



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

(PPGIBA/ICB/UFAM)

MARCOS HENRIQUE GURGEL RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DAS VARIANTES DE BASE ÚNICA EM GENES DE miRNA NA  
TUBERCULOSE**

MANAUS-AM

2026

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

MARCOS HENRIQUE GURGEL RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DAS VARIANTES DE BASE ÚNICA EM GENES DE miRNA NA  
TUBERCULOSE**

ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> AYA SADAHIRO

COORIENTADOR: Dr. MAURICIO MORISHI OGUSKU

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

**Área de concentração:** Imunologia Básica e Aplicada.

**Linha de pesquisa:** Genômica, imunogenética e epidemiologia de doenças infecciosas e inflamatórias.

MANAUS-AM

2026

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

- 
- R696a      Rodrigues, Marcos Henrique Gurgel  
Avaliação das Variantes de Base Única em Genes de miRNA na  
Tuberculose / Marcos Henrique Gurgel Rodrigues. - 2026.  
165 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Aya Sadahiro.  
Coorientador(a): Mauricio Morishi Ogusku.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de  
Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Manaus, 2026.
1. Tuberculose. 2. miRNA. 3. Variantes de Base única (SNVs). 4.  
Mycobacterium tuberculosis. 5. Imunogenética. I. Sadahiro, Aya. II.  
Ogusku, Mauricio Morishi. III. Universidade Federal do Amazonas.  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. IV. Título
-

“...Não vê que me lembrei que lá no Norte, meu Deus!  
muito longe de mim  
Na escuridão ativa da noite que caiu  
Um homem pálido, magro, de cabelo escorrendo nos olhos,  
Depois de fazer uma pele com a borracha do dia,  
Faz pouco se deitou, está dormindo.  
Esse homem é brasileiro que nem eu.”

**Mário de Andrade – Descobrimento, 1928.**

*“... porque na trama destes tecidos invisíveis  
da água entornada, da incessante areia,  
sustentamos a única e acossada ternura.”*  
**Pablo Neruda – Manhã (Soneto IX), 1959.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu pai Marcos Augusto de Aguiar Rodrigues e à minha mãe Tarciana Grijó Gurgel de Nazaré. Aos meus avós, tias, tios, primos, afilhados e amigos, obrigado pela alegria de viver.

Agradeço ao meu marido Edison Vieira Kiss, com quem compartilho cada página desta tese, da música e da arte.

Agradeço aos meus animais, meus amigos e companheiros do dia a dia: Barriguinha, Olhinho, Kira, Tereza, Draco, Seu Jorge, Donatela, Félix e Nita. Amo meus animais com todo meu coração.

Minha gratidão aos professores do PPGIBA, especialmente à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aya Sadahiro, e ao meu coorientador, Prof. Dr. Mauricio Morishi Ogusku.

Agradeço ao PPGIBA, aos seus funcionários Edson Augusto Brazão Castro, Magda Rabelo da Silva e Ana Paula de Araújo.

Ao INPA e seus funcionários Tania Cristina Sumita, Maisa Porto dos Santos e Sr. Ray, meu agradecimento.

À Policlínica Cardoso Fontes, especialmente aos funcionários e pacientes que participaram desta pesquisa.

Ao Laboratório de Imunologia Molecular – LIM, e aos colegas que contribuíram com este trabalho: Alliny Queiroz, Gilberto Ferreira, Renata Gualberto, Laianne Lopes e professora Mariana Brasil.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas e pelo apoio financeiro.

Agradeço ao Laboratório de Vigilância Dr. Edivar dos Santos Fernandes, em especial à diretora Dra. Meire Jane Vilaça Pereira pela compreensão e colaboração com a realização deste doutorado.

À Universidade Federal do Amazonas, meu lar por pelo menos 18 anos, obrigado por pavimentar o caminho que me trouxe até aqui.

À banca examinadora, que gentilmente se dispôs a ler este trabalho e contribuir para sua melhoria, meu muito obrigado!

## RESUMO

A tuberculose pulmonar (TBP) é uma doença infecciosa causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Estima-se que 25% da população mundial esteja infectada por este bacilo, que dispõe de vários mecanismos que conferem sua adaptabilidade a partir da interação com o hospedeiro humano. A partir dessa interação, esse patógeno é capaz de modular a expressão gênica de miRNAs (sequências curtas de RNAs reguladores que atuam em diferentes vias de sinalização), a fim de sobreviver e persistir com a infecção. Em algumas pessoas infectadas, a resposta imune é capaz de eliminar o bacilo através dos mecanismos inatos, ou até mesmo com o desenvolvimento de resposta imune adaptativa. Em outros indivíduos, no entanto, o bacilo pode permanecer vivo e confinado em granulomas, podendo reativar-se em algumas situações da vida dessas pessoas, causando a doença ativa. Os fatores imunogenéticos individuais podem ser um dos responsáveis por esta variedade de desfechos que ocorrem a partir da interação patógeno-hospedeiro. Desse modo, visando contribuir para a elucidação desta dinâmica, este estudo avaliou em pacientes com TBP e em indivíduos saudáveis, a frequência das variantes de base única (SNVs) em genes de miRNAs rs6505162 (*MIR423*), rs4713693 (*MIR1275*), rs2910164 (*MIR146A*) e rs895819 (*MIR27A*), bem como as possíveis associações destes SNVs com a suscetibilidade à doença. Foram incluídos 457 pacientes com TBP e 429 controles recrutados em Manaus-AM. As genotipagens dos SNVs pela técnica de qPCR foram realizadas com sondas TaqMan. Adicionalmente, avaliaram-se as concentrações de citocinas inflamatórias (IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-18) no plasma dos indivíduos estudados para averiguar se esses SNVs podem interferir na produção destas moléculas. Identificou-se que a frequência dos alelos minoritários dessas variantes foi superior a 0,30 na população estudada. Observou-se uma associação inicial de rs4713693 com proteção contra a TBP no modelo dominante (C/T + C/C vs. T/T;  $p = 0,0278$ ; OR = 0,73; IC95% = 0,55–0,97); entretanto, após a correção para múltiplas comparações, essa associação não permaneceu estatisticamente significativa ( $p^{\text{Bonferroni}} = 0,556$ ). Foi identificada interação entre as variantes rs6505162 (genótipo A/C) e rs895819 (genótipo C/C), associada à proteção contra TBP ( $p^{\text{Bonferroni}} = 0,0466$ ; OR = 0,13; IC95% = 0,04–0,42). Observou-se ainda associação do genótipo C/C de rs4713693 com menor concentração plasmática de IFN- $\gamma$  nos pacientes. Esses resultados contribuem para a compreensão do papel de variantes genéticas em miRNAs na suscetibilidade à TBP em uma região altamente endêmica para a doença.

**Palavras-chave:** Tuberculose; miRNA; Variantes de Base Única (SNV); *Mycobacterium tuberculosis*; Imunogenética.

## ABSTRACT

Pulmonary tuberculosis (PTB) is an infectious disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis* complex. It is estimated that 25% of the world's population is infected with this bacillus, which possesses several mechanisms that confer adaptability through interaction with the human host. Through this interaction, the pathogen is able to modulate the gene expression of miRNAs (short regulatory RNA sequences that act in different signaling pathways) in order to survive and persist during infection. In some infected individuals, the immune response is capable of eliminating the bacillus through innate mechanisms or even through the development of an adaptive immune response. In other individuals, however, the bacillus may remain alive and confined within granulomas, with potential reactivation under certain conditions, leading to active disease. Individual immunogenetic factors may account for this diversity of outcomes arising from the pathogen–host interaction. Thus, aiming to contribute to the elucidation of this dynamic, this study evaluated, in patients with PTB and healthy individuals, the frequency of single nucleotide variants (SNVs) in miRNA genes rs6505162 (MIR423), rs4713693 (MIR1275), rs2910164 (MIR146A), and rs895819 (MIR27A), as well as the possible associations of these SNVs with disease susceptibility. A total of 457 PTB patients and 429 controls were recruited in Manaus, Amazonas, Brazil. SNV genotyping was performed by qPCR using TaqMan probes. Additionally, the concentrations of inflammatory cytokines (IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , and IL-18) were measured in plasma samples to investigate whether these SNVs may interfere with the production of these molecules. The frequency of the minor alleles of these variants was higher than 0.30 in the studied population. An initial association of rs4713693 with protection against PTB was observed under the dominant model (C/T + C/C vs. T/T;  $p = 0.0278$ ; OR = 0.73; 95%CI = 0.55–0.97); however, after correction for multiple comparisons, this association did not remain statistically significant ( $p^{\text{Bonferroni}} = 0.556$ ). An interaction between rs6505162 (A/C genotype) and rs895819 (C/C genotype) was identified and associated with protection against PTB ( $p^{\text{Bonferroni}} = 0.0466$ ; OR = 0.13; 95%CI = 0.04–0.42). The rs4713693 C/C genotype was also associated with lower plasma IFN- $\gamma$  concentrations in patients. These findings contribute to understanding the role of genetic variants in miRNAs in susceptibility to PTB in a region highly endemic for the disease.

**Keywords:** Tuberculosis; miRNA; Single Nucleotide Variants (SNV); *Mycobacterium tuberculosis*; Immunogenetics.

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1.</b> Condições do mix utilizado nas reações de qPCR para genotipagem.....                                                       | 73 |
| <b>Quadro 2.</b> Característica das sondas utilizadas no experimento. ....                                                                  | 73 |
| <b>Quadro 3.</b> Avaliação do Equilíbrio de Hardy Weinberg (p-EHW) dos grupos de controles e de pacientes para as variantes estudadas. .... | 81 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Características gerais dos grupos estudados. ....                                                                                                                                                                                        | 77  |
| <b>Tabela 2.</b> Resultados das análises de associação do SNV rs6505162 com TBP segundo diferentes modelos genéticos, após o ajuste por “sexo” e “idade” e valor de p com e sem correção de Bonferroni. ....                                              | 86  |
| <b>Tabela 3.</b> Resultados das análises de associação do SNV rs6505162 com TBP, considerando separadamente os subgrupos controle (contatos saudáveis e doadores), com valores ajustados por “sexo” e “idade” e valor de p corrigido por Bonferroni. .... | 87  |
| <b>Tabela 4.</b> Associação do SNV rs6505162 com a carga bacilar sob diferentes modelos genéticos, com valores de <i>p</i> antes e após correção de Bonferroni. ....                                                                                      | 88  |
| <b>Tabela 5.</b> Resultados das análises de associação do SNV rs4713693 com TBP segundo diferentes modelos genéticos, após o ajuste por “sexo” e “idade” e valor de p com e sem correção de Bonferroni. ....                                              | 90  |
| <b>Tabela 6.</b> Resultados das análises de associação do SNV rs4713693 com TBP, considerando separadamente os subgrupos controle (contatos saudáveis e doadores), com valores ajustados por “sexo” e “idade” e valor de p corrigido por Bonferroni. .... | 91  |
| <b>Tabela 7.</b> Associação do SNV rs4713693 com a carga bacilar sob diferentes modelos genéticos, com valores de p antes e após correção de Bonferroni. ....                                                                                             | 91  |
| <b>Tabela 8.</b> Resultados das análises de associação do SNV rs2910164 com TBP segundo diferentes modelos genéticos, após o ajuste por “sexo” e “idade” e valor de p com e sem correção de Bonferroni. ....                                              | 95  |
| <b>Tabela 9.</b> Resultados das análises de associação do SNV rs2910164 com TBP, considerando separadamente os subgrupos controle (contatos saudáveis e doadores), com valores ajustados por “sexo” e “idade” e valor de p corrigido por Bonferroni. .... | 95  |
| <b>Tabela 10.</b> Associação do SNV rs2910164 com a carga bacilar sob diferentes modelos genéticos, com valores de p antes e após correção de Bonferroni. ....                                                                                            | 96  |
| <b>Tabela 11.</b> Resultados das análises de associação do SNV rs895819 com TBP segundo diferentes modelos genéticos, após o ajuste por “sexo” e “idade” e valor de p com e sem correção de Bonferroni. ....                                              | 98  |
| <b>Tabela 12.</b> Resultados das análises de associação do SNV rs895819 com TBP, considerando separadamente os subgrupos controle (contatos saudáveis e doadores), com valores ajustados por “sexo” e “idade” e valor de p corrigido por Bonferroni. .... | 99  |
| <b>Tabela 13.</b> Associação do SNV rs895819 com a carga bacilar sob diferentes modelos genéticos, com valores de p antes e após correção de Bonferroni. ....                                                                                             | 99  |
| <b>Tabela 14.</b> Interação entre genótipos dos SNVs e sua associação com TBP ajustado por “sexo” e “idade”. ....                                                                                                                                         | 102 |
| <b>Tabela 15.</b> Frequências alélicas das variantes rs4713693, rs6505162, rs2910164 e rs895819 nos grupo de pacientes e de controles, e análise de associação com TBP. ....                                                                              | 104 |
| <b>Tabela 16.</b> Frequência dos alelos dos SNVs rs4713693 e rs6505162, rs2910164 e rs895819 na população estudada e em outras populações do mundo. ....                                                                                                  | 105 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1.</b> Curvas de amplificação geradas para a variante rs6505162. ....                                                                                                                                                             | 82  |
| <b>Figura 2.</b> Curvas de amplificação geradas para a variante rs4713693. ....                                                                                                                                                             | 83  |
| <b>Figura 3.</b> Curvas de amplificação geradas para a variante rs2910164. ....                                                                                                                                                             | 84  |
| <b>Figura 4.</b> Curvas de amplificação geradas para a variante rs895819. ....                                                                                                                                                              | 85  |
| <b>Figura 5.</b> Concentração plasmática de IL-6 nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde), bem como segundo os diferentes genótipos dos SNVs analisados. ....                                                                | 108 |
| <b>Figura 6.</b> Concentração plasmática de IL-6 distribuída de acordo com os modelos genéticos dominantes, recessivos e overdominantes para cada SNV, estratificada nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde). ....          | 110 |
| <b>Figura 7.</b> Concentração plasmática de IFN- $\gamma$ nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde), bem como segundo os diferentes genótipos dos SNVs analisados. ....                                                       | 111 |
| <b>Figura 8.</b> Concentração plasmática de IFN- $\gamma$ distribuída de acordo com os modelos genéticos dominantes, recessivos e overdominantes para cada SNV, estratificada nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde). .... | 113 |
| <b>Figura 9.</b> Concentração sérica de IL-1 $\beta$ nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde), bem como segundo os diferentes genótipos dos SNVs analisados. ....                                                            | 115 |
| <b>Figura 10.</b> Concentração plasmática de IL-1 $\beta$ distribuída de acordo com os modelos genéticos dominantes, recessivos e overdominantes para cada SNV, estratificada nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde). .... | 116 |
| <b>Figura 11.</b> Concentração plasmática de IL-18 nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde), bem como segundo os diferentes genótipos dos SNVs analisados. ....                                                              | 118 |
| <b>Figura 12.</b> Concentração plasmática de IL-18 distribuída de acordo com os modelos genéticos dominantes, recessivos e overdominantes para cada SNV, estratificada nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde). ....        | 119 |

## LISTA DE ABREVIACÕES

- AIC** – Akaike Information Criterion (Critério de Informação de Akaike)
- AP-1** – Activator protein 1 (Proteína ativadora 1)
- APAF-1** – Apoptotic protease activating factor-1 (Fator ativador de protease apoptótica-1)
- BAAR** – Bacilo Álcool-Ácido Resistente
- BCG** – Bacillus Calmette-Guérin (Bacilo Calmette-Guérin)
- CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CLR** – C-type lectin receptor (Receptor de lectina do tipo C)
- CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CR** – Complement receptor (Receptor de complemento)
- CT** – Cycle threshold (Limite de ciclo)
- CTAB** – Brometo de cetiltrimetilamônio
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DTAB** – Brometo de dodeciltrimetilamônio
- EHW** – Equilíbrio de Hardy-Weinberg
- ELANE** – Elastase, neutrophil expressed (Elastase expressa por neutrófilos)
- ELISA** – Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensaio imunoenzimático ligado à enzima)
- ERK1** – Extracellular signal-regulated kinase 1 (Quinase 1 regulada por sinal extracelular)
- ESX** – ESAT-6 secretion system (Sistema de secreção ESAT-6)
- FAPEAM** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
- HSP** – Heat shock proteins (Proteínas de choque térmico)
- IC95%** – Intervalo de confiança de 95%
- ICB** – Instituto de Ciências Biológicas
- IFN- $\gamma$**  – Interferon gama
- IL** – Interleucina
- INPA** – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
- JNK1** – c-Jun N-terminal kinase 1 (Quinase N-terminal c-Jun 1)
- KLF4** – Krüppel-like factor 4 (Fator 4 semelhante a Krüppel)
- LAM** – Lipoarabinomannan (Lipoarabinomanana)
- LIM** – Laboratório de Imunologia Molecular
- LM** – Lipomannan (Lipomanana)
- MAPK** – Mitogen-activated protein kinases (Proteínas quinases ativadas por mitógeno)
- MBL** – Mannose-binding lectin (Lectina ligadora de manose)

**mRNA** – RNA mensageiro

**miRNA** – MicroRNA

**MR** – Mannose receptor (Receptor de manose)

**NF- $\kappa$ B** – Nuclear factor kappa B (Fator nuclear kappa B)

**NK** – Natural killer cells (Células natural killer)

**NLR** – NOD-like receptors (Receptores semelhantes a NOD)

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**OR** – Odds ratio (Razão de chances)

**P2X7** – Purinergic receptor P2X7 (Receptor purinérgico P2X7)

**PAMP** – Pathogen-associated molecular pattern (Padrão molecular associado a patógenos)

**PDIMs** – Phthiocerol dimycocerosates (Dimicocerosatos de ftiocerol)

**PILAMs** – Phosphatidylinositol lipoarabinomannans (Lipoarabinomananas associadas a fosfatidilinositol)

**PIM** – Phosphatidylinositol mannoside (Manosídeo de fosfatidilinositol)

**PPGIBA** – Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

**PRRs** – Pattern recognition receptors (Receptores de reconhecimento de padrão)

**qPCR** – Quantitative polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)

**RNA** – Ácido ribonucleico

**SNP** – Single nucleotide polymorphism (Polimorfismo de nucleotídeo único)

**SNV** – Single nucleotide variant (Variante de nucleotídeo único)

**SP** – Surfactant protein (Proteína do surfactante)

**TB** – Tuberculose

**TBP** – Tuberculose pulmonar

**TLR** – Toll-like receptor (Receptor do tipo Toll)

**TNF** – Tumor necrosis factor (Fator de necrose tumoral)

**UFAM** – Universidade Federal do Amazonas

**WHO** – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

## SUMÁRIO

|                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                      | <b>14</b> |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                            | <b>16</b> |
| 2.1. Aspectos gerais da TB.....                                                 | 16        |
| 2.2. Resposta imunológica frente à TB .....                                     | 21        |
| 2.3. Citocinas importantes na TB.....                                           | 33        |
| 2.3.1. Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ).....                                    | 35        |
| 2.3.2. Interleucina-6 (IL-6).....                                               | 36        |
| 2.3.3. Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ).....                              | 38        |
| 2.3.4. Interleucina-18 (IL-18).....                                             | 40        |
| 2.4. Variantes de base única (SNVs) em genes imunológicos associados à TB ..... | 41        |
| 2.5. MicroRNAs na TB .....                                                      | 47        |
| 2.5.1. miR-423.....                                                             | 52        |
| 2.5.2. miR-1275.....                                                            | 56        |
| 2.5.3. miR-146a.....                                                            | 58        |
| 2.5.4. miR-27a.....                                                             | 62        |
| <b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>                                                    | <b>66</b> |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>                                                        | <b>68</b> |
| 4.1. Objetivo geral .....                                                       | 68        |
| 4.2. Objetivos específicos .....                                                | 68        |
| <b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                              | <b>69</b> |
| 5.1. Aspectos éticos.....                                                       | 69        |
| 5.2. Tipo de estudo.....                                                        | 69        |
| 5.3. População de estudo.....                                                   | 69        |
| 5.4. Critérios de inclusão .....                                                | 69        |
| 5.5. Critérios de exclusão.....                                                 | 70        |
| 5.6. Recrutamento dos participantes .....                                       | 70        |
| 5.7. Cálculo amostral .....                                                     | 71        |
| 5.8. Amostras biológicas .....                                                  | 71        |
| 5.9. Exames micobacteriológicos nas amostras de escarro .....                   | 72        |
| 5.10. Processamento das amostras de sangue .....                                | 72        |
| 5.11. Extração de DNA a partir da amostra de sangue .....                       | 72        |
| 5.12. Critérios de seleção das variantes (SNVs) e dos miRNAs .....              | 72        |

|                                                                                  |            |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.13. Ensaios de genotipagem por qPCR.....                                       | 73         |
| 5.14. Quantificação de citocinas por <i>ProQuantum Immunoassay</i> .....         | 73         |
| 5.15. Quantificação das citocinas por ELISA.....                                 | 74         |
| 5.16 Análises estatísticas.....                                                  | 74         |
| <b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                           | <b>76</b>  |
| 6.1. Características gerais da população estudada .....                          | 76         |
| 6.2. Análise das variantes gênicas.....                                          | 81         |
| 6.2.1. Análise da variante rs6505162 .....                                       | 86         |
| 6.2.2. Análise da variante rs4713693 .....                                       | 89         |
| 6.2.3. Análise da variante rs2910164. ....                                       | 94         |
| 6.2.4. Análise da variante rs895819. ....                                        | 98         |
| 6.3. Análise da interação entre SNVs .....                                       | 102        |
| 6.4. Frequência alélica e comparação populacional das variantes.....             | 104        |
| 6.5. Quantificação das citocinas IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ e IL-18..... | 107        |
| <b>7. CONCLUSÃO .....</b>                                                        | <b>126</b> |
| <b>8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....</b>                                             | <b>128</b> |
| <b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>                                              | <b>129</b> |
| <b>10. ORÇAMENTO E FONTE DE FINANCIAMENTO .....</b>                              | <b>130</b> |
| <b>11. CRONOGRAMA .....</b>                                                      | <b>131</b> |
| <b>12. EQUIPE DO PROJETO.....</b>                                                | <b>132</b> |
| <b>13. REFERÊNCIAS .....</b>                                                     | <b>134</b> |
| <b>14. ANEXOS .....</b>                                                          | <b>164</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa responsável por mais de 1 milhão de mortes anuais em todo o mundo (WHO, 2025). Estima-se que cerca de 25% da população mundial esteja latentemente infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Houben; Dodd, 2016). No Brasil, país que figura entre os 30 países com mais elevada carga de TB no mundo (WHO, 2025), o estado do Amazonas destaca-se por apresentar a maior taxa de incidência da doença entre os estados (94,7 casos/100 mil habitantes) além disso, Manaus é vice-líder em incidência de TB entre as capitais brasileiras, com incidência de 127,3 casos de TB/100 mil habitantes, atrás do município de Belém-PA, que registrou 133 casos/100 mil habitantes em 2024, evidenciando a relevância desse problema na região (Brasil, 2025).

Após a exposição a *M. tuberculosis*, diferentes desfechos podem ocorrer, variando desde a eliminação do patógeno até o estabelecimento de uma infecção latente, que pode permanecer assintomática ou evoluir para a doença ativa. Esses desfechos são influenciados por múltiplos fatores, incluindo condições imunossupressoras, determinantes sociais e características imunogenéticas individuais, nas quais podemos destacar as variantes de base única (SNVs).

Embora cerca de 76% do genoma humano seja transcrito em RNA, menos de 2% desses transcritos codificam proteínas (Lee et al., 2019). O restante se constitui de sequências intrônicas e demais sequências não codificadoras. Tais sequências eram consideradas sem função conhecida até que, na década de 90, foram descobertos os microRNAs (ou miRNAs), os quais têm a capacidade de regular a expressão gênica, função que era majoritariamente atribuída às proteínas (Watson et al., 2015).

Cada miRNA é capaz de regular múltiplos alvos de RNA mensageiro (mRNA), enquanto um mesmo mRNA pode ser regulado por diferentes miRNAs, conferindo elevada complexidade e integração entre as redes regulatórias nas células (Watson et al., 2015; Machowska et al., 2022). Apesar do avanço no entendimento dessas vias, diversos aspectos carecem de maiores elucidações, incluindo o impacto das variantes nos genes de miRNAs nas diversas doenças humanas.

A atuação dos miRNAs depende do reconhecimento complementar de sequências-alvo no mRNA e de um processo de biogênese altamente regulado, mediado por enzimas RNase, como DROSHA e Dicer, que reconhecem as sequências específicas dos precursores de miRNA. Nesse contexto, SNVs podem alterar tanto o reconhecimento dos alvos, quanto o processamento

do miRNA, resultando em alterações quantitativas e funcionais, que interferem na ação dessas moléculas (Watson et al., 2015; Machowska et al., 2022).

SNVs em genes de miRNA já foram associadas a diversas doenças humanas, especialmente cânceres, bem como doenças não infecciosas, como asma, endometriose, doenças cardiovasculares e autoimunes. No entanto, o papel dessas variantes nas doenças infecciosas, particularmente na TB, permanece pouco explorado, apesar de evidências indicarem que determinadas variantes podem influenciar a suscetibilidade ou resistência à infecção, de forma dependente da população estudada (Li et al., 2016a; Dai et al., 2018; Liu et al., 2021a; Machowska et al., 2022).

Estudos demonstraram que *M. tuberculosis* é capaz de modular a expressão de diversos miRNAs envolvidos em vias biológicas relevantes para a sua patogênese, incluindo inflamação, morte celular e autofagia, a fim de favorecer a sobrevivência do bacilo e a persistência da infecção (Davuluri; Chauhan, 2022). Essa interação dinâmica entre hospedeiro e patógeno reforça a importância dos miRNAs como elementos centrais da resposta imunológica contra a TB.

