas estimadas de incidência para tuberculose no mundo (Fonte: WHO, 2015)

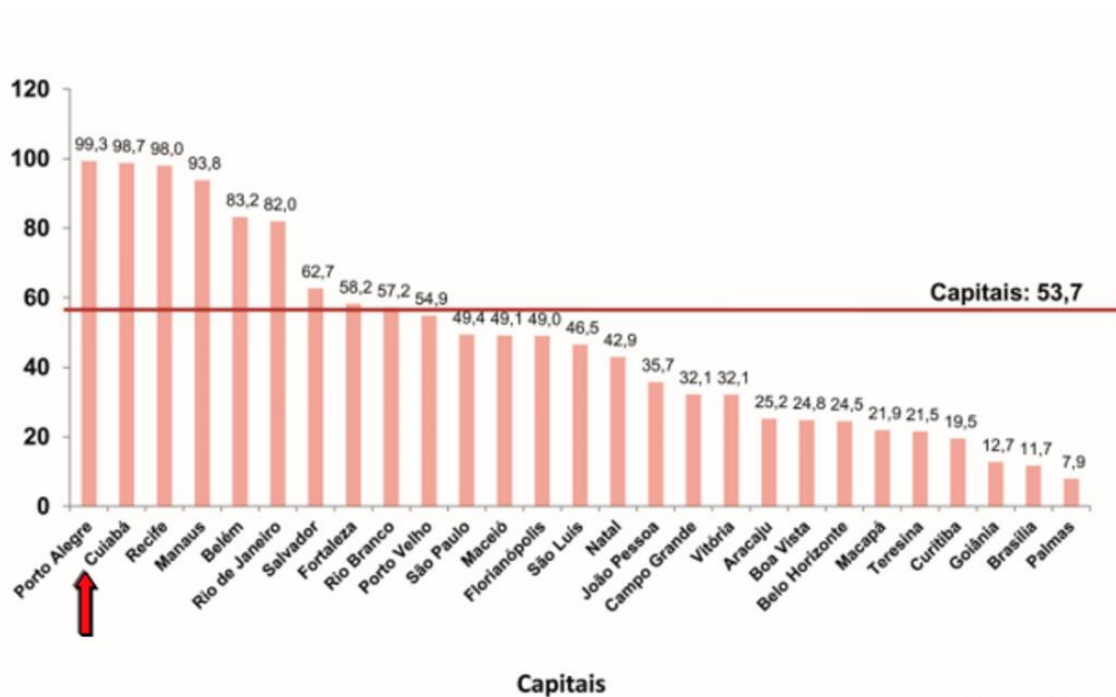
423



424

425 Figura 2. Taxas estimadas de incidência da tuberculose na região Sul 1990 a 2014
 426 (Fonte: BRASIL, 2015).

427



428

429 Figura 3. Taxas estimadas de incidência da tuberculose por capitais brasileiras (Fonte:
 430 BRASIL, 2015).

431

432

433

434

435

436

437

1.2 A Tuberculose e o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*

438
439

440 O agente etiológico da TB em humanos, *M. tuberculosis*, é um bacilo
441 pertencente à família Mycobacteriaceae (BARRERA, 2002). A maioria das
442 micobactérias são saprófitas e vivem e se replicam livremente em ecossistemas
443 naturais e raramente são capazes de causar doença. No entanto, algumas
444 micobactérias evoluíram e se tornaram importantes agentes patogênicos na área
445 clínica, adquirindo a capacidade de infectar o interior de células fagocíticas
446 mononucleares (BOTTAI *et al.*, 2014). Os bacilos que causam a TB estão
447 agrupados no complexo *Mycobacterium tuberculosis* dos quais fazem parte: *M.*
448 *bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*
449 e *M. caprae* (ALEXANDER *et al.*, 2010). As diferentes espécies que causa a
450 doença, caracteristicamente, apresentam tropismo por hospedeiros distintos
451 (BROSH *et al.*, 2012). Em humanos, *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. canettii*
452 são primariamente patogênicos.

453 A TB é considerada uma enfermidade de elevada magnitude e importância
454 global a qual se mantém no topo entre as doenças infecciosas que mais mortes
455 causa no mundo (WHO, 2015). A TB é uma doença infectocontagiosa que
456 tipicamente manifesta-se como uma doença pulmonar, porém caracteristicamente
457 desenvolve manifestações sistêmicas incluindo febre, anorexia, perda de peso e
458 suor noturno (FLYNN & LIN, 2011; O'GARRA *et al.*, 2013). A doença causada por
459 *M. tuberculosis* é considerada uma doença complexa e, por isso, o seu
460 desenvolvimento é atribuído a importantes interações entre fatores do ambiente,
461 do hospedeiro e do patógeno (O'GARRA *et al.*, 2013). Entre os fatores de risco
462 associados ao desenvolvimento desta doença, estão diretamente relacionados à
463 infecção por HIV/AIDS, ao diabetes mellitus e a fatores relacionados a pobreza
464 como, por exemplo, ambientes superlotados, mal ventilados e malnutrição
465 (YOUNG *et al.*, 2008).

466 Na maioria dos países economicamente desenvolvidos, as estratégias de
467 combate à TB ainda são amplamente dependentes da parcial eficácia da vacina
468 BCG, do diagnóstico precoce e no tratamento dos casos ativos da doença
469 (GIDEON & FLYNN, 2011). No entanto, a vacina BCG é capaz de reduzir o risco
470 de desenvolvimento da TB apenas em 50% nos adultos e sua eficácia pode variar

471 de 0 a 80% entre diferentes populações (COLDITZ *et al.*, 1994; BREWER, 2000).
472 Além disso, na TBP, a identificação da presença de micobactéria em exame de
473 microscopia direta apresenta uma sensibilidade que varia entre 32 a 97%
474 (STEINGART *et al.*, 2006). E por isso, o padrão ouro no diagnóstico da TB requer
475 o isolamento e a confirmação da presença do bacilo por exame de cultura, a qual
476 pode levar mais de seis semanas devido a características próprias do crescimento
477 lento dessa micobactéria (PFYFFER *et al.*, 1997).

478 Estimativas da OMS apontam que 2 a 3 bilhões de indivíduos no mundo
479 estão latentemente infectados por *M. tuberculosis*, caracterizando a ILTB, a qual
480 não apresenta qualquer sintoma clínico, nem tampouco é capaz de ser
481 transmitida (WHO, 2015). No entanto, estudos epidemiológicos mostram que 5 a
482 10% dos indivíduos imunocompetentes infectados desenvolverão a TB ativa, por
483 razões ainda desconhecidas, enquanto o restante é capaz de eficientemente
484 conter a infecção (SCHURR *et al.*, 2007; O'GARRA *et al.*, 2013, ABEL *et al.*,
485 2014).

486 Consequentemente, essa variabilidade interindividual para o
487 desenvolvimento da TB vêm despertando o interesse de pesquisadores e
488 contribuindo com estudos adicionais para avaliação da influência de fatores
489 genéticos do hospedeiro na maior suscetibilidade ao seu desenvolvimento (ABEL
490 *et al.*, 2014). Esses estudos trouxeram fortes evidências da influência de fatores
491 genéticos do hospedeiro humano na suscetibilidade ao desenvolvimento da TB,
492 bem como foram capazes de apontar a importância de genes relacionados a
493 resposta imune no controle da infecção micobacteriana (BELLAMY *et al.*, 1998;
494 MÖLLER *et al.*, 2010; PACHECO *et al.*, 2008).

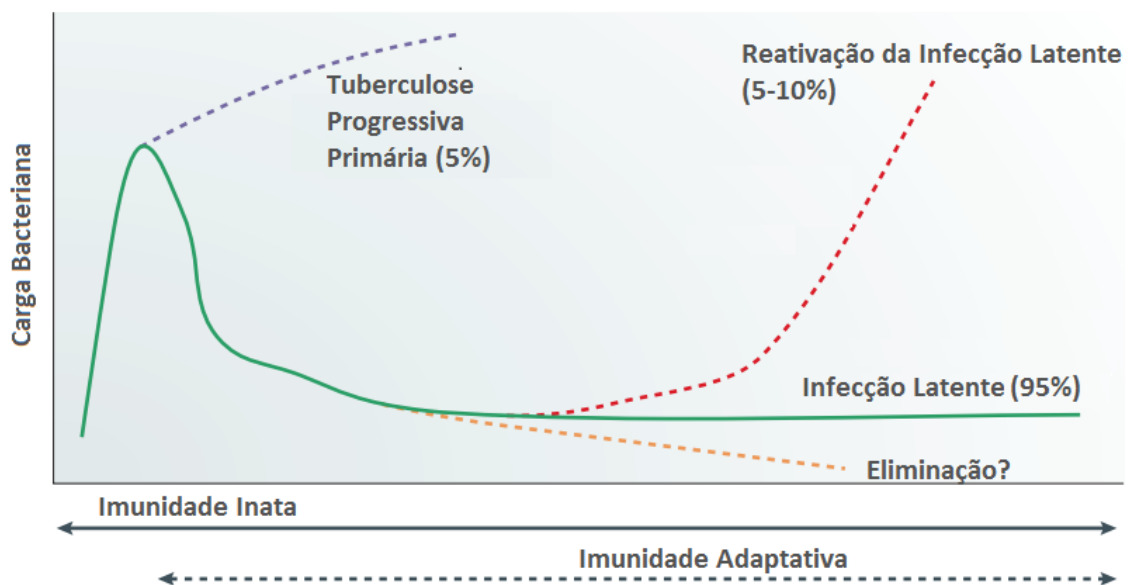
495

496 **1.3 Curso Natural da Infecção por *M. tuberculosis***

497

498 Apesar dos altos níveis de exposição ao bacilo *M. tuberculosis* a que
499 algumas pessoas são submetidas, observa-se que 10-20% destas não são
500 infectadas (ALCAÏS *et al.*, 2005; ABEL *et al.* 2014), sugerindo que essa porção de
501 indivíduos apresenta resistência ao bacilo. O restante dos indivíduos, 80-90%,
502 tornam-se infectados e seguem três possíveis cursos para infecção: (i) 5% da

503 população infectada desenvolve rapidamente a TB exibindo os sintomas clássicos
 504 da doença ativa, caracterizando a TB progressiva primária (ii) 95% dos indivíduos
 505 infectados não apresentam sintomas da doença, mas desenvolvem uma resposta
 506 imune adaptativa eficiente e são descritos como portadores de ILTB e (iii) 5-10%
 507 dos indivíduos com ILTB reativam esta infecção e desenvolvem a TB pós-
 508 primária, ou também conhecida como TB secundária (YOUNG *et al.* 2009;
 509 GIDEON & FLYNN, 2011; ABEL *et al.*, 2014).
 510



511
 512 Figura 6. A história natural da infecção por *M. tuberculosis*. Os sistemas imune inato e
 513 adaptativo permitem que indivíduos imunocompetentes (> 90%) controlem o crescimento
 514 de *M. tuberculosis*, entretanto esses indivíduos permanecem latentemente infectados
 515 (não se sabe se a resposta imune do hospedeiro pode eliminar a infecção). Alguns
 516 indivíduos, especialmente aqueles com a função das células T prejudicada, desenvolvem
 517 TB ativa, quer como progressão primária ou como reativação da ILTB (Adaptado de
 518 Harding & Boom, 2010).
 519
 520

521 1.3.1 Tuberculose Progressiva Primária

522
 523 Aproximadamente 5% dos indivíduos desenvolvem a TB ativa após a
 524 infecção inicial imediata ou após um período de latência, normalmente 1-2 anos
 525 (ZUMLA *et al.*, 2013). A TB progressiva primária geralmente ocorre em
 526 consequência da multiplicação local e propagação do bacilo para outros focos

527 pulmonares ou propagação através da via hematogênica (GIDEON & FLYNN,
528 2011). Essa forma é particularmente comum em crianças, algumas das quais
529 desenvolvem a TB severa primária, denominada hematogênica disseminada
530 (STEWART *et al.*, 2003). O risco do desenvolvimento da TB severa primária
531 permanece altamente dependente da idade na primeira infecção, reduzindo de
532 10-20% em crianças com menos de 1 ano para menos que 0,5% em crianças
533 maiores de 5 anos (MARAIS *et al.*, 2006; CRUZ & STARKE, 2007). As formas
534 severas mais comuns em crianças são principalmente a forma miliar e aquelas
535 que afetam o sistema nervoso central, causando meningite (MARAIS *et al.*, 2006;
536 CRUZ & STARKE, 2007). A vacina BCG promove proteção contra as formas
537 disseminadas na infância, embora essa proteção não seja considerada completa
538 (MAARTENS & WILKINSON, 2007).

539

540 **1.3.2 ILTB e Reativação da Infecção Latente**

541

542 A maioria dos indivíduos infectados por *M. tuberculosis*, aproximadamente
543 95%, nunca manifesta a TB ativa, desenvolvendo apenas a ILTB (ABEL *et al.*,
544 2014). A ILTB é definida por ausência de sintomas clínicos da TB em presença de
545 evidências imunológicas da sensibilização por *M. tuberculosis*, como já descrito
546 anteriormente (BARRY *et al.*, 2009; GIDEON & FLYNN, 2011; ESMAIL *et al.*,
547 2014). O desenvolvimento da TB latente, em parte, é atribuído a uma potente
548 resposta imune, a qual conduz o bacilo a uma fase estacionária, tornando-o não
549 replicativo. Porém, mantendo sua capacidade de retomar seu crescimento sob
550 condições favoráveis (CARDONA, 2007).

551 Com relação a TB pós-primária, esta é tipicamente uma doença pulmonar
552 crônica de adultos que se manifesta anos ou décadas após a infecção inicial
553 (LILLEBAEK *et al.*, 2003). Esse processo pode ser ativado por infecção com
554 HIV/AIDS ou tratamentos com anti-TNF (PHILIPS & ERNEST, 2012), sugerindo
555 importante papel dessas citocinas no controle da TB.

556 A progressão para TB ativa é amplamente atribuída a falhas no controle
557 imunológico do indivíduo. Entretanto, a patogênese da reativação em indivíduos
558 imunocompetentes permanece desconhecida (O'GARRA *et al.*, 2013). A resposta

559 imune observada nesses indivíduos frequentemente conduz a lesões patológicas
560 caracterizadas por extensa destruição do tecido pulmonar com cavitações e
561 apresentação de lesões no lobo superior do pulmão (GIDEON & FLYNN, 2011).

562

563 **1.3 Imunopatogênese da Tuberculose**

564

565 **1.3.1 Forma de Contágio da TB**

566

567 A exposição à *M. tuberculosis* ocorre quando partículas infecciosas
568 expelidas através das vias aéreas de indivíduos com TBP ativa atingem as vias
569 respiratórias de indivíduos não infectados (GIDEON & FLYNN, 2011). Conforme
570 observado em estudos com modelos animais, a quantidade de partículas
571 infecciosas capaz de causar a infecção é geralmente muito baixa, 1-5 bacilos, e a
572 implantação primária pode ocorrer em qualquer parte no pulmão
573 (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 1994). No entanto, o tamanho das partículas parece
574 exercer forte influência sob o local da implantação entre os lobos pulmonares. Os
575 bacilos inalados comportam-se como partículas de gás onde seguem até atingir o
576 trato respiratório.

577

578 **1.3.2 A Resposta Imune e a Formação do Granuloma na Infecção por** 579 ***M. tuberculosis***

580

581 Até atingir os alvéolos pulmonares o bacilo interage com células epiteliais,
582 pneumócitos alveolares tipo II, macrófagos alveolares, células dendríticas e
583 neutrófilos (O'GARRA *et al.*, 2013). A interação de receptores de reconhecimento
584 padrão patógeno-associadas (PAMPS), os quais são capazes de reconhecer
585 vários fatores codificados pelo bacilo, como os componentes da membrana
586 celular micobacteriana, moléculas secretadas e ácidos nucleicos micobacterianos
587 (JO *et al.*, 2007; PHILIPS & ERNEST, 2012). Essa interação entre o bacilo e as
588 células do sistema imune resultam na secreção de quimiocinas e citocinas,
589 destacando principalmente as citocinas TNF- α , IL-12 e o INF- γ , as quais são
590 particularmente críticas na imunidade protetora na TB (HARDING & BOOM,

591 2010). Estas células também liberam β -defensinas, surfactantes e espécies
592 reativas de oxigênio (ROS) os quais são potentes moléculas microbicidas (LEE
593 *et al.*, 2009).

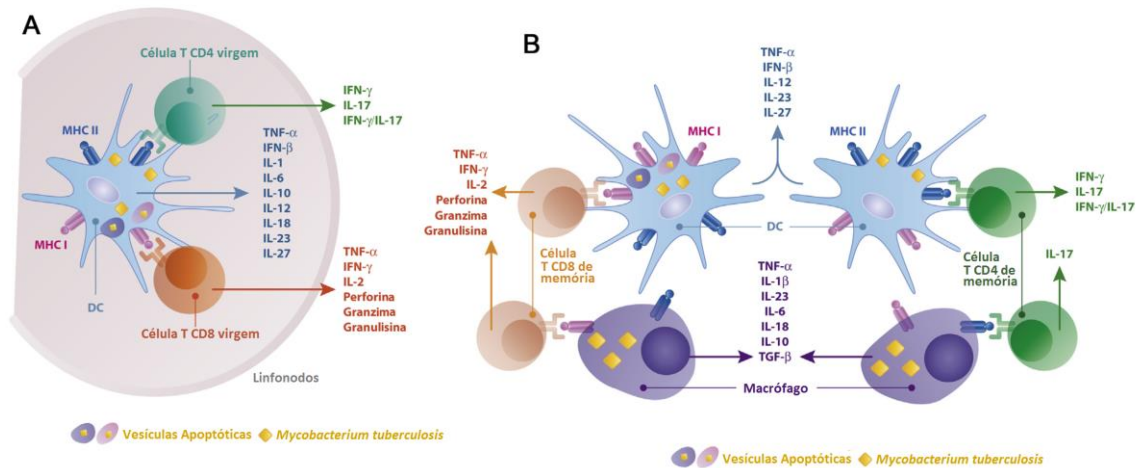
594 Cabe mencionar que as citocinas pro-inflamatórias TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-
595 18 e anti-inflamatória IL-10 são rapidamente secretadas por macrófagos
596 infectados no pulmão e mantidas em níveis elevados durante o processo
597 infeccioso (ETNA *et al.*, 2014).

598 Estima-se que após 8-12 dias do início da infecção as DCs infectadas
599 migram ao linfonodo mais próximo sob influência da IL-12 (p40) e IL-12p70 e das
600 quimiocinas CCR7, CCL19 e CCL21 (ERNEST, 2012; RAMAKRISHNAN, 2012;
601 O'GARRA *et al.*, 2013). Já nos linfonodos, as DCs apresentam antígenos
602 micobacterianos às células T virgens através de moléculas do complexo de MHC.
603 As moléculas de MHC classe II expressas na superfície celular das DCs
604 medeiam a apresentação dos antígenos micobacterianos às células T CD4+ e as
605 moléculas MHC classe I são responsáveis por apresentar antígenos
606 micobacterianos às células T CD8+ (HARDING & BOOM, 2010). O
607 reconhecimento dos antígenos micobacterianos ativa a produção de IL-12 e IFN- β
608 para a polarização dos linfócitos T CD4+ em células Th1 (HARDING & BOOM,
609 2010; O'GARRA *et al.*, 2013).

610 Logo após, as células Th1 antígeno-específicas migram ao sítio da
611 infecção pulmonar produzindo principalmente INF- γ (O'GARRA *et al.*, 2013). O
612 INF- γ é considerado a principal citocina da resposta Th1 e seus efeitos levam a
613 ativação de macrófagos, indução da produção de fatores microbicidas, aumento
614 da expressão de moléculas de MHC e reforço na produção de importantes
615 citocinas (HARDING & BOOM, 2010; ERNEST, 2012; O'GARRA *et al.*, 2013). O
616 balanço entre a imunidade do hospedeiro mediada pela produção de diversas
617 citocinas pro- e anti-inflamatórias e a multiplicação dos bacilos são considerados
618 fatores chave no resultado da infecção (GIDEON & FLYNN, 2011).

619 Uma característica comum na infecção por *M. tuberculosis* é o atraso na
620 formação da resposta imune adaptativa, sendo observada em humanos após 42
621 dias da infecção inicial (ERNEST, 2012). Esse atraso parece possibilitar ao bacilo
622 crescer e se replicar mais livremente no pulmão infectado durante este período.