Diante desse contexto, o presente estudo propõe avaliar a frequência de SNVs em genes de miRNAs em pacientes com TB e em controles sem a doença, investigando sua possível associação com a suscetibilidade à doença e com a produção de citocinas inflamatórias relevantes para a resposta imune contra o *M. tuberculosis*. Além disso, ao focar em uma população altamente endêmica no estado do Amazonas, essa tese busca contribuir para a compreensão do papel desses SNVs em um contexto epidemiológico de elevada carga de TB pulmonar, especialmente em uma população pouco explorada em estudos envolvendo esse tema.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Aspectos gerais da TB

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Em 2024, a World Health Organization estimou que cerca de 10,7 milhões de pessoas desenvolveram a TB em todo o mundo, entretanto, somente 8,3 milhões de pessoas receberam o devido diagnóstico da doença neste período. Esses dados evidenciam a contínua problemática da TB em nossa sociedade, na qual 1,23 milhão de pessoas morreram da doença neste referido ano, e o Brasil se mantém entre os 30 países com mais elevada carga de TB (WHO, 2025).

No Brasil, no ano de 2024, foram diagnosticados mais de 84 mil novos casos de TB, o que representa uma incidência de 39,7 casos a cada 100 mil habitantes, e em relação ao número de óbitos, os dados mais atualizados do Boletim epidemiológico da TB indicam que em 2023 ocorreram mais de 6 mil mortes em razão dessa doença em todo o país (2,8 óbitos/100 mil habitantes) (Brasil, 2025).

No ano de 2024, o Amazonas registrou mais de 4 mil casos de TB e taxa de incidência de 94,7 casos a cada 100 mil habitantes, sendo o estado com maior taxa de incidência entre as unidades da federação. A cidade de Manaus registrou 127,3 casos a cada 100 mil habitantes, sendo a capital vice-líder em incidência no país (Brasil, 2025).

Dados atualizados do painel epidemiológico da tuberculose da Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVS-RCP), indicam que em 2025 mais de 4,4 mil casos de TB foram registrados no estado com 265 óbitos registrados, e a capital Manaus apresentou a maior incidência do estado com 3,2 mil novos casos (155,1 casos/100 mil hab.) e 188 óbitos pela doença (FVS-RCP, 2026), revelando a persistência da TB como importante problema de saúde pública no Amazonas.

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é um grupo de micobactérias que compreende as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG; *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*. (Brasil, 2022). Apesar da espécie mais importante para a saúde pública ser *M. tuberculosis* (Brasil, 2019), as demais espécies do complexo podem ter ocorrência mais elevada entre certos grupos populacionais e regiões do globo. *M. bovis*, por exemplo, acomete mais frequentemente trabalhadores que lidam com gado em relação a outros grupos (Esteban; Muñoz-Egea, 2016), e *M. africanum* está mais restrito ao continente africano, sendo que o

primeiro caso no Brasil, de TB pulmonar por este patógeno, foi registrado em 2020 no estado do Pará (Rabahi et al., 2020).

Historicamente, *M. tuberculosis* também recebe o nome de bacilo de Koch, em homenagem a Robert Koch, médico e cientista alemão que descobriu a micobactéria causadora da TB em 1882 (Sakula, 1982). *M. tuberculosis* é fino e ligeiramente curvo, o seu tamanho foi avaliado em macrófagos alveolares isolados de pacientes, nos quais se identificou variações na morfologia, podendo apresentar um formato oval mais curto, com aproximadamente 0,5 a 1 µm de comprimento e hastes clássicas com comprimento médio de 2 a 4 µm, chegando a formas filamentosas longas com mais de 6-7 µm de comprimento (Ufimtseva et al., 2019).

É um bacilo aeróbio, álcool-ácido resistente (BAAR) que se cora em tom avermelhado em esfregaços corados com carbolfuccina e, por apresentar uma parede celular espessa rica em lipídios, não é corado pelo método de Gram, pois a composição da parede micobacteriana não permite a absorção do corante cristal violeta. Além disso, esses lipídios são importantes para o reconhecimento da micobactéria pelo sistema imunológico, contribuindo também para que o bacilo consiga evadir não somente os mecanismos imunes, mas também a ação dos antimicrobianos (Procop et al., 2018; Brasil, 2019). O tempo de crescimento de *M. tuberculosis*, em meios de cultivo a base de ovos é de 12 até 25 dias a 37°C, porém, dependendo da espécie e da carga micobacteriana presente no espécime clínico, este tempo pode variar, chegando até 60 dias de cultivo (Procop et al., 2018).

A transmissão da TB ocorre normalmente quando indivíduos com a doença ativa, que apresentam acometimento dos pulmões e/ou a laringe, eliminam bacilos através da tosse, espirro ou fala (pacientes bacilíferos). Essas gotículas contendo o agente etiológico podem ressecar e manter-se suspensas no ar por várias horas, possibilitando a inalação por indivíduos suscetíveis que entram em contato com esta carga infecciosa. O bacilo inalado chega aos alvéolos pulmonares, onde pode se estabelecer e se multiplicar, causando infecção neste sítio primário de entrada no organismo do hospedeiro (Brasil, 2019).

A partir da entrada dos bacilos pelas vias aéreas superiores, diferentes desfechos podem ocorrer. É possível que os bacilos não consigam se estabelecer no tecido pulmonar, mesmo que os indivíduos estejam sujeitos a uma longa exposição ao caso índice, e essas bactérias são eliminadas pelos mecanismos de defesa do sistema imune inato. Tais indivíduos são considerados “resisters” (resistentes) e estima-se que correspondam a até 10% da população (Simmons et al., 2018).

Outro possível desfecho é a permanência dos bacilos em um estado quiescente no interior dos granulomas, o qual se constitui de uma estrutura compacta composta de diversos tipos celulares, especialmente macrófagos, que atuam para manter o bacilo confinado, prevenindo sua disseminação. Esse desfecho é conhecido como infecção latente (Ramakrishnan, 2012).

Em uma parcela dos indivíduos infectados, entretanto, fatores diversos como doenças ou tratamentos imunossupressores, dentre outros, levam o sistema imune a falhar na manutenção dos granulomas, e os bacilos, que estavam confinados e em um estado metabólico basal, são reativados, multiplicando-se continuamente até que a infecção assintomática torne-se clinicamente aparente (Ramakrishnan, 2012; Boom; Schaible; Achkar, 2021). Estima-se que entre 5-10% dos indivíduos latentemente infectados irão desenvolver a TB em algum momento de suas vidas (Vynnycky; Fine, 2000; WHO, 2025).

Além da infecção pulmonar, a forma extrapulmonar da TB também pode ocorrer. Algumas espécies são mais associadas a forma extrapulmonar, como *M. bovis* (Esteban; Muñoz-Egea, 2016) e *M. africanum* (Sharma et al., 2016), entretanto, *M. tuberculosis* também pode ser agente de formas extrapulmonares da doença, sendo estimado que entre 15 e 20% dos casos de TB ocorram fora do sítio pulmonar (Baykan et al., 2022). No Brasil, dados do Ministério da Saúde apontam que cerca de 13% dos casos de TB diagnosticados no país em 2024 eram de TB extrapulmonar (Brasil, 2025).

Diversos sítios anatômicos podem ser acometidos pela TB extrapulmonar, como linfonodos, espaço pleural, peritônio, pele, ossos, entre outras localidades (Baykan et al., 2022). Porém, a identidade do patógeno e a rota de infecção, bem como o “status” imunológico do hospedeiro são determinantes nesse processo. Por exemplo, *M. bovis* que acomete principalmente gado: a ingestão de produtos lácteos não pasteurizados oriundos de animais infectados pode ocasionar formas gastrointestinais da TB (Esteban; Muñoz-Egea, 2016; Xu et al., 2021).

Outras maneiras de transmissão para formas extrapulmonares além da via oral compreendem a inoculação traumática do bacilo (Hadj et al., 2014) e o contato direto com ferimento infectado (Esteban; Muñoz-Egea, 2016). Uma das formas mais relevantes, porém, ocorre através da inalação do bacilo, não somente para a espécie *M. tuberculosis*, mas também para *M. africanum* (Sharma et al., 2016). A disseminação da micobactéria para outros órgãos e tecidos geralmente ocorre por via hematogênica ou linfática, especialmente quando

comprometimentos no sistema imunológico impedem que os granulomas mantenham os bacilos confinados, possibilitando sua evasão e proliferação, podendo atingir diversas regiões do organismo (Moule; Cirillo, 2020; Baykan et al., 2022). É por essa razão que indivíduos imunocomprometidos, como aqueles com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, são especialmente suscetíveis à TB extrapulmonar (Golden; Vikram, 2005; Sharma et al., 2016; Rodriguez-Takeuchi et al., 2019).

Os sintomas da doença irão depender dos órgãos acometidos, entretanto, as manifestações clínicas clássicas da forma pulmonar da TB compreendem a tosse seca ou produtiva persistente, febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento. Nos casos em que a tosse é produtiva, a expectoração pode ser purulenta ou mucoide, com ou sem sangue, e a febre vespertina que geralmente é sem calafrios, não costuma ultrapassar os 38,5°C (Brasil, 2019).

Um outro ponto de destaque que impacta inclusive o diagnóstico e a cadeia de transmissibilidade da doença é a carga bacilar dos indivíduos acometidos na forma pulmonar. Na TBP paucibacilar, os pacientes apresentam uma menor carga de *M. tuberculosis*, o que leva a baciloscopia de escarro frequentemente negativas, além de elevar o tempo para a positividade da cultura, e comprometer a sensibilidade dos testes moleculares (Zhao et al., 2022). Essa menor carga de bacilos pode ser atribuída a uma maior capacidade do hospedeiro em conter a proliferação bacteriana através dos mecanismos imunológicos efetores, como produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e resposta Th1 predominante (Arriaga et al., 2002). Por outro lado, na TBP multibacilar, a carga bacilar é mais elevada, consequentemente há maior detecção do *M. tuberculosis* nas amostras de escarro e tempo menos longo para as colônias se tornarem visíveis nos meios de cultura (Brasil, 2022).

Na TB pleural, que é a forma mais comum de TB extrapulmonar em indivíduos HIV-negativos, o sintoma mais frequente é a dor torácica, bem como a tríade astenia, emagrecimento e anorexia que ocorre em cerca de 70% dos pacientes, e a febre com tosse seca, que ocorre em cerca de 60% dos pacientes com essa forma clínica (Brasil, 2019).

De grande importância para a saúde pública está o diagnóstico dos casos de TB pulmonar, uma vez que são os bacilíferos que sustentam a cadeia de transmissão ao eliminarem bacilos viáveis pelas vias aéreas. Logo, é fundamental que os indivíduos sintomáticos respiratórios (pessoa com tosse por período  $\geq 3$  semanas de duração) realizem a investigação através da baciloscopia direta de escarro ou Teste Rápido Molecular para TB (TRM-TB),

quando disponível (Brasil, 2019). Além desses métodos, outras técnicas bacteriológicas como o exame de cultura (Procop et al., 2018), além de métodos de imagem como radiografia de tórax, podem ser empregados para aumentar a eficiência diagnóstica (Bombarda et al., 2001; Brasil, 2019).

Apesar de grandes avanços, o diagnóstico da doença permanece desafiador, especialmente em casos paucibacilares e extrapulmonares, em virtude das limitações de sensibilidade dos métodos convencionais, especialmente da baciloscopia, com sensibilidade reduzida em crianças, indivíduos com HIV, com baixa capacidade de expectoração, ou com baixa carga bacilar. Outro desafio consiste na ausência de ampla disponibilidade dos métodos moleculares (em razão do elevado custo e maior demanda de equipamentos quando comparado à baciloscopia), além de questões como a estrutura da rede laboratorial no Brasil, que muitas vezes é desigual entre cidades de menor porte e grandes centros urbanos (Brasil, 2019; Brasil, 2022).

Embora o diagnóstico deva alcançar as pessoas sob suspeita de infecção, é fundamental que ações especiais sejam tomadas para garantir o acesso ao diagnóstico a populações que vivenciam epidemias concentradas, como povos indígenas, a população privada de liberdade, pessoas em situação de rua, pessoas vivendo com o HIV e aqueles vivendo em situação de extrema pobreza. Esses grupos apresentam maior risco de adoecimento por TB e contribuem de forma mais elevada para a manutenção da cadeia de transmissão. Estima-se que essas populações podem ter até 56 vezes mais chance de adoecimento em razão de problemas imunológicos inerentes a condição clínica que possuem, ou mesmo problemas nutricionais em razão da escassez de recursos, além disso, dada a característica do *M. tuberculosis* de ser transmitido por aerossóis gerados pela tosse, e de manter-se suspenso no ar, as aglomerações encontradas em moradias precárias, ou penitenciárias, favorecem a persistência do ciclo infeccioso (Brasil, 2019; Brasil, 2022).

O tratamento da TB no Brasil é padronizado e disponível no Sistema Público de Saúde, com o tratamento correto, virtualmente todos os casos de TB podem ser curados. O esquema básico para adultos e adolescentes possui duas fases: a fase intensiva, com duração de 2 meses, composta pela associação entre rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (RHZE), e a fase de manutenção, com duração de 4 meses, composta por rifampicina e isoniazida (RH). A fase intensiva tem como objetivo reduzir rapidamente a carga bacilar e eliminar bacilos com resistência natural a algum medicamento, resultando na diminuição da transmissibilidade,

enquanto a fase de manutenção visa eliminar bacilos persistentes e reduzir a possibilidade de recidivas (Brasil, 2019).

Os medicamentos utilizados apresentam diferentes propriedades terapêuticas, incluindo atividade bactericida precoce, esterilizante e ação bacteriostática, que em associação contribuem para o sucesso da terapêutica. Entretanto, para um tratamento eficiente, é necessário um acompanhamento clínico e a correta adesão para se obter a cura da doença, destacando-se o tratamento diretamente observado, que constitui na observação por parte de um profissional da saúde ou pessoa capacitada, da tomada do medicamento pelo paciente, para fortalecer a adesão e prevenir falhas terapêuticas (Brasil, 2019).

Grandes desafios fazem com que a TB permaneça como uma das principais doenças infecciosas causadoras de morte no mundo, por exemplo, a resistência aos antimicrobianos que muitas vezes ocorre em decorrência da falta de adesão ao tratamento por parte do paciente (Barreira, 2018; Brasil, 2019; Brasil, 2022). Segundo o Ministério da Saúde, somente 62,3% dos novos casos de TB em 2023 tiveram desfechos de cura confirmados, ao passo mais de 18% dos indivíduos interromperam o tratamento (Brasil, 2025).

Desse modo, todas as estratégias que podem ser adotadas no controle dessa doença devem ser empregadas, desde o acolhimento do paciente pelo profissional de saúde, fornecendo a ele orientações sobre o tratamento para se diminuir as chances de falhas na adesão (Brasil, 2019), até o investimento maciço em pesquisa básica e aplicada e em desenvolvimento tecnológico, voltado à descoberta de novos fármacos anti-TB com esquemas terapêuticos mais curtos e menos tóxicos, à elaboração de novos testes diagnósticos mais rápidos, sensíveis e acessíveis, e ao desenvolvimento de vacinas efetivas contra as diferentes formas da doença (Barreira, 2018).

## **2.2. Resposta imunológica frente à TB**

Na forma clínica pulmonar, a mais comum da TB, as células alveolares da imunidade inata atuam de modo muito importante na interação inicial com a micobactéria após sua inalação, podendo eliminar o bacilo por mecanismos efetores acionados por macrófagos alveolares, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos, células NK, entre outras células que compõem a primeira linha de defesa imunológica. Essas células comunicam-se por mediadores solúveis (principalmente quimiocinas e citocinas) que coordenam o recrutamento, a ativação e a polarização celulares. A dinâmica da produção das citocinas determina em grande parte se o

hospedeiro conseguirá conter a infecção ou se haverá progressão para a doença ativa (Schorey; Schlesinger, 2016; Herrera et al., 2022).

Além das citocinas e quimiocinas, cuja produção é induzida pela interação entre os Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs) e Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs), com a finalidade de amplificar a reação imunológica, outras moléculas antimicrobianas como lisozimas, defensinas e catelicidinas presentes no líquido localizado na superfície do lúmen das vias aéreas, atuam conjuntamente na tentativa de controlar e eliminar o patógeno (Ferluga et al., 2020).

As ações efectoras do sistema imune inato têm início a partir do reconhecimento dos PAMPs de micobactérias pelos PRRs presentes nas células imunes do inato. A espessa parede celular de *M. tuberculosis* contém uma grande diversidade de PAMPs passíveis de serem reconhecidos pelos receptores da imunidade inata, tais como os peptidoglicanos e as arabinogalactanas covalentemente ligadas a uma grande quantidade de ácidos graxos de cadeia longa denominados de ácidos micólicos, localizados na camada mais interna da parede celular. Além destes, há também vários lipídios complexos como glicolipídios fenólicos, dimicocerosato de fitiocerol (PDIMs), trealose-6,60-dimicolato, lipoarabinomananas (LAM), lipomananas (LM) e manosídeos de fosfatidilinositol (PIM), dentre outros, localizados na camada mais externa dessa parede, e por fim, uma última camada que envolve a superfície micobacteriana, referido por alguns pesquisadores como “envelope”, constituída majoritariamente de  $\alpha$ -glucanas além de outros açúcares, lipídios e proteínas (Ishikawa; Mori; Yamasaki, 2017; Ly; Liu, 2020).

Além dos lipídios associados ao bacilo, *M. tuberculosis* é capaz de secretar vários produtos antigênicos de natureza proteica através de sistemas de secreção, por exemplo o sistema ESX/T7S, que é responsável pela secreção das proteínas ESX-1, ESX-3 e ESX-5, dentre outras. Também tem a capacidade de secretar lipídios, proteínas e lipopolissacarídeos através da liberação de vesículas membranosas (Majlessi et al., 2015; Ly; Liu, 2020).

Esses componentes antigênicos, tanto os associados a superfície micobacteriana como aqueles liberados por mecanismos de secreção são parte do arsenal molecular disponível pelo bacilo para evadir o sistema imunológico e, conseqüentemente, sobreviver, multiplicar-se e provocar doença, por exemplo, o ESX-1 está envolvido na modulação do pH dos fagossomos tornando-os menos ácidos, contribuindo para o escape de *M. tuberculosis* dos fagossomos no interior de macrófagos, enquanto os PDIMs estão associados à proteção do bacilo contra a ação

de espécies reativas de nitrogênio no interior de macrófagos ativados, e ao escape do bacilo do interior de fagócitos (Majlessi et al., 2015; Ly; Liu, 2020).

Apesar de serem importantes fatores de virulência de *M. tuberculosis* auxiliando na sobrevivência deste patógeno nas células do hospedeiro, esses componentes também são fundamentais na interação com as células imunológicas via PRRs. Por exemplo, o PDIM pode ser reconhecido por fagócitos através do Receptor de Complemento 3 (CR-3) induzindo a fagocitose da micobactéria, outro exemplo decorre da secreção de componentes antigênicos pelas vesículas membranosas da micobactéria, que ao serem reconhecidos por Receptores Semelhantes a Toll tipo 2 (TLR2) induzem uma intensa resposta pró-inflamatória com o objetivo de eliminar o agente invasor (Majlessi et al., 2015; Ly; Liu, 2020; Augenstreich et al., 2020).

São diversos os receptores da imunidade inata capazes de reconhecer os PAMPs de *M. tuberculosis*. Dentre esses receptores os TLRs estão entre os mais estudados e nos humanos, 10 diferentes tipos de TLRs já foram identificados. Estes receptores constituem um grupo de proteínas transmembranares que reconhecem moléculas derivadas de patógenos, e quando ativados, induzem a expressão de fatores de transcrição que atuam no material genético para favorecer a produção de citocinas, quimiocinas e óxido nítrico (Peroval et al., 2013; Murphy, 2014; Ishikawa, Mori, Yamasaki, 2017).

Os TLRs podem estar localizados na membrana plasmática da célula (TLR1/TLR2, TLR2/TLR6, TLR2, TLR4 e TLR5), ou localizados nas membranas endossomais no interior das células (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 e TLR10), dessa maneira, esses receptores são importantes no reconhecimento tanto dos PAMPs bacilares que estão fora, quanto daqueles que são liberados no interior das células (Peroval et al., 2013; Murphy, 2014; Ishikawa, Mori, Yamasaki, 2017).

Dentre os PAMPs reconhecidos pelas células do hospedeiro estão as lipomananas e as lipoproteínas triaciladas reconhecidas pelo heterodímero TLR1/TLR2; as lipoproteínas diaciladas reconhecidas pelo heterodímero TLR2/TLR6; os manosídeos de fosfatidilinositol, as lipomananas, lipoarabinomananas, peptidoglicanas e lipoproteínas por TLR2; lipomananas tri e tetra aciladas, proteínas do choque térmico 60/65 (60- e 65-HSP), e proteína ribossomal da unidade 50S por TLR4; e os motivos CpG não metilados do DNA micobacteriano por TLR9 (Murphy, 2014; Mortaz et al., 2015; Ishikawa, Mori, Yamasaki, 2017; Faridgozar; Nikoueinejad, 2017).

A partir desse reconhecimento, diferentes vias de sinalização são ativadas para gerar as respostas efetoras da imunidade inata. Uma dessas vias é dependente da molécula adaptadora MyD88, que é recrutada até o domínio TIR citoplasmático do TLR, após este se dimerizar diante da ligação do PAMP micobacteriano à região do TLR rica em leucina, responsável por esta ligação antigênica. Com isso, ocorre a transdução do sinal, que compreende uma via intracelular baseada no recrutamento e ativação de diversas proteinoquinas que levam à degradação do inibidor I $\kappa$ B $\alpha$ , e consequente translocação nuclear do Fator de Transcrição NF- $\kappa$ B. Esse fator induz a transcrição de genes de moléculas envolvidas na inflamação, como das citocinas IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ , das quimiocinas CXCL-8, CCL2, das moléculas de adesão endotelial e das moléculas coestimulatórias (CD 80 e CD 86) para a ativação de linfócitos T (Kleinnijenhuis et al., 2011; Mortaz et al., 2015; Poladian et al., 2023).

Outras vias de sinalização também podem ser ativadas a partir da ligação do ligante aos TLRs, por exemplo, a via das Proteína-quinases Ativadas por Mitógenos (MAPK ou MAP quinases), que também é dependente da molécula adaptadora MyD88 para ocorrer. Inclui a degradação da proteína MyD88, que é ocasionada pelo fator de virulência PPE36, uma proteína associada à parede celular de *M. tuberculosis*, leva à inibição da ativação das vias MAPK e NF $\kappa$ B, com consequente redução da resposta inflamatória necessária para eliminar o bacilo (Peng; Yue; Xiong, 2022).

A via de sinalização genérica das MAP quinases é compartilhada por quatro cascatas sinalizadoras distintas que são nomeadas de acordo com a MAP quinase envolvida, sendo elas a ERK1/2, JNK1/2/3, p38-MAPK e ERK5, e podem ser ativadas por diversos sinais além dos receptores TLRs, como radiação ultravioleta, agentes genotóxicos, estresse oxidativo, fatores de crescimento, estimulação inflamatória e de citocinas, o que leva a diversas respostas celulares como proliferação, diferenciação, ampliação da inflamação e morte celular (Sui et al., 2014; Sun et al., 2015). Tanto TLR2, quanto TLR4, que são reconhecidamente receptores capazes de ligarem-se a PAMPs de *M. tuberculosis* já foram demonstrados como ativadores dessa via de sinalização (Zhou et al., 2018; Wang et al., 2020).

As quinases da família MAPK (ERKs, P38 e JNK) também podem ativar o fator de transcrição Proteína Ativadora-1 (AP-1) (Kong et al., 2022), responsável por estimular a expressão de genes pró-inflamatórios como das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. Além disso, a ativação da via de sinalização das MAP quinases, bem como do fator AP-1, está relacionada à regulação da maturação do fagossomo durante a infecção pelo *M. tuberculosis*, e à regulação

da morte celular programada, incluindo a apoptose, além da autofagia, que são dois mecanismos celulares efetores no combate a este patógeno intracelular (Lefkir et al., 2004; Sui et al., 2014; Mortaz et al., 2015; Mishra et al., 2017; Wu; Nicoll; Ingham, 2021; Nisa et al., 2022).

Uma outra sinalização, que é capaz de ativar e promover a translocação nuclear dos Fatores Regulatórios de Interferons (IRFs), também pode ocorrer a partir da ligação do PAMP micobacteriano aos TLRs, especialmente TLR3, TLR4, TLR7 e TLR9, promovendo a produção dos Interferons tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) (Nguyen et al., 2020).

Embora os IFN tipo I estejam amplamente relacionados à resposta contra vírus, induzindo um estado celular antiviral, o aumento da expressão de MHC classe I e a ativação de células NK, na TB, os Interferons tipo I estão relacionadas a diversos efeitos deletérios ao paciente, como à progressão da doença e à gravidade das lesões pulmonares (Berry et al., 2010; Mundra et al., 2023). Acredita-se que os efeitos prejudiciais ao paciente ocorram pela ação dos IFNs tipo I na diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias necessárias para controlar *M. tuberculosis*, como IL-1 $\beta$ , TNF, IFN- $\gamma$ , e IL-12, favorecendo a sobrevivência do bacilo (Novikov et al., 2011; de Paus et al., 2013).

Além dos TLRs o reconhecimento de *M. tuberculosis* pode ocorrer por meio de receptores NOD (NLRs), os quais compõem um grupo variado de receptores citoplasmáticos capazes de reconhecer PAMPs, e DAMPs (produtos oriundos do dano e estresse celular) (Liu et al., 2019; Platnich et al., 2019). Os membros dessa família de PRRs possuem estrutura e mecanismos de ação diferentes, alguns NLRs possuem a capacidade de levar a formação de um complexo multiproteico denominado inflamassoma, que culmina com o recrutamento de várias Pró-caspases-1, e suas respectivas autoclivagens, gerando duas subunidades (p10 e p20) que se unem para formar um heterodímero, este que por sua vez corresponde a forma ativada da caspase-1, responsável pelo processamento da pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 gerando as formas ativas dessas citocinas pró-inflamatórias (Platnich et al., 2019).

Além da via canônica de ativação de NLRs, que envolve a montagem do inflamassoma e consequente produção de IL-1 $\beta$  e IL-18, alguns NLRs podem também atuar como reguladores de vias de sinalização importantes no processo inflamatório, como a via de ativação de NF- $\kappa$ B, a via das MAP quinases, e via dos IFN tipo I, além da autofagia e da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Tuladhar; Kanneganti, 2020).