623 Ainda assim, a maioria dos indivíduos são assintomáticos nas etapas que
 624 seguem a exposição/infecção inicial, mas alguns podem apresentar febre ou
 625 outros sintomas inespecíficos (PONNUSWAMY, 2014).
 626



627
 628 Figura 4. Uma visão geral da resposta imune nas etapas iniciais que seguem a infecção
 629 por *M. tuberculosis*. São apresentadas as principais citocinas produzidas durante os
 630 estágios iniciais da infecção pulmonar e migração para os linfonodos, algumas das
 631 dessas citocinas possuem polimorfismos genéticos que são potenciais candidatos para
 632 influência do resultado da infecção por *M. tuberculosis*.(a) ao contrário das DCs, os
 633 macrófagos ativados são principalmente envolvidos na estimulação de células de
 634 memória T CD4 + e CD8 + no tecido infectado (b) a geração de subconjuntos específicos
 635 de linfócitos T depende fortemente do microambiente de citocinas produzidas pelas
 636 células apresentadoras de antígenos. Em particular, as DCs possuem a capacidade
 637 peculiar de produzir IL-12, IL-23, IL-27 e IFN- γ enquanto os macrófagos são o principal
 638 produtores de outros mediadores pró-inflamatórios e células reguladoras, tais como TNF-
 639 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-10 e TGF- β (Adaptado de Etna *et al.*, 2014).
 640

641 Após o estabelecimento da resposta imune inicial e o recrutamento de
 642 novos tipos celulares ao foco da resposta inflamatória pulmonar uma lesão
 643 primária amadurece representando o início da formação do granuloma (GYDEON
 644 & FLYNN, 2011). O sistema imune de aproximadamente 95% dos indivíduos
 645 imunocompetentes infectados é capaz de controlar o patógeno neste estágio
 646 contendo a propagação do bacilo para outros focos de infecção e estabelecendo
 647 a ILTB (GENGENBACHER & KAUFMANN, 2012). A ILTB não manifesta sinais ou
 648 sintomas clínicos que possam ser percebidos pelo indivíduo ou pelo médico
 649 (ESMAIL *et al.*, 2014), mas manifesta evidências imunológicas de sensibilização
 650 por proteínas micobacterianas (GYDEON & FLYNN, 2011) inferida por prova
 651 tuberculínica positiva ou por testes *in vitro* que determinam a produção de INF- γ a

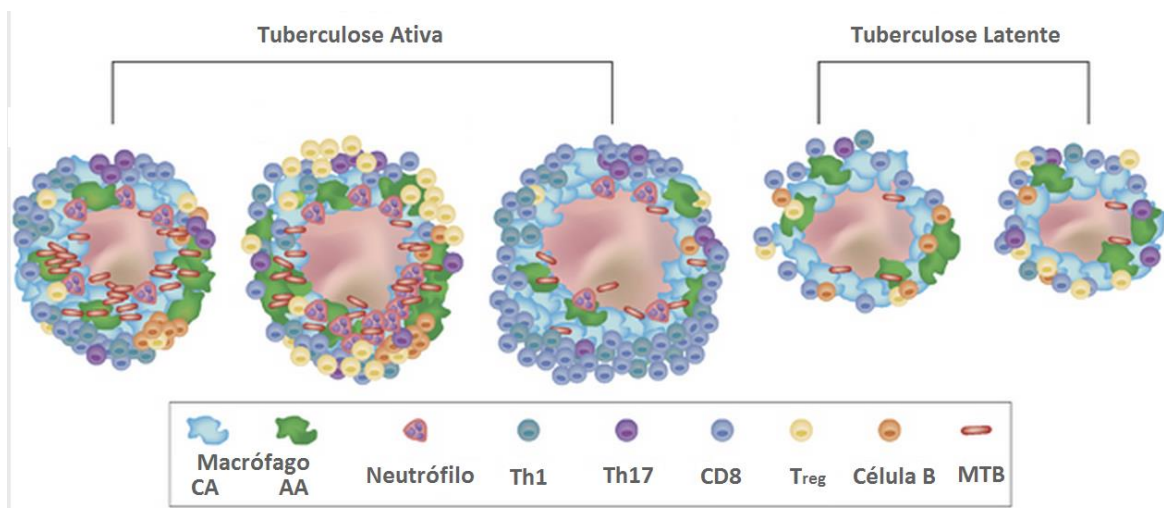
652 antígenos específicos (PAI *et al.*, 2008, RUSSEL *et al.*, 2010). Ambos os testes se
653 baseiam na resposta das células Th1 de memória ao derivado purificado da
654 proteína tuberculina, na prova tuberculínica; e a antígenos especificamente
655 secretados por *M. tuberculosis*, nos testes baseados na produção de INF- γ .
656 Embora os ensaios da produção do INF- γ antígeno-específico tenham
657 demonstrado maior sensibilidade e especificidade quando comparado `a prova
658 tuberculínica, nenhum dos testes descritos é capaz de diferenciar o indivíduo com
659 ILTB daquele com a TB ativa (LALVANI & PAREEK, 2010).

660 A contenção do bacilo no granuloma é a fonte do dano tecidual e determina
661 a correlação entre a proteção e a patologia na TB (REECE & KAUFMANN, 2012).
662 Os macrófagos são considerados o tipo celular predominante na formação inicial
663 do granuloma, mas células T CD4+ e T CD8+, células B, neutrófilos, células NKT,
664 células TCD1 $\alpha\beta$ e fibroblastos são observadas ao longo da maturação desta
665 estrutura (FLYNN *et al.*, 2011; GIDEON & FLYNN, 2011; ETNA *et al.*, 2014).

666 Além disso as células T $\gamma\delta$ e TCD1-restritas com especificidade para
667 antígenos não protéicos também são estimuladas e servem para moldar o
668 subsequente desenvolvimento da resposta imune dominante Th1 (PIETERS *et al.*,
669 2008). A expressão precoce de IL-17 exerce um papel essencial como mediador
670 do recrutamento celular, atuando principalmente sobre neutrófilos e células T
671 (GOPAL *et al.*, 2014). As células T reguladoras formam um subconjunto de
672 linfócitos T CD4+ que auxiliam na secreção de citocinas, como a IL-10 e TGF β e
673 minimizam a destruição do tecido permitindo o estabelecimento da infecção
674 crônica (FLYNN *et al.*, 2011).

675 Assim, as diferentes composições de granulomas podem ser observadas
676 tanto na TB ativa quanto na ILTB (FLYNN *et al.*, 2011). Em humanos, o
677 granuloma mostra alta plasticidade e três principais tipos podem ser observados:
678 (i) o granuloma sólido, o qual retêm os bacilos, (ii) granuloma necrótico, típico dos
679 estágios iniciais da TB ativa e (iii) o granuloma caseoso, tipicamente observado
680 nos estágios tardios da TB (GENGENBACHER & KAUFMANN, 2012).

681



682

683 Figura 6. Representação esquemática dos tipos celulares predominantes na formação do
 684 granuloma durante a TB ativa e a ILTB (Adaptado de Flynn *et al.*, 2011).

685

686 CA classicamente ativado, AA alternativamente ativado

687

688

689 1. 4 As Citocinas Alvos do Estudo e a interação com a 690 Tuberculose

691 1.4.1 Interferon Gama

692

693 O IFN- γ é invariavelmente detectado seja como proteína ou RNAm em
 694 sítios de infecção por *M. tuberculosis* e amplamente expressos por células
 695 monocleares de sangue periférico expostas a antígenos micobacterianos
 696 (O’GARRA *et al.*, 2013). Esta citocina é secretada por células T CD4+, as quais
 697 são amplamente dependentes da produção da IL-12 (p40/p35) para sua
 698 polarização (COOPER *et al.*, 1997; FLYNN & CHAN, 2001; KHADER *et al.*, 2006).
 699 Quatorze genes que impactam de forma mendeliana a suscetibilidade a
 700 microbactérias não virulentas foram caracterizados e pertencem a via *IL12/IFNG*
 701 (SCHURR *et al.*, 2011). Esses achados contribuíram para o estabelecimento da
 702 importância crítica do IFN- γ na imunidade protetora a infecções micobacterianas
 703 e para sua relação com as formas severas de TB na infância (JOUANGUY *et al.*,
 704 1997; ABEL *et al.*, 2014). Todos os defeitos genéticos identificados são
 705 fisiologicamente relacionados e resultam em falha da resposta imune mediada por
 706 IFN- γ (ABEL *et al.*, 2014).

707 O gene *IFNG* localizado na região cromossômica 12q24.1 compreende 4
708 éxons que codificam 146 aminoácidos e três íntrons (THYE *et al.*, 2009). Esse
709 gene é altamente conservado e poucos SNPs são encontrados na região
710 intragênica (PACHECO *et al.*, 2008). Entre estes, o SNP mais estudado é o *IFNG*
711 +874T>A, o qual está localizado no primeiro íntron e adjacente a um polimorfismo
712 de repetição CA (PRAVICA *et al.*, 2000). O Alelo +874T parece contribuir para
713 maior preferência de ligação do fator de transcrição NF-kB, resultando no
714 aumento da expressão do gene *IFNG* (ROSSOUW *et al.*, 2003; ANSARI *et al.*,
715 2009). Embora o alelo T tenha sido associado à proteção à TB em diversos
716 estudos (PACHECO *et al.*, 2008), a influência deste polimorfismo na população
717 brasileira apresenta resultados ainda conflitantes quanto a influência do *IFNG*
718 +874T>A no resultado da TB (AMIM *et al.*, 2008; LEANDRO *et al.*, 2013).

719

720 **1.4.2 Fator de Necrose Tumoral Alfa**

721

722 O gene *TNF* está localizado no cromossomo 6p21.3 justaposto à região do
723 HLA classe III (CARDOSO *et al.*, 2011). O TNF- α é uma citocina pro-inflamatória
724 pleiotrópica produzida durante a TB por diferentes tipos celulares como os
725 macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células T CD4+ e T CD8+ tanto
726 quanto por células NK (FLYNN & CHAN, 2001; O'GARRA *et al.*, 2013). A
727 produção precoce de TNF- α é necessária para modular a biogênese e a
728 integridade dos granulomas (DORHOI *et al.*, 2014). O TNF- α , assim como o IFN-
729 γ , é uma citocina abundante nos sítios persistentes de infecção pulmonar de
730 pacientes com TB (LAW *et al.*, 1996) e também detectada nos modelos
731 experimentais da doença (O'GARRA *et al.*, 2013), sugerindo que ocorre
732 estimulação ativa desta citocina na presença da micobactéria. Por conseguinte,
733 as perturbações dos níveis de TNF- α afetam significativamente o curso da
734 infecção e da patogênese da TB, tanto na TB progressiva primária quanto na
735 reativação da ILTB. Esse fenômeno tem sido observado em humanos devido à
736 reativação da doença em indivíduos com ILTB tratados com inibidores do TNF- α
737 (WALLIS, 2008).

738 Corroborando com o importante papel atribuído a essa citocina durante a

739 infecção micobacteriana, um locus denominado TNF1 foi identificado no
740 cromossomo 11p15 associado à produção de TNF- α em consequência da
741 exposição à BCG e INF- γ + BCG em região hiperendêmica para TB no sul da
742 África (COBAT *et al.*, 2013). Esse importante achado sugere fortemente uma
743 ligação do controle genético induzido por *M. tuberculosis* na produção de TNF- α .

744 Estudos tipo caso-controle têm demonstrado a influência de variantes
745 polimórficas deste gene em doenças infecciosas (CARDOSO *et al.*, 2011;
746 GRANDI *et al.*, 2014). Na TB, alguns estudos de meta-análise avaliaram a
747 associação do polimorfismo mais estudado do gene *TNF*, o SNP -308G>A à
748 suscetibilidade à TB. Entretanto, os mesmos não incluem qualquer trabalho
749 realizado em populações brasileiras. Além disso, mesmo os estudos de meta-
750 análise divergem quanto a associação do SNP -308G>A e a TB (PACHECO *et al.*,
751 2008; WANG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012; LEE & SONG
752 2015) entre asiáticos, africanos, europeus e americanos. Provavelmente devido
753 ao reduzido número de estudos de associação entre os SNPs -308G>A e -
754 208G>A e a TB entre indivíduos americanos e europeus.

755

756 **1.4.3 Interleucina 2**

757

758 A citocina IL-2 é responsável por influenciar os vários subconjuntos de
759 linfócitos durante a diferenciação, a resposta imune e a homeostasia. Os
760 estímulos gerados por essa citocina são cruciais para diferenciação das células T
761 CD4+ em um definido subconjunto de células T efectoras tanto quanto para a
762 manutenção das células T_{reg} (BOYMAN & SPRENT, 2012). Em condições
763 normais, a IL-2 é produzida principalmente por células T CD4+ nos órgãos
764 linfáticos secundários e gera efeitos autócrinos e parácrinos sobre as células T
765 CD8+ e T_{reg} (BOYMAN & SPRENT, 2012)

766 Na diferenciação das células T CD4+ antígeno-específica, a IL-2
767 desempenha um importante papel na geração da resposta Th17, a qual produz a
768 citocina IL-17. Em ausência dos sinais gerados pela IL-2 ocorre a redução
769 substancial das células T_{reg}, ao mesmo tempo que o número de células Th17
770 aumenta expressivamente. Esse efeito foi associado previamente a maior

771 suscetibilidade a doenças autoimunes e inflamatórias (LITTMAN & RUDENSKY,
772 2010). Como consequência, essa observação conduziu ao conceito de que os
773 sinais gerados pela IL-2 são cruciais ao equilíbrio entre as células Th17 e as
774 células T_{reg} FOXP3+. Os sinais moleculares associados ao controle exercido pela
775 IL-2 sobre a resposta Th17 envolvem a redução dos níveis de expressão de
776 IL6R β , que juntamente com o IL6R α formam o IL-6R, o qual é necessário ao
777 desenvolvimento das células Th17 (LIAO *et al.*, 2011).

778 Os sinais gerados pela IL-2 também influenciam a polarização das células
779 T CD4+ efectoras em células Th1 e Th2. A polarização em células com fenótipo
780 Th1 dependem de sinais gerados pela IL-12, a qual leva a indução do fator de
781 transcrição de células Th1, Tbet, via STAT4. Tbet então induz a produção de IFN-
782 γ , o qual é reforçado pela co-produção de IL-2 (LIAO *et al.*, 2011).

783 Similarmente a geração da resposta Th1, o estímulo da IL-2 também é
784 necessário a diferenciação das células Th2. As células com fenótipo Th2 são
785 conhecidas por expressar níveis elevados de GATA3 e produzem as citocinas IL-
786 4, IL-5 e IL13 em grandes quantidades. A IL-2 induz a expressão precoce da IL-
787 4R α e mantém a configuração acessível do loci do gene *IL4* e *IL13* durante os
788 estágios finais da diferenciação das células Th2 (COTE-SIERRA *et al.*, 2004;
789 LIAO *et al.*, 2008).

790 Na TB, estudos mostram que a presença de células T multifuncionais
791 secretoras de IL-2, INF- γ e TNF- α estão associadas a resposta imune protetora
792 ao bacilo *M. tuberculosis* (FORBES *et al.*, 2008). Interessantemente, um perfil
793 similar foi observado nos pacientes com TB após o início do tratamento da
794 doença (MILLINGTON *et al.*, 2007; WILKINSON & WILKINSON, 2010; HARARI *et*
795 *al.*, 2011).

796 O gene *IL2* está localizado no cromossomo 4 e o polimorfismo *IL2* -
797 330T>G (rs2069762) foi previamente associado a maior suscetibilidade de
798 doenças inflamatórias e câncer (SONG *et al.*, 2012). Embora pouco investigado
799 para avaliação da influência sobre a suscetibilidade à TB, o SNP da *IL2* -330T>G
800 (rs2069762) foi associado a TB em populações não brasileiras. Estes estudos,
801 entretanto, são estudos modestos e apresentam resultados inconsistentes e
802 inconclusivos da associação do *IL2* -330T>G com a suscetibilidade ao

803 desenvolvimento da TB (AMIRZARGAR *et al.*, 2006; SELVARAJ *et al.*, 2008;
804 NASLEDNIKOVA *et al.*, 2009; TRAJKOV *et al.*, 2009; SINGALA *et al.*, 2013).

805

806 **1.4. 4 Interleucina 4**

807

808 A citocina anti-inflamatória IL-4 pode ser produzida por diferentes tipos
809 celulares, entre estes: células T, eosinófilos, basófilos, mastócitos, células NK e
810 algumas células apresentadoras de antígeno (ROOK, 2007).

811 O aumento da produção da IL-4 na infecção por *M. tuberculosis* foi alvo de
812 muita controvérsia entre os pesquisadores. Entretanto, atualmente diversos
813 trabalhos apontam evidências da participação desta citocina na TB (SEAH *et al.*,
814 2000; VAN CREVEL *et al.*, 2000; LIENHARDT *et al.*, 2002), conforme observado
815 pela produção de anticorpos IgE para *M. tuberculosis* entre pacientes com a
816 doença (YONG *et al.*, 1989). Similarmente, os níveis de RNAm e de células T
817 produtoras de IL-4 estão aumentados entre os pacientes com TB e foram
818 significativamente associados à extensão de lesões cavitárias (SUZUKI *et al.*,
819 2001). Corroborando com estes achados, a expressão da IL-4 também foi
820 detectada por hibridização *in situ* em lesões pulmonares de pacientes com TBP
821 (FENHALLS *et al.*, 2000).

822 Entre os potenciais efeitos prejudiciais atribuídos a IL-4 na TB estão a
823 ativação de macrófagos alternativos, a inibição da apoptose entre macrófagos
824 infectados e ativação de fibroblastos e promoção da formação de colágeno, os
825 dois últimos, associados aos danos respiratórios observado na TB (ROOK,
826 2007).

827 Em consequência do envolvimento da IL-4 na TB, o gene *IL4* foi alvo de
828 discretos estudos de associação para com a suscetibilidade à TB, especialmente,
829 o polimorfismo *IL4* -590C>T, o qual está associado a alterações no nível de
830 transcrição deste gene (ROSENWASSER *et al.*, 1995). Nesse contexto, um
831 estudo avaliou a produção da citocina IL-4 sob diferentes condições de tratamento
832 da TB e observou que a capacidade de sobrevivência do bacilo no ambiente
833 intracelular é significativamente diferente entre os genótipos deste polimorfismo.
834 O estudo atribuiu os efeitos observados entre os indivíduos portadores de

835 diferentes genótipos *IL4* -590C>T a alterações na ativação da resposta
836 inflamatória. Outros trabalhos avaliaram a influência deste mesmo SNP nas
837 populações russa, macedonia, sul africana, sul indiana e ameríndia
838 (AMIRZARGAR *et al.*, 2006; VIDYARARAI *et al.*, 2006; NASLEDNIKOVA *et al.*,
839 2009; TRAJKOV *et al.*, 2009; MÖLLER *et al.*, 2010; ZEMBRZUSKI *et al.*, 2010;
840 SINGALA *et al.*, 2013; LINDENAU *et al.*, 2014). Entretanto, os resultados
841 conflitantes e inconclusivos destes trabalhos sugere a necessidade de mais
842 estudos sobre a influência do *IL4* -590C>T na imunogênese da TB. Corroborando
843 com a importância deste locus na TB, em crianças chinesas, dois outros
844 polimorfismos no gene da *IL4* (rs2243274) e (rs2243268) foram associados a
845 menor risco de TB severa e tuberculose extra-pulmonar (QI *et al.*, 2014).

846 **1.4.5 Interleucina 6** 847

848 A IL-6 é uma citocina pro-inflamatória pleiotrópica e os níveis
849 extremamente variáveis desta citocina durante a inflamação aguda e crônica são
850 considerados fatores críticos na progressão e desfecho de diversas doenças
851 (SMITH & HUMPHRIES, 2009). Na TB a atuação da IL-6 não é bem estabelecida.
852 No entanto, em modelos experimentais ela é precocemente produzida após a
853 exposição a *M. tuberculosis* (GIACOMINI *et al.*, 2001; INDRIGO *et al.*, 2002). Em
854 estudos com camundongos *IL6*^{-/-} mutantes expostos a altas concentrações do
855 bacilo essa citocina demonstrou um papel crítico na resposta imune protetora
856 (LADEL *et al.*, 1997). Além disso, pacientes com TBP apresentam níveis
857 plasmáticos de IL-6 elevados quando comparados a indivíduos saudáveis (EL-
858 AHAMADY *et al.*, 1997). Mais recentemente Singh & Goyal sugeriram a IL-6 como
859 um potente biomarcador de infecção micobacteriana (SINGH & GOYAL, 2013).

860 A região cromossômica 7p21-24, na qual se localiza o gene *IL6*,
861 demonstrou significativa ligação entre este locus e a TB no estudo tipo GWA de
862 Stein e colaboradores (STEIN *et al.*, 2008). No entanto, a associação direta com
863 variantes do gene *IL6* não foi confirmada em um estudo subsequente (BAKER *et*
864 *al.*, 2011) .

865 O gene *IL6* não contém polimorfismos identificados dentro da região
866 codificadora e, por isso, diferentes estudos têm focado em variantes polimórficas

867 localizadas na região promotora (SMITH & HUMPHRIES, 2009). O polimorfismo
868 *IL6* -174G>C vem sendo associado à suscetibilidade genética à TB em
869 populações distintas, embora muitos destes estudos sejam inconsistentes e
870 inconclusivos (AMIRGARZAR *et al.*, 2006; HENAO *et al.*, 2006; ORAL *et al.*, 2008;
871 LARCOMBE *et al.*, 2006; SELVARAJ *et al.* 2008; TRAJKOV *et al.*, 2009;
872 ZEMBZRUSKI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2012). Assim, a atuação da IL-6 na
873 imunofisiologia da TB em humanos ainda é bastante controversa, tanto quanto o
874 envolvimento do polimorfismo *IL6* -174G>C na suscetibilidade à infecção
875 micobacteriana.

876

877 **1.4.6 Interleucina 10**

878

879 Um dos mecanismos do sistema imune para evitar danos ao tecido
880 pulmonar durante a potente resposta inflamatória conduzida por patógenos como
881 *M. tuberculosis* é a produção da citocina inibitória e anti-inflamatória IL-10
882 (REDFORD *et al.*, 2011). No organismo humano, esta citocina pode ser
883 produzida por células mielóides e células T (REDFORD *et al.*, 2011).

884 A IL-10 é capaz de inibir a resposta imune pelo bloqueio da produção de
885 citocinas pro-inflamatórias, como o TNF- α e a citocina polarizadora da resposta
886 Th1, a IL-12, atuando diretamente sobre macrófagos e células dendríticas
887 (FIORENTINO *et al.*, 1991a; FIORENTINO *et al.*, 1991b). A IL-10 também é
888 capaz de inibir a fagocitose e morte do patógeno através da limitação da
889 produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio em resposta ao IFN- γ
890 (γ) (GAZZINELLI *et al.*, 1992; MOORE *et al.*, 2001; REDPATH *et al.*, 2001). Além
891 do efeito antagonista gerado pela IL-10 sobre a produção do IFN- γ em
892 macrófagos infectados, a IL-10 pode funcionar bloqueando a apresentação de
893 antígenos micobacterianos via regulação negativa de moléculas de HLA (MOORE
894 *et al.*, 2001). Além disso, o processo de migração das células dendríticas para os
895 linfonodos após a infecção por *M. tuberculosis* é em parte dependente da ação da
896 IL-12p40 (KHADER *et al.*, 2006), a qual pode ser inibida por ação da IL-10. Ainda,
897 os efeitos inibitórios sobre a CXCL10 e a IP-10 durante a infecção por *M.*
898 *tuberculosis* sugere que esta citocina limita o recrutamento de células Th1 ao

899 pulmão infectado em modelos animais (REDFORD *et al.*, 2010). Observações em
900 humanos mostram que a IL-10 exibe níveis elevados no pulmão (BARNES *et al.*,
901 1993; HUARD *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2009) e soro de pacientes com TBP
902 (VERBON *et al.*, 1999).

903 O gene *IL10* está localizado no cromossomo 1q31-32 e é composto por
904 cinco éxons (SPITS & de WAAL MALEFYT, 1992). O promotor contém diversos
905 polimorfismos os quais são capazes de influenciar os níveis de expressão desta
906 citocina e aumentar o risco de desenvolvimento da TB (LIANG *et al.*, 2011).
907 Entretanto, estudos genéticos realizados em polimorfismos importantes da região
908 promotora do gene *IL10*, mais especificamente os locus -1082 e -592, e a
909 suscetibilidade à TB revelaram-se inconclusivos, com resultados divergentes
910 conforme a população estudada (BELLAMY *et al.*, 1998; DELGADO *et al.*, 2002;
911 LOPEZ-MADERUELO *et al.*, 2003; FITNESS *et al.*, 2004; SHIN *et al.*, 2005;
912 HENAO *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2008; LIANG *et al.*, 2011; LIANG *et al.*,
913 2014; GAO *et al.*, 2015).