Alguns exemplos de reconhecimento de PAMPs micobacterianos por NLRs já foram descritos, por exemplo, moléculas derivadas de peptidoglicanas como o Muramil Dipeptídeo, que é reconhecido por NOD-2, ativando a via NF- $\kappa$ B, com consequente produção de citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 (Coulombe et al., 2009), ao passo que outro PAMP micobacteriano, o ácido meso-diaminopimélico é reconhecido por NOD-1, também ativando as vias pró-inflamatórias como aquelas das MAP quinases com a ativação do fator NF- $\kappa$ B (Franchi et al., 2008).

Além do reconhecimento dos PAMPs micobacterianos, o dano celular ocasionado pela infecção por *M. tuberculosis* também pode ser detectado pelos NLRs, por exemplo, tanto a fagocitose da micobactéria, quanto a ruptura de fagossomos no interior de macrófagos, levam à translocação das micobactérias para o citosol, produzem dano celular, com efluxo de K<sup>+</sup> e consequente ativação de NLRP3, levando a formação do inflamassoma e a liberação de IL-1 $\beta$ . Tal processo de dano celular, é mediado por proteínas secretadas pelo sistema secretor ESX-1 de *M. tuberculosis*, que além de estarem envolvidas na ruptura do fagossomo, também parecem ser importantes ativadores do inflamassoma (Beckwith et al., 2020).

Os Receptores de Lectina tipo C (CLRs) também são muito importantes no reconhecimento inicial de *M. tuberculosis*. Os CLRs compõem um grupo heterogêneo de receptores que reconhecem carboidratos presentes na superfície microbiana, induzindo a produção de respostas inflamatórias e fagocitose, estes receptores podem estar localizados na superfície das células de forma transmembranar, ou solúveis em fluidos corpóreos, tais como o soro ou fluido pulmonar, permitindo a montagem de resposta imunológica contra tumores e patógenos diversos tais como vírus, fungos e micobactérias (Goyal; Klassert; Slevogt, 2016; Abbas; Lichtman; Pillai, 2023).

Dentre os CLRs solúveis, encontramos, no grupo das colectinas, as proteínas surfactantes A e D (SP-A e SP-D), além da proteína do complemento Lectina Ligante de Manose (MBL) com capacidade de reconhecer variados tipos de PAMPs, dentre os quais estão os de *M. tuberculosis*. SP-A e SP-D são proteínas do surfactante pulmonar e são capazes de reconhecer LAMs de *M. tuberculosis* (Goyal et al., 2016), entretanto SP-A já foi identificada na promoção da fagocitose de uma cepa virulenta de *M. tuberculosis* por macrófagos derivados de monócitos humanos (Gaynor et al., 1995; Goyal et al., 2016), e no aumento da expressão de Receptores de Manose em humanos (Beharka et al., 2002) em face do reconhecimento do bacilo. Já SP-D também é capaz de reconhecer LMs e LAMs revestidos com fosfatidilinositol (PILAMs),

conduzindo à aglutinação do bacilo, porém parece não favorecer a fagocitose da mesma forma que SP-A (Fergusson et al., 2002; Goyal; Klassert; Slevogt, 2016).

Outro CLR solúvel, a MBL, encontrada no soro e em outros tipos de líquidos corporais, é frequentemente encontrada como hexâmero na circulação, sendo capaz de reconhecer carboidratos como D-manose e L-fucose de diversos patógenos, e a partir desse reconhecimento, MBL pode agir diretamente como uma opsonina (ligando-se simultaneamente ao patógeno e ao receptor de C1q do fagócito), ou através da ativação do sistema complemento pela via das lectinas independente de anticorpo, que culmina com a clivagem de C3 gerando o fragmento C3b, o qual também funciona como opsonina potencializando a fagocitose (Goyal; Klassert; Slevogt, 2016; Abbas; Lichtman; Pillai, 2023).

MBL já foi identificada atuando no reconhecimento do PAMP de *M. tuberculosis*, lipoarabinomanana manosilada (ManLAM), e tal reconhecimento induziu a ativação do complemento bem como aumentou a opsonização e a fagocitose de *M. tuberculosis* por uma linhagem de macrófagos (U937) (Bartłomiejczyk et al., 2014). Evidenciando o papel da MBL e da ativação do complemento pela via das lectinas, algumas mutações nos genes que codificam estes componentes (Zhang et al., 2020; Shen et al., 2020; Li et al., 2021), bem como deficiências na produção destes componentes tem levado a maior suscetibilidade no desenvolvimento da TB (Nisihara et al., 2017).

Dentre os CLRs associados à célula no reconhecimento de *M. tuberculosis*, há os receptores de Manose (MR), um tipo de proteína transmembranar, cuja porção N-terminal extracelular possui além de outros domínios, oito domínios de lectina-C (CTLDs), seguido por um domínio transmembranar e um motivo citoplasmático envolvido na internalização do ligante. MRs estão localizados abundantemente na superfície de macrófagos alveolares, reconhecendo açúcares terminais presentes em carboidratos da superfície microbiana tais como L-fucose, D-manose e N-cetil-D-glicosamina, a partir deste reconhecimento ocorre a fagocitose do microrganismo ligante (Goyal; Klassert; Slevogt, 2016; Abbas; Lichtman; Pillai, 2023).

No pulmão, as primeiras células a encontrarem os bacilos são os macrófagos. Existem diversos tipos de macrófagos neste órgão: os alveolares, residentes no pulmão e oriundos de precursores da medula óssea; os residentes oriundos do fígado fetal; e os macrófagos alveolares com capacidade de autorrenovação, oriundos do saco vitelino. Além destes, em resposta a infecção, macrófagos diferenciados a partir de monócitos circulantes também são direcionados

até o pulmão. Entretanto essa diversidade de células apresenta características de respostas distintas em face da interação com o patógeno (Ahmad et al., 2022).

Ainda que os diferentes tipos de macrófagos localizados no mesmo microambiente imunológico sejam expostos ao patógeno, as diferenças na ontogenia desses tipos celulares determinam características significativamente diferentes entre eles. Os macrófagos oriundos de monócitos que foram atraídos até o pulmão apresentam como característica o aumento nos transcritos relacionados à glicólise, à sinalização via IFN- $\gamma$ , e às respostas inflamatórias, sendo, portanto, mais ligados ao combate contra *M. tuberculosis* e classificados no subtipo M1 (macrófagos classicamente ativados) (Huang et al., 2019; Ahmad et al., 2022).

Por outro lado, os macrófagos residentes possuem aumento nos transcritos relacionados ao metabolismo de ácidos graxos e colesterol, essencial para o metabolismo micobacteriano, sendo mais permissivos à sobrevivência bacilar, logo, são classificados no subtipo M2 (macrófagos alternativamente ativados). Embora o conceito de macrófagos M1/M2 seja útil para contextualizar os tipos de respostas exercidas por estas células, *in vivo*, essa classificação é pouco aplicável, pois existem células com marcadores de subtipo M1 e M2 sendo expressos concomitantemente (Huang et al., 2019; Ahmad et al., 2022).

Além da ontogenia das células, à medida que a resposta adaptativa é montada a partir da apresentação dos antígenos micobacterianos por células dendríticas nos órgãos linfoides secundários, o tipo de resposta adaptativa gerada também irá influenciar o tipo de função que os macrófagos irão desempenhar, no caso de predomínio de resposta Th1, que possui como característica o combate aos patógenos intracelulares, o aumento da produção de IFN- $\gamma$  promove maior ativação dos macrófagos, potencializando sua ação fagocítica. Por outro lado, citocinas como IL-4 e IL-13, advindas da resposta Th2, direcionam os macrófagos ao subtipo M2, que é mais ligado ao reparo tecidual e mais favorável sobrevivência do bacilo (Ahmad et al., 2022).

Outro fator importante, que faz com que essa bactéria seja altamente capaz de sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro humano, é o rico arsenal molecular que permite ao bacilo subverter as estratégias imunológicas, impedindo, por exemplo, a fusão do fagossomo com o lisossomo, ou mesmo causando rupturas na membrana dessa organela, além de impedir a acidificação do fagolisossomo maduro quando este é formado, mantendo um pH em torno de 6,5 e favorecendo a replicação bacteriana (Thakur; Muniyappa, 2023).

Uma das ferramentas de controle da infecção por *M. tuberculosis* é a morte celular. Embora haja relatos conflitantes de que *M. tuberculosis* poderia atuar na ativação ou no bloqueio da apoptose, este tipo de morte celular é considerado como uma importante ferramenta do hospedeiro para combater a infecção micobacteriana, enquanto a indução à necrose seria uma estratégia do bacilo, levando à proliferação e à disseminação da infecção, além de dano tecidual (Amaral et al. 2016; Nisa et al., 2022).

Os mediadores inflamatórios envolvidos, os aspectos genéticos do hospedeiro, bem como a virulência do patógeno em questão, são fundamentais para se definir qual o destino do macrófago infectado. Normalmente, o reconhecimento do bacilo intracelular na fase inicial da infecção pode ativar a morte celular, antecipando a destruição das células infectadas e contribuindo para o controle da carga infecciosa através da apoptose. Por outro lado, uma vez que a infecção progride e a carga micobacteriana aumente, os efeitos citotóxicos de *M. tuberculosis* promovem o aumento da morte de macrófagos por necrose, ocasionando a formação de lesões caseosas em razão da ruptura dos granulomas, gerando a disseminação do bacilo (Amaral et al., 2016). Da mesma forma, a apoptose que ocorre nos estágios avançados da infecção também pode favorecer a sobrevivência do bacilo e sua disseminação (Nisa et al., 2022).

Durante a apoptose, as vesículas formadas ou corpos apoptóticos podem ser captados por macrófagos vizinhos num processo chamado eferocitose. Já na necrose os DAMPs são liberados, e podem ser reconhecidos por outras células inflamatórias (Amaral et al., 2016).

Um destes DAMPs é o próprio ATP que no meio extracelular pode ser reconhecido por receptores como P2X7 de células vizinhas e, após a ativação deste receptor, ocorrem distúrbios na concentração de íons na célula, ativando o inflamassoma NLRP3 e levando a produção e liberação de IL-1 $\beta$ . Entretanto, quanto mais extensiva e prolongada é a ativação do P2X7, poros são formados na célula que reconheceu o DAMP, amplificando a morte celular. Ou seja, a magnitude e a duração desse estímulo contribuirão para o tipo de morte que se sucede, apoptose ou necrose, sendo que baixas quantidades de ATP extracelular podem induzir a morte celular por apoptose, e elevadas quantidades podem acelerar a morte necrótica das células (Fairbairn et al., 2001; Amaral et al., 2014; Amaral et al., 2016).

Vários outros mediadores imunológicos estão envolvidos no desenvolvimento da morte celular. Ressalta-se que não somente o tipo de mediador químico que determina os tipos de morte celular, mas também a quantidade produzida e a extensão do estímulo gerado. Por

exemplo, a detecção micobacteriana por PRRs induz a produção de TNF- $\alpha$ , que por sua vez é capaz de induzir tanto apoptose quanto necrose. TNF- $\alpha$ , após liberado, pode ser reconhecido pelo receptor TNFR1 que induz a ativação de vias apoptóticas, porém, produção excessiva e desregulada dessa citocina contribui para elevada indução de necrose e disseminação do bacilo (Rodrigues et al., 2013; Amaral et al., 2016).

O próprio bacilo consegue produzir diversas proteínas com capacidade de impedir a apoptose dos macrófagos infectados, por exemplo, através da secreção de TNF-R2, inativando e impedindo a apoptose mediada por TNF- $\alpha$  (Balcewicz-Sablinska et al., 1998), e aumentando suas taxas de sobrevivência. A autofagia também pode ser bloqueada pelo bacilo, impedindo seu *clearance*, como demonstrado por Quadir et al. (2023), que identificou uma proteína do bacilo denominada de MoxR1 (um ligante de TLR-4), capaz de bloquear a autofagia a partir da inibição da quinase reguladora da autofagia ULK1, além de inibir a apoptose pela inibição da via pró-apoptótica MAPK JNK1/2.

Em razão dessa capacidade de *M. tuberculosis* de evadir ou subverter, e até mesmo modular os mecanismos imunológicos envolvidos no combate inicial à micobactéria, a infecção tende a se estabelecer e persistir (Herrera et al., 2022). Como consequência da persistência do patógeno, o estímulo antigênico permanece atraindo células até o foco infeccioso levando a formação do granuloma, que é a marca histopatológica da TB, e consiste em um agregado organizado e compacto de células que envolve o bacilo. Este agregado de células imunológicas, inicialmente formado por macrófagos até a chegada de outros tipos celulares, pode levar à eliminação do bacilo com mineralização da estrutura granulomatosa, ou à morte das células participantes por necrose, formando áreas de degeneração caseosa que, além do dano tecidual gerado, permite a liberação e a disseminação do bacilo (Russell et al., 2009; Ramakrishnan, 2012).

Logo, é possível notar o papel ambíguo do granuloma na imunopatogenia da TB, pois a deficiência na formação do granuloma leva à alta suscetibilidade ao desenvolvimento da forma ativa dessa doença. Por outro lado, o granuloma também pode contribuir com a disseminação do bacilo e a destruição do tecido pulmonar à medida que o hospedeiro falha em conter a replicação micobacteriana, pois a crescente inflamação tecidual e injúria celular que ocorrem levam à formação dos granulomas necrotizantes (Ramakrishnan 2012; Sawyer et al., 2023).

De maneira geral, a caracterização de granulomas em necrotizantes e não-necrotizantes embora útil, é bastante limitada, pois os granulomas são bastante diversos em termos de

composição celular. Sawyer et al. (2023), ao analisar lesões granulomatosas de 13 pacientes, identificou uma elevada heterogeneidade na densidade populacional de cada tipo de célula imune investigada entre os tipos de granuloma (necrotizante ou não-necrotizante), observando que, nas lesões necrotizantes, os macrófagos CD86+ são mais abundantes, enquanto linfócitos B CD20+ e linfócitos T CD4+ são mais abundantes nas lesões não-necrotizantes.

Nas lesões necrotizantes, em razão da destruição caseosa, o centro do granuloma apresenta estrutura acelular, ao passo que nas lesões não-necrotizantes há uma distribuição espacial das células imunes de forma desigual, onde em algumas lesões a maioria das células se dispunham na região central, enquanto outras lesões do mesmo tipo, as células se organizavam de forma mais periférica (Sawyer et al., 2023).

Na composição dos granulomas, embora os macrófagos representem a população celular chave para o seu desenvolvimento em razão do caráter intracelular do patógeno, e da característica fagocítica dessas células, outras células também fazem parte de sua estruturação inicial, como por exemplo neutrófilos e células dendríticas (Ramakrishnan, 2012). Outras células também são atraídas à medida que moléculas inflamatórias são produzidas, como as quimiocinas, que amplificam a migração celular ao foco granulomatoso. Nesse contexto, os neutrófilos são fundamentais para a formação do granuloma uma vez que são uma das principais células produtoras de quimiocinas, potencializando a migração de mais células imunes ao granuloma (Alcantara et al., 2023).

Conforme o granuloma progride, os macrófagos presentes podem passar por processos de alterações morfológicas significativas como a formação de células gigantes multinucleadas, formadas a partir da fusão de vários macrófagos, ou podem se transformar em células epitelioides que possuem membranas interdigitadas capazes de se ligar às células adjacentes, contribuindo para o caráter compacto do granuloma. Outra mudança pela qual os macrófagos podem passar é a transformação em células espumosas, que ocorre pelo acúmulo de lipídios em seu interior. Essa alteração se dá principalmente pela desregulação do metabolismo lipídico promovida por *M. tuberculosis* nos macrófagos do hospedeiro, contribuindo para a formação de necrose caseosa e sobrevivência da bactéria (Russell et al., 2009; Ramakrishnan, 2012).

Ao longo da evolução da resposta granulomatosa, e consequentemente da exposição e estimulação antigênica, a resposta imune adaptativa também começa a ser produzida através do acúmulo de células dendríticas nos linfonodos adjacentes. Com isso, linfócitos específicos começam a ser produzidos e direcionados até o granuloma e começam a fazer parte dessa

estrutura. De maneira geral, respostas de células Th1 são preponderantes para o controle da proliferação micobacteriana, mas outros tipos de respostas adaptativas também são fundamentais neste combate, como a resposta das células Th17 que contribui para potencializar o recrutamento de mais células imunológicas ao foco infeccioso (Russell et al., 2009; Ramakrishnan, 2012; Alcantara et al., 2023).

Conforme a resposta adaptativa surge e compõe o granuloma, a proliferação micobacteriana atinge um platô, evidenciando a importância de uma resposta específica para o controle da infecção, ainda que os eventos-chave de formação do granuloma sejam primordialmente compostos por elementos da imunidade inata (Russell et al., 2009; Ramakrishnan, 2012; Alcantara et al., 2023).

Estima-se que cerca de ¼ da população mundial esteja latentemente infectada pelo *M. tuberculosis* (Houben; Dodd, 2016; WHO, 2025), e cerca de 10% dos indivíduos com a infecção latente acabam por desenvolver a TB ativa em algum momento de suas vidas, especialmente em razão de falhas no sistema imunológico e a consequente perda da capacidade de contenção da micobactéria (Schorey; Schlesinger, 2016; Herrera et al., 2022). O granuloma é parte fundamental nessa contenção do bacilo e na manutenção da infecção assintomática (latência).

Uma vez que em muitos indivíduos que são infectados, a TB pulmonar não se manifestará, e em outros, a doença se desenvolverá em algum momento de suas vidas, certos fatores atuam na determinação do desfecho que se sucede após a formação do granuloma: se a eliminação do bacilo, a contenção em um estado latente, ou o desenvolvimento da forma ativa. Dentre esses fatores, a atuação das células que compõem o granuloma é fundamental, bem como a resposta inflamatória e os aspectos genéticos da cepa de *M. tuberculosis* envolvida na infecção e do próprio hospedeiro (Rao et al., 2019).

Chowdhury et al. (2018) identificou células NK atuando na manutenção da infecção latente pelo *M. tuberculosis*, de maneira que a porcentagem dessas células é elevada em indivíduos latentemente infectados, e diminuída nos indivíduos com a forma ativa da doença. Os autores também identificaram que nos indivíduos que tinham a doença ativa e que respondiam ao tratamento contra TB, a porcentagem de células NK voltava a ser elevada, ao passo que os não respondedores ao tratamento, mantinham baixos números de células NK.

Corroborando com esses achados, a presença de células expressando granzimas B e perforinas é significativamente mais elevada em indivíduos com TB latente, compatível com o

elevado número de células NK nesses indivíduos, e com o papel efetor dessas células, que atuam controlando a infecção através da ação tóxica nas células infectadas por *M. tuberculosis*, levando-as à morte (Chowdhury et al., 2018).

São muitos os fatores que contribuem para que diferentes desfechos ocorram face a infecção por *M. tuberculosis*, variando da eliminação do bacilo pela imunidade do paciente até o desenvolvimento da forma sintomática da doença. Já outras pessoas são expostas ao bacilo e sequer tornam-se infectadas. Os fatores imunogenéticos individuais de cada hospedeiro estão no centro desses diferentes desfechos, e dentre os componentes que formam o arcabouço genético dos indivíduos, os RNAs reguladores, como miRNAs, podem ser elementos-chave nessa dinâmica, uma vez que atuam regulando diversas vias imunes que fazem parte do combate contra o *M. tuberculosis*. Além disso, variações nos genes que codificam os miRNAs podem determinar diferenças na funcionalidade dessas moléculas, levando a maior ou menor suscetibilidade ao adoecimento por TB, a depender do tipo de miRNA envolvido e do tipo de variante presente.

### **2.3. Citocinas importantes na TB**

A infecção pelo *M. tuberculosis* desencadeia uma resposta imune complexa e coordenada, onde citocinas e quimiocinas assumem papel central como mensageiros entre os componentes do sistema imunológico, organizando o recrutamento celular, a ativação dos macrófagos, a diferenciação de linfócitos e a formação do granuloma. As citocinas e quimiocinas regulam a intensidade, duração e tipo de resposta, sendo decisivo o equilíbrio entre sinais pró-inflamatórios e regulatórios para contenção da micobactéria sem provocar dano pulmonar excessivo. Há evidências de que a deficiência ou disfunção de certas citocinas está associada à incapacidade de controlar a infecção, enquanto o excesso ou desregulação pode levar ao dano tecidual grave (Cooper et al., 2011; Domingo-Gonzalez et al., 2016; Boni et al., 2022).

Diversas citocinas têm sido implicadas nas respostas contra *M. tuberculosis*, entre elas estão os membros da família IL-1, IL-6, IL-12 e TNF, além das citocinas da via Th1, como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), e as citocinas processadas pelo inflamassoma como a interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ) e a interleucina-18 (IL-18), por seus papéis que vão desde a ativação microbicida de macrófagos, regulação e amplificação da inflamação e modulação da resposta adaptativa (Cooper et al., 2011; Hossain; Norazmi, 2013; Domingo-Gonzalez et al., 2016).

Dentre as citocinas mencionadas, a IL-12, que é produzida por macrófagos e células dendríticas se destaca por atuar na diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> no padrão de Th1, contribuindo para a produção de IFN- $\gamma$  e aumento da atividade citotóxica de células NK (Hossain; Norazmi, 2013; Domingo-Gonzalez et al., 2016; Abbas et al., 2023). Ao mesmo tempo, IL-1 $\beta$  e IL-18, após processamento via inflamassoma, contribuem para a ativação de células inatas e adaptativas, intensificando a defesa inicial (Domingo-Gonzalez et al., 2016; Zhang et al., 2021a).

Outra citocina crítica é TNF- $\alpha$  que atua tanto na fase inicial da infecção quanto na contenção do bacilo durante a latência. Produzida principalmente por macrófagos, células dendríticas, monócitos e linfócitos T ativados, o TNF- $\alpha$  atua sinergicamente com IFN- $\gamma$  para ativar a ação microbicida de macrófagos, estimulando a produção de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio, fundamentais para a restrição do crescimento intracelular do bacilo. O TNF- $\alpha$  também modula a permeabilidade endotelial, favorecendo o recrutamento de células efectoras, e regula vias de morte celular (apoptose), e autofagia, o que impacta diretamente o destino do macrófago infectado e a carga bacilar (Hossain; Norazmi, 2013; Sia; Rengarajan, 2019).

Outro papel do TNF- $\alpha$  envolve o remodelamento metabólico de macrófagos para um fenótipo M1, caracterizado por aumento da glicólise aeróbica, produção de lactato e expressão de iNOS, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e quimiocinas, contribuindo para a amplificação da resposta bactericida. Níveis adequados de TNF- $\alpha$  também são necessários para preservar a organização celular do granuloma, controlar inflamação e evitar a disseminação do bacilo, enquanto níveis insuficientes levam à desestruturação do granuloma e a reativação da doença. Evidências também apontam que não apenas a deficiência, mas também o excesso de TNF- $\alpha$  compromete a estabilidade do granuloma pois leva a respostas exacerbadas com produção excessiva de espécies reativas, e desencadeamento de necroptose, culminando com dano tecidual, liberação de bacilos e piora clínica. Isso evidencia a necessidade de uma regulação fina da produção e liberação dessa citocina ao longo de toda a infecção (Yuk et al., 2024).

O equilíbrio dessas respostas é regulado por citocinas regulatórias (muitas vezes descritas como anti-inflamatórias), por exemplo IL-10 e TGF- $\beta$ , que ajudam a evitar dano tecidual excessivo e promovem o controle da inflamação, embora em um contexto de TB prolongada possam favorecer a persistência bacilar (Sasindran; Torrelles, 2011; Yuk et al., 2024).

### 2.3.1. Interferon-gama (IFN- $\gamma$ )

IFN- $\gamma$  é produzido por células Th1, CD8+, células NK e ILCs, estimuladas por IL-12, IL-18 e outros sinais de ativação (Abbas et al., 2023). A combinação de IL-12 com IL-18 ou IL-1 $\beta$  intensifica a produção do IFN- $\gamma$  pelas células T e NK fortalecendo a resposta celular (Tominaga et al., 2000; Yang et al., 2018a).

O IFN- $\gamma$  após se ligar ao seu receptor, que é formado por dois polipeptídeos homólogos (IFN- $\gamma$ R1 e IFN- $\gamma$ R2), há a indução da dimerização destas subunidades, isso leva ao acoplamento das quinases JAK1 e JAK2, que fosforilam STAT1, levando a formação de homodímeros que migram ao núcleo para induzir a transcrição de vários genes importantes que medeiam atividades biológicas desta citocina (Ghanavi et al., 2021; Casanova et al., 2024).

Dentre as atividades induzidas pelo IFN- $\gamma$  estão a ativação dos macrófagos para a destruição de patógenos intracelulares através da acidificação lisossomal e aumento das enzimas lisossomais, a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, a privação de ferro (nutriente vital para *M. tuberculosis*), a execução da apoptose via óxido nítrico/caspase, a ativação da autofagia, e o redirecionamento do metabolismo para glicólise aeróbica via HIF-1 $\alpha$ , tais mecanismos são fundamentais para a limitação da proliferação do bacilo. A importância dessa sinalização é evidenciada pela suscetibilidade observada em indivíduos com defeitos genéticos em IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ R1/IFN- $\gamma$ R2, STAT ou moléculas indutoras como IL-12 (Ghanavi et al., 2021; Casanova et al., 2024).

IFN- $\gamma$  é um dos principais determinantes da capacidade dos macrófagos de conter *M. tuberculosis*, revertendo o bloqueio induzido pela micobactéria e promovendo a fusão fagossomo-lisossomo. Além de ativar intensamente os macrófagos, o IFN- $\gamma$  também estimula células dendríticas a produzirem citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 e diversas quimiocinas que amplificam a resposta imune do hospedeiro ao recrutar novos leucócitos para o sítio infeccioso. Essas células ativadas (macrófagos e DCs) também secretam IL-12, fortalecendo o desenvolvimento de linfócitos Th1 e regulando positivamente a própria produção de IFN- $\gamma$ . (Ghanavi et al., 2021; Shanmuganathan et al., 2022; Abbas et al., 2023; Casanova et al., 2024).

O IFN- $\gamma$  desempenha papel central na indução de uma resposta adaptativa eficiente ao intensificar a apresentação de antígenos e promover a ativação de linfócitos T, sustentando a imunidade celular necessária para o controle de infecções intracelulares. Essa citocina aumenta a expressão de moléculas do MHC classe I e II (HLA), de componentes do processamento

antigênico e moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86) nas células apresentadoras de antígenos. Desse modo, O IFN- $\gamma$  intensifica a ativação tanto de células T CD4<sup>+</sup> quando de CD8<sup>+</sup> aumentando a resposta imune adaptativa. Além disso, as quimiocinas induzidas por IFN- $\gamma$  favorecem o recrutamento de linfócitos T para o local da infecção potencializando os mecanismos efetores mediados por células T (Jaruga et al., 2004; Rakityanskaya et al., 2020; Abbas et al., 2023).

Outra função vital do IFN- $\gamma$  na imunidade contra TB envolve contribuir para a montagem e manutenção do granuloma. O IFN- $\gamma$  mantém a ativação sustentada de macrófagos, aumentando sua capacidade microbicida e preservando a estrutura granulomatosa, a ausência de IFN- $\gamma$  resulta em granulomas pouco efetivos na contenção do bacilo, com necrose e influxo excessivo de neutrófilos, bem como elevadas cargas micobacteriana. IFN- $\gamma$  também atua na indução da produção de indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO-1) e consequentemente inibindo a secreção excessiva de IL-17 prevenindo granulomas neutrofílicos. Ao mesmo tempo IFN- $\gamma$  sustenta o recrutamento de macrófagos e células T contribuindo para a contenção da bactéria, desse modo o IFN- $\gamma$  age como um regulador que organiza e modula a evolução do granuloma (Ramakrishnan, 2012; Cavalcanti et al., 2012; Lyu et al., 2024).

### **2.3.2. Interleucina-6 (IL-6)**

Outra citocina importante na TBP é a IL-6, uma citocina pleiotrópica, ou seja, que é capaz de exercer múltiplas funções distintas dependendo do tipo celular e do contexto inflamatório. Ela se liga ao seu receptor (IL-6R), presente na forma de receptor de membrana, especialmente em hepatócitos e leucócitos, ou na forma solúvel, e recruta a subunidade gp130, iniciando cascatas de sinalização JAK/STAT que resultam em respostas inflamatórias, metabólicas, de fase aguda e até mesmo reparo tecidual. Essa pleiotropia decorre não apenas da ampla variedade de células que produzem ou respondem à IL-6, mas também do fato de que diferentes modos de sinalização que ela desencadeia ativam programas funcionais distintos que podem ser protetores ou prejudiciais a depender do cenário (Schaper; Rose-John, 2015; Murakami et al., 2019).

Várias células produzem IL-6 durante a infecção, como macrófagos alveolares, monócitos, células epiteliais respiratórias, células dendríticas entre outras. Sua secreção pode ser induzida tanto por PAMPs (via TLR e NF- $\kappa$ B) quanto por citocinas como IL-1 e TNF (Schaper; Rose-John, 2015; Abbas et al., 2023). Como a IL-6 pode sinalizar por meio da via clássica (dependente de IL-6R de membrana) ou da trans-sinalização (via IL-6R solúvel), que

desencadeiam programas funcionais distintos, sua ação na TB se mostra ambígua e altamente dependente do contexto (Schaper; Rose-John, 2015). Há relatos de que essa citocina está associada a fenótipos não-cavitários de TB (Domingo-Gonzalez et al., 2016), por outro lado, a elevada concentração circulante desta citocina tem sido associada a maior gravidade da doença e pior prognóstico (Gupte et al., 2022).

A via clássica de sinalização da IL-6 está associada a respostas regulatórias e protetoras, incluindo indução de fase aguda e em alguns relatos, atuando na potencialização da IFN- $\gamma$ , de modo que a ausência de IL-6 pode aumentar a suscetibilidade inicial à TB (Schaper; Rose-John, 2015; Domingo-Gonzalez et al., 2016). Em contraste, a trans-sinalização está ligada à inflamação elevada e à imunopatologia pulmonar, pois amplia o recrutamento de neutrófilos, monócitos, inibe a apoptose de células-T e a diferenciação de células T-reg, e induz a formação de macrófagos permissivos ao bacilo piorando o controle da infecção (Schaper; Rose-John, 2015; Schmok et al., 2017; Ritter et al., 2020). Fato é que o excesso de IL-6 é capaz de inibir a resposta Th1, prejudicando a ação do IFN- $\gamma$ , e favorecendo a sobrevivência do bacilo (Dutta et al., 2012; Schmok et al., 2017).

Uma das principais funções da IL-6 é de induzir proteínas de fase aguda, ativando hepatócitos a produzir mediadores como proteína C reativa, haptoglobina, ferritina, ceruloplasmina entre outros (Schaper; Rose-John, 2015; Choy; Rose-John, 2017). Na TB, esses componentes não apenas refletem a intensidade da inflamação sistêmica, mas participam do metabolismo do ferro como parte da resposta imunometabólica à infecção, evidenciada, por exemplo, pela elevação da ferritina e da ceruloplasmina e redução da ferroportina observadas em TB ativa (Kaushik et al., 2023).

Estudos mostram que proteínas de fase aguda se elevam de forma marcante na TBP ativa e diminuem conforme a inflamação é controlada pelo tratamento (Peresi et al., 2008). Além disso, níveis persistentes altos dessas proteínas associam-se a maior gravidade e pior prognóstico da TB, com maior extensão do acometimento pulmonar e maior probabilidade de falha terapêutica (Unsal et al., 2005; Kumar et al., 2021). Esses achados convergem com evidências de que concentrações basais elevadas de IL-6 constituem um forte indicador de desfecho desfavorável incluindo falha, recidiva e mortalidade (Gupte et al., 2022).

Em síntese a IL-6 exerce um papel amplo na TB, funcionando como mediador para montagem inicial da resposta imune, mas também como potencial amplificador da inflamação e dano tecidual quando sua sinalização se torna excessiva ou desregulada. Seus efeitos que

incluem desde a indução de proteínas de fase aguda até modulação do metabolismo do ferro, a diferenciação de células imunes e a permissividade de macrófagos evidencia que a IL-6 atua como um ponto central entre a imunidade, inflamação e patogênese da TB. Além disso, a sua capacidade de influenciar a imunidade adaptativa modulando o equilíbrio entre respostas Th1 e Th17, interferindo na eficácia de mediadores como o IFN- $\gamma$ , reforça como seu equilíbrio é importante no curso da infecção pelo *M. tuberculosis*.

### 2.3.3. Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Interleucina-1 compreende principalmente a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , citocinas pró-inflamatórias produzidas majoritariamente por monócitos, macrófagos e células dendríticas, e em menor escala por neutrófilos. A IL-1 $\alpha$  tem papel principal como alarmina em danos estéreis, enquanto a IL-1 $\beta$  é classicamente induzida por infecções após o reconhecimento de PAMPs microbianos por PRRs (TLRs) e ativação de NF- $\kappa$ B, resultando na síntese do precursor pró-IL-1 $\beta$ , que requer processamento proteolítico para maturação. A IL-1 sinaliza através do receptor IL-1R1, que utiliza o adaptador MyD88, desencadeando vias pró-inflamatórias (por exemplo NF- $\kappa$ B e MAPK) amplificando respostas imunológicas locais e sistêmicas (Lopez-Castejon; Brough, 2011; Domingo-Gonzales et al., 2016).

A geração de IL-1 $\beta$  funcional envolve duas etapas, o priming via TLR/MyD88 que leva a transcrição de *IL-1B* e produção da pró-IL-1 $\beta$  e posteriormente a clivagem dessa pró citocina em sua forma ativa (IL-1 $\beta$ ). Este processamento ocorre principalmente via inflamassoma NLRP3 (Lopez-Castejon; Brough, 2011). Este inflamassoma pode ser ativado por múltiplos sinais, como dano lisossomal mediado por ESX-1/ESAT-6, elevação das espécies reativas de oxigênio mitocondrial, queda de potássio intracelular e a presença de DNA citosólico. Após a montagem do complexo multimérico NLRP3, que inclui a proteína adaptadora ASC, ocorre a produção proteolítica da caspase 1 ativa, que por sua vez processa pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em IL-1 $\beta$  e IL-18 ativas (Lopez-Castejon; Brough, 2011; Jo et al., 2016; Jung et al., 2021).

Embora o NLRP3 seja importante, alguns estudos indicam que rotas alternativas também podem atuar na produção da IL-1 $\beta$  ativa, incluindo a caspase 8, serinoproteases e granzimas (Krishnan et al., 2013; Domingo-Gonzalez et al., 2016; Llibre et al., 2022). Além disso, vias de secreção não convencionais como a piroptose também podem ocorrer. A escolha entre liberação vesicular ou piroptótica depende da intensidade e do tipo de estímulo, em certas condições a célula pode secretar IL-1 $\beta$  sem morte, enquanto estímulos intensos, decorrente de elevada carga infecciosa, promovem liberação explosiva associada a poros na membrana e

agravamento da inflamação (Lopez-Castejon; Brough, 2011; Semino et al., 2018; Silverio et al., 2021). As diferentes cepas de *M. tuberculosis* também influenciam no tipo de resposta mediada por IL-1 $\beta$ , por exemplo, alguns isolados são capazes de induzir a autofagia dependente de IL-1 $\beta$ , mas escapam do processo de degradação autofágica, mantendo sua sobrevivência e replicação intracelular (Romagnoli et al., 2018).

Na TB, a IL-1 exerce papel protetor fundamental, pois modelos genéticos mostram que a ausência dessa citocina, ou do receptor IL-1R1, ou de MyD88 leva a alta suscetibilidade, carga bacilar aumentada, inflamação desorganizada e necrose pulmonar. Um mecanismo protetor importante envolvendo a IL-1 $\beta$  inclui a estimulação da prostaglandina E2, que por sua vez atua limitando efeitos patogênicos de interferons tipo I e permite o recrutamento excessivo de macrófagos permissivos. IL-1 também participa da coordenação do recrutamento celular (por exemplo recrutando monócitos e células T que participam do granuloma), e da indução de respostas Th17 (Domingo-Gonzalez et al., 2016; Silverio et al., 2021). Outro mecanismo protetor induzido por IL-1 $\beta$  é a indução da autofagia que restringe a replicação do bacilo no interior de macrófagos (Romagnoli et al., 2018).

Contudo, IL-1 quando encontrada em níveis excessivos ou desregulada, contribuem para imunopatologia na TB. A inflamação intensa mediada por esta citocina favorece infiltração neutrofílica, necrose caseosa e cavitação pulmonar, que leva a piora clínica e maior transmissibilidade da doença, ou seja, os sinais que promovem controle inicial da doença, organizando a resposta imunológica e o recrutamento celular, podem, quando exagerados ou prolongados, causar dano ao tecido pulmonar (Domingo-Gonzalez et al., 2016; Romagnoli et al., 2018; Silverio et al., 2021).

A própria bactéria é capaz de modular a atuação da IL-1 $\beta$  por múltiplos mecanismos. Fatores de virulência micobacteriano como ESX-1/ESAT-6 promovem efluxo de K<sup>+</sup> e sinais que ativam o inflamassoma, mas também induzem vias que aumentam interferons tipo I, o qual suprime IL-1 $\beta$  por mecanismos regulatórios. Alguns genes bacterianos como o ZMP1 e miRNAs induzidos pelo *M. tuberculosis* também podem inibir a ativação do inflamassoma (Silverio et al., 2021), além disso, o hospedeiro contribui com mediadores como SAA3 que em resposta a ESAT-6, amplificam a ativação do inflamassoma e a produção de IL-1 $\beta$  (Jung et al., 2021). Esses mecanismos sobrepostos e por vezes antagônicos mostram a natureza complexa da interação entre hospedeiro e o *M. tuberculosis*.

#### 2.3.4. Interleucina-18 (IL-18)

A IL-18 é uma citocina da família IL-1 cujo papel clássico é funcionar como um potente indutor de IFN- $\gamma$ , participando da polarização da resposta Th1 e da ativação de células NK e T citotóxicas. Essa citocina é um importante mediador pró-inflamatório que amplia a imunidade contra patógenos intracelulares, como é o caso do *M. tuberculosis*, onde propicia a ativação de macrófagos e a organização do granuloma (Sugawara et al., 1999; Akira, 2000; Vecchié et al., 2020).

A produção de IL-18 exige processamento intracelular onde a pró-IL-18 precisa ser clivada por caspase-1 (ativada pelo inflamassoma) para formar a molécula madura ativa que será secretada. Este precursor por sua vez tem sua transcrição aumentada durante a infecção e ativação de TLR e do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Após a produção da IL-18 ativa ela se liga a seu receptor (IL-18R) levando à sinalização intracelular que culmina com a transcrição de genes pró-inflamatórios (Vecchié et al., 2020).

A produção da IL-18 madura na TB é consistentemente atribuída ao NLRP3, cuja ativação depende de sinais celulares como efluxo de potássio, dano lisossomal e estresse mitocondrial. Além do NLRP3, destaca-se também outras vias como o inflamassoma AIM2, que reconhece DNA micobacteriano no citosol após a permeabilização do fagossomo mediada por fatores de virulência como ESX-1, resultando também em ativação de caspase-1 e liberação de IL-18. É importante notar que vias não-canônicas independentes de caspases-1 também podem contribuir com a maturação da IL-18 (Saiga et al., 2012; He et al., 2016; Kaplanski, 2018; Feng et al., 2022).

Uma grande variedade de células são produtoras de IL-18 como monócitos, macrófagos, células endoteliais, células dendríticas e células de Kupffer, dentre outras (Akira, 2000; Domingo-Gonzalez et al., 2016). Macrófagos humanos e de modelo murino infectados com *M. tuberculosis* aumentam significativamente a transcrição e a liberação de IL-18, refletindo a ativação inflamatória induzida pela infecção intracelular (Sugawara et al., 1999; Song et al., 2002). Além disso, as células produtoras de IL-18 apresentam a pró-IL-18 constitutivamente no citosol, o qual é rapidamente processado e convertido na forma ativa após estímulo micobacteriano, servindo como uma rápida fonte celular da citocina frente a infecção recém-instalada (Domingo-Gonzalez et al., 2016).

Em nível celular, a IL-18 atua principalmente sobre linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como sobre células NK e macrófagos. Sua ação mais relevante na infecção pelo *M. tuberculosis*

consiste em induzir e amplificar a produção de IFN- $\gamma$ , especialmente em cooperação com IL-12, promovendo a ativação clássica de macrófagos, o aumento de mediadores microbicidas, como óxido nítrico, e a expressão de genes efetores associados ao controle do bacilo, bem como quimiocinas e moléculas de adesão celular (Kaplanski, 2018; Vecchié et al., 2020). Esse eixo entre IL-18 e IFN- $\gamma$  é determinante para a formação de granulomas organizados e para a restrição da replicação intracelular do bacilo, constituindo um mecanismo fundamental da imunidade protetora contra a TB (Sugawara et al., 1999; Schneider et al., 2010).

Alguns dados experimentais confirmam a importância da IL-18 na TB. Camundongos deficientes dessa citocina apresentam redução significativa da produção de IFN- $\gamma$ , bem como a formação de granulomas desorganizados, elevada carga bacilar e maior mortalidade (Sugawara et al., 1999; Schneider et al., 2010). De forma complementar, a administração exógena de IL-18 em modelos murinos reduz o número de bacilos viáveis e restabelece a arquitetura granulomatosa, indicando um efeito restaurador da resposta imunológica (Sugawara et al., 1999). Em humanos, uma meta-análise mostrou concentrações séricas elevadas da IL-18 em indivíduos com TB ativa. Conjuntamente esses achados indicam que a IL-18 é indispensável para uma imunidade eficiente contra *M. tuberculosis* (Song et al., 2002; Zhang et al., 2021a).

Entre os aspectos potencialmente negativos, a produção excessiva ou desregulação da via IL-18 pode amplificar a inflamação e contribuir para dano tecidual, incluindo necrose e desorganização granulomatosa, além de favorecer o recrutamento exacerbado de neutrófilos quando a resposta imune fica desequilibrada (Schneider et al., 2010; Kaplanski, 2018). A modulação exercida pelo bacilo também influencia esse cenário, pois *M. tuberculosis* é capaz de atenuar a ativação do inflamassoma e, conseqüentemente, o processamento de IL-18, reduzindo a disponibilidade da citocina funcional, enfraquecendo a resposta Th1 (Feng et al., 2022). Dessa forma, IL-18 atua como componente protetor quando adequadamente regulada, mas sua relação com o patógeno no curso da infecção pode determinar se seus efeitos serão benéficos ou patogênicos.

#### **2.4. Variantes de base única (SNVs) em genes imunológicos associados à TB**

A suscetibilidade à TB é fortemente influenciada por fatores genéticos do hospedeiro, como é o caso dos SNVs em genes envolvidos na imunidade inata e adaptativa. Esses SNVs, além de em alguns casos determinar maior suscetibilidade ao desenvolvimento da TB, podem também modular a probabilidade da progressão da infecção latente para a doença ativa, bem como a gravidade clínica, a organização da resposta inflamatória e a capacidade de resposta ao

tratamento farmacoterapêutico. Variantes genéticas podem alterar a intensidade e a qualidade da resposta imune frente ao *M. tuberculosis*, interferindo em processos-chave como reconhecimento do patógeno, ativação dos macrófagos e produção de citocinas (Azad et al., 2012; Bukhari et al., 2015; Schurz et al., 2015; Barliana et al., 2023; Wodelo et al., 2024).

Diversos tipos de SNVs têm sido implicados nesse processo. Variantes em receptores de reconhecimento de padrão como TLRs podem modificar a ligação a componentes micobacteriano e a ativação de vias de sinalização intracelular, afetando a indução de fatores de transcrição e a produção das citocinas necessárias para a polarização da resposta Th1. SNVs em genes de citocinas e seus receptores como a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-18 dentre outras, influenciam diretamente o balanço entre a inflamação protetora e a patológica, determinando se a resposta será eficaz no controle bacilar ou mesmo associada ao prejuízo funcional. Além disso, variantes em genes efetores como *NOS2* (iNOS), podem alterar a produção de óxido nítrico comprometendo a capacidade de macrófagos em conter a replicação intracelular do bacilo em seu interior (Azad et al., 2012; Schurz et al., 2015; Wodelo et al., 2024).

Os efeitos dessas variantes podem mudar entre as populações refletindo as particularidades genéticas de cada grupo, como as diferentes frequências alélicas, as estruturas de haplótipos e os padrões de desequilíbrio de ligação. Fatores evolutivos, como pressões seletivas exercidas pela TB em determinadas regiões, contribuem para a manutenção ou a eliminação de variantes específicas ao longo do tempo. Além disso, aspectos ambientais e epidemiológicos, que inclui coinfeções, estado nutricional, exposição prévia ao bacilo e diversidade genética das cepas circulantes interagem com o arcabouço genético do hospedeiro, modulando o impacto funcional dos SNVs. Assim, o envolvimento de aspectos genéticos na TB é complexo, dependente do contexto populacional e caracterizada por múltiplas variantes que muitas vezes apresenta somente um efeito modesto, mas que podem atuar de forma integrada em redes imunológicas (Azad et al., 2012; Schurz et al., 2015).

Dentre os principais genes estudados quanto ao papel das variantes genéticas na TB, estão os *TLRs*. O TLR1, por exemplo, tem sido amplamente estudado e os resultados obtidos demonstram associações que variam de acordo com a população analisada e o modelo do estudo. Por exemplo o genótipo T/T da variante rs5743618 foi associado com risco para TB em indivíduos hispânicos e afro-americanos, mas não teve qualquer associação com TB entre caucasianos (Ma et al., 2007). Em outro estudo com indivíduos caucasianos europeus foi identificado a associação do alelo C e do genótipo C/C com risco para TBP (Ocejo-Vinyals et

al., 2013). Em contraste, um estudo realizado com indivíduos recrutados no Amazonas (Brasil), demonstrou que tanto o alelo C quanto o genótipo C/C de rs5743618 foram associados com proteção contra TBP (Rodrigues et al., 2025). Estes achados evidenciam como os resultados de um mesmo SNV podem variar entre diferentes grupos populacionais, além de demonstrar a influência de aspectos metodológicos, como o tamanho amostral e as características da coorte, nas análises de associação genética.

São muitos os estudos envolvendo variantes em genes de TLR e a TB, algumas revisões-sistemáticas e meta-análises são realizadas periodicamente com o intuito de consolidar aquelas variantes que realmente apresentam significado estatístico importante, como os trabalhos realizados por Zhang et al. (2013), Schurz et al. (2015), Zhou e Zhang (2020) e Varshney et al. (2022). Estes estudos demonstram que o efeito associativo das variantes de TLR depende fortemente do contexto populacional onde o estudo foi desenvolvido, podendo uma mesma variante apresentar efeitos distintos em diferentes grupos étnicos.

Outros exemplos de SNVs em genes de TLR que apresentaram associações estatisticamente significativas incluem o rs4833095 em *TLR1*, em que o genótipo heterozigoto A/G, bem como o modelo dominante (A/A+A/G) foram associados com efeito protetor contra a TB. O SNV rs5743708 de *TLR2* apresentou associações dependentes do contexto populacional, sendo o alelo A, o genótipo heterozigoto A/G e o modelo dominante (A/A+A/G) associados a maior risco de TB no subgrupo asiático, enquanto no subgrupo hispânico a associação identificada foi com proteção. De forma semelhante, o rs4986791 de *TLR4* apresentou associação do alelo T, do genótipo heterozigoto T/C, e do modelo dominante (T/T+T/C) com risco aumentado para TB em indivíduos asiáticos (Schurz et al., 2015).

Embora os TLRs sejam os PRRs mais amplamente estudados na TB, outros receptores também têm sido investigados, como é o caso do receptor de manose (MR), que desempenha papel fundamental na fagocitose do bacilo por macrófagos. Nesse contexto, o SNV rs34039386 foi associado à TB, sendo o genótipo heterozigoto (A/G), bem como o modelo dominante (A/A+A/G) associados à proteção em uma população recrutada na China (Zhang et al., 2012a).

Outro receptor estudado é o DECTIN-1, uma molécula transmembrana que também reconhece e induz a internalização do bacilo da TB por macrófagos e células dendríticas. O alelo C e o genótipo heterozigoto C/A do SNV rs16910526 do gene *CLEC7A* foram associados com o maior risco de desenvolvimento de TB em população recrutada na Argentina. Além disso,

os portadores desse alelo possuem menor expressão do receptor e menor produção de espécies reativas de oxigênio, o que prejudica no combate ao *M. tuberculosis* (Cufré et al., 2024).

Além desses receptores, a MBL, um receptor solúvel codificado pelo gene *MBL2* e sintetizado pelo fígado, tem suas variantes amplamente investigadas. A MBL é capaz de reconhecer carboidratos da superfície de *M. tuberculosis* favorecendo a fagocitose e a ativação do sistema complemento. Segundo a meta-análise realizada por Mandal et al. (2019) o genótipo homozigoto (A/A versus C/C) de rs1800451 está associado a menor risco de TBP, enquanto o alelo D (D versus A) da variante rs5030737 está associada ao maior risco de desenvolvimento da TBP (Mandal et al., 2019).

Variantes genéticas em componentes do inflamassoma também têm sido estudadas no contexto da TB. Em um estudo com macrófagos derivados de monócitos oriundos de indivíduos da Suécia, os portadores de variantes que induzem ganho de função de NLRP3 (*M299V* ou *Q705K*) em combinação com a variante *C10X* em CARD8, que introduz um códon de parada prematuro, apresentaram maior capacidade de restringir a multiplicação intracelular de *M. tuberculosis*. Esse efeito foi associado a maior produção de IL-1 $\beta$  e maior eficiência da fusão fagolisossomal, quando comparado a indivíduos sem essas variantes gênicas (Eklund et al., 2014).

Em outro estudo, a variante de ganho de função rs10754558 de *NLRP3*, que atua na estabilização do mRNA desse gene, apresentou o genótipo G/G associado com proteção contra TBP em indivíduos recrutados no Amazonas (Brasil) (Souza de Lima et al., 2016). Por sua vez, em um estudo realizado com indivíduos da Etiópia, a variante rs35829419 (*Q705K*) de *NLRP3* foi associada ao pior prognóstico clínico, sendo o genótipo heterozigoto (C/A) relacionado a desfechos desfavoráveis durante o tratamento, embora sem associação direta com suscetibilidade ao desenvolvimento da doença (Abate et al., 2019).

Assim como em *NLRP3*, variantes genéticas em outros componentes do inflamassoma, como *AIM2*, também tem sido investigadas. Em estudo realizado com outra população recrutada no Amazonas (Brasil), o genótipo C/C da variante rs1103577 foi associado com maiores concentrações da citocina IL-1 $\beta$ , por outro, lado o modelo dominante (T/C+T/T) foi associado com menor risco de TB na população estudada. Em conjunto, esses achados reforçam a importância do eixo do inflamassoma na regulação imunológica e no controle da infecção pelo *M. tuberculosis* (Figueira et al., 2021).

Além dos receptores e sensores imunológicos, moléculas envolvidas nas vias de sinalização intracelular também podem abrigar SNVs relevantes para a suscetibilidade à TB e para os desfechos clínicos da doença. Nesse contexto, as variantes rs78872571 e rs4647992, no gene *NFKB1* que codifica a subunidade p50 do NF-κB, foram associadas a maior risco de hepatotoxicidade induzida por drogas antituberculose (Zhang et al., 2019). Além disso, foi demonstrado em um estudo que interações envolvendo o rs230487 em *NFKB1*, em combinação com variantes em outros genes inflamatórios, aumentam significativamente o risco de TB (Leu et al., 2017). Esses achados reforçam a importância do NF-κB como regulador central da resposta inflamatória na tuberculose, cuja modulação genética pode influenciar tanto a suscetibilidade à infecção quanto a resposta ao tratamento.

Quanto as citocinas, estudos indicam que variantes genéticas nos genes que as codificam estão envolvidas com o desenvolvimento, a progressão e o desfecho da doença. Uma das citocinas mais estudadas neste contexto é o IFN-γ. A variante +874 A>T (rs2430561) tem sido a mais investigada, uma meta análise identificou a associação do alelo T, bem como dos genótipos homozigoto (T/T), heterozigoto (A/T), e do perfil dominante (T/T+A/T *versus* A/A), e recessivo (T/T *versus* A/A+A/T) com a diminuição do risco de TBP. Entretanto, na análise por subgrupos, a redução do risco foi observada entre os caucasianos, mas entre os asiáticos, nenhum efeito foi observado (Areeshi et al., 2019).