914

915 **1.4.7 Interleucina 17A**

916

917 Na TB, a expressão precoce da IL-17A exerce um papel importante como
918 mediador do recrutamento celular, principalmente neutrófilos via CXCL8
919 (MACALEER *et al.*, 2014) e células T CXC5+ via CXCL-13 (GOPAL *et al.*, 2014).
920 As células de memória produtoras de IL-17 atuam como uma população de
921 vigilância, capaz de induzir quimiocinas que atuam no recrutamento de células
922 produtoras de INF- γ , as quais ativam fagócitos infectados e medeiam a
923 interrupção do crescimento micobacteriano (ETNA *et al.*, 2014). Estudos com
924 modelos animais mostraram que camundongos mutantes incapazes de produzir
925 IL-17A apresentam falha na maturação do granuloma e na elaboração de uma
926 resposta imune protetora quando infectados por linhagens virulentas de *M.*
927 *tuberculosis*. Surpreendentemente, a introdução de células T produtoras de IL-
928 17A nesses animais é capaz de reverter este quadro e reconduzir a formação do
929 granuloma (OKAMOTO *et al.*, 2010). Diversos estudos também apontam a
930 atuação da IL-17A na imunidade protetora induzida pela vacina BCG (KHADER *et*

931 *al.*, 2007; WORNIAK *et al.*, 2010; CRUZ *et al.*, 2015).

932 Apesar da IL-17A contribuir para a defesa contra *M. tuberculosis* e
933 formação do granuloma maduro durante os estágios iniciais da infecção primária
934 (TORRADO *et al.*, 2011; GOPAL *et al.*, 2014), durante a fase crônica e infecção
935 latente a hiperatividade da resposta Th17 parece ser prejudicial. Isso porque,
936 nesta fase da infecção a IL-17A foi associada ao aumento da imunopatologia via
937 influxo de neutrófilos e maior destruição tecidual opostamente ao papel inicial
938 desempenhado por esta citocina na contenção da infecção pulmonar (KHADER *et*
939 *al.*, 2007).

940 O gene *IL17A* é composto por três éxons e dois íntrons e está localizado
941 no cromossomo 6p12 (NAKADA *et al.*, 2011). Previamente, o polimorfismo
942 genético da região promotora *IL17A* -197G>A foi associado à suscetibilidade
943 doenças inflamatórias e infecciosas (ARISAWA *e tal.*, 2008; NAKADA *et al.*,
944 2011), incluindo a TB (OCEJO-VINYALS *et al.*, 2013; SHI & ZHANG, 2015).
945 Entretanto, esses relatos reportaram resultados divergentes do alelo de
946 risco/suscetibilidade para TB.

947

948 **1. 5 Bases Genéticas da Tuberculose**

949

950 Uma característica marcante sobre doenças infecciosas em humanos,
951 observadas ao longo da história, é a sua considerável variabilidade fenotípica
952 interindividual, variando de infecções assintomáticas a infecções letais
953 (CASANOVA & ABEL, 2005). A variabilidade interindividual no desenvolvimento
954 dessas doenças é atribuída em parte à variabilidade observadas nos genes
955 humanos que controlam o sistema imune (CASANOVA & ABEL, 2002).

956 Na TB, as primeiras fortes evidências do envolvimento de fatores genéticos
957 do hospedeiro na suscetibilidade à TB vieram na década de 1930. Os estudos
958 conduzidos em gêmeos indicaram maior concordância para o desenvolvimento da
959 TB entre os gêmeos monozigóticos quando comparados aos dizigóticos
960 (PUFFER, 1944; COMSTOCK, 1978). Esses e outros estudos também
961 contribuíram com as evidências de que a suscetibilidade/ proteção à TB é
962 poligênica (KAUFFMANN *et al.*, 2005).

963 Entretanto, a grande descoberta dos últimos anos foi a demonstração de
964 que a TB em crianças é uma doença distinta e pode refletir uma predisposição
965 mendeliana (ALCAÏS *et al.*, 2005; CASANOVA & ABEL, 2005). A proporção de
966 crianças com TB disseminada devido à predisposição mendeliana continua a ser
967 determinada experimentalmente, sendo estimada em 3-30% (ALCAÏS *et al.*,
968 2005).

969 Por outro lado, as bases genéticas da TB em adultos parece mais
970 complexa e de difícil caracterização. Os estudos GWAs contribuíram com a
971 identificação do primeiro grande locus mapeado no cromossomo 8q12-q13 em
972 pacientes adultos com TBP na população do Marrocos (BAGHDADI *et al.*, 2006).
973 Posteriormente, outros estudos importantes apontaram as regiões cromossômicas
974 11p13 e 18q11 (THYE *et al.*, 2010, THYE *et al.*, 2012). Entretanto, ao contrário
975 do esperado, os estudos GWAs para TB têm demonstrado um sucesso limitado
976 em identificar genes ou vias principais associadas à doença. Uma característica
977 comum desses trabalhos é a falta de replicação dos resultados previamente
978 reportados em estudos independentes (ABEL *et al.*, 2014). Além disso, os
979 resultados globais desses estudos sugerem que variantes comuns têm um
980 limitado impacto sobre a predisposição para TBP em indivíduos adultos (ABEL *et*
981 *al.*, 2014).

982 Neste contexto, os fatores de suscetibilidade genéticas à TB têm sido
983 identificados com maior sucesso em estudos caso-controle. A maioria dos
984 estudos de associação genética clássica concentraram-se em genes candidatos,
985 em particular, em genes relacionados com a resposta imune, tais como os que
986 codificam DC-SIGN, os receptores Toll-like 1 e 2, o receptor de vitamina D, o
987 TNF, a IL-1 β ou algumas moléculas do HLA de classe II (BELLAMY *et al.*, 1998;
988 MÖLLER *et al.*, 2010). Um das descobertas mais consistentes da suscetibilidade
989 à TB até o momento foi a identificação de polimorfismos associados ao gene
990 NRAMP1, o ortólogo humano do gene murino NRAMP1 (VIDAL *et al.*, 1993).

991 Esses trabalhos incentivam a busca por variantes causais que possam
992 contribuir para o resultado da infecção por *M. tuberculosis*. Por isso, os esforços
993 para caracterização das bases genéticas da TB continuam, embora as razões
994 genéticas pelas quais alguns indivíduos adultos são capazes de conter a infecção

995 por *M. tuberculosis* e outros não ainda permanecem desconhecidas (O’GARRA *et*
996 *al.*, 2013).
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022

Objetivos

1023

1024

1025 **2.1 Objetivo Geral**

1026

1027

1028

1029

1030

1031

Este estudo teve como principal objetivo avaliar a influência de polimorfismos genéticos nos genes *IL2*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *IL17A*, *TNF* e *IFNG* na suscetibilidade ao desenvolvimento da tuberculose pulmonar em indivíduos adultos do Rio Grande do Sul, Brasil .

1032 **2.2. Objetivos Específicos**

1033

1034

1035

1036

1037

1038

I. Determinar as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos *TNF* -208G>A e -308 G>A, *IFNG* +874T>A, *IL2* -330T>G, *IL4* -590 C>T, *IL6* -174 G>C, *IL10* -1082 G>A e -592A>C, *IL17A* -692C>T e -197G>A em pacientes TBP e indivíduos saudáveis;

1039

1040

1041

1042

II. Avaliar a influência dos polimorfismos *TNF* -208G>A e -308 G>A, *IFNG* +874T>A, *IL2* -330T>G, *IL4* -590 C>T, *IL6* -174 G>C, *IL10* -1082 G>A e -592A>C, *IL17A* -692C>T e -197G>A na suscetibilidade ao desenvolvimento da TBP;

1043

1044

III. Identificar o possíveis marcadores de risco para a TBP na população do RS.

1045

1046

1047

1048

1049

Resultados

1050

1051

1052

1053

1054 **Single Nucleotide Polymorphisms in IL17A and IL6 are**
1055 **Associated with Decreased Risk for Pulmonary**
1056 **Tuberculosis in Southern Brazilian Population**

1057

1058

1059

1060

1061

1062

1063

1064

1065

1066

1067

1068 Artigo submetido `a publicação na revista PLoS One - Fator de Impacto 3,23.

1069

1070

1071

1072

1073

1074

1075

1076

1077 Autores

1078

1079

1080 **Mariana Milano^{1,2*}, Milton Ozório Moraes^{3*}, Rodrigo Rodenbusch², Caroline**
1081 **Xavier Carvalho³, Melaine Delcroix⁴, Gabriel Mousquer⁵, Lucas Laux da**
1082 **Costa^{2,6}, Gisela Unis⁷, Elis Regina Dalla Costa², Maria L. R. Rossetti^{1,2,8}.**

1083

1084

1085

1086

1087

1088 **Single Nucleotide Polymorphisms in IL17A and IL6**
1089 **are Associated with Decreased Risk for Pulmonary**
1090 **Tuberculosis in Southern Brazilian Population**

1091
1092 Mariana Milano^{1,2*}, Milton Ozório Moraes^{3*}, Rodrigo Rodenbusch², Caroline Xavier
1093 Carvalho³, Melaine Delcroix⁴, Gabriel Mousquer⁵, Lucas Laux da Costa^{2,6}, Gisela
1094 Unis⁷, Elis Regina Dalla Costa², Maria L. R. Rossetti^{1,2,8}.

1095

1096

1097

1098

1099 ¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade
1100 Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre , Rio Grande do Sul, Brazil.

1101

1102 ² Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de
1103 Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

1104

1105 ³ Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz Fundação Oswaldo Cruz, Rio
1106 de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

1107

1108 ⁴ Division of Infectious Disease and Vaccinology, University of California, Berkeley,
1109 United States of America.

1110

1111 ⁵ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio
1112 Grande do Sul, Brazil.

1113

1114 ⁶ Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

1115

⁷ Hospital Sanatório Partenon, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

1116

⁸ Universidade Luterana do Brazil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil.

1117

1118

1119

1120

*Corresponding Authors:

1121

E-mail: marianamilano@hotmail.com (MM), mmoraes@fiocruz.br (MOM)

1122

1123

1124

1125

1126

1127

1128

Abstract

1129
1130
1131 In *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) infection, the complex interaction of
1132 host immune system and the mycobacteria is associated with levels of cytokines
1133 production that play a major role in determining the outcome of the disease.
1134 Several single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in cytokine genes have been
1135 associated with tuberculosis (TB) outcome. The aim of this study was to evaluate
1136 the association between previously reported SNPs *IL2* -330 T>G (rs2069762); *IL4*
1137 -590 C>T (rs2243250); *IL6* -174 G>C (rs1800795); *IL10* -592 A>C (rs1800872);
1138 *IL10* -1082 G>A (rs1800896); *IL17A* -692 C>T (rs8193036); *IL17A* -197 G>A
1139 (rs2275913); *TNF* -238 G>A (rs361525); *TNF* -308 G>A (rs1800629) and *IFNG*
1140 +874 T>A (rs2430561) and pulmonary TB (PTB) susceptibility. We conducted a
1141 case-control study in individuals from Southern Brazil who were recruited between
1142 February 2012 and October 2013 in a high incidence TB city. We performed a
1143 multiplex genotyping assay in 191 patients with PTB and 175 healthy subjects.
1144 Our results suggest a decreased risk for PTB development associated with the
1145 *IL17A* -197A allele (OR=0.29; p=0.04), AA genotype (OR=0.12; p=0.04) and A
1146 carrier (AG/AA) (OR=0.29; p=0.004) and *IL6* -174C carrier (CC/CG) (OR= 0.46;
1147 p=0.04). We found no evidence of association for the *IL2*, *IL4*, *IL10* and *TNF*
1148 polymorphisms and PTB. In conclusion, our results show a protective effect of
1149 *IL17* and *IL6* polymorphisms on PTB outcome in Southern Brazilian population.

1150

1151 Short Title: Genetic Polymorphisms and Tuberculosis Susceptibility

1152

1153

1154

1155

1-Introduction

1156

1157

1158

1159

1160

1161

1162

1163

1164

1165

1166

1167

1168

1169

1170

1171

1172

1173

1174

1175

1176

1177

1178

1179

1180

Tuberculosis (TB) is a chronic granulomatous disease that predominantly affects the lungs and is caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) [1]. TB is ranked as the second leading cause of death from a single infectious agent, and remains a public health issue with 1.5 million of deaths in 2013 [2]. Annually 5.7 million of new TB cases are reported worldwide. Disturbingly, according to World Health Organization approximately one-third of the world's population is infected with MTB [2].

Consistent with a long lasting host–pathogen interaction and co-evolution, only 10% of MTB-infected individuals progress towards active disease [3]. The mechanisms explaining why some individuals develop the disease are unclear [4]. A significant proportion of interindividual variation in susceptibility to TB can be attributed to environmental factors such as malnutrition, but a substantial part has been credited to host genetic factors [5,6]. Strong evidence derived from family-based, twin and segregation genetic studies indicate that the inherited background influences TB outcome [7-9]. The critical importance of CD4-T cell mediated immunity [10,11] and of the interleukin (IL)-12/interferon-gamma pathway in resistance to MTB has been duly described [12,13]. Unexpectedly, genome-wide association studies (GWAS) have shown a limited success finding either genes or pathways associated with TB. These studies were unable to consistently pinpoint major genes and there are no independent replications in the described chromosome regions: 8q, 11p13 and 18q11 [14-17]. Nevertheless, genetic determinants of TB susceptibility in case-control studies and in some cases followed by meta-analysis confirmed single nucleotide polymorphisms (SNPs)

1181 mostly in immunity-related genes. Studies based on such approaches have
1182 properly identified polymorphisms in candidate genes such as *IFNG*, *SLC11A1*,
1183 *IL10*, *MCP-1*, and *P2RX7* [18-23] to be associated with TB susceptibility.

1184 Cytokines are important modulatory molecules that orchestrate the
1185 activation of immune system against microorganisms. In TB, cytokines play a key
1186 role in driving the appropriate immune response to mycobacteria via activation of
1187 inflammatory and immunomodulatory networks orchestrated by both macrophages
1188 and T cells [24]. The interleukin (IL)-17A is a potent pro-inflammatory cytokine
1189 capable of inducing chemokine expression, migration of neutrophil and recruitment
1190 and trafficking of Th1 cells to parenchymal tissue during TB infection [24, 25]. IL-
1191 17A has also been suggested to be critical in the first steps of TB and granuloma
1192 formation [24, 25] along with TNF [26]. Likewise, cytokines as IL-2, IL-4, IL-6 and
1193 IL-10 are known to work together to promote an immune response satisfactory
1194 against MTB [27, 28].

1195 Few studies have investigated the influence of polymorphic variants in *IL6* and
1196 *IL17A* genes and PTB outcome showing inconsistent results. The aim of our study
1197 was to investigate whether *IL6* -174 G>C SNP and *IL17A* -197 G>A polymorphism
1198 and additional cytokine genes involved in immune response to MTB (*IL2*, *IL4*,
1199 *IL10*, *IFNG* and *TNF*) are associated with genetic susceptibility to pulmonary TB
1200 (PTB). In this study, the genetic association of polymorphic variants within cytokine
1201 genes was evaluated in a case-control study in a PTB population from
1202 Southern Brazil.

1203 **2- Materials and Methods**

1204

1205 **2.1-Case-control study**

1206
1207 This case-control study recruited 191 PTB patients in a reference hospital
1208 for TB in Porto Alegre, the capital of Rio Grande do Sul State in southern Brazil
1209 between February 2012 and October 2013.

1210 We enrolled patients > 18 years old, diagnosed with PTB who were on anti-
1211 TB and anti-multidrug-resistant (MDR)-TB treatment during any time between
1212 disease diagnosis and the completion of treatment. The information about patients'
1213 medical conditions as results of drug susceptibility test, coexisting of forms of
1214 extra-pulmonary TB, diabetes, asthma were extracted through medical records.
1215 Serum samples were tested for HIV 1/2 and HCV. Patients were confirmed to
1216 have PTB by chest X-ray, sputum smear microscopy and culture according
1217 recommendations described in Brazilian National TB guideline [29]. Smear sputum
1218 samples were tested for MDR-TB at a referral laboratory in Porto Alegre, Brazil
1219 [30]. In this study, patients with comorbidities including diabetes, asthma, HCV,
1220 HIV or HCV+HIV were included in PTB group and comprised 22% of patients
1221 population. Although, some of the comorbidities are known risk factors for TB
1222 outcome such as HIV and diabetes, a comparison of patient population stratified
1223 according to the presence and absence of comorbidities were not statistically
1224 different (data not shown) indicating that comorbidities are unlikely confounding
1225 factors. Adjustments in the regression logistic model using comorbidities were not
1226 feasible because this condition was present only in patients. We excluded patients
1227 who were not in eligible age criteria, coexisting of forms of extra pulmonary TB,
1228 drug users, prisoners and Native Americans.

1229 The control group was composed by 175 unrelated healthy individuals, over
1230 18 years old, among them 50 household contacts and 125 blood donors recruited

1231 at the Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul in Porto Alegre, which is
1232 located at the same geographical area that the PTB cases were recruited. All
1233 individuals in control group were HIV and HCV or HIV+HCV negatives, without
1234 signs or symptoms of TB, previous history of TB or have completed anti-TB
1235 prophylaxis. Ethnic background was determined by self-identification as white,
1236 non-white, or other. No individual of auto referred Asiatic ancestry participated in
1237 the study. All subjects were BCG vaccinated at birth that was confirmed by the
1238 presence of the BCG scar.

1239

1240 **2.2 Ethics considerations**

1241

1242 The study was approved by Research Ethics Committee of Fundação
1243 Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, FEPPS-RS #09/2011 in Porto
1244 Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. An information sheet describing the purpose of
1245 the study and the individuals' rights as participants study were read along, and a
1246 copy provided, for all volunteers. The researcher also provided a contact phone
1247 number for any additional information about the research. After all clarification, a
1248 written informed consent was obtained for each person.

1249

1250 **2.3- DNA extraction and SNP Genotyping**

1251

1252

1253 Genomic DNA was isolated from peripheral blood using Nucleo Spin®
1254 Blood kit (Macherey-Nagel Inc.). Amplification of regions flanking SNPs in
1255 cytokines genes *IL2* -330 T>G (rs2069762); *IL4* -590 C>T (rs2243250); *IL6* -174
1256 G>C (rs1800795); *IL10* -592 A>C (rs1800872); *IL10* -1082 G>A (rs1800896);

1257 *IL17A* -197 G>A (rs2275913); *IL17A* -692 C>T (rs8193036); *TNF* -238 G>A
1258 (rs361525); *TNF* -308 G>A (rs1800629) and *IFNG* +874 T>A (rs2430561) was
1259 accomplished with a multiplex PCR on 5 to 10 ng genomic DNA, 0.2 µM of each
1260 primer (S1 Table) and Qiagen Multiplex PCR Master Mix© (QIAGEN,Invitrogen).
1261 Amplification reaction consisted of 95°C for 15 minutes followed by 30 cycles of 35
1262 seconds at 94°C, 90 seconds at 57°C, 90 seconds at 72°C and a final extension
1263 for 10 minutes at 72°C. Amplicons were purified using Illustra™ EXOProStar™
1264 (GE HealthCare®) according to the user's manual recommendation.

1265 SNP analysis were performed on the SNaPshot® Multiplex System ABI
1266 Prism (Applied Biosystems®, São Paulo, Brazil). SNaPshot primers are listed in
1267 Table S1.

1268 According instructions of user's manual the reactions were performed in a
1269 final volume of 10 µL, containing 3.0 µL (0.01 to 0.4 pmol) of purified multiplex
1270 PCR product, 5.0 µL of SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix and 1µl of a
1271 pooled of the ten SNaPshot primers described at Table S1. All the ten primers
1272 used in the pooled SNaPshot reactions were previously premixed to have a
1273 concentration of 1 µM for each primer. Multiplex single base extension was carried
1274 out for 28 cycles as follows: 10 seconds at 96°C, 5 seconds at 50°C and 30
1275 seconds at 60°C. SNaPshot products were then incubated at 37°C for 1h with 0.8
1276 U of thermo sensitive alkaline phosphatase (ThermoScientific™ FastAP™). After
1277 heat inactivation of the alkaline phosphatase for 20 minutes at 80°C, 1µL of the
1278 labeled products were mixed with 9.5 µL of HiDi™ formamide and 0.5 µL of
1279 GeneScan-120 LIZ size standard (Applied Biosystems). They were then separated
1280 using an ABIPRISM® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with POP-

1281 4TMpolymer and with respective run parameters: injection voltage of 1.2 Kv,
1282 injection time of 23 seconds run voltage of 15Kv and run time 1200 seconds in a
1283 capillary of 36 cm length. Analysis was performed using Gene Mapper ID software
1284 version 3.2.1 (Applied Biosystems). In order to confirm the genotyping system at
1285 least 10% of samples were sequenced on ABIPRISM® 3130xl Genetic Analyzer
1286 (Applied Biosystems).

1287

1288 **2.4- Statistical Analysis**

1289

1290

1291

All statistical analysis was performed using Genetics package - software R
1292 version 2.11.1 [31]. Genotype frequencies were tested for Hardy Weinberg
1293 Equilibrium (HWE) using a Chi-square test. Frequencies of the genotypes, alleles
1294 and carriers were compared in cases and controls by logistic regression with
1295 adjustment for gender, income and age (> or < 25 years old). Categorical age
1296 criteria have been set according epidemiological features of TB [32]. Odds ratio
1297 (OR) was used as the point estimates of risk and were calculated along with their
1298 95% confidence intervals (CIs) and the significant p values was adjusted by false
1299 discovery rate (FDR) test.

1300

1301 **3-Results**

1302

1303 **3.1 Characteristics of PTB patients and healthy** 1304 **controls**

1305

1306

Three-hundred sixty six individuals of the metropolitan area of Porto Alegre,
1307 Brazil were included in the study. This city it is ranked as the Brazilian capital with

1308 the highest incidence of TB [33]. The PTB group was comprised of 191 individuals,
 1309 56 females and 135 males, with a mean age of 42.46 (\pm 14.57). Regarding
 1310 ethnicity within the PTB group, 134 individuals reported themselves as white and
 1311 56 as non-whites. However, this covariate showed no association with outcome in
 1312 logistic regression model, so it was excluded of the analysis. Fifty-six subjects
 1313 were infected with MDR-TB and 42 had comorbidities such as asthma, diabetes,
 1314 hepatitis C, HIV/AIDS or HCV+HIV. The healthy control group included 175
 1315 individuals, 81 females and 94 males, with a mean age of 36.64 (\pm 14.59) and 133
 1316 individuals declared themselves as white and 42 as non-white.