O Efeito associativo da variante rs2430561 ocorre em razão da troca de nucleotídeos proporcionar o bloqueio do sítio de ligação do fator de transcrição NF-κB, o que afeta a produção do IFN-γ. O genótipo A/A está relacionado com a menor produção da citocina prejudicando a resposta contra o *M. tuberculosis* (Priyanka et al., 2021).

Em relação a IL-6, um estudo conduzido na China identificou que o genótipo heterozigoto (G/A) da variante rs2069837 do gene *IL6* foi associado com proteção contra o desenvolvimento da TBP ativa a partir de um quadro de infecção latente pelo *M. tuberculosis*, evidenciando o papel das variantes genéticas na progressão da doença (Wu et al., 2018). Outra variante de IL-6, rs1800796 localizada na região promotora do gene da citocina, está associada com a suscetibilidade à TB. No estudo, os autores detectaram que o genótipo G/G foi associado a um menor risco de desenvolvimento da doença, além disso, monócitos isolados de indivíduos portadores desse genótipo, apresentaram uma produção reduzida de IL-6. Esse achado sugere que para um melhor controle e desfecho clínico da doença, concentrações elevadas de citocinas inflamatórias, como a IL-6, não são necessariamente benéficas, pois uma produção mais

controlada e menos exacerbada dessa citocina pode resultar em menor estímulo inflamatório, contribuindo para limitação do dano tecidual, e até mesmo para um perfil mais protetor da resposta imune (Zhang et al., 2012b).

Na citocina TNF- $\alpha$ , a variante -308G/A do gene *TNFA* é uma das mais estudadas quanto a sua associação com a TB. Em um estudo conduzido no Pará (Brasil), foi identificado que os portadores do alelo A tem maior probabilidade de desenvolver formas disseminadas (extrapulmonares) de tuberculose, porém não foi identificada associação com a forma pulmonar da doença (Sousa et al., 2023). Por outro lado, outros estudos realizados identificaram que essa variante está associada com a TBP, onde o modelo dominante (G/G+G/A) foi ligado à proteção contra a doença em uma análise geral, e especificamente no subgrupo de pacientes africanos (Yi et al., 2015). Esses achados evidenciam a influência do contexto populacional e reforçam a importância de estudos conduzidos em diferentes grupos étnicos.

No gene *IL1B*, que codifica a citocina IL-1 $\beta$ , a variante rs1143643, localizada em uma região intrônica, foi investigada em diferentes populações. Em um estudo conduzido na Uganda, verificou-se que o modelo dominante deste SNV foi associado com maior risco de desenvolvimento da TBP (Hall et al., 2015). Entretanto este mesmo SNV não apresentou associação significativa com TB entre indivíduos de etnia tibetana (Wang et al., 2018). Em contraste, neste mesmo estudo de Wang et al. (2018), uma outra variante intrônica em *IL1B*, rs1143623, teve o alelo G associado com maior risco de TB. Esse conjunto de achados demonstra que variantes localizadas em regiões não-codificantes também podem influenciar a suscetibilidade a doenças, uma vez que tais regiões podem abrigar elementos reguladores (como miRNAs), podem ser relevantes para a estabilidade do mRNA, ou mesmo interferir no processo de *splicing* (Joynt et al., 2020).

Quanto às variantes na IL-18 (outra citocina que ao lado da IL-1 $\beta$  é processada por NLRP3), o modelo dominante (C/G+C/C) da variante intrônica rs187238 foi associada com efeito protetor contra TB em indivíduos recrutados no norte da Índia. Além disso, os indivíduos homozigotos C/C possuíam uma concentração plasmática de IL-18 maior em comparação aos portadores do alelo G, evidenciando o papel regulador dos SNVs na produção de citocinas e, consequentemente na capacidade de combater o patógeno (Gupta et al., 2025).

Os genes de diversos componentes imunológicos envolvidos direta ou indiretamente na resposta contra a TB podem abrigar variantes genéticas associadas à suscetibilidade à doença. As variantes no gene *NOS2A* que codifica a enzima óxido nítrico sintase induzida,

demonstraram suscetibilidade com TB em indivíduos recrutados na Índia. O alelo A e o genótipo A/A de rs8078340, bem como o alelo T de rs2274894, ambos localizados em *NOS2A* estão associados com maior risco de desenvolvimento da doença, além disso, os pacientes portadores do genótipo A/A da variante rs8078340 apresentaram maior produção de óxido nítrico (Pandey et al., 2025).

Diversas outras variantes em genes que codificam proteínas envolvidas na resposta imune também têm sido associadas à suscetibilidade à TB. Entre elas podemos citar variantes em P2X7, um canal iônico que contribui para a ativação do inflamassoma NLRP3; em *SLC11A1*, uma proteína transportadora de cátions divalente e que contribui para a resistência contra patógenos intracelulares; e em genes de quimiocinas, que desempenham papel central no recrutamento de células inflamatórias para o sítio de infecção (Azad et al., 2012). Além desses exemplos, variantes em genes de miRNAs, que regulam diversos mecanismos da imunidade inata e adaptativa, também têm sido descritas como moduladoras da suscetibilidade à TB. Essas variantes, no entanto, serão discutidas de forma mais aprofundada na sessão seguinte, dedicada especificamente ao papel dos miRNAs na TB.

## **2.5. MicroRNAs na TB**

Dentre as estratégias utilizadas pelo *M. tuberculosis* para colonizar e invadir os tecidos do hospedeiro e persistir na infecção, mesmo diante do microambiente hostil de fagócitos, destaca-se a capacidade do patógeno de induzir ou inibir certas moléculas reguladoras do hospedeiro, tais como miRNAs. Esses pequenos RNAs não codificantes participam ativamente no controle e regulação de inúmeros processos biológicos, como a proliferação celular, autofagia, apoptose, processos inflamatórios e a manutenção da homeostase. Eles exercem essas funções por meio do silenciamento de genes em nível pós-transcricional, tendo como alvo moléculas de RNA mensageiro, o que permite que o bacilo interfira na resposta imunológica do hospedeiro (Davuluri; Chauhan, 2022).

A partir da interação entre *M. tuberculosis* e a célula hospedeira, o bacilo desencadeia mudanças no ambiente celular por meio de estratégias epigenéticas, incluindo metilação do DNA e modificações de histonas, como acetilação, desacetilação, fosforilação e ubiquitinação. Esses processos resultam em mudanças na organização da cromatina, modulando a expressão gênica do hospedeiro, incluindo os genes de miRNAs. Além disso, diante da infecção pelo *M. tuberculosis* ocorre a ativação de diversos fatores de transcrição que atuam sobre regiões

promotoras e reguladoras do genoma, incluindo os *loci* de miRNAs, promovendo ou reprimindo a expressão dessas moléculas (Qin et al., 2021; Looney et al., 2021; Abbasnia et al., 2024).

Os miRNA são sequências curtas, de 19 a 25 nucleotídeos, que se ligam a sequências de mRNA de maneira complementar e então regulam a expressão de proteínas, sendo centrais no controle de uma série de vias biológicas de sinalização. Os miRNAs atuam principalmente silenciando genes através da inibição da tradução (Watson et al., 2015; Machowska et al., 2022).

Após a transcrição dos genes de miRNA pelas RNA polimerase II/III, o transcrito resultante (miRNA primário ou pri-miRNA) passa pelo processo de biogênese. Inicialmente, no núcleo celular, o pri-miRNA é clivado pelo complexo microprocessador composto pela RNase III DROSHA, liberando uma estrutura secundária em forma de haste-alça (grampo) conhecida como pré-miRNA. Em seguida, após sua exportação para o citoplasma, o pré-miRNA sofre uma clivagem na região alça-terminal pela RNase III Dicer, gerando o miRNA dupla-fita (duplex). Esse duplex é incorporado ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC), onde ocorre a separação das fitas, sendo que a fita guia é mantida no complexo. O RISC, guiado pelo miRNA maduro, reconhece mRNAs alvo específicos, promovendo a repressão da tradução e/ou degradação desses transcritos (Watson et al., 2015; Machowska et al., 2022).

A modulação na expressão de miRNAs a partir da interação entre *M. tuberculosis* e células imunológicas do hospedeiro tem sido evidenciada nos últimos anos, com a identificação de miRNAs que estão expressos em quantidades distintas em indivíduos com TB ativa, em comparação com indivíduos saudáveis, ou indivíduos com infecção latente. Além de serem identificados miRNAs que atuam de maneira importante nas redes de regulação e virulência do bacilo da TB, favorecendo a sobrevivência do patógeno e causando efeitos prejudiciais ao hospedeiro (Davuluri; Chauhan, 2022; Wang et al., 2022).

Uma vez que a infecção por *M. tuberculosis* desencadeia uma resposta inflamatória intensa com o objetivo de eliminar o patógeno, um dos principais grupos de miRNAs cuja expressão se encontra alterada durante a interação entre o hospedeiro e a micobactéria compreende aqueles envolvidos na regulação de processos inflamatórios. MiRNAs previamente descritos na literatura como moduladores da inflamação foram detectados em níveis elevados no soro de pacientes com TBP quando comparados com indivíduos saudáveis (Chakrabarty et al., 2019). Além da inflamação, modelos experimentais baseados na infecção

de camundongos com cepas de *M. tuberculosis* induziram a expressão de miRNAs que modulam a autofagia, o que favorece a sobrevivência intracelular do bacilo (Liu et al., 2018).

Um dos exemplos de miRNA que atua direcionando processos biológicos que podem ser favoráveis à persistência da infecção por *M. tuberculosis* é o miR-21-5p, que é capaz de inibir respostas inflamatórias mediadas por TLR, regula a apoptose, e se encontra superexpresso em face da infecção por *M. tuberculosis*. (Sinigaglia et al., 2020).

Em um estudo conduzido com monócitos humanos transfectados com este miRNA ou com um oligonucleotídeo controle, posteriormente infectados com a cepa H37Ra do bacilo e estimulados com ligante de TLR2/TLR1, observou-se que a viabilidade de *M. tuberculosis* foi significativamente maior nas células que superexpressavam o miR-21-5p, em comparação aos controles, possivelmente por este miRNA comprometer a atividade antimicrobiana induzida por TLR2/TLR1 favorecendo a sobrevivência intracelular do patógeno (Liu et al., 2012).

Outro estudo conduzido em macrófagos murinos, bem como em monócitos e células dendríticas derivadas da medula óssea e geradas *in vitro*, demonstrou que o miR-21 está aumentado em um contexto de estimulação com BCG, sendo a sua expressão regulada por vias dependentes de TLRs e de NF- $\kappa$ B. Nesse contexto, o miR-21 exerce um efeito imunomodulador negativo ao reduzir a resposta mediada por células T, especialmente a resposta Th1, por meio da ligação direta ao mRNA de IL-12p35, levando a diminuição da produção de IL-12, o que causa prejuízo na ativação de células Th1 e redução da produção de citocinas importantes como o IFN- $\gamma$ . Além disso, o miR-21 é capaz de promover a apoptose de células dendríticas ao ter como alvo também o gene Bcl-2, comprometendo a sobrevivência dessas APCs, o que prejudica também a apresentação de antígenos e a montagem de uma resposta Th1 eficaz (Wu et al., 2012).

Assim como observado por Wu et al. (2012), outro estudo conduzido em macrófagos humanos e murinos infectados com *M. tuberculosis* demonstrou que a infecção induz o miR-21-5p, e que essa modulação promove a sobrevivência do bacilo no interior dos fagócitos. Essa permissividade ao patógeno ocorre através da redução da viabilidade celular dos macrófagos, associada à redução da produção de citocinas como IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Esses efeitos ocorrem, ao menos em parte, pois o miR-21-5p tem os genes Bcl-2 e o *TLR4* como alvos, reprimindo a tradução de suas proteínas efectoras (Zhao et al., 2019).

Outro estudo corrobora com esses achados. Yang et al. (2021) demonstraram em um modelo murino que a disbiose intestinal leva a uma maior produção de miR-21 tanto nos pulmões quanto no intestino, e esse aumento causa uma redução na produção de IFN- $\gamma$  durante a infecção por *M. tuberculosis*. A administração sistêmica de um antagonista de miR-21 foi capaz de restaurar os níveis de IFN- $\gamma$  nos animais. Além disso, os autores identificaram que o miR-21 é capaz de se ligar diretamente ao *IFNG* promovendo a repressão pós-transcricional desse gene e gerando prejuízo na resposta anti-TB.

Um outro miRNA que tem sido bastante estudado na TB é o miR-155-5p, o qual também é induzido na infecção pelo *M. tuberculosis*. Em um estudo como modelo murino, foi demonstrado que o miR-155 é fortemente induzido em macrófagos após infecção pelo *M. tuberculosis*, sendo ativado precocemente durante a infecção. Este miRNA atua na imunidade inata promovendo a sobrevivência de macrófagos infectados por meio da modulação do eixo SHIP1-Akt, reduzindo a apoptose e favorecendo a replicação bacteriana. Em contraste, no contexto da imunidade adaptativa, o miR-155 exerce um papel protetor ao sustentar a sobrevivência, a expansão e função efetora de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicas para *M. tuberculosis*, sendo importante para a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Corroborando com esses achados, camundongos miR-155 <sup>-/-</sup> apresentaram melhor controle da carga micobacteriana de forma precoce, mas pior controle na fase crônica da infecção, o que pode ser revertido com a transferência de células T wild-type (Rothchild et al., 2016).

Assim, o miR-155 tem papel dual, sendo essencial para a resposta adaptativa protetora na fase crônica da TB, mas permissivo à replicação do bacilo nas células inatas especialmente nas fases iniciais da infecção onde o papel dos macrófagos é crítico (Sinigaglia et al., 2020).

Outro mecanismo explorado pelo *M. tuberculosis* para favorecer sua sobrevivência, no contexto das ações do miR-155, é a redução da formação de autofagossomos. Em um estudo realizado em células dendríticas humanas, foi demonstrado que a infecção por *M. tuberculosis* induz a expressão desse miRNA. Os autores mostraram que o miR-155 reprime pós-transcricionalmente o gene *ATG3*, que codifica uma enzima importante para o início do processo autofágico, essa repressão diminui a formação de autofagossomos. Essa interferência compromete a maturação do compartimento fagossomal/autofágico em células dendríticas, configurando um mecanismo de evasão imune que favorece a sobrevivência intracelular do bacilo, uma vez que a autofagia constitui um importante mecanismo celular de controle da micobactéria (Etna et al., 2018).

É interessante notar que enquanto o miR-155 atua inibindo a apoptose via repressão de *SHIP-1*, mantendo o nicho intracelular necessário para a replicação do bacilo, o miR-21 atua promovendo apoptose por meio da inibição de *Bcl-2*. Embora esses dois miRNAs sejam positivamente modulados pelo *M. tuberculosis* e induzam respostas antagônicas à primeira vista, é importante destacar que esses mecanismos são muito dependentes do contexto, incluindo fatores como a carga bacilar, as vias moleculares diferentes em que atuam, e o momento da infecção. No caso de miR-155, por exemplo, o efeito benéfico da apoptose impedida ocorre nos momentos iniciais da infecção garantindo a sobrevivência do macrófago infectado e a proliferação imediata do bacilo, ao passo que o miR-21 atua de forma mais proeminente no contexto das APCs, incluindo não apenas macrófagos, mas também células dendríticas, comprometendo a ativação de células T naïve e reprimindo a inflamação necessária ao combate da infecção pelo *M. tuberculosis*.

A infecção pelo *M. tuberculosis* não apenas induz a expressão aumentada de miRNAs, ele pode também reduzir a expressão, é o caso do miR-26a, que teve a diminuição de sua expressão detectada em alguns estudos envolvendo pacientes com TB, em relação ao grupo controle. Por exemplo, Kleinstein et al. (2013) identificou em seu estudo a expressão reduzida deste miRNA em linfócitos T CD4+, bem como na circulação sanguínea de pacientes com TB em comparação com pacientes com a infecção latente e com contatos saudáveis.

Este mesmo miRNA foi detectado com a expressão reduzida em diferentes modelos de infecção por *M. tuberculosis*, como em culturas de células RAW264.7, de macrófagos derivados da medula óssea murina e de macrófagos derivados de monócitos humanos (Sahu et al., 2017). Os autores também identificaram que o fator de transcrição KLF4 é um alvo do miR-26a, e que durante a infecção por *M. tuberculosis*, a diminuição dos níveis de miR-26a permite a regulação positiva do KLF4, que por sua vez, favorece o aumento da arginase-1 e a diminuição da atividade da Óxido Nítrico Sintetase induzida (iNOS). Além disso, foi demonstrado que o aumento do fator KLF4 impede o transporte do bacilo para os lisossomos favorecendo a sobrevivência do *M. tuberculosis*.

Por outro lado, um trabalho realizado por Ni et al. (2014) identificou que o miR-26a bem como o miR-132 têm suas expressões aumentadas durante a infecção por *M. tuberculosis* em macrófagos humanos primários, além disso, esse indução reduz a expressão da proteína p300, o que ocasiona a redução da transcrição de genes induzidos por IFN- $\gamma$  e a capacidade de resposta dos macrófagos à infecção.

Nos exemplos citados, nota-se diferenças marcantes nos resultados obtidos. Enquanto alguns autores relatam a diminuição do miR-26a, outro autor aponta para sua indução em resposta à infecção pelo *M. tuberculosis*. Essas discrepâncias podem ocorrer devido a diferenças metodológicas empregadas (por exemplo no uso das plataformas de *screening* de miRNAs). Conforme mencionado por Gunasekaran et al. (2024), estudo de expressão de miRNAs são sensíveis a variabilidades individuais, uma vez que o perfil dessas moléculas pode ser fortemente influenciado por comorbidades e pelo estado imunológico de cada indivíduo. Dessa forma, a baixa reprodutibilidade entre estudos pode ser atribuída à heterogeneidade dos experimentos realizados nos diferentes trabalhos, incluindo variações no tamanho amostral, diferenças étnicas e de ancestralidade genética, faixa etária dos participantes, além do emprego de metodologias distintas para detecção e análise destas moléculas.

Diversos miRNAs atuam na patogênese da TB em processos que envolvem a imunidade inata e adaptativa. Outros exemplos de miRNAs são o miR-99b e miR-132-5p, que são induzidos durante a infecção pelo *M. tuberculosis* e exercem a função de atenuar a inflamação do hospedeiro estimulada por TLRs. Outros miRNAs como o Mir-33, o miR-125 e o miR-144-5p, assim como o miR-155, são capazes de inibir a formação do autofagossomos e interferir na autofagia. Além desses, o miR-325 que afeta a apoptose e é induzido pelo *M. tuberculosis* também contribui para a evasão imune do bacilo (Sinigaglia et al., 2020). Nesse contexto, a seguir serão abordados os miRNAs nos quais se localizam os SNVs estudados nesta tese. São eles o miR-423 (rs6505162), o miR-1275 (rs4713693), o miR-146a (rs2910164) e o miR-27a (rs895819).

### **2.5.1. miR-423**

A variante rs6505162 está localizada exatamente na base 30,117,165 do cromossomo 17, de acordo com o genoma humano de referência GRCh38 (Dyer et al., 2025). Esse SNV está no pré-miRNA-423, especificamente a 12 pares de base de distância da extremidade 3' do miRNA-423-3p maduro. Tal miRNA é codificado pelo gene *MIR423*, e a presença dessa variante nessa localização do gene pode impactar o processamento do miRNA, ao interferir na ação das endonucleases responsáveis pela clivagem da molécula durante as etapas da biossíntese. Como consequência, essa variante pode afetar a maturação desse miRNA e a quantidade das isoformas de miR-423 produzida, o que afeta a ação da molécula (Hendawy et al., 2025).

Em um modelo de cultura de células humanas (HEC-1b), foi identificado que o alelo A do rs6505162 está associado a uma maior produção do miRNA-423 maduro em comparação com o alelo C, evidenciando que variantes localizadas fora da sequência do miRNA maduro podem influenciar a eficiência do processamento e expressão da molécula (Su et al., 2015).

Na TB, a atuação do miRNA maduro miR-423-5p já foi descrita. Foi identificado em um estudo conduzido na China, que esse miRNA apresentou expressão aumentada no soro de pacientes com tuberculose, bem como em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) isoladas desses indivíduos, em comparação com controles saudáveis, sugerindo sua associação com a doença ativa, além de seu potencial como biomarcador (Tu et al., 2019).

Análises de bioinformática indicaram o miR-423-5p como potencial regulador da maturação do autofagossomos. Essa função foi averiguada em modelos de culturas de macrófagos humanos, em que foi demonstrado que a superexpressão desse miRNA inibe a maturação do autofagossomos, especialmente por meio do bloqueio da fusão entre o autofagossomos e lisossomos. Esse efeito ocorre pela regulação negativa do gene *VPS33A*, identificado como alvo direto do miR-423-5p, sendo este gene codificador de um componente essencial do complexo que medeia a fusão autofagossomo-lisossomo. Dessa forma, ao comprometer a autofagia, o miR-423-5p favorece a sobrevivência intracelular de *M. tuberculosis* e sua patogênese (Tu et al., 2019).

Outro estudo com o miR-423-5p, conduzido no Uruguai com pacientes com TB grave internados em unidade de terapia intensivo (UTI), identificou achados semelhantes aos descritos por Tu et al. (2019), no que se refere à concentração desse miRNA. Os autores observaram que os níveis séricos de miR-423-5p estavam mais elevados nos pacientes com TB em comparação com o grupo controle. Além disso, os níveis de miR-423-5p também estiveram mais elevados entre os pacientes que sobreviveram em comparação com aqueles que evoluíram a óbito durante internação (Hurtado et al., 2024).

Os autores também identificaram que a razão de contração entre o miR-423-5p/miR-378a-3p foi aproximadamente 6 vezes maior entre os pacientes que sobreviveram em comparação com aqueles que evoluíram a óbito durante a internação, evidenciando o papel de miR-423 como biomarcador da tuberculose e indicador de prognóstico (Hurtado et al., 2024).

Corroborando esses achados, Hashimoto et al. (2020) demonstraram em um estudo realizado no Japão, que o miR-423-5p encontra-se aumentado em pacientes com TB, quando

analisado em fração sérica enriquecida em exossomos. Nesse estudo, o miR-423-5p integrou um painel de oito miRNAs com capacidade de discriminar a doença ativa da infecção latente, reforçando o seu papel como biomarcador da TB. Os autores observaram também maior expressão do miR-423-5p em células epiteliais das vias aéreas de pacientes com tuberculose em comparação com indivíduos latentemente infectados, sugerindo que essas células constituem uma fonte importante de produção desse miRNA no contexto da TB.

Apesar de muitos estudos indicarem a produção aumentada do miR-423 na TB, apenas o estudo de Tu et al. (2019) descreveu até o momento um mecanismo funcional desse miRNA na patogênese da doença, demonstrando a repressão do gene *VPS33A* e o consequente comprometimento da autofagia. No entanto, o miR-423 possui múltiplos alvos moleculares que ainda não foram investigados no contexto da TB e que poderiam eventualmente desempenhar papel importante nessa doença. Um exemplo é o gene *FKBP4*, que foi estudado em um contexto de câncer de mama, no qual apresentou expressão diferencial e foi identificado como alvo potencial do miR-423 (Xiong et al., 2020). O *FKBP4* codifica uma imunofilina envolvida em processos de imunorregulação, bem como no controle da expressão gênica em linfócitos B e T (NCBI, 2026), sugerindo que sua modulação pelo miR-423 pode impactar respostas imunes não exploradas ainda na TB.

Um outro estudo também em modelo oncológico demonstrou que o miR-423 encontra-se aumentado em câncer de mama humano, estando associado a um pior prognóstico. Utilizando cultura de células de linhagem oncológica, foi demonstrado que o miR-423 superexpresso promove a ativação do NF- $\kappa$ B através da repressão pós-transcricional do gene *TNIP2*, que é um regulador negativo do NF- $\kappa$ B. Embora o estudo tenha sido realizado em um contexto de câncer de mama, esses achados são relevantes para a tuberculose, uma vez que o miR-423 também se encontra superexpresso na tuberculose e a via NF- $\kappa$ B é central na resposta contra *M. tuberculosis*, induzindo a produção de citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$ . Entretanto, essa hipótese carece de validação direta na TB (Dai et al., 2020a).

Fato é que a maioria dos estudos envolvendo o miR-423 são referentes ao seu papel regulatório no câncer. O miR-423 pode participar na proliferação celular e no crescimento tumoral, na migração e invasão tecidual, na apoptose, no escape imunológico e na resistência à quimioterapia através da regulação de múltiplos genes (Ke et al., 2020). A variante estudada nessa tese rs6505162 tem sido inclusive amplamente estudada nos cânceres, sendo associada

em alguns estudos, por exemplo, com câncer de mama (El-Ashry et al., 2022), câncer de esôfago (Yin et al., 2013), câncer colorretal (Jia et al., 2018), dentre outros.

Na TB a variante rs6505162 de *miR-423* já foi investigada em alguns estudos. Em um estudo conduzido no estado do Pará com pacientes com TBP, foi encontrada associação do alelo C com proteção contra a doença ( $p = 0,021$ ; OR = 0,33; IC95% = 0,13 – 0,84) (Leal et al., 2022). Esse efeito é coerente com estudos prévios que identificaram o alelo C com a menor produção desse miRNA em comparação com o alelo A (Su et al., 2015). E considerando que o *miR-423* pode favorecer a sobrevivência do bacilo, níveis menores dessa molécula podem ter um efeito protetor contra a infecção pelo *M. tuberculosis*.

Em outro estudo realizado com indivíduos recrutados em Belém, avaliou-se se o SNV rs6505162 está associado ao risco de desenvolvimento de TB multidroga resistente (MDR). Os autores identificaram que o genótipo A/A dessa variante estava associado ao maior risco de desenvolver (TB MDR) ( $p = 0,02$ ; OR = 14,03; IC95% = 2.66-74.06) (Athayde et al., 2024). Apesar de ambos os trabalhos conduzidos com amazônidas convergirem, é importante citar que o número amostral foi bem limitado no trabalho de Athayde et al. (2024), que contou apenas com 12 participantes no grupo de MDR, gerando um IC95% extremamente amplo.