1317 **Table 1. Characteristics of The Population Studied.**

1318

Characteristics	PTB (n=191)	HC (n=175)
Age* Mean (SD)	42.46 (14.57)	36.64 (14.59)
Gender Female , n (frequency) Male , n (frequency)	56 (0.29) 135 (0.71)	81 (0.46) 94 (0.54)
Ethnicity** White n (frequency) Non-white n (frequency)	134 (0.71) 56 (0.29)	133 (0.76) 42 (0.24)
Income*** Mean (SD)	484,6 (437,6)	788,5 (572,5)
BCG vaccine	Yes	Yes
Comorbidities n (frequency)	42 (0.22)	0
MTB MDR-TB n (frequency) Sensitive n (frequency)	56 (0.29) 135 (0.71)	NA

1319 PTB pulmonary tuberculosis, HC healthy controls, n number of individuals, SD standard deviation, NA not apply, MTB
 1320 *Mycobacterium tuberculosis*, MDR-TB tuberculosis multidrug resistant
 1321 * Information was missing for 21 PTB (0.11) and 1 HC (0.006)
 1322 ** Information was missing for 1 PTB (0.005)

1323 *** Information was missing for 61 PTB (0.32) and 18 HC (0.10)
1324 Income was represented as American dollar
1325
1326

1327 To confirm whether we could run our analysis combining household
1328 contacts and blood bank donors as one group defined as healthy controls, we first
1329 compared all SNPs in both populations and no difference was observed (S2
1330 Table). Likewise, we compared patients infected with either drug sensitive or
1331 resistant strains (S3 Table) and no differences were observed. Thus, all following
1332 analyses were run comparing two groups: a combined PTB group and a combined
1333 healthy control group.

1334 Cases and controls were in accordance with HWE (data not shown) for the
1335 SNPs evaluated except for the *IL17A* -692 C>T that deviated from HWE in cases
1336 and controls and *IFNG* +874T>A in control group. In order to avoid bias in our
1337 analysis *IL17A* -692 C>T and *IFNG* +874T>A were excluded of this study.

1338

1339 **3.2- SNPs in *IL17A* -197G>A and *IL6* -174G>A are** 1340 **associated with protection to PTB development**

1341

1342 As observed in Table 2, for - *IL17A* 197A>G polymorphism the presence of
1343 -197A allele was significantly higher in control group than PTB patients (p=0.04).
1344 Furthermore, the logistic regression model showed a decreased risk for PTB
1345 development among individuals with AA genotype (adjusted OR=0.12; p=0.04)
1346 and carriers of A allele (AG+AA) (adjusted OR=0.29; p=0.004).

1347 Regarding *IL6* -174G>C polymorphism (Table 2), the CG genotype and
1348 carriers of C allele (CC+CG) exhibited a decreased risk of PTB development
1349 (OR=0.55, p=0.04 and OR=0.49, p=0.008 respectively). Heterozygotes for -174
1350 (GC) became not statistically significant after statistical adjustment (OR=0.54,

1351 p=0.20),

1352 Taken together our results suggest that polymorphisms of *IL17A* and *IL6*
1353 cytokine genes at positions -197 and -174, respectively, are associated with
1354 protection for PTB development in the Southern Brazilian population.

1355

1356 **Table 2. Distribution of *IL17A* -197G>A and *IL6* -174G>C Alleles, Genotypes and**
1357 **Carrier Frequencies in PTB Patients and Healthy Controls.**

1358

Gene/ refSNP	Allele/ Genotype	PTB (n)	HC (n)	OR (95% CI)	p value	OR (95% CI)*	p value
<i>IL17A</i>		171	133				
rs2275913	Allele G	307 (0.90)	214 (0.80)	Reference		Reference	
	Allele A	35 (0.10)	52 (0.20)	0.47 (0.24- 0.90)	0.08	0.29 (0.12- 0.68)	0.04
	GG	141 (0.82)	89 (0.67)	Reference		Reference	
	GA	25 (0.15)	36 (0.27)	0.44 (0.24- 0.78)	0.04	0.35 (0.16- 0.73)	0.20
	AA	5 (0.03)	8 (0.06)	0.39 (0.12- 1.24)	0.44	0.12 (0.02- 0.64)	0.04
	Carrier A	30 (0.18)	44 (0.33)	0.43 (0.25- 0.78)	0.008	0.29 (0.14- 0.58)	0.004
<i>IL6</i>		182	164				
rs1800795	Allele G	309 (0.85)	243 (0.74)	Reference		Reference	
	Allele C	55 (0.15)	85 (0.26)	0.51 (0.30- 0.87)	0.08	0.46 (0.23- 0.94)	0.12
	GG	133 (0.73)	94 (0.57)	Reference		Reference	
	GC	43 (0.24)	55 (0.34)	0.55 (0.34- 0.89)	0.04	0.54 (0.29- 1.00)	0.20
	CC	6 (0.03)	15 (0.09)	0.28 (0.10- 0.75)	0.08	0.23 (0.06- 0.89)	0.06
	Carrier C	49 (0.27)	70 (0.43)	0.49 (0.31- 0.78)	0.008	0.46 (0.26- 0.83)	0.04

1359

1360

1361

1362

1363

1364

1365

PTB pulmonary tuberculosis, HC healthy controls, n number of individuals, OR odds ratio, CI confidence interval, *Logistic regression model adjusted by gender, age (> or < 25 years old) and income.
p values was adjusted by FDR test
Bold values express statistically significant results, p < 0,05.

1366 **3.3 - SNPs in *IL2* -330 T>G, *IL4* -590 C>T, *IL10* -592**
1367 **A>C, *IL10* -1082 G>A, *TNF* -238 G>A and -308 G>A are not**
1368 **associated with to PTB development**

1369 Among polymorphisms at positions *IL2* -330 T>G, *IL4* -590 C>T, *IL10* -592
1370 A>C, *IL10* -1082 G>A, *TNF* -238 G>A and *TNF* -308 G>A were found no evidence
1371 of association for genotypes, alleles and allele carriers and PTB development (S4
1372 Table). Thus, our results suggest that the SNPs of cytokine genes *IL2*, *IL4*, *IL10*
1373 and *TNF* above are not directly related to PTB outcome.
1374

1375 **4-Discussion**

1376 Genetic effect on TB susceptibility is more complicated than many other
1377 common human diseases because there are substantial confounding effects of
1378 environmental factors involved in MTB exposure, infection, and progression to
1379 active TB [34]. However, considerable evidence has accumulated to support the
1380 role of human genetic factors in TB susceptibility [7-9]. In the past few years,
1381 population case-control studies have reported association between genetic
1382 variations in immune-related genes and susceptibility to TB [18, 20]. SNPs in
1383 cytokine genes are able to influence the cytokine levels and regulate resistance
1384 and susceptibility to TB [35].
1385

1386 In TB, it is assumed that the balance between pro and anti-inflammatory
1387 cytokines is responsible for regulating the immune response [27]. In this regard,
1388 cytokines have been established to have a major role in determining the outcome
1389 of infection with MTB [36].
1390

1391 The IL-17 cytokine family includes several cytokines among which IL-17A is
1392 thought a main pro-inflammatory cytokine being important to the innate and

1393 adaptive immune responses [37]. Recent progress in studies of IL-17A cytokine
1394 has revealed its important role in protective mechanisms against infectious
1395 diseases [24, 25, 38] and in studies of BCG-vaccine induced immunity [39-40].
1396 Despite the growing evidences of IL-17A activity in antimycobacterial host
1397 defense, few genetic studies have been focused in polymorphic variants within
1398 *IL17A* gene and TB susceptibility.

1399 The present study shows for the first time association between the -
1400 197G>A polymorphism and PTB susceptibility in Southern Brazilian population.
1401 Our results showed a statistically significant increase of -197A allele in control
1402 group when compared to PTB patients ($p=0.04$). Functional analysis of this
1403 polymorphism associated the A allele with higher IL-17A releases, higher promoter
1404 activity and higher affinity to transcriptional factor NFAT [41, 42]. In this regard,
1405 this polymorphism has shown a functional role in the promoter activity of the *IL17A*
1406 gene through influencing the transcriptional activity of NFAT, affecting the
1407 production of IL-17A by T cells [42].

1408 Therefore, the higher production of IL-17A could be beneficial in to hamper
1409 the mycobacterial infection contributing in formation of mature granuloma and
1410 blocking disease progression [43, 44].

1411 The *IL17A* polymorphism (rs2275913) was also evaluated in distinct
1412 populations reporting contradictory results. In Northern Spain population G allele
1413 (OR=1.40, $p=0.02$) and GG genotype (OR=1.59, $p=0.015$) were associated with
1414 increased risk for PTB development [45] whereas two other studies failed in
1415 replicate such association in Croatian and a Chinese populations [46, 47]. In
1416 contrast, a recent report showed A allele carrier (GA/AA) (OR=1.52, $p=0.006$) and

1417 AA genotype (OR=2.2, p=0.001) associated to increased risk for PTB
1418 development [48]. However, this latter study did not fulfill HWE criteria for cases.
1419 Therefore, these results should be evaluated with caution. Therefore, we thought
1420 our findings about *IL17A* (rs2275913) are converging with the literature suggesting
1421 the A allele is associated with TB protection or G allele is associated with TB
1422 susceptibility, which means rigorously the same.

1423 In contrast, the A allele of *IL17A* (rs2275913) has been associated with increased
1424 risk for inflammatory diseases [49,50] indicating that its overproduction could as
1425 well be deleterious leading to pathological conditions. However, in MTB infection is
1426 likely that a genetic variation slightly increasing IL-17A production may be
1427 advantageous in the formation of mature granulomas making difficult mycobacteria
1428 spread [44].

1429 The importance of cytokine IL-6 have been shown studies murine models of
1430 mycobacterial infections as well in vaccination with a tuberculosis subunit vaccine
1431 demonstrating that IL-6 is needed for optimal T-cell development [51, 52]. Indeed,
1432 high levels of IL-6 cytokine are produced in response to MTB infection [53, 54] and
1433 its role seems especially critical when bacterial burden is high [55]. Despite the
1434 evidence of participation of IL-6 cytokine in MTB infection, reports about the
1435 involvement of polymorphic variants within *IL6* gene and PTB susceptibility remain
1436 inconsistent and inconclusive [56]. To provide further investigation into
1437 controversial points between *IL6* polymorphisms and TB susceptibility we
1438 analyzed the influence of *IL6* -174 G>C polymorphism on PTB outcome. Our
1439 results suggested decreased risk for PTB development among carrier of C allele
1440 The resulted showed in our study corroborates with reported in Pakistani

1441 population and confirmed by meta-analysis study [56, 57]. It was previously
1442 demonstrated that -174G allele is associated with higher production levels of IL-6
1443 [58] In this context, it was recognized that during MTB infection higher levels of IL-
1444 6 affect the production of other critical cytokines of immune response, such as
1445 IFN- γ [59]. Therefore, the decreased frequency of high IL-6 production genotype
1446 observed among the controls could be favorable for optimal macrophage
1447 activation and effective immunity in mycobacterial infection.

1448 In contrast, the present study showed that *IL2* -330 T>G is not associated
1449 with PTB susceptibility, although the role of IL-2 cytokine in modulating the
1450 immune response in TB is has become evident. Similarly, it was found no
1451 evidence of association between PTB and *IL4* -590C>T, *TNF* -308G>A and *TNF* -
1452 238G>A polymorphisms. Our results corroborate with previous reports concerning
1453 TB susceptibility in non-Brazilian populations [18, 60, 61], although, recently the -
1454 308A was associated with PTB susceptibility on an ethnically distinct population in
1455 Mozambique [62]. Also, the *IL4* -590CC genotype showed a protective effect for
1456 PTB in a Southern India population [63]. Concerning our results for *IL10* -1082 and
1457 -592, we found no influence of these polymorphisms on PTB outcome. Our result
1458 for *IL10* polymorphism at -1082 position corroborates with a meta-analysis study in
1459 a worldwide-pooled population [18].

1460 Interestingly, more recent meta-analysis studies that performed subgroup
1461 analysis for the *IL10* -1082G>A SNP revealed conflicting results for analysis
1462 stratified by ethnicity for European and American population [20, 64]. Further,
1463 according to our findings, *IL10* -592 A>C OR analysis showed no risk association
1464 with PTB and a meta-analysis study confirmed such finding for Europeans,

1465 Africans, and Americans populations but reported a decreased risk for TB
1466 development among the Asian population [20]. In this context, reports have
1467 highlighted the importance of haplotype analysis since both polymorphisms -592
1468 A>C and -819 C>T in *IL10* promoter region are in perfect linkage disequilibrium
1469 [64, 65].

1470 Furthermore our findings indicate that *IL17A* -197 G>A, *IL4* -590 C>T, *IL6* -174
1471 G>C, *IL10* -1082 G>A and *IL10* -592 A>C SNPs likely contribute differently to TB
1472 outcome among distinct populations.

1473 The use of popular case-control designs to test candidate genes or
1474 genome-wide association studies have proved suitable to pinpoint functional
1475 genetic variants in complex diseases [66]. Sometimes it is necessary to test
1476 several independent population to replicate the data, but results could be useful to
1477 envisage better diagnostics and prognostics methods [66, 67]. TB used to be a
1478 chronic disease and it is likely that a subtle balance of immune response could
1479 have a great impact over its control and progression. In this regard, Our study
1480 showed for the first time in that population the protective role of *IL17A* -197G>A
1481 and *IL6* -174G>C on PTB outcome. Indeed, our findings support *IL17A*
1482 (rs2275913) and *IL6* (rs1800795) polymorphisms as promising markers for PTB
1483 risk and indicate the role of IL-6 and IL-17A cytokines in immunophysiology of TB.
1484 This novel information of host response to MTB infection can help design more
1485 effective vaccines, identify risk populations and new treatment strategies. In the
1486 future, additional larger studies are needed to validate our findings. Moreover, a
1487 dense SNP mapping on *IL6* and *IL17A* loci could be interestingly for better
1488 elucidate such association.

5 - Acknowledgments

1489
1490
1491

We thank all patients, household contacts and blood donors for participating in study and collaborating with this research. We also grateful workers from Hospital Sanatório Partenon and Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul for allowing us interrupt their tough routines over two years of blood collect in their work places.

6 - References

1496
1497
1498
1499

1. Fernando SL, Britton WJ. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. *Immunol Cell Biol.* 2006;84(2):125-37.

1500
1501
1502
1503

2. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2014.* Geneva, Switzerland: 2014.

1504
1505
1506

3. Karlsson EK, Kwiatkowski DP, Sabeti PC. Natural selection and infectious disease in human populations. *Nat Rev Genet.* 2014;15(6):379-93.

1507
1508
1509

4. Barry CE, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(12):845-55.

1510
1511
1512
1513

5. Berrington WR, Hawn TR. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev.* 2007;219:167-86.

1514
1515
1516
1517

6. Comstock G. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proplit Study. *Am Rev Resp Dis.* 1978;117:621–624.

1518
1519
1520

7. Puffer R. *Familial susceptibility to tuberculosis; Its importance as a public health problem.* Harvard University Press, Cambridge. 1944;106 pp.

1521
1522
1523

8. Kallmann FJ, Reisner D. Twin studies on the significance of genetic factors in tuberculosis. *Am Rev Tuberc.* 1942;47:549–574.

1524
1525
1526

9. Cobat A, Gallant CJ, Simkin L, Black GF, Stanley K, Hughes J, et al. Two loci control tuberculin skin test reactivity in an area hyperendemic for tuberculosis. *J Exp Med.* 2009;206(12):2583-91.

1527
1528
1529
1530

10. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:393-422.

- 1531 11. North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol.*
1532 2004;22:599-623.
1533
- 1534 12. Alcaïs A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL. Tuberculosis in children and adults:
1535 two distinct genetic diseases. *J Exp Med.* 2005;202(12):1617-21.
1536
- 1537 13. Alcaïs A, Quintana-Murci L, Thaler DS, Schurr E, Abel L, Casanova JL. Life-
1538 threatening infectious diseases of childhood: single-gene inborn errors of
1539 immunity? *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1214:18-33.
1540
- 1541 14. Baghdadi JE, Orlova M, Alter A, Ranque B, Chentoufi M, Lazrak F, et al. An
1542 autosomal dominant major gene confers predisposition to pulmonary tuberculosis
1543 in adults. *J Exp Med.* 2006;203(7):1679-84.
1544
- 1545 15. Thye T, Owusu-Dabo E, Vannberg FO, van Crevel R, Curtis J, Sahiratmadja
1546 E, et al. Common variants at 11p13 are associated with susceptibility to
1547 tuberculosis. *Nat Genet.* 2012;44(3):257-9.
1548
- 1549 16. Chimusa ER, Zaitlen N, Daya M, Möller M, van Helden PD, Mulder NJ, et al.
1550 Genome-wide association study of ancestry-specific TB risk in the South African
1551 Coloured population. *Hum Mol Genet.* 2014;23(3):796-809.
1552
- 1553 17. Thye T, Vannberg FO, Wong SH, Owusu-Dabo E, Osei I, Gyapong J, et al.
1554 Genome-wide association analyses identifies a susceptibility locus for
1555 tuberculosis on chromosome 18q11.2. *Nat Genet.* 2010;42(9):739-41.
1556
- 1557 18. Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and
1558 TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a
1559 meta-analysis study. *Hum Genet.* 2008;123(5):477-84.
1560
- 1561 19. Li X, Yang Y, Zhou F, Zhang Y, Lu H, Jin Q, et al. SLC11A1 (NRAMP1)
1562 polymorphisms and tuberculosis susceptibility: updated systematic review and
1563 meta-analysis. *PLoS One.* 2011;6(1):e15831.
1564
- 1565 20. Liang B, Guo Y, Li Y, Kong H. Association between IL-10 gene
1566 polymorphisms and susceptibility of tuberculosis: evidence based on a meta-
1567 analysis. *PLoS One.* 2014;9(2):e88448.
1568
- 1569 21. Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song CH, Flores LM, Jo EK,
1570 Montaña M, et al. A functional promoter polymorphism in monocyte
1571 chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary
1572 tuberculosis. *J Exp Med.* 2005;202(12):1649-58.
1573
- 1574 22. Tian G, Li X, Li H, Wang X, Cheng B. Systematic meta-analysis of the
1575 association between monocyte chemoattractant protein-1 -2518A/G
1576 polymorphism and risk of tuberculosis. *Genet Mol Res.* 2015;14(2):5501-10.

- 1577 23. Wu G, Zhao M, Gu X, Yao Y, Liu H, Song Y. The effect of P2X7 receptor
1578 1513 polymorphism on susceptibility to tuberculosis: A meta-analysis. *Infect*
1579 *Genet Evol.* 2014;24:82-91.
1580
- 1581 24. Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth*
1582 *Factor Rev.* 2010;21(6):455-62.
1583
- 1584 25. Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, et
1585 al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against
1586 pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol.*
1587 2007;178(6):3786-96.
1588
- 1589 26. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al.
1590 Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response
1591 against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 1995;2(6):561-72.
1592
- 1593 27. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.*
1594 2001;19:93-129.
1595
- 1596 28. Khanna M, Srivastava LM, Kumar P. Defective interleukin-2 production and
1597 interleukin-2 receptor expression in pulmonary tuberculosis. *J Commun Dis.*
1598 2003;35(2):65-70.
1599
- 1600 29. Ministério da Saúde. Manual Nacional de recomendações para o controle da
1601 tuberculose no Brasil. MS. 2011. Available:
1602 [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/TB/mat_tec/manuais/MS11_Manual_Recom.](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/TB/mat_tec/manuais/MS11_Manual_Recom.pdf)
1603 pdf
1604
- 1605 30. World Health Organization. Guidelines for the Programmatic Management of
1606 Drug-Resistant Tuberculosis: 2011 Update. Geneva, Switzerland: WHO.
1607
- 1608 31. Team RDC. R: A language and environment for statistical computing. Vienna,
1609 Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2008.
1610
- 1611 32. Alcaïs A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL. Tuberculosis in children and adults:
1612 two distinct genetic diseases. *J Exp Med.* 2005;202(12):1617-21.
1613
- 1614 33. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Secretaria da Saúde.-MS.
1615 Available: [http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/06/boletim2-](http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/06/boletim2-2013-tb-web.pdf)
1616 2013-tb-web.pdf
1617
- 1618 34. Stein CM, Baker AR. Tuberculosis as a complex trait: impact of genetic
1619 epidemiological study design. *Mamm Genome.* 2011;22(1-2):91-9.
1620
- 1621 35. Fairfax BP, Knight JC. Genetics of gene expression in immunity to infection.
1622 *Curr Opin Immunol.* 2014;30:63-71.
1623

- 1624 36. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The
1625 immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:475-527.
1626
- 1627 37. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. Interleukin-17 and innate immunity
1628 in infections and chronic inflammation. *J Autoimmun.* 2015;60:1-11.
1629
- 1630 38. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of
1631 interleukin-17 family members. *Immunity.* 2011;34(2):149-62.
1632
- 1633 39. Wareham AS, Tree JA, Marsh PD, Butcher PD, Dennis M, Sharpe SA.
1634 Evidence for a role for interleukin-17, Th17 cells and iron homeostasis in
1635 protective immunity against tuberculosis in cynomolgus macaques. *PLoS One.*
1636 2014; 9 (2):e88149.
1637
- 1638 40. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al.
1639 IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell
1640 responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge.
1641 *Nat Immunol.* 2007;8(4):369-77.
1642
- 1643 41. Liu XK, Lin X, Gaffen SL. Crucial role for nuclear factor of activated T cells in
1644 T cell receptor-mediated regulation of human interleukin-17. *J Biol Chem.*
1645 2004;279(50):52762-71.
1646
- 1647 42. Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, et al. A
1648 genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-
1649 versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One.*
1650 2011;6(10):e26229.
1651
- 1652 43. Gopal R, Monin L, Slight S, Uche U, Blanchard E, Fallert Junecko BA, et al.
1653 Unexpected role for IL-17 in protective immunity against hypervirulent
1654 Mycobacterium tuberculosis HN878 infection. *PLoS Pathog.*
1655 2014;10(5):e1004099.
1656
- 1657 44. Etna MP, Giacomini E, Severa M, Coccia EM. Pro- and anti-inflammatory
1658 cytokines in tuberculosis: a two-edged sword in TB pathogenesis. *Semin
1659 Immunol.* 2014;26(6):543-51.
1660
- 1661 45. Ocejo-Vinyals JG, de Mateo EP, Hoz M, Arroyo JL, Agüero R, Ausín F, et al.
1662 The IL-17 G-152A single nucleotide polymorphism is associated with pulmonary
1663 tuberculosis in northern Spain. *Cytokine.* 2013;64(1):58-61.
1664
- 1665 46. Bulat-Kardum LJ, Etokebe GE, Lederer P, Balen S, Dembic Z. Genetic
1666 Polymorphisms in the Toll-like Receptor 10, Interleukin (IL)17A and IL17F Genes
1667 Differently Affect the Risk for Tuberculosis in Croatian Population. *Scand J
1668 Immunol.* 2015;82(1):63-9.
1669
- 1670 47. Peng R, Yue J, Han M, Zhao Y, Liu L, Liang L. The IL-17F sequence variant
is associated with susceptibility to tuberculosis. *Gene.* 2013;515(1):229-32.