Na população chinesa, Zhang et al. (2021b) não detectou associação significativa entre o SNV rs6505162 e a TBP quando analisada essa variante de forma isolada. Entretanto, os autores identificaram que combinações de SNVs envolvendo rs6505162 e outras variantes em um haplótipo, estiveram associados ao desenvolvimento da doença, dependendo da combinação do haplótipo, conferindo risco ou efeito protetor em relação à tuberculose pulmonar.

Em outro modelo de infecção, em um estudo com indivíduos portadores de Hepatite B, a variante rs6505162 também foi associada aos desfechos clínicos da doença. O alelo A foi identificado como protetor ( $p < 0,0001$ ; OR = 0.432; 95%IC = 0,28-0,68) contra a progressão para formas mais graves, como cirrose e carcinoma hepatocelular. Já na análise referente a capacidade de *clearance* viral, observou-se que modelo dominante envolvendo o alelo C (C/C+A/C) foi associado com maior capacidade de eliminação do vírus ( $p < 0.0001$ ; OR = 0.35; 95%IC = 0,246-0.505), resultado compatível com o trabalho de Leal et al. (2022) no contexto da TB (Al-Qahtani et al., 2017).

Esses resultados reforçam o potencial protetor do alelo C no controle de infecções intracelulares, possivelmente em razão da menor expressão do *miR-423*. Entretanto, o fato de

o alelo A conferir proteção contra a progressão para as formas graves, evidencia que os efeitos funcionais das variantes genéticas são dependentes do contexto celular, do estágio da infecção e do patógeno envolvido.

### 2.5.2. miR-1275

A variante rs4713693 está localizada exatamente na base 33,850,152 do cromossomo 6, de acordo com o genoma humano de referência GRCh38 (Dyer et al., 2025). Esse SNV encontra-se em uma região regulatória associada à expressão do miR-1275 (que é codificado pelo gene *MIR1275*) especificamente o *enhancer* (intensificador) GH06J033850 (Fishilevich et al., 2017). *Enhancers* são sequências regulatórias que, ao se ligarem a proteínas específicas (fatores de transcrição), aumentam a expressão dos genes associados (Thomas; Buecker, 2023). Logo, variantes gênicas presentes nessas regiões podem impactar a atividade regulatória do *enhancer*, modular a produção do miRNA maduro e, consequentemente, afetar a ação nas doenças e demais processos biológicos onde este miRNA está envolvido.

O miR-1275 já foi identificado com expressão aumentada na TB, em macrófagos da linhagem THP-1 infectados com a cepa virulenta de *M. tuberculosis* (H37Rv), em comparação com os mesmos tipos celulares infectados com a cepa avirulenta (H37Ra). Neste estudo, os autores utilizaram a técnica de *microarray*, a partir do RNA total extraído das células, para identificar diferenças na expressão de miRNAs entre esses dois modelos de infecção, encontrando, além do miR-1275, outros miRNAs com produção elevada nas células, como miR-4668-5p, miR-30e, miR-30a e miR-3178 (Das et al., 2013).

São limitados os estudos envolvendo o miR-1275 no contexto da TB, entretanto, esse miRNA tem sido estudado em outros modelos de infecção. Em um estudo com pacientes de Hepatite B, foi identificado que a concentração sérica de miR-1275 está aumentada na circulação dos pacientes em comparação aos indivíduos saudáveis, mostrando que o HBV também é capaz de modular a expressão de miR-1275 (Akamatsu et al., 2015).

Em outro modelo de infecção envolvendo o vírus da Influenza A, foi identificado que esse miRNA apresenta expressão aumentada em células do epitélio pulmonar infectadas. Nesse estudo, o miR-1275 foi identificado como regulador negativo de genes da imunidade inata *MAPK3* e *IRAK1*, que são importantes em vias de sinalização envolvendo TLRs, JAK-STAT, TNF, IL-1 e IL-7. Os autores demonstraram que as proteínas MAPK3 e IRAK1 encontram-se em níveis reduzidos na infecção por Influenza A, e essa diminuição é mais pronunciada após o tratamento das células com um mimetizador de miR-1275 (Buggele et al., 2012). Tal

mecanismo, embora demonstrado no contexto da infecção pelo vírus Influenza A, sugere que esse miRNA e os mecanismos mencionados, mediados por ele, também podem estar envolvidos na TB, uma vez que ambas as infecções acometem primariamente os pulmões e compartilham vias centrais da resposta imune.

O miR-1275 tem sido amplamente descrito na literatura como regulador da progressão tumoral, podendo atuar como regulador pró- ou antitumoral conforme o tipo de câncer e os alvos moleculares envolvidos. Estudos pré-clínicos e clínicos associaram a desregulação do miR-1275 a neoplasias como câncer de mama, fígado, pulmão trato gastrointestinal e geniturinário. Funcionalmente, o miR-1275 tem sido implicado em vias de sinalização como *MAPK*, *ERK/JNK* e *Wnt*, influenciando processos como apoptose, proliferação celular e progressão tumoral (Chong et al., 2022).

Além de estarem presentes no contexto oncológico, essas vias reguladas por miR-1275 (*MAPK*, *JNK* e *Wnt*) também desempenham papel central na resposta imune contra o *M. tuberculosis*, onde a infecção por esse bacilo ativa inicialmente vias clássicas de sinalização como MAPK e NF- $\kappa$ B, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF e IL-6. Por outro lado, a via Wnt, induzida durante a infecção, atua como um modulador da resposta inflamatória, inibindo a produção de IL-12, TNF e IFN- $\gamma$ . Apesar disso, essa via pode ser protetora na tuberculose ao contribuir com a prevenção da disseminação da doença, uma vez que Wnt3 promove a apoptose de macrófagos infectados pelo *M. tuberculosis* limitando a proliferação bacteriana (Villaseñor et al., 2017).

Em outro estudo que trata do papel oncológico de miR-1275 e que pode ser considerado no contexto da TB, Ou et al. (2023) identificaram, a partir de ferramentas de bioinformática, que esse miRNA está correlacionado com a atividade de células NK. Os autores demonstraram que a regulação negativa do miR-1275 está associada à diminuição da efetividade dessas células em pacientes com câncer de pâncreas, afetando também a sobrevivência desses indivíduos.

Os autores também demonstraram, por meio de análises em cultura de células NK-92, que ocorre a redução da expressão do miR-1275 no interior das células NK quando o submetidas a condições de hipóxia, ocorrendo também a inibição da expressão de perforina, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nas células NK-92 nessas condições. Além disso, foi identificado que a capacidade do miR-1275 em promover a atividade citotóxica das células NK-92 ocorre através da inibição da *AXIN2*, a qual se encontra altamente expressa em células NK de indivíduos com câncer em comparação ao grupo controle, e que esta molécula possui a capacidade de reverter

a ação do miR-1275 na promoção da morte das células tumorais pelas células NK (Ou et al., 2023).

Esses achados indicam que a diminuição da expressão do miR-1275 está associada à redução da produção de mediadores imunológicos importantes para o controle de patógenos intracelulares, como IFN- $\gamma$  e TNF. Em paralelo, o estudo de Das et al. (2013), indicou o aumento desse miRNA durante a infecção por *M. tuberculosis*, o que sugere que em face da infecção, a indução do miR-1275 possa integrar o repertório molecular envolvido na resposta imune contra o bacilo da TB.

Por fim, o SNV rs4713693 (localizado em um *enhancer* de miR-1275), que está sendo investigado no presente estudo pela primeira vez quanto ao seu impacto no desenvolvimento da TB, não possui dados na literatura acerca de sua associação com qualquer doença infecciosa, desse modo, localizou-se somente um trabalho com indivíduos japoneses, que identifica o alelo T ( $p = 0,0015$ ; OR = 1,20; IC95% = 1.07–1.35) associado ao risco de desenvolvimento da Doença de Graves, um processo autoimune (Nakabayashi et al., 2011).

### 2.5.3. miR-146a

A variante rs2910164 está localizada na posição 160,485,411 do cromossomo 5, de acordo com o genoma humano de referência GRCh38, no gene *MIR146A*, que codifica o miRNA miR-146a (Dyer et al., 2025). Esse SNV se encontra no precursor do miR-146, no qual o alelo G favorece a formação de uma estrutura mais estável na sequência do pre-miRNA, enquanto o alelo de menor frequência C, promove a formação de um *mismatch* na haste-alça, o que gera uma estrutura menos estável e interfere no processamento da molécula. Alguns estudos demonstram que esse alelo está associado à redução da produção do miR-146a maduro, enquanto outros apontam que o alelo C leva a maior produção da molécula madura (Jazdzewski et al., 2008; Ali et al., 2024).

O efeito do miR-146a diante da infecção pelo *M. bovis* (BCG) foi avaliado por Li et al., (2016b). Nesse estudo, os autores identificaram que a indução da expressão de miR-146a em macrófagos levou à redução da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e, consequentemente, à diminuição da produção de óxido nítrico (um mediador essencial no combate a patógenos intracelulares).

Além disso, a superexpressão do miR-146a levou a maior proliferação micobacteriana ao longo de 48h no interior dos macrófagos. Esse efeito foi mediado através da inibição do alvo

molecular desse miRNA, o gene *TRAF6*. Ao se reestabelecer a expressão de TRAF6 por meio da transfecção com plasmídeo, a produção de NO foi reestabelecida, bem como a capacidade de controle da replicação micobacteriana. Nesse contexto, foi identificado que a inibição de TRAF6 atenua a ativação das vias NF- $\kappa$ B e MAPK, essenciais na produção de mediadores pró-inflamatórios na TB (Li et al., 2016b).

Em um estudo no qual foi realizada a transfecção de miR-146 em um modelo de cultura de macrófagos THP-1 infectados com TB, verificou-se que esse miRNA foi capaz de promover a autofagia nas células infectadas, um mecanismo essencial para o controle da infecção intracelular ocasionada pelo *M. tuberculosis*. Além disso, os autores identificaram que o miR-146a atua na TB por meio da inibição do gene *TRAF6*, afetando a sinalização via NF- $\kappa$ B, e levando a redução de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$ . Ou seja, o miR-146a exerce um papel duplo, agindo como um modulador negativo da inflamação, bem como um indutor da autofagia na TB. Esse efeito pode parecer ambíguo, mas é protetor no contexto da TB, pois uma inflamação controlada é fundamental para evitar dano tecidual, enquanto a autofagia é necessária para o controle da proliferação intracelular do bacilo (Sheikhpour et al., 2025).

Além dos mecanismos citados previamente, em que miR-146a afeta a via TLR-TRAF6-NF- $\kappa$ B, reduzindo a inflamação na TB, outro mecanismo que pode impactar a resposta imunológica na TB é o papel de regulador negativo do inflamassoma NLRP3. Em um modelo experimental de inflamação induzida por gota, Zhang et al., (2018) identificou que a expressão de NALP3, ASC e caspase-1 esteve significativamente aumentada nos monócitos derivados da medula óssea oriundos de camundongos *knockout* para miR-146a em comparação com camundongos *wild type* expostos a cristais de urato monossódico. Nos animais *knockout* também se observou que a produção das proteínas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  também estiveram aumentadas (Zhang et al., 2018). Esse efeito ressalta o papel modulador negativo da inflamação mediado por miR-146a, e, apesar de a IL-18 madura não ter sido diretamente avaliada nesse estudo, é possível que ela também seja impactada pelo miR-146a pois também depende da clivagem por NLRP3.

Em consonância com o trabalho de Zhang et al. (2018), o estudo de Chen et al. (2021) também identificou o miR-146a-5p, como regulador negativo dos elementos moleculares do inflamassoma NLRP3 em cultura de macrófagos THP-1. Nesse trabalho, a expressão de Caspase-1, e a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 foram significativamente reduzidos diante do

tratamento das células com mimetizador de miR-146a-5p, em um modelo de ativação de NLRP3 induzido por LPS/ATP. Interessantemente, essa regulação só ocorreu quando as doses de LPS eram baixas, enquanto doses elevadas de LPS não resultaram na regulação negativa do NLRP3, indicando que a carga infecciosa pode influenciar a capacidade do miR-146a de regular a inflamação (Chen et al., 2021).

Alguns autores indicam que o miR-146a encontra-se altamente expresso em pacientes com TB. Um estudo conduzido com pacientes recrutados na Índia identificou que o miR-146a tem a concentração aumentada em pacientes com TBP, em comparação com o grupo controle, destacando-se o papel dessa molécula como biomarcador da doença (Chakrabarty et al., 2019). Já em outro estudo conduzido com amostras de pacientes da Indonésia, identificou que o miR-146a encontra-se superexpresso na circulação plasmática de indivíduos com TB ativa, e diminuído na circulação dos indivíduos com infecção latente, evidenciando que esse miRNA tem potencial como biomarcador dos diferentes estágios da infecção pelo *M. tuberculosis* (Rusmariza et al., 2025).

Outro estudo que reforça o possível efeito do miR-146a como biomarcador da TB foi conduzido com pacientes recrutados na China. Foi identificado que esse miRNA está superexpresso tanto na circulação sérica quanto no escarro de pacientes com TBP em comparação com os indivíduos com infecção latente, ou com controles sem doença. Além disso, o miR-146a esteve aumentado também nos pacientes com desfecho terapêutico desfavorável, quando comparados aos pacientes que tiveram boa resposta ao tratamento. Esse achado indica que o miR-146a possui potencial como biomarcador tanto da doença ativa quanto da resposta ao tratamento (Wang; Xu, 2025).

Diferentemente dos estudos previamente citados, um trabalho realizado com pacientes e controles sérvios identificou que o miR-146a apresenta expressão diminuída em amostras de células mononucleares derivadas do sangue periférico de indivíduos com TBP, em comparação com as amostras oriundas de controles sem TB (Buha et al., 2022). Esse achado, contrastante com os estudos previamente mencionados que apontam para a expressão aumentada do miR-146a em pacientes com TB, pode ser explicado, em parte, por questões metodológicas, por exemplo, o estudo com a população sérvia analisou o conteúdo de células mononucleares, enquanto os demais estudos analisaram o conteúdo de miRNAs circulantes no soro/plasma ou no escarro. Ademais, a questão populacional pode impactar esses diferentes resultados, uma vez que os estudos que indicaram a expressão aumentada de miR-146a foram realizados com

populações asiáticas, enquanto o estudo de Buha et al., (2022) foi conduzido com indivíduos de origem europeia.

A variante rs2910164 localizada no miR-146a tem sido estudada quanto a sua associação com a TB em diferentes populações. Naderi et al. (2015) não identificou em seu estudo envolvendo indivíduos iranianos com TBP, associação entre o rs2910164 com suscetibilidade a essa doença. Da mesma forma, outro estudo realizado com essa variante não identificou a associação desse SNV com TB em indivíduos recrutados na China (Wang et al., 2016). Assim como o estudo de Zhang et al. (2021b) que também não identificou associação de rs2910164 com TBP em pacientes recrutados na província Zhejiang, China.

No estudo conduzido por Buha et al. (2022) na população sérvia, também não foi identificado associação de rs2910164 com TB. Nesse mesmo estudo os autores também não encontraram diferenças na concentração do miR146a nas amostras dos portadores do alelo C em comparação com o alelo G.

Em outro estudo conduzido com diferentes grupos étnicos da China, identificou-se que o SNV rs2910164 foi associado ao risco de TBP entre o subgrupo cazaque chinês, em que o alelo C ( $p = 0,023$ ; OR = 1,33; IC95% = 1,04 – 1,69) e o genótipo C/C ( $p = 0,013$ ; OR = 1,84; IC95% = 1,14 – 2,98) foram associados a maior suscetibilidade de desenvolvimento de TBP. Já nos subgrupos Uygur e Han, não foi observada diferenças significativas (Zhang et al., 2015).

Evidenciando ainda mais a importância do contexto populacional nos estudos de associação de variantes genéticas, o estudo conduzido por Li et al. (2011) identificou que o alelo G está associado com a TBP em dois grupos étnicos diferentes estudados, a população Han e a população Tibetana. Entre os Han o alelo G foi associado com proteção contra a TBP ( $p = 0,000$ ; OR = 0,58; IC95% = 0,45–0,73) ao passo que nos tibetanos esse mesmo alelo foi associado ao risco aumentado de desenvolvimento de TBP ( $p = 0,031$ ; OR = 1,51; IC95% = 1,10–2,07). Esse efeito aparentemente antagônico reforça que essas variantes genéticas podem modular fenótipos em conjunto com outros caracteres populacionais como o arcabouço genético particular de cada grupo e possíveis mecanismos epigenéticos.

Na população amazônica, essa variante foi estudada por Leal et al. (2022), com indivíduos recrutados no Pará, entretanto, nenhuma associação foi encontrada. Em outro estudo conduzido com indivíduos recrutados no Pará envolvendo essa variante, mas dessa vez em pacientes acometidos pela hanseníase (uma outra doença micobacteriana), da Silva et al. (2022)

identificou associação do alelo C com proteção contra a forma paucibacilar da doença ( $p = 0,04$ ; OR = 0,14; IC95% = 0,01–1,36).

Já o estudo de Cezar-de-Mello et al. (2014) também realizado com pacientes com hanseníase no Brasil (Rio de Janeiro), identificou associação dos genótipos C/G ( $p = 0.041$ ; OR = 1.44; IC95% = 1,02–2,05) e C/C ( $p = 0.0091$ ; OR = 2.18; IC95% = 1,21–3,93) do rs2910164 com risco aumentado para a hanseníase, identificando o alelo C como alelo de risco, o que foi confirmado por teste de desequilíbrio de transmissão ( $p = 0.003$ ). Paralelamente, os autores detectaram que portadores do alelo C apresentam maior expressão do miR-146a maduro, bem como menor produção de TNF, em comparação aos portadores do alelo G (Cezar-de-Mello et al., 2014).

#### 2.5.4. miR-27a

A variante rs895819 localiza-se na posição 13,836,478 do cromossomo 19, de acordo com o genoma humano de referência GRCh38, no gene *MIR27A*, responsável pela codificação do miRNA miR-27a (Dyer et al., 2025). Esse SNV está localizado no *loop* (alça) terminal do pre-miRNA-27a, uma região importante para o processamento dessa molécula precursora, pelas endonucleases envolvidas na biogênese de miRNAs. Alterações nessa região podem comprometer a atuação das endonucleases e consequentemente afetar a produção do miRNA maduro. Inclusive, alguns estudos apontam que o alelo C e o genótipo C/C, estão associados a uma menor produção do miR-27a em comparação ao alelo T (Yang et al., 2022; Ragia et al., 2024).

Um estudo chinês identificou que o miR-27a encontra-se expresso de forma aumentada nos exossomos séricos de pacientes com TBP ativa em comparação com indivíduos com infecção latente, ou com controles sem tuberculose. Além disso, níveis elevados desse miRNA foram associados à resistência aos fármacos antituberculose, especialmente nos indivíduos multidroga-resistentes, bem como a piores sinais clínicos da doença. Dessa forma, a alta expressão de miR-27a em exossomos séricos pode funcionar como potencial biomarcador da doença e do prognóstico clínico da TBP (Zheng et al., 2023).

Em contraste com o estudo de Zheng et al. (2023), o trabalho de Furci et al. (2013) demonstrou, em um modelo *in vitro* de macrófagos derivados de monócitos infectados com a cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv, que o miR-27a encontra-se com a expressão reduzida no interior dessas células. Esses achados contrastantes podem ser explicados em parte, pelas diferenças nos modelos experimentais testados, pois, o estudo de Zheng et al. (2023) avaliou a

expressão do miR-27a em exossomos secretados, enquanto Furci et al. (2013) analisou a expressão em culturas celulares. É possível que a modulação negativa do miR-27a pelo bacilo ocorra predominantemente no interior dos macrófagos visando sua sobrevivência, exercendo menor efeito no quantitativo de miR-27a circulante transportado em exossomos.

Em concordância com o trabalho de Furci et al. (2013), Wang et al. (2017) também identificou que o miR-27a encontra-se negativamente regulado no interior de macrófagos THP-1 infectados com a cepa virulenta H37Rv. Além disso, identificou-se que a transfecção de mimetizador de miR-27a nos macrófagos infectados leva a redução da produção de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Subsequentemente, foi demonstrado que esse efeito anti-inflamatório decorre do fato de o miR-27a ter como alvo a quinase IRAK4, que é um componente central da via de sinalização TLR-MyD88-NF- $\kappa$ B. Dessa forma o miR-27a atua como regulador negativo da inflamação e a sua superexpressão em macrófagos infectados favorece a replicação aumentada do bacilo no interior dessas células, evidenciando um mecanismo de modulação imune no qual os miRNAs desempenham papel importante na imunopatogenia da TB (Wang et al., 2017).

Outro estudo que indica o papel do miR-27a na resposta imunológica frente à TB foi realizado por Ahluwalia et al. (2017). Nesse trabalho, foi identificado através de análises bioinformáticas, que o miR-27a apresenta como alvo putativo a região 3'-UTR do fator de transcrição IRF4, o qual contribui para a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2, caracterizado por um perfil anti-inflamatório e mais permissivo à sobrevivência do bacilo. Logo, em consonância com os achados de Furci et al. (2013) e Wang et al. (2017), que demonstraram a redução da expressão do miR-27a nos macrófagos infectados, é possível que tal redução contribua para o aumento da expressão de IRF-4, favorecendo a formação de macrófagos permissivos, que contribuem para a cronificação da infecção pelo bacilo da TB.

Além das vias citadas acima, o miR-27a também atua modulando a autofagia diante da infecção pelo *M. tuberculosis*. De acordo com o estudo de Liu et al. (2018), a expressão desse miRNA encontra-se aumentada em macrófagos peritoneais de camundongos infectados com a cepa H37Rv, bem como nos pulmões desses animais, além de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com TB. De acordo com esse estudo, o miR-27a tem como alvo direto o gene *Cacna2d3*, e ao reprimi-lo, prejudica a sinalização mediada por Ca<sup>2+</sup>, comprometendo a formação de autofagossomos e diminuindo a capacidade autofágica. Adicionalmente, foi observado que camundongos *knockout* para o miR-27a possuíam menor carga bacilar nos

pulmões, indicando que, ao contribuir para o bloqueio da autofagia, a presença desse miRNA, favorece a sobrevivência bacilar (Liu et al., 2018).

Esse estudo de Liu et al. (2018) contrasta-se com os de Furci et al. (2013) e Wang et al. (2017), que relataram a redução da expressão do miR-27a em macrófagos *in vitro*. Por outro lado, resultados semelhantes aos de Liu et al. (2018) foram observados no trabalho de Zheng et al. (2023), que identificou níveis elevados de miR-27a em exossomos séricos de pacientes com tuberculose. Essas divergências podem ser atribuídas, ao menos em parte, às diferenças metodológicas e aos modelos experimentais empregados. Enquanto Furci et al. (2013) e Wang et al. (2017) utilizaram modelos de cultura celular *in vitro*, os estudos de Liu et al. (2018), Zheng et al. (2023) analisaram amostras clínicas e *in vivo*, nas quais fatores como tempo de infecção, compartimentalização dos miRNAs e interações de múltiplos processos imunológicos e moleculares podem influenciar a dinâmicas dos perfis de expressão observados.

A variante rs895819, do miR-27a, tem sido amplamente investigada no contexto oncológico e tem sido associada a diferentes tipos de câncer, de forma dependente do tecido e do modelo genético. Uma meta-análise realizada em 2020 não identificou associação do rs895819 com o risco global de câncer, entretanto, efeitos significativos foram encontrados em câncer de mama em que o alelo C foi associado à proteção ( $p = 0,021$ ; OR = 0.89; 95%IC = 0.80-0.98) e em câncer colorretal onde o alelo C foi considerado de risco ( $p < 0.001$ ; OR = 1.22, 95%IC = 1.10-1.34) (Dai et al., 2020b).

Na TB, até o momento poucos estudos têm sido realizados com a variante rs895819. Em um recente estudo caso-controle com população recrutada no Irã, foi identificado o alelo C ( $p = 0,001$ ; OR = 2.77; 95%IC = 1,61–4,79) e o genótipo C/C ( $p = 0,008$ ; OR = 4.21; 95%IC = 1.54–11.41) estão associados ao risco de desenvolvimento de TBP (Arabshahi et al., 2025). Já no estudo conduzido por Zhang et al. (2021b) com indivíduos chineses, não foi observada associação entre o rs895819 e a população geral estudada, entretanto, quando estratificado por sexo, observou-se a associação do modelo dominante dessa variante (CC+C/T) no sexo feminino com redução do risco contra TBP ( $p = 0,045$ ; OR = 0.45; IC95% = 0.23–0.98).

Esses estudos apontam que a variante rs895819 pode estar associada tanto ao risco quanto a proteção contra TB, dependendo da população estudada, uma vez que resultados opostos foram identificados entre iranianos e chineses para o mesmo alelo. Além disso, tem sido identificado que o alelo C é responsável pela redução da expressão do miR-27a maduro (Ragia et al., 2024). Enquanto alguns trabalhos apontam que a expressão aumentada de miR-

27a favorece a sobrevivência do bacilo, outros apontam que a redução desse miR-27a pode contribuir para vias favoráveis ao bacilo, como a polarização de macrófagos para o fenótipo M2.

Os mecanismos descritos ao longo desta revisão evidenciam a complexidade da regulação imunológica mediada por miRNAs na TBP. A expressão e a função dessas moléculas dependem do contexto celular, da carga bacilar, do estágio da infecção, do arcabouço genético do hospedeiro, e da interação entre múltiplos miRNAs, SNVs e vias de sinalização imunológica. Apesar do avanço no entendimento do papel de diversos miRNAs na TBP, ainda são escassos os estudos que investigam SNVs em genes de miRNAs, especialmente em populações com elevada carga dessa doença. Logo, a análise de variantes em miR-423, miR-1275, miR-146a e miR-27a é uma abordagem relevante para elucidar lacunas sobre os determinantes imunogenéticos da TBP, especialmente no contexto amazônico, contribuindo para a compreensão de mecanismos de suscetibilidade e características clínicas da doença, como a carga bacilar.

### 3. JUSTIFICATIVA

Diante da interação entre *M. tuberculosis* e o hospedeiro humano, diferentes desfechos podem ocorrer após a exposição ao bacilo da TB, variando desde a sua eliminação por mecanismos da imunidade inata até o estabelecimento de uma infecção latente crônica, que pode permanecer assintomática ou evoluir para a doença pulmonar ativa. Esses diferentes desfechos não dependem exclusivamente da intensidade da exposição ao patógeno, mas também de características individuais do hospedeiro, incluindo fatores imunogenéticos. Diante disso, a presença de variantes genéticas, como variantes de base única (SNVs), pode conferir maior resistência ou maior suscetibilidade ao desenvolvimento da TB (Simmons et al., 2018).

Genes de miRNAs normalmente apresentam baixa densidade de SNVs na região haste-alça que abriga o precursor do miRNA em comparação com outras regiões adjacentes, o que sugere que variantes de base única não são bem toleradas nas sequências gênicas que codificam miRNAs. Esse padrão reforça a importância da conservação dessas regiões para a funcionalidade dessas moléculas. De forma semelhante, observa-se baixa densidade de SNVs tanto na região “seed” (responsável pela ligação complementar do miRNA com o mRNA), quanto na região do “loop”, e nas demais da sequência de dsRNA, indicando que a conservação das sequências em todas as regiões do precursor do miRNA maduro, é fundamental para a obtenção de um miRNA funcional (Saunders et al., 2007; Machowska et al., 2022).

Apesar desse grau elevado de conservação, diversos SNVs têm sido descritos em genes de miRNA, podendo ocorrer em diferentes regiões da molécula. Variantes na região *seed* podem determinar que o miRNA passe a reconhecer outros alvos, ou não reconhecer os seus alvos canônicos, acarretando alterações na regulação das vias originais. Já as variantes em outras regiões podem causar alterações estruturais que impeçam as enzimas que clivam o pré-miRNA, como as enzimas DROSHA e Dicer, de se ligarem e exercerem sua função, afetando a maturação e a expressão do miRNA (Machowska et al., 2022).

Considerando que *M. tuberculosis* é capaz de modular a expressão de diversos miRNAs para direcionar vias biológicas que favorecem a infecção e a persistência do patógeno, e que a compreensão das características moleculares da patogênese micobacteriana é necessária para o desenvolvimento de novos biomarcadores e estratégias terapêuticas, torna-se relevante a investigação do papel das variantes genéticas em genes de miRNA nesse contexto. Além disso, a associação de SNVs em genes de miRNA com doenças micobacterianas, como a tuberculose, ainda é pouco explorada.

Nesse sentido, esta tese de doutorado propõe analisar a frequência de variantes de base única em genes de miRNA envolvidos na regulação de vias imunológicas relevantes para a TBP, bem como avaliar se essas variantes estão associadas à suscetibilidade ao desenvolvimento da doença e à produção de citocinas relacionadas à inflamação. Adicionalmente, considerando que o estado do Amazonas e, em especial, a cidade de Manaus, têm registrado as maiores taxas de incidência de TB do Brasil, o estudo se justifica por gerar dados relevantes sobre a ocorrência dessas variantes genéticas em uma população altamente endêmica e pouco estudada nesse contexto, permitindo avaliar de forma específica o papel desses SNVs na suscetibilidade à TBP em uma localidade de elevada carga da doença.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

Avaliar a frequência de variantes de base única em genes de miRNAs em pacientes com tuberculose pulmonar (TBP) e sua possível associação com a doença em indivíduos recrutados em Manaus-AM.

### 4.2. Objetivos específicos

- Avaliar a frequência das variantes de base única (SNVs) nos genes de miRNAs *MIR423* (rs6505162), *MIR1275* (rs4713693), *MIR146A* (rs2910164) e *MIR27A* (rs895819), em pacientes com tuberculose pulmonar e em controles sem tuberculose.
- Avaliar se existe associação destes SNVs com a suscetibilidade à TBP nos indivíduos estudados, bem como com a carga bacilar.
- Avaliar a concentração de citocinas envolvidas na TBP como IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-18, no plasma de pacientes e de controles.
- Verificar se os SNVs avaliados dos genes de miRNA estudados estão associados às concentrações de citocinas no plasma dos indivíduos estudados.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Aspectos éticos**

Este projeto de doutorado foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas sob o número de CAAE: 19021519.9.0000.5020, e número do parecer: 3.530.854. Também foi submetido ao CEP da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM para a utilização de amostras de 128 doadores para compor o grupo controle sob o número de CAAE: 51257921.2.0000.0009, e número de parecer: 4.982.395.

### **5.2. Tipo de estudo**

Trata-se de um estudo do tipo caso/controle que visa avaliar se as variantes de base única (SNV), nos genes que codificam microRNAs estão associados com TBP.

### **5.3. População de estudo**

Para a realização deste projeto foram selecionados indivíduos residentes em Manaus ou em outros municípios da região Norte, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 69 anos. Dentre estes indivíduos, foram incluídos pacientes com tuberculose pulmonar recrutados na Policlínica Cardoso Fontes, e controles sem TBP.

Os controles são indivíduos sem parentesco consanguíneo com os pacientes, esse grupo é composto por: I) contatos, que são os acompanhantes dos pacientes com tuberculose pulmonar ou indivíduos que convivem com esses pacientes, bem como profissionais da saúde que atendem na policlínica, ou alunos e profissionais que atuam ou frequentam laboratórios com pesquisa na área de TB; II) doadores, que são indivíduos saudáveis admitidos como doadores de sangue na fundação HEMOAM, sem histórico conhecido de TBP.

### **5.4. Critérios de inclusão**

#### **a) Pacientes com Tuberculose Pulmonar (TBP)**

Foram incluídos os pacientes com TBP, sintomáticos respiratórios, que apresentaram diagnóstico por pelo menos 1 dos seguintes critérios: I) resultados positivos (*M. tuberculosis* detectável) para o Teste Rápido Molecular (TRM, GeneXpert *M. TUBERCULOSIS*/RIF); II) baciloscopia de escarro positiva em pelo menos uma amostra e/ou cultivo do escarro com isolamento de *M. tuberculosis*; III) ou diagnóstico de TBP baseado em critérios clínicos e radiológicos, com achados de imagem clássicos compatíveis com a doença em radiografia ou

tomografia computadorizada de tórax, nos casos em que foi iniciado o tratamento medicamentoso específico para TBP.

b) Contatos sem TBP (controles)

Os contatos incluídos foram indivíduos sem diagnóstico prévio de TBP, e que não possuem qualquer sintoma respiratório. Esses indivíduos tiveram contato com pacientes com TBP, sendo acompanhantes desses indivíduos na ocasião do diagnóstico laboratorial ou tratamento na policlínica Cardoso Fontes, sem parentesco consanguíneo. Também foram incluídos profissionais de saúde envolvidos no atendimento a pacientes com tuberculose, bem como estudantes e pesquisadores que atuavam em ambientes de assistência e pesquisa relacionada a TBP, caracterizando um grupo de indivíduos expostos ao bacilo, porém sem manifestação clínica da doença.

c) Doadores (controles)

Nesse grupo foram incluídos indivíduos saudáveis que realizaram doação de sangue na Fundação HEMOAM. No momento da inclusão, os participantes foram submetidos a entrevista, na qual relataram ausência de diagnóstico prévio de TBP e ausência de histórico conhecido de contato com indivíduos com tuberculose confirmada, conforme informações fornecidas informadas no momento da doação.

## 5.5. Critérios de exclusão

Foram excluídos os indivíduos que apresentam outras comorbidades como câncer, Aids, hepatites, diabetes e doenças autoimunes, bem como os indivíduos HIV positivos, gestantes, transplantados ou que estiverem fazendo uso de algum imunorregulador; pacientes com resultados de cultivo com identificação de micobactérias não causadoras de TB (NTM); pacientes diagnosticados com TB (por exames clínicos e de imagens), mas que no decorrer da execução do projeto não responderem aos medicamentos para o tratamento de TB; e controles que, no decorrer do projeto, apresentaram sintomas respiratórios e/ou resultados da baciloscopia e/ou cultivo positivo para *M. tuberculosis*.

## 5.6. Recrutamento dos participantes

O recrutamento dos indivíduos com TBP e contatos ocorreu na Policlínica Cardoso Fontes, na cidade de Manaus, durante o período de realização do projeto. A abordagem foi realizada no setor de Aprazamento 1, local onde os pacientes recebem rotineiramente as

orientações sobre o tratamento da doença e a autorização para retirada dos medicamentos. Os indivíduos com TBP e contatos foram convidados a participar do projeto e àqueles que consentiram em participar, foram fornecidos a explicação e o esclarecimentos sobre a pesquisa e posterior coleta dos dados. As coletas das amostras foram realizadas em ambientes adequados e para cada procedimento e sempre com a autorização dos participantes. Os contatos na maioria dos casos foram os acompanhantes dos pacientes (sem consanguinidade) e estes são convidados a participar do projeto, antes ou após a entrevista com os indivíduos com TBP no setor de Aprazamento 1 da Policlínica Cardoso Fontes. Os doadores foram entrevistados em sala apropriada da Fundação HEMOAM. Esses indivíduos foram submetidos a testes sorológicos para HIV, HCV, HBV, HTLV-1/2, Sífilis e doença de Chagas, para garantir que fossem considerados saudáveis. Além disso, foram entrevistados para identificar a presença de doenças e outros fatores de risco, seguindo as normas técnicas do Ministério da Saúde.

### **5.7. Cálculo amostral**

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

### **5.8. Amostras biológicas**

As amostras de escarro e de sangue total (5mL) foram coletadas em local ou salas apropriadas da Policlínica Cardoso Fontes. Nesta policlínica, as amostras de escarro são analisadas por exames rotineiros como a Baciloscopia direta e/ou TRM (GeneXpert *M. TUBERCULOSIS*/Rif). Para esta pesquisa também foram solicitadas ao paciente amostras de escarro que foram encaminhadas ao Laboratório de Micobacteriologia do Instituto de Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) para cultura de micobactérias. As amostras de sangue coletadas, na Policlínica Cardoso Fontes, foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia Molecular (LIM), do Instituto de Ciências Biológicas/ICB, da Universidade Federal do Amazonas, onde foram registradas e codificadas na forma de sequência numérica com a finalidade de preservar o sigilo dos participantes do estudo. Além disso, no LIM, as amostras foram processadas e realizados testes rápidos sorológicos para HIV (vírus da Imunodeficiência Humana), HCV (vírus da hepatite C), HBsAg (Antígeno de superfície da Hepatite B) e para sífilis.

## **5.9. Exames micobacteriológicos nas amostras de escarro**

Nas amostras cujo diagnóstico ocorreu por meio de baciloscopia e exame de cultura, foi utilizada a técnica de baciloscopia direta e baciloscopia pós-concentração. O cultivo foi realizado segundo Salem et al. (2007), pelo método PKO (Petroff, Kudoh e Ogawa). A identificação de *M. tuberculosis* ocorreu por PCR, utilizando-se primers específicos para o elemento de inserção IS6110 (Hermans et al., 1990; Van Embden et al., 1993).

Normalmente, nas amostras analisadas pelos métodos microbiológicos convencionais, eram realizadas 2 baciloscopias na Policlínica Cardoso Fontes e 2 baciloscopias no Laboratório de Micobacteriologia do INPA. A definição de amostras paucibacilares ocorreu quando 2 ou mais exames de baciloscopia de escarro apresentavam resultados negativos, apesar da confirmação do caso de TBP por exame de cultura ou método molecular; foram consideradas multibacilares as amostras de pacientes que apresentaram positividade nas baciloscopias de escarro. Esses dados foram obtidos a partir dos livros de registro e planilhas disponíveis no Laboratório de Imunologia Molecular (LIM).

## **5.10. Processamento das amostras de sangue**

Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA (anticoagulante). Estas amostras foram imediatamente registradas e codificadas no LIM, em seguida, centrifugadas para separação e armazenamento a -20°C do plasma, e a camada de leucócitos foi coletada para extração de DNA.

## **5.11. Extração de DNA a partir da amostra de sangue**

A partir da amostra de sangue, após centrifugação, foi coletada a camada de leucócitos para extração de DNA que é feita pelo método descrito por Gustincich et al. (1991) com modificações, baseado na precipitação do DNA por sais de brometo de tetrametilamônio (DTAB/CTAB). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro de luz UV e armazenadas a -20 °C no LIM/ICB/UFAM em tubos de polipropileno, devidamente codificados e datados até o momento do uso.

## **5.12. Critérios de seleção das variantes (SNVs) e dos miRNAs**

Foram selecionados miRNAs envolvidos em respostas relevantes para o combate ao bacilo da TB (por exemplo, inflamação e autofagia). Além disso, estes miRNAs selecionados possuem a expressão aumentada ou diminuída em face de infecção por *M. tuberculosis*. Quanto aos SNVs escolhidos, foram selecionados aqueles que apresentam frequência superior a 10%

na população das Américas, segundo a plataforma Ensembl (<https://www.ensembl.org/>), e que possuíam estudos disponíveis em bancos de dados públicos quanto à sua funcionalidade na TBP ou outras doenças, para fins de comparação e discussão de resultados.

### 5.13. Ensaios de genotipagem por qPCR

O ensaio de genotipagem das variantes foi realizada pela técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) em equipamento QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems). Neste estudo, foram utilizadas sondas fluorescentes de hidrólise TaqMan com sequências alelo-específicas, as quais permitem a genotipagem de indivíduos para um SNV específico.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, incluindo-se para maior segurança nos resultados, um controle negativo constituído do mix da reação e água ultrapura, além de dois controles homozigotos para cada alelo e um heterozigoto. As condições de preparo do mix das reações de qPCR se encontram no **Quadro 01**, e as características das sondas utilizadas se encontram no **Quadro 02**.

**Quadro 1.** Condições do mix utilizado nas reações de qPCR para genotipagem.

| Reagentes                        | Concentração | Volume para 1 reação (µl) |
|----------------------------------|--------------|---------------------------|
| TaqMan Genotyping Master Mix 2x  | 0,5X         | 3                         |
| Sonda TaqMan® SNP Genotyping 20x | 0,8X         | 0,5                       |
| H <sub>2</sub> O ultrapura       | -            | 6,5                       |
| <b>VOLUME FINAL DO MIX</b>       | -            | <b>10</b>                 |
| DNA adicionado                   | 50ng/µL      | 2                         |

**Quadro 2.** Característica das sondas utilizadas no experimento.

| Gene           | Localização cromossômica | ID SNV    | Sequência da sonda 5''-[VIC/FAM]-3''                          | Alelos                                 |
|----------------|--------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <i>MIR146A</i> | 5:160485411              | rs2910164 | CATGGGTTGTGTCAGTGTGTCAGACCT[C/G]<br>TGAAATTCAGTTCTTCAGCTGGGAT | <b>G:</b> ancestral<br><b>C:</b> menor |
| <i>MIR27A</i>  | 19:13836478              | rs895819  | CTTAGCCACTGTGAACACGACTTGG[C/T]<br>GTGGACCCTGCTCACAAGCAGCTAA   | <b>T:</b> ancestral<br><b>C:</b> menor |
| <i>MIR423</i>  | 17:30117165              | rs6505162 | TGAGGCCCTCAGTCTTGCTTCCTA[A/C]<br>CCCGCGCTTGAGTTTCTCCCCGCTT    | <b>C:</b> ancestral<br><b>A:</b> menor |
| <i>MIR1275</i> | 6:33850152               | rs4713693 | GGGTAGAACCTCCTGGTCAAATTCC[C/T]<br>GTCAAATTCAAGACCTGAAGGAAGC   | <b>T:</b> ancestral<br><b>C:</b> menor |

Legenda: ID SNV: identificação da variante de nucleotídeo único; menor: alelo minoritário na população global segundo Ensembl.org.

### 5.14. Quantificação de citocinas por *ProQuantum Immunoassay*

A quantificação das citocinas IFN-γ e IL-18 foi realizada pelo método ProQuantum™ (Invitrogen), utilizando-se 2 µL das amostras de plasma sanguíneo de pacientes e de controles, conforme as instruções do fabricante. As amostras estavam previamente armazenadas a -20 °C.

Este método se baseia na detecção de analitos através da ligação de anticorpos conjugados com oligonucleotídeos (um anticorpo com oligonucleotídeos 3'-terminal, e outro anticorpo com oligonucleotídeos 5'-terminal), que ao se ligarem no analito de interesse, são unidos e formam uma fita simples de 100 pb que serve de molde para a amplificação, e detecção de sinal pelo método de qPCR. As concentrações das citocinas foram determinadas a partir da conversão do *cycle threshold* ( $C_T$ ) gerado na curva de amplificação, para pg/mL, conforme o manual do fabricante.

### 5.15. Quantificação das citocinas por ELISA

As citocinas IL-6 e IL-1 $\beta$  foram quantificadas por ensaio imunoenzimático do tipo ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) em amostras de plasma previamente armazenadas a -20 °C, seguindo rigorosamente os protocolos fornecidos pelo fabricante. Para a dosagem, foram utilizados kits comerciais ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe Sets (BioLegend), conforme especificação do fabricante. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Bio-Rad), utilizando filtro de 450 nm. Os valores de densidade óptica obtidos foram convertidos em concentrações (pg/mL) a partir das curvas padrão geradas para cada citocina.

### 5.16 Análises estatísticas

As frequências genótípicas das variantes na população investigada foram avaliadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) através do *software* R, versão 4.4.1 (R Core Team, 2024), usando o pacote SNPAssoc, versão 2.1-2 (SNPs-Based Whole Genome Association Studies) (Moreno et al., 2024). Foram considerados em equilíbrio as frequências genótípicas que apresentaram valor de  $p > 0,05$ .

As análises de associação entre os genótipos, considerando diferentes modelos genéticos, e a TBP, bem como entre os genótipos e a carga bacilar (classificada como paucibacilar ou multibacilar), foram realizadas por regressão logística, utilizando o *software* R, versão 4.4.1, ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)), o pacote SNPAssoc, versão 2.1-2. O nível de significância foi de  $p < 0,05$ , com o intervalo de confiança de 95%. Valores de Odds Ratio (OR) inferiores a 1 foram interpretados como efeito protetor, enquanto valores superiores a 1 foram interpretados como fator de risco. O critério de informação de Akaike (AIC) foi utilizado para a seleção do modelo genético que melhor explica a associação observada, esse método considera a qualidade de ajuste do modelo aos dados, e a sua complexidade, sendo o modelo com menor valor de AIC considerado o mais adequado (Lucambio, 2020).

A análise de associação alélica com a doença foi realizada por meio do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), utilizando o software GraphPadPrism (versão 10.6.1). Também adotando-se o nível de significância de  $p < 0,05$ , com o intervalo de confiança de 95%.

Para as análises das concentrações de citocinas e associação aos diferentes genótipos, foram aplicados testes de Análise de Variância não paramétricos, empregando o programa GraphPadPrism (versão 10.6.1). O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ . Essas análises foram conduzidas com caráter exploratório e não foram submetidas à correção para múltiplas comparações.

Para controle do erro do tipo I decorrente de múltiplas comparações, foi aplicada a correção de Bonferroni, considerando conjuntos independentes de análises. Nas análises de associação entre TBP e controles, bem como nas análises estratificadas (TBP versus contatos e TBP versus doadores) e na análise de associação com a carga bacilar, foram considerados 20 testes em cada conjunto ( $4 \text{ SNVs} \times 5 \text{ modelos genéticos}$ ), em que os valores de  $p$  obtidos originalmente foram corrigidos pela multiplicação por 20. Para as análises de interação entre SNVs, foram consideradas as combinações genóticas par a par entre quatro variantes ( $3 \text{ genótipos} \times 3 \text{ genótipos}$ ), totalizando 54 comparações, sendo aplicada a correção de Bonferroni correspondente a esse valor. Para as análises alélicas, foram considerados quatro testes independentes, correspondentes aos quatro SNVs avaliados, aplicando-se a correção de Bonferroni pela multiplicação dos valores de  $p$  por 4. Valores de  $p$  corrigidos  $< 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Características gerais da população estudada

Nesta pesquisa foram inicialmente selecionadas 487 amostras de pacientes com TB, dentre as quais 30 eram de pacientes com TB extrapulmonar, entretanto, para evitar viés nas análises, uma vez que há diferenças imunológicas entre as formas pulmonar e extrapulmonar da doença, optou-se por incluir no estudo somente indivíduos com acometimento pulmonar, dessa forma, o grupo de pacientes analisados foi composto por **457 indivíduos com TBP**.

Entre esses pacientes, foi possível recuperar dados de baciloscopia de 116 indivíduos, correspondendo àqueles diagnosticados por métodos convencionais como baciloscopia de escarro, cultura e exames de imagem. Desses 116, 27 foram considerados paucibacilares e 89 multibacilares. A recuperação parcial dos dados deve-se ao fato de que a maior parte dos casos mais recentes foram diagnosticados pelo método molecular GeneXpert, e os dados de Ct (Cycle Threshold) não são arquivados rotineiramente pela Policlínica Cardoso Fontes, enquanto os pacientes mais antigos dispõem principalmente de resultados de baciloscopia registrados nos livros de registros do LIM.

O grupo controle por sua vez, foi formado por **429 participantes**, sendo 128 doadores de sangue que relataram na triagem não possuir histórico pessoal de TBP, ou contato com pessoas diagnosticadas com a doença, e 301 contatos sem TBP ativa. Ao todo **886 participantes** foram incluídos neste estudo.

A média de idade dos pacientes foi de 40,1 anos, enquanto do grupo controle a média foi de 32,2 anos de idade. No que diz respeito ao sexo, 57,6% dos pacientes eram do sexo masculino e 42,4% do sexo feminino, já no grupo controle a distribuição foi semelhante, com 58,7% de homens e 41,3% de mulheres. Além dessas variáveis, também foram coletadas informações sobre tabagismo, etilismo e vacinação com BCG, embora nem todos os participantes tenham respondido essas questões.

Entre os pacientes, 270 indivíduos informaram se fumam ou não, desse total 24,8% eram tabagistas. Essa proporção foi superior à observada nos controles, no qual a taxa foi de 11,3% entre os 230 que responderam sobre essa questão. Em relação ao etilismo 180 pacientes forneceram essa informação, e 43,9% relataram fazer consumo de álcool, enquanto entre os 218 controles que responderam, apenas 22,9% declararam consumi-lo. Quanto à vacinação com BCG, 292 pacientes informaram a situação vacinal, sendo 86,6% de vacinados, já entre os 230

controles que responderam, essa proporção foi maior (94,8%). As características gerais da população estudada estão na **Tabela 01**.

**Tabela 1.** Características gerais dos grupos estudados.

| CARACTERÍSTICA                     | PACIENTES<br>(n=457),<br>completude | CONTROLES<br>(n=429),<br>completude | OR          | 95% CI             | p-valor           |
|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------|--------------------|-------------------|
| <b>IDADE (anos)<br/>(média±DP)</b> | 100%<br>40,1±13,9                   | 100%<br>32,2±11,4                   | -           | -                  | <b>&lt;0.0001</b> |
| <b>SEXO</b>                        | 100%                                | 100%                                |             |                    |                   |
| <b>Masculino n. (%)</b>            | 263 (57,6%)                         | 252 (58,7%)                         | 0,95        | 0,73 - 1,25        | 0,7193            |
| <b>Feminino n. (%)</b>             | 194 (42,4%)                         | 177 (41,3%)                         |             |                    |                   |
| <b>TABAGISMO</b>                   | 59,1%                               | 53,6%                               |             |                    |                   |
| <b>Sim n. (%)</b>                  | 67 (24,8%)                          | 26 (11,3%)                          | <b>2,59</b> | <b>1,57 - 4,20</b> | <b>0,0001</b>     |
| <b>Não n. (%)</b>                  | 203 (75,2%)                         | 204 (88,7%)                         |             |                    |                   |
| <b>ETILISMO</b>                    | 39,4%                               | 50,8%                               |             |                    |                   |
| <b>Sim n. (%)</b>                  | 79 (43,9%)                          | 50 (22,9%)                          | <b>2,63</b> | <b>1,71 - 4,01</b> | <b>&lt;0,0001</b> |
| <b>Não n. (%)</b>                  | 101 (56,1%)                         | 168 (77,1%)                         |             |                    |                   |
| <b>VACINAÇÃO BCG</b>               | 63,9%                               | 53,6%                               |             |                    |                   |
| <b>Sim n. (%)</b>                  | 253 (86,6%)                         | 218 (94,8%)                         | <b>0,36</b> | <b>0,19 - 0,70</b> | <b>0,0019</b>     |
| <b>Não n. (%)</b>                  | 39 (13,4%)                          | 12 (5,2%)                           |             |                    |                   |

Legenda: As associação entre sexo, tabagismo, etilismo e BCG entre pacientes e controles foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ). A comparação das idades entre os grupos foi realizada pelo teste Mann-Whitney. Valores  $p < 0,05$  foram considerados significativos e destacados em negrito. OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%. Completude refere-se à proporção de indivíduos com informação disponível para cada variável em relação ao total de participantes de cada grupo.

No grupo de indivíduos com TB, 444 participantes informaram sua naturalidade. Desses, 385 eram provenientes do estado do Amazonas (86,7%) sendo a maioria natural da capital Manaus (232 indivíduos; 60,3%), enquanto os demais eram oriundos do interior do estado. Além disso 40 pacientes (9,0%) declararam ser do estado do Pará, e 19 eram naturais de outros estados, correspondendo a 4,3% do total pacientes. Quanto à naturalidade dos participantes do grupo controle, foi possível obter essa informação apenas para os contatos saudáveis. Entre eles, 228 declararam ser naturais de municípios do Amazonas (75,7%), sendo 173 provenientes de Manaus e 55 do interior do estado. Os demais participantes do grupo controle (24,3%) eram oriundos de outros estados.