- 1671 48. Shi GC, Zhang LG. Influence of interleukin-17 gene polymorphisms on the
1672 development of pulmonary tuberculosis. *Genet Mol Res.* 2015;14(3):8526-31.
- 1673 49. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, et al.
1674 The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on
1675 the susceptibility to ulcerative colitis. *J Clin Immunol.* 2008;28(1):44-9.
1676
- 1677 50. Chen J, Deng Y, Zhao J, Luo Z, Peng W, Yang J, et al. The polymorphism of
1678 IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of
1679 the hypopharynx in bronchiolitis. *J Clin Immunol.* 2010;30(4):539-45.
1680
- 1681 51. Appelberg R, Castro AG, Pedrosa J, Minóprio P. Role of interleukin-6 in the
1682 induction of protective T cells during mycobacterial infections in mice.
1683 *Immunology.* 1994;82(3):361-4.
1684
- 1685 52. Leal IS, Smedegård B, Andersen P, Appelberg R. Interleukin-6 and
1686 interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during
1687 vaccination with a tuberculosis subunit vaccine. *Infect Immun.* 1999;67(11):5747-
1688 54.
1689
- 1690 53. Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, et al.
1691 Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium*
1692 *tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell
1693 response. *J Immunol.* 2001;166(12):7033-41.
1694
- 1695 54. Indrigo J, Hunter RL, Actor JK. Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)
1696 during mycobacterial infection of bone marrow macrophages. *Microbiology.*
1697 2002;148(Pt 7):1991-8.
1698
- 1699 55. Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kopf M, Kaufmann SH. Lethal
1700 tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infect Immun.*
1701 1997;65(11):4843-9.
1702
- 1703 56. Mao X, Ke Z, Liu S, Tang B, Wang J, Huang H, et al. IL-1 β +3953C/T, -
1704 511T/C and IL-6 -174C/G polymorphisms in association with tuberculosis
1705 susceptibility: A meta-analysis. *Gene.* 2015.
1706
- 1707 57. Ansari A, Hasan Z, Dawood G, Hussain R. Differential combination of cytokine
1708 and interferon- γ +874 T/A polymorphisms determines disease severity in
1709 pulmonary tuberculosis. *PLoS One.* 2011;6(11):e27848.
1710
- 1711 58. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et
1712 al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6
1713 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset
1714 juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998;102(7):1369-76.
1715

- 1716 59. Nagabhushanam V, Solache A, Ting LM, Escaron CJ, Zhang JY, Ernst JD.
1717 Innate inhibition of adaptive immunity: Mycobacterium tuberculosis-induced IL-6
1718 inhibits macrophage responses to IFN-gamma. *J Immunol.* 2003;171(9):4750-7.
1719
- 1720 60. Cruz A, Torrado E, Carmona J, Fraga AG, Costa P, Rodrigues F, et al. BCG
1721 vaccination-induced long-lasting control of Mycobacterium tuberculosis correlates
1722 with the accumulation of a novel population of CD4⁺ IL-17⁺ TNF⁺ IL-2⁺ T cells.
1723 *Vaccine.* 2015;33(1):85-91.
1724
- 1725 61. Millington KA, Innes JA, Hackforth S, Hinks TS, Deeks JJ, Dosanjh DP, et al.
1726 Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium
1727 tuberculosis-specific T cells and antigen load. *J Immunol.* 2007;178(8):5217-26.
1728
- 1729 62. Mabunda N, Alvarado-Arnez LE, Vubil A, Mariamo A, Pacheco AG, Jani IV, et
1730 al. Gene polymorphisms in patients with pulmonary tuberculosis from
1731 Mozambique. *Mol Biol Rep.* 2015;42(1):71-6.
1732
- 1733 63 Vidyarani M, Selvaraj P, Prabhu Anand S, Jawahar MS, Adhilakshmi AR,
1734 Narayanan PR. Interferon gamma (IFNgamma) & interleukin-4 (IL-4) gene
1735 variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res.*
1736 2006;124(4):403-10.
1737
- 1738 64. Gao X, Chen J, Tong Z, Yang G, Yao Y, Xu F, et al. Interleukin-10 promoter
1739 gene polymorphisms and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis. *PLoS*
1740 *One.* 2015;10(6):e0127496.
1741
- 1742 65. Alvarado-Arnez LE, Amaral EP, Sales-Marques C, M B Durães S, C Cardoso
1743 C, Nunes Sarno E, et al. Association of IL10 Polymorphisms and Leprosy: A
1744 Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(9):e0136282.
1745
- 1746 66. Moraes MO, Pacheco AG. Genetics of complex diseases: knowing gene
1747 polymorphisms do matter. *Cad Saude Publica.* 2013; 29(11):2144-6.
1748
- 1749 67. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy
1750 susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and
1751 disease outcome. *Future Microbiol.* 2011 May;6(5):533-49.
1752

1753 **7- Supporting Information**

- 1754
- 1755 S1 Table. Primer Sequences for Conventional PCR and for SNaPshot Multiplex
1756 System.
- 1757 S2 Table. Allelic and Genotypic Frequencies for Cytokine SNPs in Blood Donors
1758 and Household Contacts.
- 1759 S3 Table. Allelic and Genotypic Frequencies for Cytokine SNPs in Pulmonary

1760 Tuberculosis Patients Sensitive and Multidrug-Resistant Infected.

1761 S4 Table. Allelic, Genotypic and Carrier Frequencies of Cytokine SNPs in

1762 Pulmonary Tuberculosis Cases and Healthy Controls.

S1 Table. Primer Sequences for Conventional PCR and for SNaPshot Multiplex System.

refSNP	Primer Sequence
rs1800896	F 5' - ttcccaggtagagcaaac- 3' / R 5' - atggaggctggataggagt - 3' aaatccaagacaacactactaaggctctttgggaA/G
rs8193036	F 5' - ccttctctttcccccac- 3' / R 5' - tgcctgctaccaagcaact- 3' catactctctactccccctgcccccttttcccatctC/T
rs2243250	F 5' - acccaactaggcctcaact- 3' / R 5' - acagggtgcatcttgaaac- 3' galacgacgtgctctcaaaacacctaaactgggagacaatgtC/T
rs1800872	F 5' - ggggtcatggtgagcaactac- 3' / R 5' - caagcagccctccattta- 3' atccaatgaaatcgggtaaaggagcctggaacacatcctgtgaccccgcctgtA/C
rs1800629	F 5' - gccctcccagttctagttc- 3' / R 5' - aaagttggggacacacaagc- 3' aggaaacagaccacagacctggtcccaaaaagaaatgagggcaatagttttgagggcctgA/G
rs2069762	F 5' - ccattctgaacaggaaacca- 3' / R 5' - aaaccccaagactgactg- 3' ttattctttcatctgttactctgctctgcccacacaatgctattccatgttcagtgagtttaG/T
rs2430561	F 5' - gcaaagcccaccactataa- 3' / R 5' - ctcgttgcctcactgggatt - 3' tcctgtaggggtattattacagactttaaaagatgctcaaacatgtagagtggtggtggtggtggtgT/A
rs1800795	F 5' - tcgtgcatgacttcagctt- 3' / R 5' - gcctcagacatctcagtc- 3' aaagaaagtaaaggaagagtggtctgctcttagcgclagcctcaatgacgacctaaqctgacctttcccctagttgtcttcC/G
rs2275913	F 5' - gcccaaggaaatctgtaggaa- 3' / R 5' - ttcaggggtgacaccattt - 3' gcatagcagctctgctcagcttcaacaagtaagaatgaaaagagacatggtctttaggaacatgaattctgacctccattttcctcagaagA/G
rs361525	F 5' - gccctcccagttctagttc- 3' / R 5' - aaagttggggacacacaagc- 3' aaaagaatggagcaatagttttgagggcctgggacgggttcagctccaggtcctacacacaatcaqtcagtgcccagaagacccccctcgaatC/A/G

S3 Table. Allelic and Genotypic Frequencies for Cytokine SNPs in Pulmonary Tuberculosis Patients Sensitive and Multidrug-Resistant Infected.

Gene/ refSNP		Sensitive	MDR	OR (p valor)	p value*
IL-2		100	55		
rs2069762	Allele T	134 (0.67)	72 (0.68)	Reference	
	Allele G	66 (0.33)	34 (0.32)	0.96 (0.91)	
	TT	46 (0.46)	26 (0.47)	Reference	
	TG	42 (0.42)	24 (0.45)	1.09 (0.80)	
	GG	12 (0.12)	5 (0.09)	0.80 (0.70)	
IL-4		100	54		
rs2243250	Allele C	125 (0.62)	67 (0.62)	Reference	
	Allele T	75 (0.38)	41 (0.38)	1.02 (0.95)	
	CC	37 (0.37)	22 (0.41)	Reference	
	TC	51 (0.51)	23 (0.43)	0.76 (0.45)	
	TT	12 (0.12)	9 (0.16)	1.26 (0.65)	
IL-6		99	54		
rs1800795	Allele G	167 (0.84)	95 (0.88)	Reference	
	Allele C	31 (0.16)	13 (0.12)	0.74 (0.54)	
	GG	71 (0.72)	43 (0.80)	Reference	
	GC	25 (0.24)	9 (0.17)	0.59 (0.23)	
	CC	3 (0.03)	2 (0.04)	1.10 (0.91)	
IL-10		100	54		
rs1800872	Allele C	136 (0.68)	66 (0.61)	Reference	
	Allele A	64 (0.32)	42 (0.39)	1.35 (0.38)	
	CC	44 (0.44)	20 (0.37)	Reference	
	AC	48 (0.48)	26 (0.48)	1.19 (0.63)	
	AA	8 (0.08)	8 (0.15)	2.2 (0.16)	
IL-10		100	54		
rs1800896	Allele A	133 (0.66)	70 (0.65)	Reference	
	Allele G	67 (0.34)	38 (0.35)	1.07 (0.83)	
	AA	43 (0.43)	23 (0.43)	Reference	
	AG	47 (0.47)	24 (0.44)	0.95 (0.90)	
	GG	10 (0.10)	7 (0.13)	1.30 (0.63)	
IL-17A		97	51		
rs2275913	Allele G	179 (0.92)	95 (0.93)	Reference	
	Allele A	15 (0.08)	7 (0.07)	0.88 (0.85)	
	GG	84 (0.87)	44 (0.86)	Reference	
	AG	11 (0.11)	7 (0.14)	1.21 (0.70)	
	AA	2 (0.02)	0	-	
TNF					
rs361525	Allele G	192 (0.97)	94 (0.9)	Reference	
	Allele A	6 (0.03)	10 (0.1)	3.04 (0.10)	
	GG	93 (0.94)	42 (0.81)	Reference	
	AG	6(0.06)	10 (0.19)	3.69 (0.02)	0.16
TNF		100	53		
rs1800629	Allele G	173(0.86)	94(0.89)	Reference	

S4 Table. Allelic, Genotypic and Carrier Frequencies of Cytokine SNPs in Pulmonary Tuberculosis Cases and Healthy Controls.

Gene/ refSNP	Allele/ Genotype	PTB (n)	HC (n)	OR (95% CI)	p value	OR (95% CI)*	* p value
IL-2		181	165				
rs2069762	Allele T	248 (0.69)	225 (0.68)	Reference		Reference	
	Allele G	114 (0.31)	105 (0.32)	0.98 (0.62-1.55)	0.95	1.09 (0.62-1.91)	0.75
	TT	86 (0.48)	80 (0.48)	Reference		Reference	
	TG	76 (0.42)	65 (0.39)	1.08 (0.69-1.70)	0.71	1.42 (0.81-2.48)	0.22
	GG	19 (0.10)	20 (0.12)	0.88 (0.44-1.77)	0.73	0.90 (0.37-2.20)	0.82
	Carrier G	162 (0.85)	145 (0.88)	1.04 (0.68-1.59)	0.86	1.30 (0.77-2.19)	0.33
IL-4		183	172				
rs2243250	Allele C	239 (0.65)	232 (0.67)	Reference		Reference	
	Allele T	127 (0.35)	112 (0.33)	1.1 (0.7-1.71)	0.67	1.29 (0.74-2.22)	0.36
	CC	79 (0.43)	79 (0.46)	Reference		Reference	
	TC	81 (0.44)	74 (0.43)	1.09 (0.70-1.70)	0.69	1.49 (0.86-2.59)	0.16
	TT	23 (0.13)	19 (0.11)	1.21 (0.61-2.39)	0.58	1.42 (0.61-3.29)	0.42
	Carrier T	160 (0.87)	153 (0.89)	1.11 (0.73-1.70)	0.60	1.47 (0.87-2.48)	0.14
IL-10		183	172				
rs1800872	Allele C	240 (0.66)	239 (0.69)	Reference		Reference	
	Allele A	126 (0.34)	105 (0.31)	1.19 (0.76-1.86)	0.43	1.25 (0.72-2.15)	0.43
	CC	75 (0.41)	79 (0.46)	Reference		Reference	Reference
	AC	90 (0.49)	81 (0.47)	1.17 (0.76-1.80)	0.46	1.29 (0.75-2.20)	0.36
	AA	18 (0.10)	12 (0.07)	1.58 (0.71-3.50)	0.26	1.63 (0.62-4.32)	0.32
	Carrier A	108 (0.59)	93 (0.48)	1.22 (0.80-1.86)	0.35	1.33 (0.79-2.24)	0.28
IL-10		183	172				
rs1800896	Allele A	242 (0.66)	224 (0.65)	Reference		Reference	
	Allele G	124 (0.34)	120 (0.35)	0.96 (0.61-1.48)	0.84	0.87 (0.50-1.49)	0.61
	AA	79 (0.43)	69 (0.4)	Reference		Reference	
	AG	84 (0.46)	86 (0.5)	0.85 (0.55-1.32)	0.48	0.73 (0.42-1.26)	0.26
	GG	20 (0.11)	17 (0.1)	1.02 (0.50-2.12)	0.94	0.89 (0.36-2.24)	0.81

	Allele A	27 (0.14)	12 (0.11)	0.82 (0.70)	
	GG	73 (0.73)	41 (0.77)	Reference	
	AG	27(0.27)	12 (0.23)	0.79 (0.55)	

MDR Multidrug resistant, * p values was adjusted by FDR test

!

Discussão Geral

1767

1768 O Brasil ainda tem como um importante desafio controlar os casos de
1769 doenças infecciosas que apresentam altos índices de morbidade e mortalidade. A
1770 estratégia de controle da TB tem sido elaborada por programas governamentais
1771 que, basicamente, consistem em diagnosticar e tratar os casos, o mais
1772 rapidamente possível, a fim de interromper a transmissão e evitar a propagação
1773 da TB entre a população (BRASIL, 2008). Embora o Brasil venha mostrando
1774 dados positivos da redução dos números de casos novos de TB nas últimas
1775 décadas (WHO, 2015), o cenário da doença em algumas regiões brasileiras
1776 permanece preocupante. No RS, a nossa capital não só ocupa a primeira posição
1777 em incidência de TB no país, como também exibe a maior taxa de coinfeção TB-
1778 HIV (28%) e o maior percentual de abandono de tratamento (24.9%) entre as
1779 capitais brasileiras (BRASIL, 2015), o que implica na manutenção da propagação
1780 do bacilo e aumento dos casos de TB-MDR entre a população.

1781 No entanto, estima-se que apenas uma pequena fração dos indivíduos que
1782 são expostos ao bacilo *M. tuberculosis* desenvolve a doença ativa, enquanto a
1783 grande maioria, aproximadamente 95%, consegue conter a infecção,
1784 desenvolvendo a forma latente da infecção (ABEL *et al.*, 2014). Em parte, a
1785 variabilidade interindividual relacionada ao resultado da infecção por *M.*
1786 *tuberculosis* é atribuída a variabilidade observada em genes humanos que
1787 controlam a resposta imune do hospedeiro (CASANOVA & ABEL, 2002).

1788 A TB é caracterizada por sofrer influência de múltiplos genes tanto quanto
1789 por interações complexas gene-gene e gene-ambiente e também pela
1790 heterogeneidade genética (STEIN & BAKER, 2012). Isso implica dizer que a
1791 contribuição relativa dos genes envolvidos no desenvolvimento da TB tem
1792 influência do *background* genético e pode variar entre diferentes populações
1793 (STEIN & BAKER, 2012). Neste contexto, a estrutura genética observada em
1794 indivíduos brasileiros é considerada uma das mais heterogêneas do mundo
1795 (ALVES-SILVA, 2000; PENA *et al.*, 2011). E, isso torna importante a replicação de

1796 estudos conduzidos em outras populações, a fim de melhor caracterizar
1797 marcadores de suscetibilidade genéticas da TB em populações brasileiras.

1798 Assim, o foco deste trabalho foi avaliar a influência de polimorfismos
1799 genéticos na região promotora de genes das citocinas *TNF*, *IL2*, *IL4*, *IL6*, *IL10* e
1800 *IL17A* e na região intragênica do *IFNG* na suscetibilidade ao desenvolvimento da
1801 TBP na população de adultos do RS.

1802 Nesse estudo, 29% dos pacientes com TBP apresentaram diagnóstico de
1803 infecção por cepas MDR. Avaliamos a influência dos polimorfismos *TNF* -308
1804 G>A e -208G>A, *IL2* -330 T>G, *IL4* -590 C>T, *IL6* -174 G>C, *IL10* -1082 G>A e -
1805 592 A>C, e -197 G>A em pacientes infectados com cepas sensíveis e cepas
1806 MDR. Embora, os pacientes portadores do genótipo *TNF* -208GA, inicialmente
1807 tenham apresentado um risco 36.9% maior de desenvolver a infecção por cepas
1808 MDR quando comparados a infecção por cepas sensíveis, essa associação
1809 perdeu a significância estatística após correções estatísticas.

1810 Em estudos tipo caso-controle como o desenvolvido nesta tese, os
1811 controles devem ser o mais similar possível aos casos, a fim de estabelecer a
1812 relação de risco (genético) e a doença estudada (STEIN & BAKER, 2012). Aqui,
1813 assumimos que todos os indivíduos incluídos no grupo controle foram, da mesma
1814 forma, expostos ao bacilo *M. tuberculosis*.

1815 Outro ponto que merece destaque é a forma como foi composto este grupo
1816 controle, o qual incluiu tanto contatos domiciliares de pacientes com TBP quanto
1817 indivíduos doadores de sangue. Cabe ressaltar, que ambos os grupos descritos
1818 acima tiveram as distribuições alélicas e genotípicas testadas para os SNPs
1819 analisados e não foram observadas diferenças significativas. Confirmando, assim,
1820 a homogeneidade na composição do grupo controle quando combinado e
1821 criteriosamente permitindo esta não usual combinação.

1822 Estudos do polimorfismo gene *IFNG*, o +874T>A, indicam que a presença
1823 do alelo +874T está associada a maior produção desta citocina (ROSSOUW *et*
1824 *al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2010) e o mesmo alelo foi previamente considerado
1825 um fator de proteção no desenvolvimento da TB (ROSSOUW *et al.*, 2003). Neste
1826 contexto, um criterioso estudo de meta-análise representado por populações de
1827 diferentes etnias apontou uma significativa associação do alelo +874T a proteção

1828 ao desenvolvimento da TB (PACHECO *et al.*, 2008). Entretanto, os estudos
1829 genéticos do polimorfismo *IFNG* +874T>A mostraram resultados divergentes da
1830 sua associação com o risco de desenvolvimento da TB quando avaliados na
1831 população brasileira (AMIM *et al.*, 2008; LEANDRO *et al.*, 2013). Apesar da
1832 importância desta citocina no contexto da TB, neste trabalho não foi possível
1833 determinar a influência do polimorfismo *IFNG*+874T>A no desenvolvimento da
1834 TBP nesta população, uma vez que o *IFNG* +874T>A desviou do equilíbrio de
1835 Hardy-Weinberg e foi excluído das análises subsequentes.

1836 O TNF- α é uma citocina pro-inflamatória chave no controle da infecção por
1837 *M. tuberculosis* e formação do granuloma (FLYNN & CHAN, 2001). Dois SNPs na
1838 região promotora da gene TNF foram alvo do nosso estudo, -208G>A e -308G>A.
1839 Na população brasileira, a presença do alelo -308A foi associada a maior
1840 produção desta citocina (CARDOSO *et al.*, 2011) e proteção à infecção por
1841 *Mycobacterium leprae* (CARDOSO *et al.*, 2011), sugerindo este SNP como
1842 marcador de resistência à hanseníase na população brasileira. Entretanto, a
1843 influência deste polimorfismo na infecção por *M. tuberculosis* não sugere
1844 associação dos SNPs *TNF* -308G>A e -208G>A no desenvolvimento da TBP.
1845 Estes achados corroboram com estudos de meta-análise (PACHECO *et al.*, 2008;
1846 ZHANG *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012; LEE & SONG, 2015) quando avaliados
1847 de forma não estratificada quanto a etnia. Em um dos estudos de meta-análise,
1848 quando a população foi estratificada por etnia, o alelo -308A foi associado a maior
1849 risco de desenvolvimento da TB entre indivíduos asiáticos (não caucasianos)
1850 (WANG *et al.*, 2012).

1851 Com relação ao polimorfismo *IL4* -590C>T (rs2243250), os estudos
1852 funcionais desse SNP mostram que ele está associado ao aumento da força do
1853 promotor, a maior afinidade de ligação de fatores de transcrição e a alterações
1854 nos níveis de produção de IL-4 (ROSENWASSER *et al.*, 1995). Entretanto, os
1855 resultados obtidos em nosso estudo mostram que as distribuições alélicas e
1856 genotípicas do polimorfismo *IL4* -590C>T são semelhantes em casos e controles,
1857 sugerindo que este polimorfismo não influencia a resposta imune de maneira a
1858 contribuir com o resultado da infecção por *M. tuberculosis* nesta população.
1859 Corroborando com nosso resultado, o estudo desenvolvido por Möller e

1860 colaboradores não identificou associação do polimorfismo *IL4* -590C>T com a TB
1861 (MÖLLER *et al.*, 2010). Enquanto, outros modestos estudos sugerem a influência
1862 deste SNP na suscetibilidade ao desenvolvimento da TBP em populações do Sul
1863 da Índia e Rússia (VIDYARANI *et al.*, 2006; NASLEDNIKOVA *et al.*, 2009).

1864 Com relação aos polimorfismos do gene da *IL10* investigados, os estudos
1865 de meta-análise dos SNPs da região promotora deste gene mostram que os lócus
1866 -1082G>A e -592A>C contribuem de maneira diferente para o resultado da
1867 infecção por *M. tuberculosis* quando avaliados em populações distintas (LIANG *et*
1868 *al.*, 2014; GAO *et al.*, 2015). Neste sentido, -1082A foi associado ao menor risco
1869 de desenvolvimento da TB em europeus e americanos enquanto o -592C foi
1870 associado a proteção para TB em asiáticos (LIANG *et al.*, 2014) e -592A a
1871 proteção em europeus (GAO *et al.* 2015). Entretanto, nenhum estudo em
1872 populações brasileiras contribuiu com os resultados reportados nas meta-
1873 análises. Em nosso estudo, ambos os polimorfismos do gene *IL10* -1082G>A e -
1874 592A>C mostraram frequências alélicas e genótípicas semelhantes em casos e
1875 controles e não sugerem qualquer associação de risco no desenvolvimento da
1876 TBP.

1877 Outro polimorfismo investigado, foi o polimorfismo *IL2* -330 T>G
1878 (rs2069762), o qual foi alvo de seletos estudos para associação ao
1879 desenvolvimento da TB em populações distintas (AMIRZARGAR *et al.*, 2006;
1880 SELVARAJ *et al.*, 2008; NASLEDNIKOVA *et al.*, 2009; TRAJKOV *et al.*, 2009).
1881 Estes estudos são modestos e apresentam resultados inconsistentes e
1882 inconclusivos. Aqui, nossos resultados mostram que as frequências alélicas e
1883 genótípicas do *IL2* -330 T>G (rs2069762) em indivíduos casos e controles são
1884 semelhantes e não sugerem influência no risco ao desenvolvimentoda TBP entre
1885 os indivíduos do RS. Corroboram com os nossos resultados os estudos de dois
1886 outros autores realizados nas populações iranianas e macedonia respectivamente
1887 (AMIRZARGAR *et al.*, 2006; TRAJKOV *et al.*, 2009).

1888 Interessantemente, com relação o polimorfismo *IL6* -174G>C (rs1800795),
1889 nossos resultados sugerem que os diferentes genótipos apresentados para este
1890 polimorfismos contribuem de forma diferente para o resultado da infecção por *M.*
1891 *tuberculosis*. Nossas análises indicaram que os portadores do alelo -174C

1892 (GC/CC) apresentam menor risco ao desenvolvimento da TBP nessa população.
1893 Nossos resultados corroboram com o reportado em um recente estudo de meta-
1894 análise, o qual sugerem que o alelo *IL6* -174C e o genótipo *IL6* -174 GC estão
1895 associados a proteção ao desenvolvimento da TB (MAO *et al.*, 2015).

1896 Embora não tenhamos avaliado a influência deste SNP sobre a produção
1897 da IL-6, os estudos funcionais do *IL6* -174G>C sugerem que os portadores do
1898 alelo -174G produzem níveis mais elevados desta citocina (FISHMAN *et al.*, 1998;
1899 RIVERA-CHAVEZ *et al.*, 2003). Neste contexto, os mecanismos subjacentes a
1900 suscetibilidade à infecção micobacteriana associados a *IL6* -174G>C não estão
1901 bem definidos, embora tenha sido proposto que a maior produção de IL-6 é capaz
1902 de inibir outras importantes citocinas, como o TNF- α , IL-1 β (AZAB *et al.*, 2012) e
1903 o IFN- γ (NAGABHUSHANAM *et al.*, 2003).

1904 A ação da IL-17 durante TB é amplamente atribuída a sua atividade sobre
1905 o recrutamento de neutrófilos e também ao seu envolvimento no reforço da
1906 ativação da resposta imune tipo Th1 (UMEMURA *et al.*, 2007; WORNIAK *et al.*,
1907 2010; ETNA *et al.*, 2014). Dois polimorfismos da região promotora do gene *IL17A*,
1908 -197G>A e -692C>T, foram inicialmente incluídos neste estudo, entretanto
1909 optamos por excluir o *IL17A* -692C>T das nossas análises após as genotipagens,
1910 uma vez que este não se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg na
1911 população amostrada.

1912 O polimorfismo *IL17A* -197A>G (rs2275913) está localizado dentro do
1913 motivo de ligação do fator nuclear de células T. Previamente, o alelo -197A e o
1914 genótipo -197AA foram associados a uma maior afinidade do promotor e a maior
1915 expressão desta citocina (LIU *et al.*, 2004).

1916 Para o polimorfismo *IL17A* -197A>G, observamos que presença do alelo -
1917 197A foi significativamente maior entre os indivíduos do grupo controle. Em
1918 consequência, os resultados mostraram uma forte associação do alelo A com
1919 proteção ao desenvolvimento da TBP, sugerindo uma maior habilidade desses
1920 indivíduos em conter a infecção por *M. tuberculosis*.

1921 Em convergência com nossos resultados, o genótipo -197GG foi associado
1922 ao risco aumentado da doença em indivíduos do norte da Espanha (OCEJO-
1923 VINYALS *et al.*, 2013). No entanto, outros estudos não encontraram associação

1924 desse SNP com a TB (PENG *et al.*, 2013) Surpreendentemente, contrariando as
1925 evidências de proteção atribuídas ao alelo -197A ou suscetibilidade ao alelo -
1926 197G, um estudo recente em asiáticos mostrou que o genótipo -197AA representa
1927 maior risco para o desenvolvimento da TB entre esses indivíduos (SHI & ZHANG,
1928 2015).

1929 Os conhecimentos atuais resultantes das tentativas de identificar variantes
1930 genéticas associadas com a TBP apontam para heterogeneidade subjacente,
1931 possivelmente devido, pelo menos em parte, à longa relação entre *M. tuberculosis*
1932 e seu hospedeiro humano, através da história natural da TB. Em particular, é
1933 possível que grupos específico de indivíduos com TB manifestem determinados
1934 fatores de risco genéticos, enquanto que outros grupos apresentam outros fatores
1935 de risco genéticos (GAGNEUX, 2012; COMAS *et al.*, 2013).

1936 Assim, é curioso que ainda existam tão poucos estudos tentando identificar
1937 polimorfismos genéticos que influenciem a suscetibilidade genética da TB entre os
1938 genes de citocinas em populações brasileiras. Neste sentido, nosso trabalho é
1939 inédito, porque reporta pela primeira vez um estudo do tipo caso-controle em
1940 importantes genes de citocinas em indivíduos com TBP no Rio Grande do Sul.
1941 Cabe, neste contexto, salientar que a população analisada apresenta uma
1942 composição singular, da qual contribuem para o pool genético as ancestralidades
1943 africana (10.3%), nativo-americana (9.4%) e europeia (79.5%) (PENA *et al.*,
1944 2011).

1945 Assim, os resultados dessa tese, em conjunto com aos dados reportados
1946 em outras publicações sugerem que os polimorfismos *IL2* (rs2069762), *IL4*
1947 (rs2243250), *IL10* (rs1800872; rs1800896), *IL6* (rs1800795), *IL17A* (rs2275913) e
1948 *TNF* (rs1800629; rs361525) contribuem para resultado da infecção por *M.*
1949 *tuberculosis* de maneira diferente entre populações distintas. Além disso, embora
1950 nossos dados tenham mostrado que os polimorfismos *IL2* (rs2069762), *IL4*
1951 (rs2243250), *IL10* (rs1800872; rs1800896) e *TNF* (rs1800629; rs361525) não
1952 estão diretamente associados ao resultado da TBP na população analisada, isso
1953 não deve excluir a importância dessas citocinas ou de outros SNPs nesses genes
1954 no contexto da infecção por *M. tuberculosis*. Uma vez que os SNPs investigados

1955 podem ainda ser importantes em associação com outros marcadores, como
1956 severidade, por exemplo, ou fatores ambientais.

1957 Acreditamos ser essencial a discriminação entre a imunidade protetora e
1958 danosa durante a infecção por *M. tuberculosis* para melhor entender a resposta
1959 imune do hospedeiro. Nesse sentido, estudos genéticos nos permitem identificar
1960 populações de risco e seus resultados podem ajudar a desenhar vacinas mais
1961 efetivas e a melhorar as estratégias de tratamento da doença. Por fim, os dados
1962 gerados com o desenvolvimento desta tese contribuíram com evidências do
1963 envolvimento das citocinas pro-inflamatórias IL-6 e IL-17A na imunofisiologia da
1964 TB, bem como foram capazes de identificar pela primeira vez o papel protetor dos
1965 polimorfismos *IL17A* -197A>G e *IL6* -174G>C no desenvolvimento da TBP na
1966 população do sul do Brasil. Entretanto, replicações independente são necessárias
1967 a fim de replicar os resultados desta associação em outras populações.

1968

1969

CONCLUSÕES

1970 1. As citocinas pro-inflamatórias IL-6 e IL-17A desempenham um papel importante
1971 na imunofisiologia da TB.

1972 2. Os SNPs *IL17A* -197A>G (rs2275913) e *IL6* -174 C>G (rs1800795) estão
1973 associados a proteção ao desenvolvimento da TBP na população do RS.

1974 3. Os SNPs *IL17A* -197A>G (rs2275913) e *IL6* -174 C>G (rs1800795) são
1975 possíveis marcadores de suscetibilidade genética `a TBP e estão envolvidos na
1976 imunogênese da TBP na população do RS.

1977 4. Os SNPs *IL2* -330T>G (rs2069762), *IL4* -5900C>T (rs2243250), *IL10* -592A>C
1978 (rs1800872) e -1082G>A (rs1800896), TNF -308G>A (rs1800629) e -208 G>A
1979 (rs361525) não estão diretamente associados a imunogênese da TBP na
1980 população do RS.

PERSPECTIVAS

1981

1982 Como perspectivas futuras a este trabalho, desejamos avaliar os
1983 polimorfismos *IL17A* -197A>G e *IL6* -174 G>C em outras populações, a fim de
1984 replicar nossos resultados e validar o efeito protetor destes no desenvolvimento
1985 da TB. Da mesma forma, consideramos importante a avaliação da influência dos
1986 diferentes genótipos dos polimorfismos *IL17A* -197A>G e *IL6* -174 G>C sob a
1987 produção das respectivas citocina em exposição a *M. tuberculosis*. Assim
1988 poderemos melhor compreender o efeito protetor atribuídos ao alelo -197A e aos
1989 portadores do alelo -174C(GC/CC) no desenvolvimento da TBP.

1990

1991

1992

1993

1994

1995

1996

1997

1998

1999

2000

2001

2002

2003

2004

Referências

2005

- 2006 ABEL, L. et al. Human genetic of tuberculosis: a long and winding road. **Philos**
2007 **Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 369, n. 1645, p. 20130428, 2014. ISSN 1471-
2008 2970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24821915> >.
2009
- 2010 ALCAÏS, A. et al. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic
2011 diseases. **J Exp Med**, v. 202, n. 12, p. 1617-21, Dec 2005. ISSN 0022-1007.
2012 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365144> >.
2013
- 2014 ALEXANDER, K. A. et al. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen,
2015 *M. mungi*. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 8, p. 1296-9, Aug 2010. ISSN 1080-6059.
2016 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20678329> >.
2017
- 2018 ALMEIDA, A. S. et al. Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung
2019 immune response that impairs Th1-type immunity. **J Immunol**, v. 183, n. 1, p.
2020 718-31, Jul 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em:
2021 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19535630> >.
2022
- 2023 ALVES-SILVA, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum**
2024 **Genet**, v. 67, n. 2, p. 444-61, Aug 2000. ISSN 0002-9297. Disponível em:
2025 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10873790>> .
2026
- 2027 AMIM, L. H. et al. Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism
2028 in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. **Mol Biol Rep**, v. 35, n. 4,
2029 p. 563-6, Dec 2008. ISSN 0301-4851. Disponível em:
2030 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17682837> >.
2031
- 2032 AMIRZARGAR, A. A. et al. Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian
2033 patients with pulmonary tuberculosis. **Eur Cytokine Netw**, v. 17, n. 2, p. 84-9,
2034 Jun 2006. ISSN 1148-5493. Disponível em:
2035 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16840026> >.
2036
- 2037 ANSARI, A. et al. Cytokine gene polymorphisms across tuberculosis clinical
2038 spectrum in Pakistani patients. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4778, 2009. ISSN
2039 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19274101> >.
2040
- 2041 ARISAWA, T. et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and
2042 interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. **J Clin Immunol**,v.
2043 28, n. 1, p. 44-9, Jan 2008. ISSN 0271-9142. Disponível em:
2044 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17828618> >.
2045
- 2046 AZAD, A. K.; SADEE, W.; SCHLESINGER, L. S. Innate immune gene
2047 polymorphisms in tuberculosis. **Infect Immun**, v. 80, n. 10, p. 3343-59, Oct 2012.

2048 ISSN 1098-5522. Disponível em:
2049 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22825450> >.
2050

2051 BAGHDADI, J. E. et al. An autosomal dominant major gene confers
2052 predisposition to pulmonary tuberculosis in adults. **J Exp Med**, v. 203, n. 7, p.
2053 1679-84, Jul 2006. ISSN 0022-1007. Disponível em:
2054 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16801399> >.
2055

2056 BAKER, A. R. et al. Genetic susceptibility to tuberculosis associated with
2057 cathepsin Z haplotype in a Ugandan household contact study. **Hum Immunol**, v.
2058 72, n. 5, p. 426-30, May 2011. ISSN 1879-1166. Disponível em:
2059 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21354459> >.
2060 BALASUBRAMANIAN, V. et al. Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical
2061 localization. **Tuber Lung Dis**, v. 75, n. 3, p. 168-78, Jun 1994. ISSN 0962-8479.
2062 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7919306> >.
2063

2064 BARNES, P. F. et al. Cytokine production at the site of disease in human
2065 tuberculosis. **Infect Immun**, v. 61, n. 8, p. 3482-9, Aug 1993. ISSN 0019-9567.
2066 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8335379> >.
2067

2068 BARRY, C. E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology
2069 and intervention strategies. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 12, p. 845-55, Dec 2009.
2070 ISSN 1740-1534. Disponível em:
2071 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855401> >.
2072

2073 BELLAMY, R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host
2074 genetics. **Genes Immun**, v. 4, n. 1, p. 4-11, Jan 2003. ISSN 1466-4879.
2075 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12595896> >.
2076

2077 BELLAMY, R. et al. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to
2078 tuberculosis in West Africans. **N Engl J Med**, v. 338, n. 10, p. 640-4, Mar 1998.
2079 ISSN 0028-4793. Disponível em:
2080 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486992> >.
2081

2082 BOTTAI, D. Stinear T, Supply P, Brosch R. Mycobacterial Pathogenomics and
2083 Evolution, p 27-47, 2014. In Hatfull G, Jacobs W (ed), **Molecular Genetics of**
2084 **Mycobacteria, Second Edition**. ASM Press, Washington, DC.
2085

2086 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento
2087 de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da
2088 tuberculose no Brasil / **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde,
2089 Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde,
2090 2011. Disponível em:
2091 http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/TB/mat_tec/manuais/MS11_Manual_Recom
2092 .pdf. Acessado em: 09 nov. 2015.
2093

2094 BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância
2095 em Saúde - **Ministério da Saúde**, v.46, n. 9, 2015. Disponível em:

2096 <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/25/Boletim-tuberculose-2015.pdf>
2097 Acessado em: 019 nov. 2015.
2098
2099 BOYMAN, O.; SPRENT, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and
2100 activation of the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 3, p. 180-90, Mar
2101 2012. ISSN 1474-1741. Disponível em:
2102 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22343569> >.
2103
2104 BREWER, T. F. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guérin vaccine: a
2105 meta-analysis of the literature. **Clin Infect Dis**, v. 31 Suppl 3, p. S64-7, Sep
2106 2000. ISSN 1058-4838. Disponível em:
2107 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11010824> >.
2108
2109 BROSCHE, R. et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium
2110 tuberculosis complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 6, p. 3684-9, Mar
2111 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em:
2112 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891304> >.
2113
2114 CARDONA, P. J. New insights on the nature of latent tuberculosis infection and
2115 its treatment. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 6, n. 1, p. 27-39, Mar 2007.
2116 ISSN 1871-5281. Disponível em:
2117 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17352686> >.
2118
2119 CARDOSO, C. C. et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is
2120 associated with leprosy among Brazilians. **Hum Genet**, v. 128, n. 5, p. 481-90,
2121 Nov 2010. ISSN 1432-1203. Disponível em:
2122 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20714752> >.
2123
2124 CARDOSO, C. C. et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is
2125 associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment,
2126 meta-analysis, and functional study. **J Infect Dis**, v. 204, n. 8, p. 1256-63, Oct
2127 2011. ISSN 1537-6613. Disponível em:
2128 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917899> >.
2129
2130 CASANOVA, J. L.; ABEL, L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the
2131 human model. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 581-620, 2002. ISSN 0732-0582.
2132 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861613> >.
2133
2134 CASANOVA, J. L.; ABEL, L. Inborn errors of immunity to infection: the rule rather
2135 than the exception. **J Exp Med**, v. 202, n. 2, p. 197-201, Jul 2005. ISSN 0022-
2136 1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16027233> >.
2137
2138 COBAT, A. et al. Identification of a major locus, TNF1, that controls BCG-
2139 triggered tumor necrosis factor production by leukocytes in an area
2140 hyperendemic for tuberculosis. **Clin Infect Dis**, v. 57, n. 7, p. 963-70, Oct 2013.
2141 ISSN 1537-6591. Disponível em:
2142 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800941> >.
2143

2144 COLDITZ, G. A. et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis.
2145 Meta-analysis of the published literature. **JAMA**, v. 271, n. 9, p. 698-702, Mar
2146 1994. ISSN 0098-7484. Disponível em:
2147 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8309034> >.
2148
2149 COMAS, I. et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of
2150 Mycobacterium tuberculosis with modern humans. **Nat Genet**, v. 45, n. 10, p.
2151 1176-82, Oct 2013. ISSN 1546-1718. Disponível em:
2152 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995134> >.

2153 COMSTOCK G. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Prophit Study. **Am Rev**
2154 **Resp Dis**.1978;117:621–624.
2155
2156 COOPER, A. M. et al. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of
2157 protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium
2158 tuberculosis. **J Exp Med**, v. 186, n. 1, p. 39-45, Jul 1997. ISSN 0022-1007.
2159 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9206995> >.
2160
2161 COTE-SIERRA, J. et al. Interleukin 2 plays a central role in Th2
2162 differentiation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 11, p. 3880-5, Mar 2004.
2163 ISSN 0027-8424. Disponível em:
2164 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004274> >.
2165
2166 CRUZ, A. et al. BCG vaccination-induced long-lasting control of Mycobacterium
2167 tuberculosis correlates with the accumulation of a novel population of CD4⁺ IL-
2168 17⁺ TNF⁺ IL-2⁺ T cells. **Vaccine**, v. 33, n. 1, p. 85-91, Jan 2015. ISSN 1873-
2169 2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25448107> >.
2170
2171 CRUZ, A. T.; STARKE, J. R. Clinical manifestations of tuberculosis in
2172 children. **Paediatr Respir Rev**, v. 8, n. 2, p. 107-17, Jun 2007. ISSN 1526-0542.
2173 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574154> >.
2174
2175 DELGADO, J. C. et al. Ethnic-specific genetic associations with pulmonary
2176 tuberculosis. **J Infect Dis**, v. 186, n. 10, p. 1463-8, Nov 2002. ISSN 0022-1899.
2177 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12404162> >.
2178
2179 DORHOI, A.; KAUFMANN, S. H. Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial
2180 infection. **Semin Immunol**, v. 26, n. 3, p. 203-9, Jun 2014. ISSN 1096-3618.
2181 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24819298> >.
2182
2183 EL-AHMADY, O. et al. Elevated concentrations of interleukins and leukotriene in
2184 response to Mycobacterium tuberculosis infection. **Ann Clin Biochem**, v. 34 (Pt
2185 2), p. 160-4, Mar 1997. ISSN 0004-5632. Disponível em:
2186 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9133249> >.
2187
2188 ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, v.
2189 12, n. 8, p. 581-91, Aug 2012. ISSN 1474-1741. Disponível em:
2190 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22790178> >.

2191
2192 ESMAIL, H. et al. The ongoing challenge of latent tuberculosis. **Philos Trans R**
2193 **Soc Lond B Biol Sci**, v. 369, n. 1645, p. 20130437, 2014. ISSN 1471-2970.
2194 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24821923> >.
2195
2196 ETNA, M. P. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: a two-
2197 edged sword in TB pathogenesis. **Semin Immunol**, v. 26, n. 6, p. 543-51, Dec
2198 2014. ISSN 1096-3618. Disponível em:
2199 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25453229> >.
2200
2201 FENHALLS, G. et al. In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and
2202 tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granulomas. **Infect**
2203 **Immun**, v. 68, n. 5, p. 2827-36, May 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em:
2204 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768979> >.
2205
2206 FIORENTINO, D. F. et al. a. IL-10 inhibits cytokine production by activated
2207 macrophages. **J Immunol**, v. 147, n. 11, p. 3815-22, Dec 1991. ISSN 0022-
2208 1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1940369> >.
2209
2210 FIORENTINO, D. F. et al. b. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit
2211 cytokine production by Th1 cells. **J Immunol**, v. 146, n. 10, p. 3444-51, May
2212 1991. ISSN 0022-1767. Disponível em:
2213 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1827484> >.
2214
2215 FISHMAN, D. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6)
2216 gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with
2217 systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest**, v. 102, n. 7, p. 1369-76,
2218 Oct 1998. ISSN 0021-9738. Disponível em:
2219 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9769329> >.
2220
2221 FITNESS, J. et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in
2222 the Karonga district of northern Malawi. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, n. 3, p. 330-
2223 40, Sep 2004. ISSN 0002-9637. Disponível em:
2224 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381816> >.
2225
2226 FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 19,
2227 p. 93-129, 2001. ISSN 0732-0582. Disponível em:
2228 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244032> >.
2229
2230 FLYNN, J. L.; CHAN, J.; LIN, P. L. Macrophages and control of granulomatous
2231 inflammation in tuberculosis. **Mucosal Immunol**, v. 4, n. 3, p. 271-8, May 2011.
2232 ISSN 1935-3456. Disponível em:
2233 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21430653> >.
2234
2235 FORBES, E. K. et al. Multifunctional, high-level cytokine-producing Th1 cells in
2236 the lung, but not spleen, correlate with protection against Mycobacterium
2237 tuberculosis aerosol challenge in mice. **J Immunol**, v. 181, n. 7, p. 4955-64, Oct

2238 2008. ISSN 1550-6606. Disponível em:
2239 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18802099> >.
2240
2241 GAGNEUX, S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. **Philos Trans**
2242 **R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, n. 1590, p. 850-9, Mar 2012. ISSN 1471-2970.
2243 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22312052> >.
2244
2245 GAO, X. et al. Interleukin-10 promoter gene polymorphisms and susceptibility to
2246 tuberculosis: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0127496, 2015. ISSN
2247 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26030829> >.
2248
2249 GAZZINELLI, R. T. et al. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide
2250 production by IFN-gamma-activated macrophages. **J Immunol**, v. 148, n. 6, p.
2251 1792-6, Mar 1992. ISSN 0022-1767. Disponível em:
2252 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1541819> >.
2253
2254 GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. Mycobacterium tuberculosis: success
2255 through dormancy. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 514-32, May 2012. ISSN
2256 1574-6976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22320122> >.
2257
2258 GIACOMINI, E. et al. Infection of human macrophages and dendritic cells with
2259 Mycobacterium tuberculosis induces a differential cytokine gene expression that
2260 modulates T cell response. **J Immunol**, v. 166, n. 12, p. 7033-41, Jun 2001.
2261 ISSN 0022-1767. Disponível em:
2262 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390447> >.
2263
2264 GIDEON, H. P.; FLYNN, J. L. Latent tuberculosis: what the host
2265 "sees"? **Immunol Res**, v. 50, n. 2-3, p. 202-12, Aug 2011. ISSN 1559-0755.
2266 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21717066> >.
2267
2268 GOPAL, R. et al. Unexpected role for IL-17 in protective immunity against
2269 hypervirulent Mycobacterium tuberculosis HN878 infection. **PLoS Pathog**, v. 10,
2270 n. 5, p. e1004099, May 2014. ISSN 1553-7374. Disponível em:
2271 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24831696> >.
2272
2273 GRANDI, T. et al. Tumour necrosis factor -308 and -238 promoter
2274 polymorphisms are predictors of a null virological response in the treatment of
2275 Brazilian hepatitis C patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 345-51,
2276 Jun 2014. ISSN 1678-8060. Disponível em:
2277 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789557> >.
2278
2279 HARARI, A. et al. Dominant TNF- α + Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+
2280 T cell responses discriminate between latent infection and active disease. **Nat**
2281 **Med**, v. 17, n. 3, p. 372-6, Mar 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em:
2282 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21336285> >.
2283
2284 HARDING, C. V.; BOOM, W. H. Regulation of antigen presentation by
2285 Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. **Nat Rev Microbiol**, v.

2286 8, n. 4, p. 296-307, Apr 2010. ISSN 1740-1534. Disponível em:
2287 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20234378> >.
2288
2289 HENAO, M. I. et al. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with
2290 different clinical presentations of tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 86, n. 1,
2291 p. 11-9, Jan 2006. ISSN 1472-9792. Disponível em:
2292 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925543> >.
2293
2294 HUARD, R. C. et al. The Mycobacterium tuberculosis complex-restricted gene
2295 cfp32 encodes an expressed protein that is detectable in tuberculosis patients
2296 and is positively correlated with pulmonary interleukin-10. **Infect Immun**, v. 71, n.
2297 12, p. 6871-83, Dec 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em:
2298 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14638775> >.
2299
2300 INDRIGO, J.; HUNTER, R. L.; ACTOR, J. K. Influence of trehalose 6,6'-
2301 dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow
2302 macrophages. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 7, p. 1991-8, Jul 2002. ISSN 1350-
2303 0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12101287> >.
2304
2305 JO, E. K. et al. Intracellular signalling cascades regulating innate immune
2306 responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. **Cell**
2307 **Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 1087-98, May 2007. ISSN 1462-5814. Disponível em:
2308 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17359235> >.
2309
2310 JOUANGUY, E. et al. Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child
2311 with tuberculoid bacillus Calmette-Guérin infection and a sibling with clinical
2312 tuberculosis. **J Clin Invest**, v. 100, n. 11, p. 2658-64, Dec 1997. ISSN 0021-
2313 9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9389728> >.
2314
2315 KAUFMANN, S. H. et al. Mycobacterium tuberculosis and the host response. **J**
2316 **Exp Med**, v. 201, n. 11, p. 1693-7, Jun 2005. ISSN 0022-1007. Disponível em:
2317 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939785> >.
2318
2319 KHADER, S. A. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective
2320 pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium
2321 tuberculosis challenge. **Nat Immunol**, v. 8, n. 4, p. 369-77, Apr 2007. ISSN
2322 1529-2908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17351619>>.
2323
2324 KHADER, S. A. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T
2325 cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. **J Exp Med**, v. 203, n. 7,
2326 p. 1805-15, Jul 2006. ISSN 0022-1007. Disponível em:
2327 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16818672> >.
2328
2329 LADEL, C. H. et al. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant
2330 mice. **Infect Immun**, v. 65, n. 11, p. 4843-9, Nov 1997. ISSN 0019-9567.
2331 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353074> >.
2332

2333 LALVANI, A.; PAREEK, M. Interferon gamma release assays: principles and
2334 practice. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 28, n. 4, p. 245-52, Apr 2010. ISSN
2335 1578-1852. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783328> >.
2336

2337 LAW, K. et al. Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor
2338 necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in
2339 pulmonary tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 153, n. 2, p. 799-804,
2340 Feb 1996. ISSN 1073-449X. Disponível em:
2341 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8564135>>.
2342

2343 LEANDRO, A. C. et al. No association of IFNG+874T/A SNP and NOS2A-
2344 954G/C SNP variants with nitric oxide radical serum levels or susceptibility to
2345 tuberculosis in a Brazilian population subset. **Biomed Res Int**, v. 2013, p.
2346 901740, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em:
2347 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024215>>.
2348

2349 LEE, H. M. et al. Dectin-1 is inducible and plays an essential role for
2350 mycobacteria-induced innate immune responses in airway epithelial cells. **J Clin**
2351 **Immunol**, v. 29, n. 6, p. 795-805, Nov 2009. ISSN 1573-2592. Disponível em:
2352 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19633936> >.
2353

2354 LEE, Y. H.; SONG, G. G. Associations between tumor necrosis factor- α
2355 polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis: meta-
2356 analysis. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 3, p. 8602-12, 2015. ISSN 1676-5680.
2357 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26345791> >.
2358

2359 LIANG, B. et al. Association between IL-10 gene polymorphisms and
2360 susceptibility of tuberculosis: evidence based on a meta-analysis. **PLoS One**, v.
2361 9, n. 2, p. e88448, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em:
2362 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24523896> >.
2363

2364 LIANG, L. et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms and their protein
2365 production in pleural fluid in patients with tuberculosis. **FEMS Immunol Med**
2366 **Microbiol**, v. 62, n. 1, p. 84-90, Jun 2011. ISSN 1574-695X. Disponível em:
2367 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21314735> >.
2368

2369 LIAO, W. et al. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates
2370 differentiation into helper T cell lineages. **Nat Immunol**, v. 12, n. 6, p. 551-9, Jun
2371 2011. ISSN 1529-2916. Disponível em:
2372 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21516110> >.
2373

2374 LIAO, W. et al. Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-
2375 mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. **Nat**
2376 **Immunol**, v. 9, n. 11, p. 1288-96, Nov 2008. ISSN 1529-2916. Disponível em:
2377 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18820682> >.
2378

2379 LIENHARDT, C. et al. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced
2380 Th1 and increased Th2 activity in vivo. **Eur J Immunol**, v. 32, n. 6, p. 1605-13,

2381 Jun 2002. ISSN 0014-2980. Disponível em:
2382 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12115643> >.
2383
2384 LILLEBAEK, T. et al. Stability of DNA patterns and evidence of Mycobacterium
2385 tuberculosis reactivation occurring decades after the initial infection. **J Infect**
2386 **Dis**, v. 188, n. 7, p. 1032-9, Oct 2003. ISSN 0022-1899. Disponível em:
2387 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14513424> >.
2388
2389 LITTMAN, D. R.; RUDENSKY, A. Y. Th17 and regulatory T cells in mediating and
2390 restraining inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 845-58, Mar 2010. ISSN 1097-
2391 4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303875> >.
2392
2393 LIU, X. K.; LIN, X.; GAFFEN, S. L. Crucial role for nuclear factor of activated T
2394 cells in T cell receptor-mediated regulation of human interleukin-17. **J Biol**
2395 **Chem**, v. 279, n. 50, p. 52762-71, Dec 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em:
2396 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15459204> >.
2397
2398 LÓPEZ-MADERUELO, D. et al. Interferon-gamma and interleukin-10 gene
2399 polymorphisms in pulmonary tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 167,
2400 n. 7, p. 970-5, Apr 2003. ISSN 1073-449X. Disponível em:
2401 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531774> >.
2402
2403 MAARTENS, G.; WILKINSON, R. J. Tuberculosis. **Lancet**, v. 370, n. 9604, p.
2404 2030-43, Dec 2007. ISSN 1474-547X. Disponível em:
2405 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719083> >.
2406
2407 MAO, X. et al. IL-1 β +3953C/T, -511T/C and IL-6 -174C/G polymorphisms in
2408 association with tuberculosis susceptibility: A meta-analysis. **Gene**, Jul 2015.
2409 ISSN 1879-0038. Disponível em:
2410 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26169021> >.
2411
2412 MARAIS, B. J. et al. Childhood pulmonary tuberculosis: old wisdom and new
2413 challenges. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 173, n. 10, p. 1078-90, May 2006.
2414 ISSN 1073-449X. Disponível em:
2415 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16484674> >.
2416
2417 MCALEER, J. P.; KOLLS, J. K. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate
2418 pulmonary immune defense. **Immunol Rev**, v. 260, n. 1, p. 129-44, Jul 2014.
2419 ISSN 1600-065X. Disponível em:
2420 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24942687> >.
2421
2422 MILLINGTON, K. A. et al. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2
2423 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load. **J**
2424 **Immunol**, v. 178, n. 8, p. 5217-26, Apr 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em:
2425 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404305> >.
2426

2427 MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev**
2428 **Immunol**, v. 19, p. 683-765, 2001. ISSN 0732-0582. Disponível em:
2429 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051> >.
2430
2431 MÖLLER, M.; DE WIT, E.; HOAL, E. G. Past, present and future directions in
2432 human genetic susceptibility to tuberculosis. **FEMS Immunol Med Microbiol**,v.
2433 58, n. 1, p. 3-26, Feb 2010. ISSN 1574-695X. Disponível em:
2434 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19780822> >.
2435
2436 NAGABHUSHANAM, V. et al. Innate inhibition of adaptive immunity:
2437 Mycobacterium tuberculosis-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN-
2438 gamma. **J Immunol**, v. 171, n. 9, p. 4750-7, Nov 2003. ISSN 0022-1767.
2439 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568951> >.
2440 NAKADA, T. A. et al. IL17A genetic variation is associated with altered
2441 susceptibility to Gram-positive infection and mortality of severe sepsis. **Crit**
2442 **Care**, v. 15, n. 5, p. R254, 2011. ISSN 1466-609X. Disponível em:
2443 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22026963> >.
2444
2445 NASLEDNIKOVA, I. O. et al. Allelic polymorphism of cytokine genes during
2446 pulmonary tuberculosis. **Bull Exp Biol Med**, v. 148, n. 2, p. 175-80, Aug 2009.
2447 ISSN 1573-8221. Disponível em:
2448 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027321> >.
2449
2450 O'GARRA, A. et al. The immune response in tuberculosis. **Annu Rev**
2451 **Immunol**, v. 31, p. 475-527, 2013. ISSN 1545-3278. Disponível em:
2452 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23516984> >.
2453
2454 OCEJO-VINYALS, J. G. et al. The IL-17 G-152A single nucleotide polymorphism
2455 is associated with pulmonary tuberculosis in northern Spain. **Cytokine**, v. 64, n.
2456 1, p. 58-61, Oct 2013. ISSN 1096-0023. Disponível em:
2457 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778030> >.
2458
2459 OKAMOTO YOSHIDA, Y. et al. Essential role of IL-17A in the formation of a
2460 mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. **J Immunol**, v. 184, n. 8,
2461 p. 4414-22, Apr 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em:
2462 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20212094> >.
2463
2464 PACHECO, A. G.; CARDOSO, C. C.; MORAES, M. O. IFNG +874T/A, IL10 -
2465 1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis
2466 susceptibility: a meta-analysis study. **Hum Genet**, v. 123, n. 5, p. 477-84, Jun
2467 2008. ISSN 1432-1203. Disponível em:
2468 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18414898> >.
2469
2470 PAI, M.; ZWERLING, A.; MENZIES, D. Systematic review: T-cell-based assays
2471 for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. **Ann Intern Med**,v.
2472 149, n. 3, p. 177-84, Aug 2008. ISSN 1539-3704. Disponível em:
2473 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593687> >.
2474

2475 PENA, S. D. et al. The genomic ancestry of individuals from different
2476 geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One**, v. 6, n.
2477 2, p. e17063, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em:
2478 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21359226> >.
2479

2480 PENG, R. et al. The IL-17F sequence variant is associated with susceptibility to
2481 tuberculosis. **Gene**, v. 515, n. 1, p. 229-32, Feb 2013. ISSN 1879-0038.
2482 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23219503> >.
2483

2484 PFYFFER, G. E. et al. Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by
2485 using the automated BACTEC 9000 MB system and comparison with radiometric
2486 and solid-culture systems. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 9, p. 2229-34, Sep 1997.
2487 ISSN 0095-1137. Disponível em:
2488 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276393> >.
2489

2490 PHILIPS, J. A.; ERNST, J. D. Tuberculosis pathogenesis and immunity. **Annu**
2491 **Rev Pathol**, v. 7, p. 353-84, 2012. ISSN 1553-4014. Disponível em:
2492 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22054143> >.
2493

2494 PIETERS, J. Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a
2495 balance. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 6, p. 399-407, Jun 2008. ISSN 1934-6069.
2496 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18541216> >.
2497

2498 PONNUSWAMY, A et al. Respiratory tuberculosis. In: **Clinical Tuberculosis,**
2499 **Fifth Edition**, cap. 9, p. 134-146, 2014.
2500

2501 PRAVICA, V. et al. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the
2502 human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA
2503 microsatellite marker of high IFN-gamma production. **Hum Immunol**, v. 61, n. 9,
2504 p. 863-6, Sep 2000. ISSN 0198-8859. Disponível em:
2505 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11053629> >.
2506

2507 PUFFER R. Familial susceptibility to tuberculosis; Its importance as a public
2508 health problem. **Harvard University Press, Cambridge**, p. 106, 1944 .
2509

2510 QI, H. et al. rs2243268 and rs2243274 of Interleukin-4 (IL-4) gene are associated
2511 with reduced risk for extrapulmonary and severe tuberculosis in Chinese Han
2512 children. **Infect Genet Evol**, v. 23, p. 121-8, Apr 2014. ISSN 1567-7257.
2513 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24518693> >.
2514

2515 RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nat**
2516 **Rev Immunol**, v. 12, n. 5, p. 352-66, May 2012. ISSN 1474-1741. Disponível
2517 em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22517424> >.
2518

2519 REDFORD, P. S. et al. Enhanced protection to Mycobacterium tuberculosis
2520 infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1

2521 responses in the lung. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 8, p. 2200-10, Aug 2010. ISSN
2522 1521-4141. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20518032>> .
2523
2524 REDFORD, P. S.; MURRAY, P. J.; O'GARRA, A. The role of IL-10 in immune
2525 regulation during M. tuberculosis infection. **Mucosal Immunol**, v. 4, n. 3, p. 261-
2526 70, May 2011. ISSN 1935-3456. Disponível em:
2527 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21451501> > .
2528
2529 REDPATH, S.; GHAZAL, P.; GASCOIGNE, N. R. Hijacking and exploitation of IL-
2530 10 by intracellular pathogens. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 2, p. 86-92, Feb 2001.
2531 ISSN 0966-842X. Disponível em:
2532 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11173248> > .
2533
2534 REECE, S. T.; KAUFMANN, S. H. Floating between the poles of pathology and
2535 protection: can we pin down the granuloma in tuberculosis? **Curr Opin**
2536 **Microbiol**, v. 15, n. 1, p. 63-70, Feb 2012. ISSN 1879-0364. Disponível em:
2537 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22074861> > .
2538
2539 RIVERA-CHAVEZ, F. A. et al. Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6
2540 cytokine responses. **Shock**, v. 20, n. 3, p. 218-23, Sep 2003. ISSN 1073-2322.
2541 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12923492> > .
2542
2543 ROOK, G. A. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. **Curr Mol Med**, v. 7,
2544 n. 3, p. 327-37, May 2007. ISSN 1566-5240. Disponível em:
2545 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17504117>> .
2546
2547 ROSENWASSER, L. J. et al. Promoter polymorphisms in the chromosome 5
2548 gene cluster in asthma and atopy. **Clin Exp Allergy**, v. 25 Suppl 2, p. 74-8;
2549 discussion 95-6, Nov 1995. ISSN 0954-7894. Disponível em:
2550 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8590350> > .
2551
2552 ROSSOUW, M. et al. Association between tuberculosis and a polymorphic
2553 NFKappaB binding site in the interferon gamma gene. **Lancet**, v. 361, n. 9372, p.
2554 1871-2, May 2003. ISSN 0140-6736. Disponível em:
2555 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788577> > .
2556
2557 RUSSELL, D. G. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here
2558 tomorrow. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 8, p. 569-77, Aug 2001. ISSN 1471-
2559 0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483990> > .
2560
2561 RUSSELL, D. G.; BARRY, C. E.; FLYNN, J. L. Tuberculosis: what we don't know
2562 can, and does, hurt us. **Science**, v. 328, n. 5980, p. 852-6, May 2010. ISSN
2563 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466922> > .
2564
2565 SCHURR, E. Is susceptibility to tuberculosis acquired or inherited? **J Intern**
2566 **Med**, v. 261, n. 2, p. 106-11, Feb 2007. ISSN 0954-6820. Disponível em:
2567 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17241175>> .
2568

2569 SCHURR, E. The contribution of host genetics to tuberculosis
2570 pathogenesis. **Kekkaku**, v. 86, n. 1, p. 17-28, Jan 2011. ISSN 0022-9776.
2571 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401002>>.
2572
2573 SEAH, G. T.; SCOTT, G. M.; ROOK, G. A. Type 2 cytokine gene activation and
2574 its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. **J Infect Dis**, v.
2575 181, n. 1, p. 385-9, Jan 2000. ISSN 0022-1899. Disponível em:
2576 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608794>>.
2577
2578 SELVARAJ, P. et al. Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in
2579 pulmonary tuberculosis. **Cytokine**, v. 43, n. 1, p. 26-33, Jul 2008. ISSN 1096-
2580 0023. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18522869>>.
2581
2582 SHI, G. C.; ZHANG, L. G. Influence of interleukin-17 gene polymorphisms on the
2583 development of pulmonary tuberculosis. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 3, p. 8526-31,
2584 2015. ISSN 1676-5680. Disponível em:
2585 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26345782>>.
2586
2587 SHIN, H. D. et al. Common interleukin 10 polymorphism associated with
2588 decreased risk of tuberculosis. **Exp Mol Med**, v. 37, n. 2, p. 128-32, Apr 2005.
2589 ISSN 1226-3613. Disponível em:
2590 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15886526>>.
2591
2592 SINGH, A. K. et al. Single nucleotide polymorphic macrophage cytokine
2593 regulation by Mycobacterium tuberculosis and drug
2594 treatment. **Pharmacogenomics**, v. 15, n. 4, p. 497-508, Mar 2014. ISSN 1744-
2595 8042. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24624917>>.
2596
2597 SMITH, A. J.; HUMPHRIES, S. E. Cytokine and cytokine receptor gene
2598 polymorphisms and their functionality. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 20, n. 1,
2599 p. 43-59, Feb 2009. ISSN 1879-0305. Disponível em:
2600 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19038572>>.
2601
2602 SONG, H. et al. Interleukin 2 gene polymorphisms are associated with non-
2603 Hodgkin lymphoma. **DNA Cell Biol**, v. 31, n. 7, p. 1279-84, Jul 2012. ISSN 1557-
2604 7430. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22472080>>.
2605
2606 SPITS, H.; DE WAAL MALEFYT, R. Functional characterization of human IL-
2607 10. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 99, n. 1, p. 8-15, 1992. ISSN 1018-2438.
2608 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1336421>>.
2609
2610 STEIN, C. M.; BAKER, A. R. Tuberculosis as a complex trait: impact of genetic
2611 epidemiological study design. **Mamm Genome**, v. 22, n. 1-2, p. 91-9, Feb 2011.
2612 ISSN 1432-1777. Disponível em:
2613 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21104256>>.
2614
2615 STEIN, C. M. et al. Genome scan of M. tuberculosis infection and disease in
2616 Ugandans. **PLoS One**, v. 3, n. 12, p. e4094, 2008. ISSN 1932-6203.

2617
2618 STEINGART, K. R. et al. Fluorescence versus conventional sputum smear
2619 microscopy for tuberculosis: a systematic review. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 9, p.
2620 570-81, Sep 2006. ISSN 1473-3099. Disponível em:
2621 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931408> >.
2622
2623 STEWART, G. R.; ROBERTSON, B. D.; YOUNG, D. B. Tuberculosis: a problem
2624 with persistence. **Nat Rev Microbiol**, v. 1, n. 2, p. 97-105, Nov 2003. ISSN 1740-
2625 1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035039> >.
2626
2627 SUZUKI, N. et al. Can Mycobacterium tuberculosis infection prevent asthma and
2628 other allergic disorders? **Int Arch Allergy Immunol**, v. 124, n. 1-3, p. 113-6,
2629 2001 Jan-Mar 2001. ISSN 1018-2438. Disponível em:
2630 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306944> >.
2631
2632 THYE, T. et al. A structural variant of the human interferon-gamma gene. **Tissue**
2633 **Antigens**, v. 73, n. 3, p. 287-8, Mar 2009. ISSN 1399-0039. Disponível em:
2634 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19254267> >.
2635
2636 THYE, T. et al. Common variants at 11p13 are associated with susceptibility to
2637 tuberculosis. **Nat Genet**, v. 44, n. 3, p. 257-9, Mar 2012. ISSN 1546-1718.
2638 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306650> >.
2639
2640 THYE, T. et al. Genome-wide association analyses identifies a susceptibility
2641 locus for tuberculosis on chromosome 18q11.2. **Nat Genet**, v. 42, n. 9, p. 739-
2642 41, Sep 2010. ISSN 1546-1718. Disponível em:
2643 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20694014> >.
2644
2645 TORRADO, E.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. Cellular response to
2646 mycobacteria: balancing protection and pathology. **Trends Immunol**, v. 32, n. 2,
2647 p. 66-72, Feb 2011. ISSN 1471-4981. Disponível em:
2648 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21216195> >.
2649
2650 TRAJKOV, D. et al. Association of 22 cytokine gene polymorphisms with
2651 tuberculosis in Macedonians. **Indian J Tuberc**, v. 56, n. 3, p. 117-31, Jul 2009.
2652 ISSN 0019-5707. Disponível em:
2653 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20349753> >.
2654
2655 UMEMURA, M. et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune
2656 response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin
2657 infection. **J Immunol**, v. 178, n. 6, p. 3786-96, Mar 2007. ISSN 0022-1767.
2658 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339477> >.
2659
2660 VAN CREVEL, R. et al. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+
2661 T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary
2662 cavities. **J Infect Dis**, v. 181, n. 3, p. 1194-7, Mar 2000. ISSN 0022-1899.
2663 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720554>>.
2664

2665 VERBON, A. et al. Serum concentrations of cytokines in patients with active
2666 tuberculosis (TB) and after treatment. **Clin Exp Immunol**, v. 115, n. 1, p. 110-3,
2667 Jan 1999. ISSN 0009-9104. Disponível em:
2668 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9933428> >.
2669
2670 VIDAL, S. M. et al. Natural resistance to infection with intracellular parasites:
2671 isolation of a candidate for Bcg. **Cell**, v. 73, n. 3, p. 469-85, May 1993. ISSN
2672 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8490962> >.
2673
2674 VIDYARANI, M. et al. Interferon gamma (IFNgamma) & interleukin-4 (IL-4) gene
2675 variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. **Indian J Med Res**, v. 124, n.
2676 4, p. 403-10, Oct 2006. ISSN 0971-5916. Disponível em:
2677 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17159260> >.
2678
2679 WALLIS, R. S. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and
2680 tuberculosis risks. **Lancet Infect Dis**, v. 8, n. 10, p. 601-11, Oct 2008. ISSN
2681 1473-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18922482> >.
2682
2683 WANG, Q. et al. TNF-308 gene polymorphism and tuberculosis susceptibility: a
2684 meta-analysis involving 18 studies. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 4, p. 3393-400, Apr
2685 2012. ISSN 1573-4978. Disponível em:
2686 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21735105> >.
2687
2688 WILKINSON, K. A.; WILKINSON, R. J. Polyfunctional T cells in human
2689 tuberculosis. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 8, p. 2139-42, Aug 2010. ISSN 1521-
2690 4141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20853500> >.
2691
2692 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report 2015. Geneva,
2693 Switzerland: 2015.
2694
2695 WOZNIAK, T. M. et al. Mycobacterium bovis BCG-specific Th17 cells confer
2696 partial protection against Mycobacterium tuberculosis infection in the absence of
2697 gamma interferon. **Infect Immun**, v. 78, n. 10, p. 4187-94, Oct 2010. ISSN 1098-
2698 5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20679438> >.
2699
2700 YONG, A. J. et al. Total and anti-mycobacterial IgE levels in serum from patients
2701 with tuberculosis and leprosy. **Tubercle**, v. 70, n. 4, p. 273-9, Dec 1989. ISSN
2702 0041-3879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2516671> >.
2703
2704 YOUNG, D. B.; GIDEON, H. P.; WILKINSON, R. J. Eliminating latent
2705 tuberculosis. **Trends Microbiol**, v. 17, n. 5, p. 183-8, May 2009. ISSN 1878-
2706 4380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19375916> >.
2707
2708 YOUNG, D. B. et al. Confronting the scientific obstacles to global control of
2709 tuberculosis. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1255-65, Apr 2008. ISSN 0021-9738.
2710 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18382738> >.
2711

2712 ZHANG, Z. et al. Association between tumor necrosis factor alpha-238G/a
2713 polymorphism and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **BMC Infect**
2714 **Dis**, v. 12, p. 328, 2012. ISSN 1471-2334. Disponível em:
2715 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23192010> >.

2716
2717 ZUMLA, A. et al. Tuberculosis. **N Engl J Med**, v. 368, n. 8, p. 745-55, Feb 2013.
2718 ISSN 1533-4406. Disponível em:
2719 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23425167> >.

2720

2721

2722

2723

2724

2725

2726

2727

2728

2729

2730

2731

2732

2733

2734

2735

2736

2737

2738

2739

2740

2741

2742

2743

2744

2745

2746

Apêndices

2747

2748

2749

2750 1. Parecer de Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa FEPPS.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FEPPS

Av Ipiranga 5400, Prédio Administrativo.
CEP 90.610-000 – PORTO ALEGRE/RS
e-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CEP/FEPPS-RS N°: 09/2011

Deliberação conforme reunião realizada em: (12/12/2011)

Título do Projeto:

**INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS IMUNOGENÉTICOS
ENVOLVIDOS NA SUSCETIBILIDADE À TUBERCULOSE: UMA
VISÃO DO BACILO E DO HOSPEDEIRO**

Nome do pesquisador principal:

Mariana Milano Rodrigues

PARECER	
<input checked="" type="checkbox"/>	APROVADO
<input type="checkbox"/>	APROVADO COM RECOMENDAÇÕES
<input type="checkbox"/>	NECESSITA DE ADEQUAÇÕES
<input type="checkbox"/>	NÃO APROVADO
<input type="checkbox"/>	RETIRADO

PARECER DO COMITÊ:

O Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS/RS em reunião do dia 12/12/2011, Ata nº 11/2011, delibera que o presente projeto está adequado ética e metodologicamente de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Res.196/96/CNS e suas complementares) e portanto, aprovado por este Comitê.

Reiteramos que relatórios semestrais do projeto em andamento, relatório final e cópia do trabalho de conclusão e/ou publicação deverão ser entregues ao Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS.

Porto Alegre, 25 de Janeiro de 2012.

Ivete Machado da Rocha
Coordenadora CEP-FEPPS/RS

2751

2752

2753

2754

2755 **2. Parecer de Aprovação da Pesquisa no Hospital Sanatório Partenon.**

2756

ANEXO 5

**Protocolo de Avaliação de Projetos de Pesquisa e Material para Publicação
Campos pra preenchimento pelo pesquisador:**

Projeto de pesquisa (x) Resumo para Congresso () Artigo para periódico ()
Outro () Especifique: _____

Título: "INVESTIGAÇÃO DE ASPECTOS IMUNOGENÉTICOS ENVOLVIDOS NA
SUSCETIBILIDADE À TUBERCULOSE: UMA VISÃO DO BACILO E DO
HOSPEDEIRO".

Nome do Pesquisador Responsável: Mariana Milano Rodrigues

Titulação/ Formação acadêmica: Mestrado/Biomedica

Telefones para contato: Laboratório: 051- 3352-0336

Nome dos demais pesquisadores:
Maria Lucia Rossetti, Elis Regina Dalla Costa, Gisela Unis, Raquel Mashmann

Nome do orientador: Dra. Maria Lucia Lucia Rossetti
Instituição do orientador: UFRGS

Assinatura do pesquisador: Mariana Milano Rodrigues
Data: 06/02/2012

Campos para preenchimento pela DEP

Assinatura do recebedor na DEP: _____ Data: 1/1
Encaminhado para avaliação pelo Dr. Carla Jarzewski Data: 10/02/12

Parecer: Aprovado

Data do parecer: 23/02/12
Parecer aprovado pela DEP em 1/1

Carla Jarzewski
Carla Jarzewski
Id. Func. 13203
Diretora Técnica
Hospital Sanatório Partenon

2757

2758 **3. Termo de Consentimento Livre Esclarecido**

2759



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: *Investigação de aspectos imunogenéticos envolvidos na suscetibilidade à tuberculose: uma visão do bacilo e do hospedeiro*

Investigadora principal: Mariana Milano Rodrigues

Você está convidado a participar de uma pesquisa científica. A participação no trabalho é voluntária e significa que você pode se recusar a participar dele que não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento ou acompanhamento. Se você desejar participar da pesquisa pediremos que assinie duas vias deste documento, uma delas ficará em nossos arquivos e outra com você.

Objetivos: O objetivo deste projeto é procurar fatores presentes no seu sangue que identifiquem uma maior probabilidade de desenvolver a doença.

Sobre a tuberculose: A tuberculose é um sério problema no estado do Rio Grande do Sul. A transmissão desta doença se dá por via aérea, ou seja, quando uma pessoa com tuberculose tosse, espirra ou fala pode transmitir a doença. A maioria dos que entram em contato com pessoas doentes nunca desenvolvem a doença, mas um percentual próximo de 10% adoece.

Métodos: Para que possamos fazer esses testes, precisamos fazer uma coleta de sangue, cerca de 10

ml de sangue serão retirados de sua veia com seringas plásticas e agulhas descartáveis. Além disso, nós pediremos que você responda a algumas perguntas.

Riscos e desconfortos: A retirada de sangue pode causar algum desconforto momentâneo no local da picada da agulha.

Benefícios potenciais: a participação nesta pesquisa ajudará a conhecer como o seu corpo se defende quando o germe da tuberculose entra em contato com o seu sistema de defesa.

Custos e/ou pagamento: Não há custos para você participar do estudo. Você também não receberá nenhuma quantia ou benefício direto pela participação.

Confidencialidade: (privacidade dos dados): seu nome jamais será revelado e todas as informações serão confidenciais. Somente os resultados dos testes serão publicados no meio científico.

Destinação do material biológico

O material genético extraído da amostra de sangue poderá fazer parte de um banco de amostras de DNA podendo vir a ser utilizado em outros projetos, depois da devida aprovação pelo respectivo Comitê de Ética em Pesquisa.

Pessoas para contato: qualquer dúvida a respeito desta pesquisa você poderá entrar em contato com a Biomédica Mariana Milano Rodrigues, pesquisadora responsável pelo estudo, através do telefone (51)3352-0336.

Participante: _____ POA, _____
(Nome) (Assinatura)

Pesquisador: _____ POA, _____
Mariana M. Rodrigues (Assinatura)

2760

2761

2762

2763

2764

2765

2766 4. Formulário de Coleta de Dados

2767



Formulário de Coleta de Dados

Grupo: (1) paciente TB (2) grupo controle

Médico: _____ **Tempo de tratamento:** _____

Prontuário: _____ **Nome:** _____

Bairro: _____ **Telefone:** _____

Data de Nascimento: _____

Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

Gravidez: (1) sim (2) não (3) ignorado

Grupo Étnico: (1) Branco (2) Não-branco (3) Outros

Renda familiar: _____ **Número Indivíduos na residência:** _____

Escolaridade: _____

BCG: (1) Sim (2) Não

Tabagismo: (1) Não-tabagista (2) Ex-tabagista (3) Tabagista ativo

Sintomas:

(1) tosse

(2) produção de escarro

(3) emagrecimento

(4) sudorese noturna

(5) dispnéia

(6) dor torácica

(7) febre

(8) hemoptise

Há quanto tempo? _____

TB prévia: (1) sim (2) não **História de TB na família:** (1) sim (2) não

Uso abusivo de álcool: (1) sim (2) não (3) passado

Uso de drogas: (1) sim (2) não (3) passado **Qual?** _____

Institucionalização (prisão, casa de repouso, abrigo) nos últimos 2 anos: (1) sim (2) não

Comorbidades: (1) HIV (2) HCV (3) HBV (4) Diabete (5) Asma (6) Uso crônico de corticóide (7) Outra imunossupressão,
Qual: _____

Baciloscopia: (1) + (2) ++ (3) +++ (4) negativa (5) não realizada

Cultura de escarro: (1) *M.tuberculosis* (2) *Mycobacterium sp.* (3) negativa (4) não realizada

RX de tórax: (1) normal (2) cavitação (3) infiltrados reticulares (4) consolidação (5) alterações fibróticas (6) padrão miliar

Tipo de TB atual: (1) pulmonar (2) extrapulmonar

Tipo de TB extrapulmonar: _____

PPD: (1) sim (2) não (3) ignorado (4) não realizado

Resultado PPD: (1) reator forte (2) reator fraco (3) não reator

Esquema de tratamento da TB: _____

Desfecho: (1) cura (2) abandono (3) mudança de tratamento (4) óbito (5) falência

2768

2769

2770

2771 **5. Carta do Editor da Revista PLoS One**

2772

PONE01542296-

-

IL7A-(rs2275913)-and-IL6-(rs1800795)-SingleNucleotide-Polymorphisms-Associated-with-Decreased-Risk-for-Pulmonary-Tuberculosis-Development-in-Southern-Brazilian-Population-

-

PLOS-ONE-

-

Dear-Dr-Milano,-

-

Thank-you-for-submitting-your-manuscript-to-PLOS-ONE.-After-careful-consideration,-we-feel-that-it-has-merit,-but-is-not-suitable-for-publication-as-it-currently-stands.-Therefore,-my-decision-is-"Major-Revision."-

-

We-invite-you-to-submit-a-revised-version-of-the-manuscript-that-addresses-all-the-points-raised-by-the-reviewers-(see-below).-

We-encourage-you-to-submit-your-revision-within-forty%five-days-of-the-date-of-this-decision.-

-

When-your-files-are-ready,-please-submit-your-revision-by-logging-on-to-<http://pone.edmgr.com/>-and-following-the-Submissions-Needing-Revision-link.-Do-not-submit-a-revised-manuscript-as-a-new-submission.-Before-uploading,-you-should-proofread-your-manuscript-very-closely-for-mistakes-and-grammatical-errors.-Should-your-manuscript-be-accepted-for-publication,-you-may-not-have-another-chance-to-make-corrections-as-we-do-not-offer-pre%publication-proofs.-

-

If-you-would-like-to-make-changes-to-your-financial-disclosure,-please-include-your-updated-statement-in-your-cover-letter.-

-

In-addition,-when-submitting-your-revision-please-include-the-following-items:

- A-rebuttal-letter-that-responds-to-each-point-brought-up-by-the-academic-editor-and-reviewer(s).-This-letter-should-be-uploaded-as-a-'Response-to-Reviewers'-file.
- A-clean-revised-manuscript-as-your-'Manuscript'-file.
- A-marked%up-copy-of-the-changes-made-from-the-previous-article-file-as-a-'Revised-Manuscript-with-Track-Changes'-file.-This-can-be-done-using-'track-changes'-in-programs-such-as-MS-Word-and/or-highlighting-any-changes-in-the-new-document.

2773

-

For more information on how to upload your revised submission, see our video: <http://blogs.plos.org/everyone/2011/05/10/how%20to%20submit%20your%20revised%20manuscript/>

-

If you choose not to submit a revision, please notify us. -

-

Yours sincerely, -

-

Selvakumar Subbian, Ph.D.
Academic Editor
PLOS ONE

!

2774

2775

2776

2777
2778
2779
2780
2781
2782
2783
2784
2785
2786
2787

Curriculum Vitae Resumido

2788

Mariana Milano Rodrigues

2789
2790
2791
2792
2793
2794
2795
2796
2797
2798
2799
2800
2801

2802 **Curriculum Vitae Resumido**

2803 **Milano, M; Rodrigues, MM.**

2804

2805 **1. Dados Pessoais**

2806

2807 **Nome:** Mariana Milano Rodrigues

2808 **Local e data de Nascimento:** Fortaleza, CE, Brasil, 28 de Junho de 1982.

2809 **Endereço Profissional:** Av. Ipiranga, 5400. Bairro Jardim Botânico, Porto
2810 Alegre/RS.

2811 **Telefone Profissional:** (51) 3352 0336

2812 **E-mail:** marianamilano@hotmail.com

2813

2814 **2. Formação Acadêmica**

2815

2816 • **2015**

2817 **Doutora em Ciências:** Biologia Celular e Molecular.
2818 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

2819

2820 **Título:** Influência de polimorfismos em genes de citocinas pró- e anti-inflamatórias
2821 na imunogênese da tuberculose pulmonar em adultos

2822

2823 **Orientadora:** Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti

2824 **Co-orientadora:** Dra. Elis Regina Dalla Costa

2825

2826 **Bolsista CAPES**

2827

2828 • **2009**

2829 **Mestre em Ciências:** Biologia Celular e Molecular.

2830 Universidade Católica do Rio Grande do sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil.

2831

2832 **Título:** Avaliação da expressão de caderinas em linhagem humana de
2833 adenocarcinoma colorretal após tratamento com inibidor do peptídeo liberador de
2834 gastrina, RC-3095.

2835

2836 **Orientadora:** Dra. Mônica Ryff Moreira Roca Vianna

2837 Bolsista CAPES

2838

2839 • **2006**

2840

2841 Bacharel em Biomedicina: Habilitação em Patologia/Análises Clínicas.

2842 Universidade Feevale, FEEVALE, Novo Hamburgo, RS, Brasil.

2843

2844 **Título:** Avaliação dos níveis de leptina sobre a elevação da massa corporal em
2845 humanos.

2846

2847 **Orientadora:** Dra. Vanessa Suñé Mattevi.

2848

2849

2850 **2. Estágios**

2851

2852 • **2002- 2003**

2853 **Rede sul de análise de genomas e biologia estrutural - Programa de**
2854 **investigação de genomas sul (pigs)**

2855

2856 Centro de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências

2857 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

2858

2859 Orientador: Jomar Pereira Laurino

2860

2861 Bolsista de Iniciação Tecnológica: 1A/CNPq

2862

2863

2864 • **2002 - 2004**

2865 **Identificação de Enterococcus sp; através de RFLP-PCR em um hospital de**
2866 **Porto Alegre**

2867

2868 Centro de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências

2869 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

2870

2871 **Orientador:** Jomar Pereira Laurino

2872

2873 Iniciação Científica

2874

2875

2876 • 2005

2877 **Estágio Supervisionado I - Análises Clínicas**

2878 Laboratório Escola

2879 Universidade Feevale, FEEVALE, Novo Hamburgo, RS, Brasil

2880 Estágio Curricular I

2881

2882 • 2006

2883 **Estágio Supervisionado II - Análises Clínicas**

2884 Laboratório Exame de Análises Clínicas

2885 Hospital Regina, Novo Hamburgo, RS, Brasil.

2886 Estágio Curricular II

2887

2888 • 2011

2889 **Perfil da expressão gênica na resposta à infecção por *M. tuberculosis*:
2890 busca por novos biomarcadores de progressão da tuberculose**

2891

2892 Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CDCT, Porto Alegre, Brasil.

2893 Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, FEPPS, Porto Alegre,

2894 RS, Brasil

2895 Estágio Voluntário

2896

2897 **3. Artigos Completos Publicados**

2898

2899 1. NERY, LAURA R. ; **RODRIGUES, MARIANA M.** ; ROSEMBERG, DENIS B. ;

2900 BOGO, MAURÍCIO R. ; DE FARIAS, CAROLINE B. ; ABUJAMRA, ANA L. ;

2901 SCHWARTSMANN, GILBERTO ; ROESLER, RAFAEL ; VIANNA, MÔNICA R.M. .

2902 Regulation of E-cadherin expression by growth factor receptors in cancer cells.

2903 Journal of Surgical Oncology (Print) **JCR**, v. 104, p. 220-221, 2011.

2904

2905

2906 2. LAUX DA COSTA, LUCAS ; DELCROIX, MELAINE ; DALLA COSTA, ELIS R. ;
2907 PRESTES, ISAÍAS V. ; **MILANO, MARIANA** ; FRANCIS, STEVE S. ; UNIS,
2908 GISELA ; SILVA, DENISE R. ; RILEY, LEE W. ; ROSSETTI, MARIA L.R. . A real-
2909 time PCR signature to discriminate between tuberculosis and other pulmonary
2910 diseases. Tuberculosis (Edinburgh) **JCR**, v. 04, p. in press, 2015.

2911

2912 **4. Resumos e Trabalhos Apresentados**

2913

2914 Laux CL, Delcroix M ; Dalla Costa ER, Rodrigues MM, Francis S, Unis G, Rossato
2915 D, Riley,L; Rossetti, MLR. GZMA/GBP5/CD64: A three-gene signature to
2916 discriminate between tuberculosis and other pulmonary diseases. in: vii meeting of
2917 the slamtb, 2014, canela/rs. gzma/gbp5/cd64: a three-gene signature to
2918 discriminate between tuberculosis and other pulmonary diseases, 2014.

2919

2920 Mousquer GT ; Mariana Milano ; Unis G ; Rossetti ML ; Dalla Costa E . Avaliação
2921 da suscetibilidade `a tuberculose relacionada com o polimorfismo de
2922 deleção/inserção -196-174 do receptor celular humano Toll-loke 2. In: VII Meeting
2923 of the SLAMTB, 2014, Canela. VII Meeting of the SLAMTB, 2014.

2924

2925 Mousquer GT ; Mariana Milano ; Unis G ; Dalla Costa E ; Rossetti ML . Avaliação
2926 da suscetibilidade `a tuberculose relacionada com o polimorfismo -196-174 do
2927 receptor celular humano TLR-2.. In: III Semana Acadêmica da UFCSPA, 2014,
2928 Porto Alegre. III Semana Acadêmica da UFCSPA, 2014.

2929

2930 Mattevi, VS. ; Mariana Milano ; Tibola, A. ; ROSSETO, S. ; Hutz, MH. .
2931 Investigação do papel do gene da leptina na etiologia da obesidade humana.. In:
2932 52 Congresso de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. 52 congresso de Genética,
2933 2006.

2934

2935 Mariana Milano ; Tibola, A. ; ROSSETO, S. ; Hutz, MH. ; Mattevi, VS. .
2936 Investigação do papel do gene da leptina na etiologia da obesidade humana.

2937 2006.

2938

2939 Mariana Milano ; Fagundes, NJR. ; Laurino, JP. . Identificação de Enterococcus

2940 sp. através de RFLP-PCR em um hospital de Porto Alegre, RS. 2004.