Quanto ao sexo dos participantes, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes e o grupo controles, a maioria dos casos de TBP

incluídos neste estudo são em homens (57,6%). Dados epidemiológicos diversos confirmam esse perfil que indica que a maioria dos casos de tuberculose, em geral, ocorrem em homens. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, em 2024, cerca de 54%, ou aproximadamente 5,8 milhões dos casos de tuberculose ocorreram em homens adultos (maiores que 15 anos de idade), enquanto 35%, ou aproximadamente 3,7 milhões ocorreram em mulheres adultas (WHO, 2025).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde apontam que dos mais de 84 mil novos casos de tuberculose detectados em 2024 no país, cerca de 57 mil foram diagnosticados em homens (68,2%), enquanto aproximadamente 26,7 mil (31,8%) foram em mulheres (Brasil, 2025). Localmente, dados disponibilizados pela Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, informam que no ano de 2025, 64,6% dos novos casos de TB foram diagnosticados em homens, ao passo que 35,4% foram registrados em mulheres. Já em Manaus, uma das capitais líderes em incidência de TB no Brasil no ano de 2024, 64,7% dos novos casos de TB registrados em 2025 foram em indivíduos do sexo masculino (FVS-RCP, 2025).

Essa ligação da TB com o sexo masculino pode ser atribuída a alguns fatores, desde aspectos biológicos, como caracteres genéticos e hormonais inerentes ao sexo masculino (Dabitao; Bishai, 2023), até questões socioculturais e comportamentais da nossa sociedade, por exemplo, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, os homens compõem a maior parte da força de trabalho no Brasil (Brasil, 2024), o que os coloca em maior risco de contato com o bacilo da TB nos diferentes ambientes em que circula, como transportes públicos, terminais de ônibus, entre outros tipos de aglomerações. Além disso, práticas de risco para a TB como tabagismo e etilismo são mais praticados por homens em comparação às mulheres (Marçôa et al., 2018). Dessa maneira, é possível que esse conjunto de fatores ajudem a entender, ainda que em partes, porque em todo o mundo mais casos de TB ocorrem em homens do que em mulheres.

Em nosso estudo, houve diferença significativa entre os grupos no que diz respeito a idade. A idade mais elevada foi no grupo de pacientes (média de 40,1 anos) e está de acordo com outros dados epidemiológicos publicados no mundo. Dados da WHO (2025) apontam que os novos casos de TB diagnosticados em 2024 foram mais prevalentes na faixa etária entre 25 e 54 anos de idade, sendo que 89% dos casos ocorreram em adultos (maiores que 15 anos de idade) (WHO, 2025). No Brasil as faixas etárias mais acometidas foram, respectivamente, de 20-34 anos, seguidas da faixa de 35-49 anos (Brasil, 2025). No Amazonas, e em Manaus, as

faixas mais acometidas pelos novos casos de TB são de 20-39 anos, seguido da faixa de 40-59 anos, respectivamente (FVS-RCP, 2025).

Esses dados reforçam que a TB é principalmente associada aos indivíduos em idade economicamente ativa (Brasil, 2025), por conta da maior exposição ao agente etiológico nos ambientes de transporte, trabalho, entre outros contextos de aglomeração. A maior concentração de casos de TB em adultos também pode ser explicada pelo desenvolvimento de infecções latentes ao longo da vida, associada ao declínio progressivo do sistema imunológico, que favorece a reativação do *M. tuberculosis* e a progressão para a doença ativa. Esse declínio imunológico acomete diversos setores da imunidade, especialmente os linfócitos T, que são essenciais para a resposta e controle do bacilo (Caraux-Paz et al., 2021; Olmo-Fontánez et al., 2022).

O tabagismo ( $p = 0,0001$ ; OR= 2,59; IC95% = 1,57–4,20) e o etilismo ( $p < 0,0001$ ; OR= 2,63; IC95% = 1,71–4,01) foram detectados no presente estudo como fatores de risco ao desenvolvimento de TB. É amplamente conhecido que tanto o consumo de álcool quanto de cigarro pode favorecer o desenvolvimento da TB, em que vários estudos identificaram a associação do consumo dessas substâncias com o desenvolvimento da doença inclusive aqui no Brasil (Barletta-Naveca et al., 2016; Silva et al., 2017; Navya et al., 2019).

Possivelmente a associação dessas práticas com o desenvolvimento da TB ocorre em razão dos prejuízos imunológicos causados pela ação do álcool e dos componentes químicos do cigarro, que podem favorecer o bacilo ao causar prejuízos no sistema imune dos indivíduos, por exemplo, o álcool é capaz de diminuir a sobrevivência e a funcionalidade de células imunológicas (Szabo; Saha, 2015). Enquanto o tabagismo pode diminuir o *clearance* mucociliar de microrganismos, além de prejudicar nos macrófagos a fusão do fagossomo com o lisossomo, reduzindo o poder de eliminação do bacilo por parte desse fagócito (Chan et al., 2014; Strzelak et al., 2018). Paralelamente, o tabagismo tem sido associado ao desbalanço da polarização M1-M2 dos macrófagos alveolares, onde a exposição ao fumo é capaz de diminuir a expressão de genes do fenótipo M1, essenciais para a resposta anti-TB, seguido de aumento da expressão de genes do fenótipo M2 (permissivos ao bacilo) (Shaykhiev et al., 2009).

Em relação a vacinação BCG ( $p = 0,0019$ ; OR= 0,36; IC95% = 0,19–0,70), ainda que tenha sido identificado um efeito protetor dessa vacina contra a TB no presente estudo, é necessário destacar a real indicação dessa vacina que tem sua administração recomendada em crianças de até 5 anos com o objetivo de prevenir formas graves da TB como a meningite

tuberculosa e TB miliar, não possuindo eficácia elevada na prevenção das formas mais comuns de TB como a forma pulmonar em adultos (Sociedade Brasileira de Imunizações, 2021).

A diferença na eficiência da vacina de BCG contra TBP entre adultos e crianças está associada principalmente às diferenças imunológicas entre esses dois grupos. Nas crianças a BCG induz uma resposta imune robusta tipo Th1, caracterizada pela ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, produção de IFN- $\gamma$  e ativação de macrófagos. Em adultos a resposta vacinal pode ser atenuada por fatores como a exposição prévia a micobactérias não tuberculosas, bem como em razão do envelhecimento imunológico, que possui uma capacidade menor de produção de células T de memória, o que compromete a durabilidade e a intensidade da proteção conferida pela BCG. Em indivíduos idosos esse cenário é agravado em razão do processo de imunossenescência (Naqvi et al., 2024).

Entretanto, uma vez que a TB é uma doença multifatorial (incluindo fatores sociais, biológicos e ambientais), a vacina de BCG pode, em conjunto com demais fatores, contribuir para que indivíduos imunizados possam ter uma proteção maior contra o desenvolvimento de TB. Isso ocorre porque a BCG é capaz de induzir respostas imunes tanto inatas quanto adaptativas, promovendo a ativação de macrófagos, células dendríticas e linfócitos T com produção de citocinas essenciais para o controle do *M. tuberculosis*. Além disso, evidências demonstram que a BCG pode induzir um estado de imunidade treinada, caracterizado por reprogramação epigenética de células da imunidade, que contribui para respostas mais rápidas e eficazes em face de infecções repetidas. Ou seja, mesmo que não produza proteção duradoura contra a TB, essa vacina pode modular a resposta imune do hospedeiro, reduzindo a probabilidade de desenvolvimento de doença ativa, e contribuindo em parte para desfechos mais favoráveis (Naqvi et al., 2024).

## 6.2. Análise das variantes gênicas

Na genotipagem da variante **rs6505162** todas as 457 amostras do grupo de pacientes amplificaram adequadamente. No grupo controle, 427 das 429 amostras apresentaram amplificação, resultando em um total de 884 genótipos obtidos para essa variante (rendimento de 99,8%). Para as variantes **rs4713693**, **rs2910164** e **rs895819** todas as amostras de pacientes e controles amplificaram (100%). Os genótipos de cada amostra foram definidos segundo as curvas de amplificação geradas (**Figuras 01, 02, 03 e 04**).

A partir dos resultados das genotipagens, foram realizadas as análises de associação considerando os diferentes modelos genéticos, bem como a análise de associação entre os alelos das variantes e a TBP. Além disso, avaliou-se a possível associação entre os genótipos dos SNVs e a forma multibacilar da doença.

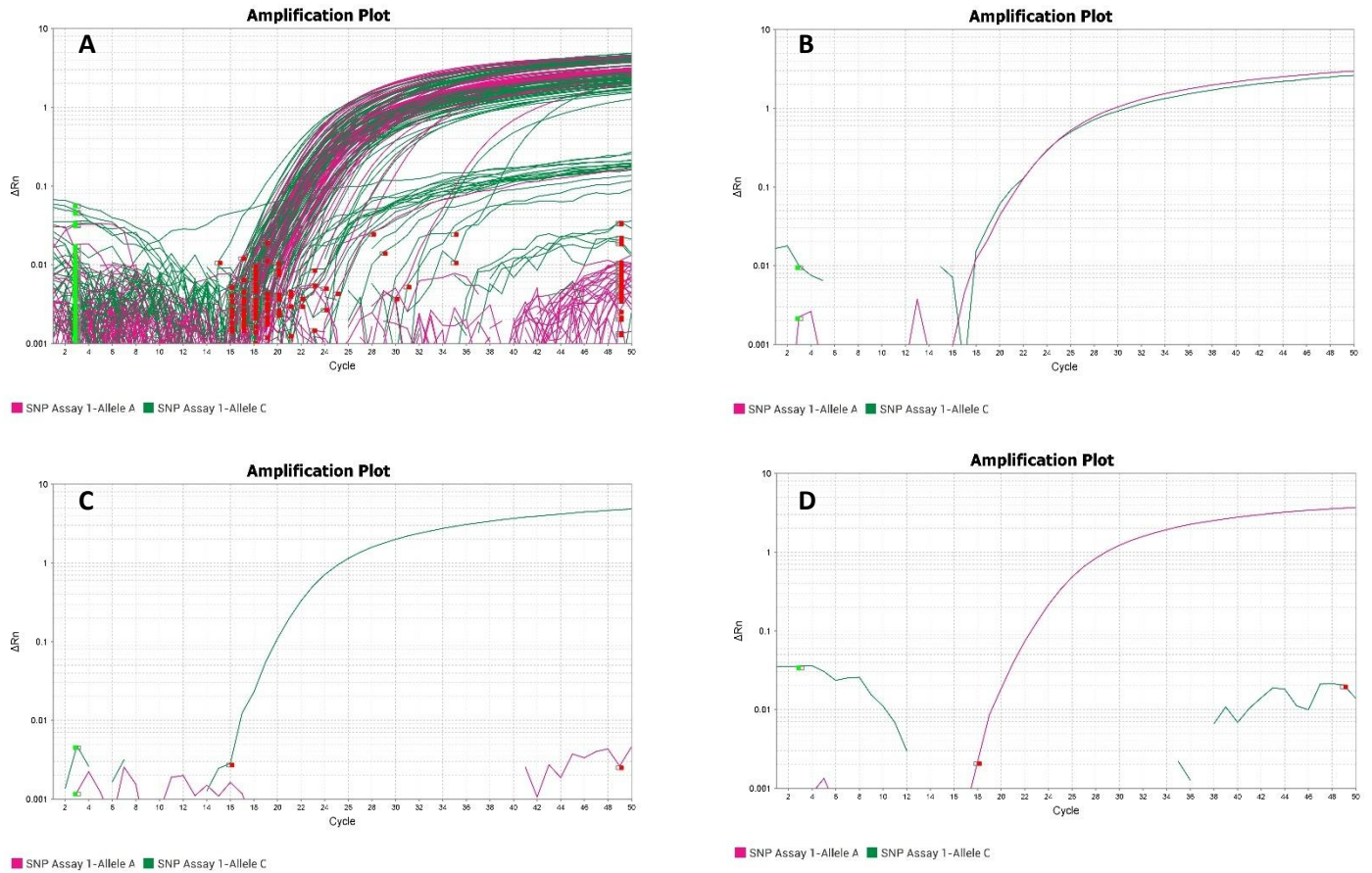
Tanto o grupo controle, quanto o de pacientes de todas as variantes estudadas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p\text{-EHW} > 0,05$ ) (**Quadro 03**), indicando que a amostragem foi adequada para a realização das análises de associação. A presença de amostras em equilíbrio sugere ausência de distorções importantes nas frequências dos genótipos, ocasionadas, por exemplo, por erros de genotipagem e problemas de seleção de participantes, como na inclusão de indivíduos oriundos de *pools* genéticos diferentes (Saadat, 2024).

**Quadro 3.** Avaliação do Equilíbrio de Hardy Weinberg ( $p\text{-EHW}$ ) dos grupos de controles e de pacientes para as variantes estudadas.

| SNV              | $p\text{-valor}$<br>(Todos) | $p\text{-valor}$<br>Controles | $p\text{-valor}$<br>contatos sem TB | $p\text{-valor}$<br>doadores | $p\text{-valor}$ Casos<br>TBP |
|------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <b>rs6505162</b> | 0.5006                      | 0,6977                        | 0,8173                              | 0,7211                       | 0,6400                        |
| <b>rs4713693</b> | 0.4912                      | 0,2060                        | 0,3824                              | 0,4285                       | 0,9115                        |
| <b>rs2910164</b> | 0.7621                      | 1,0000                        | 0,8981                              | 0,8453                       | 0,6695                        |
| <b>rs895819</b>  | 0.2906                      | 1,0000                        | 0,5188                              | 0,4478                       | 0,1351                        |

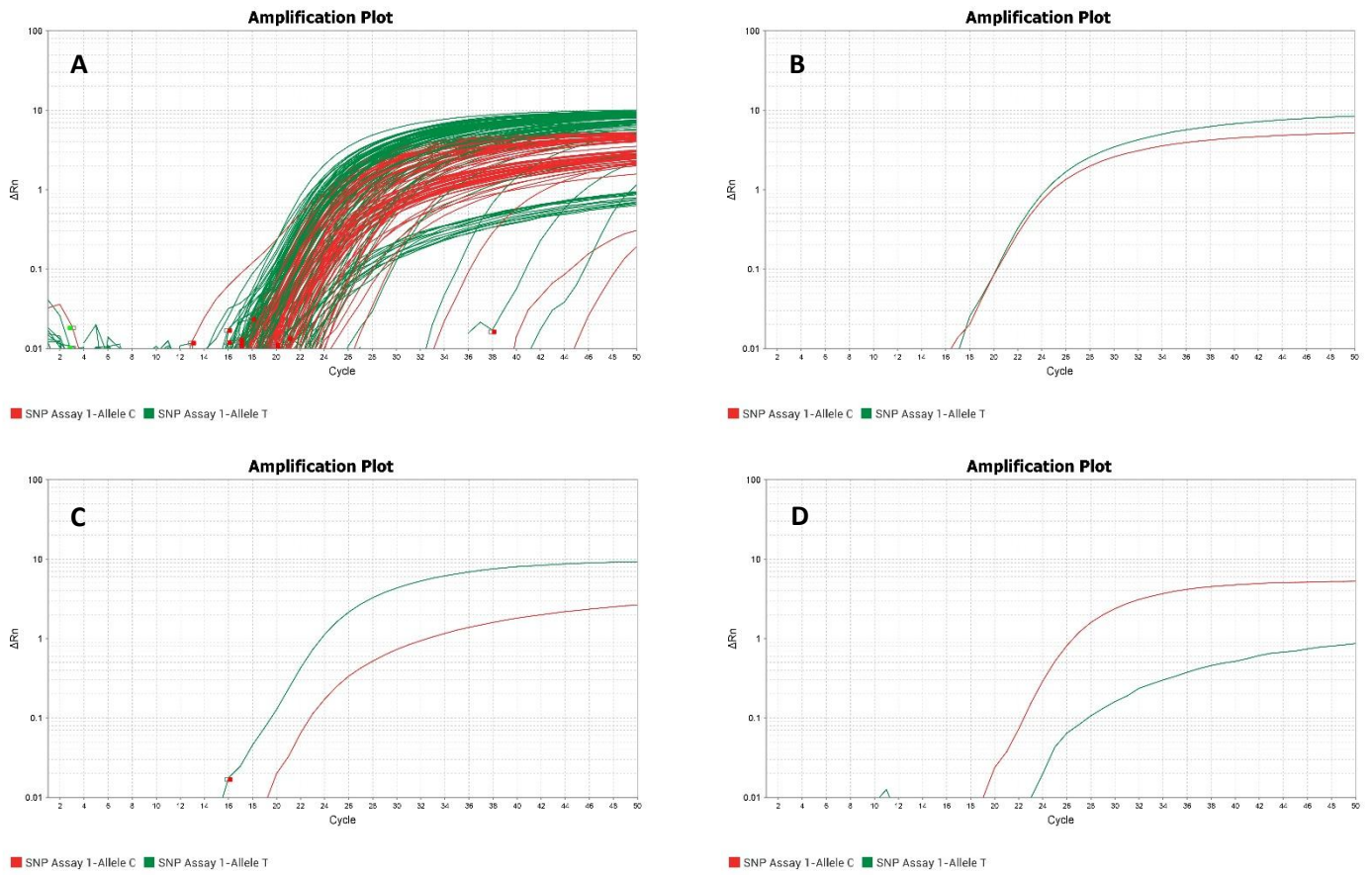
Legenda: Resultado do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para as variantes genéticas estudadas. O HWE foi avaliado no conjunto total de participantes, no grupo controle, e, separadamente, nos contatos saudáveis, nos doadores, e nos casos de TBP. Todas as variantes apresentaram  $p > 0,05$  em todos os grupos, indicando ausência de desvio do equilíbrio.

**Figura 1.** Curvas de amplificação geradas para a variante rs6505162.



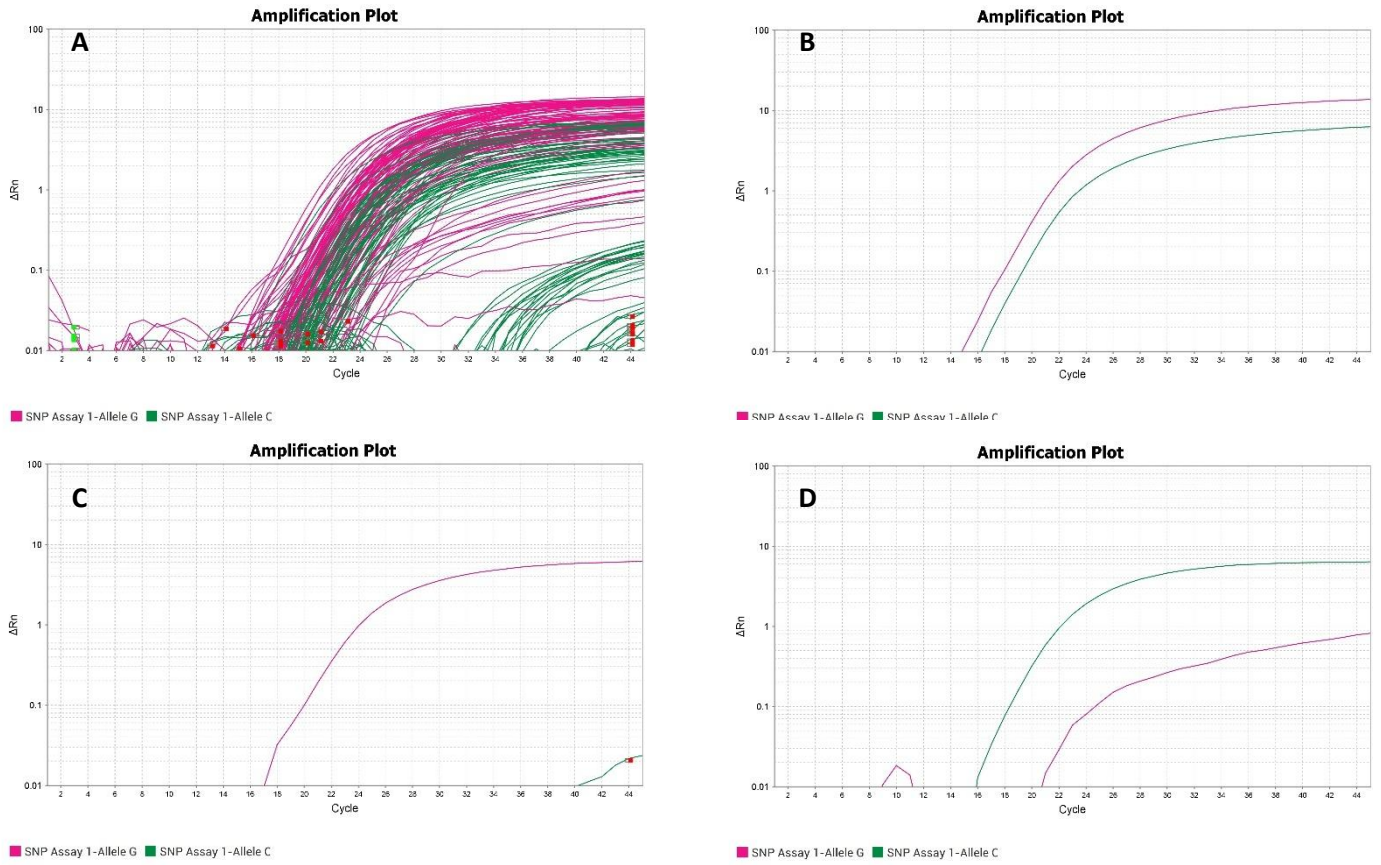
**Legenda:** Curvas de amplificação geradas para a variante rs6505162. **(A)** Curvas de amplificação geradas para várias amostras de uma placa de 96 poços; **(B)** Curva de amplificação do genótipo heterozigoto (A/C); **(C)** Curva de amplificação do genótipo homozigoto para o alelo C (C/C); **(D)** Curva de amplificação do genótipo homozigoto para o alelo A (A/A).

**Figura 2.** Curvas de amplificação geradas para a variante rs4713693.



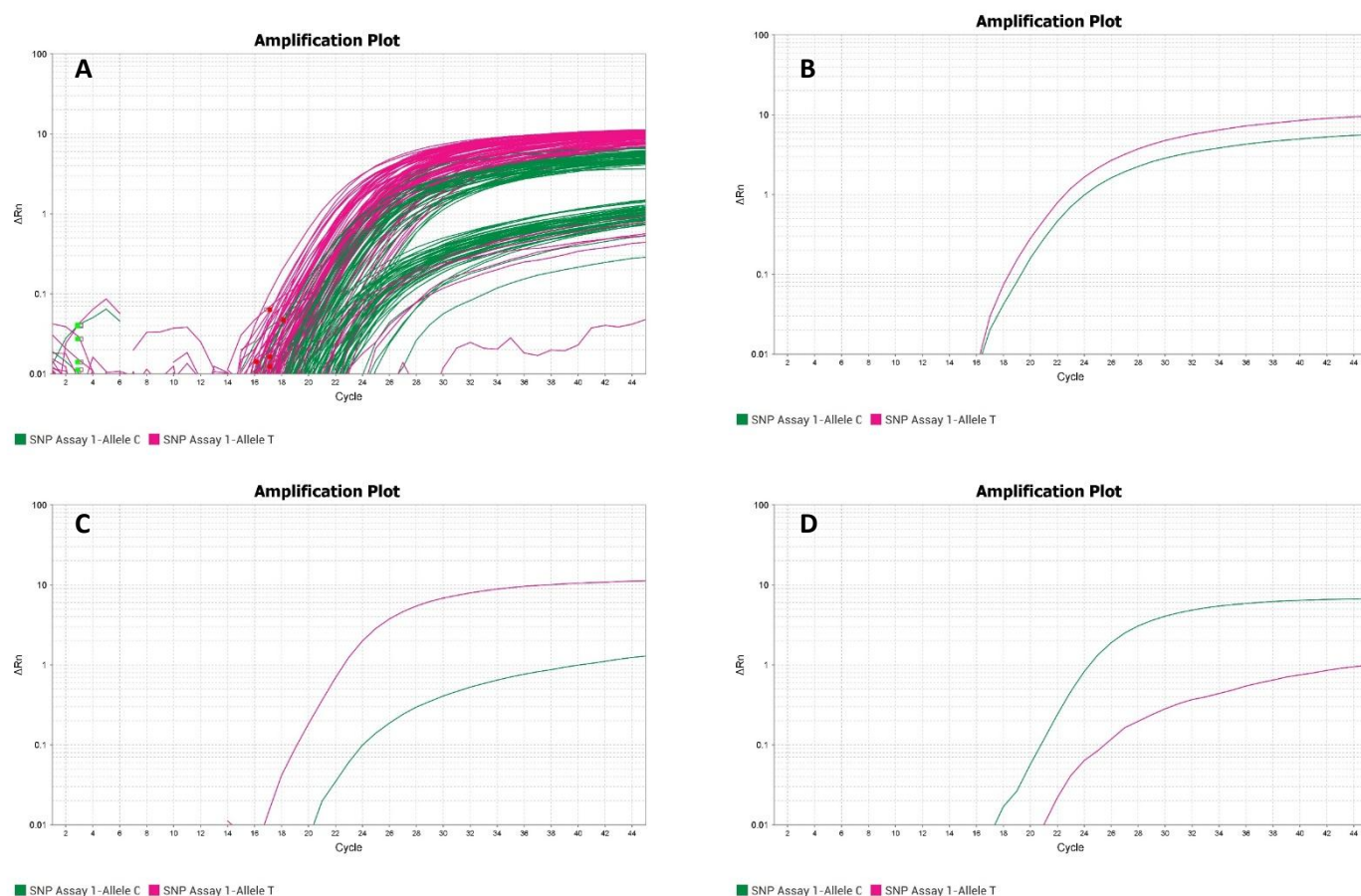
**Legenda:** Curvas de amplificação geradas para a variante rs4713693. **(A)** Curvas de amplificação geradas para várias amostras de uma placa de 96 poços; **(B)** Curva de amplificação do genótipo heterozigoto (C/T); **(C)** Curva de amplificação do genótipo homozigoto para o alelo T (T/T); **(D)** Curva de amplificação do genótipo homozigoto para o alelo C (C/C).

**Figura 3.** Curvas de amplificação geradas para a variante rs2910164.



**Legenda:** Curvas de amplificação geradas para a variante rs2910164. **(A)** Curvas de amplificação geradas para várias amostras de uma placa de 96 poços; **(B)** Curva de amplificação do genótipo heterozigoto (C/G); **(C)** Curva de amplificação do genótipo homozigoto para o alelo G (G/G); **(D)** Curva de amplificação do genótipo homozigoto para o alelo C (C/C).

**Figura 4.** Curvas de amplificação geradas para a variante rs895819.



**Legenda:** Curvas de amplificação geradas para a variante rs895819. **(A)** Curvas de amplificação geradas para várias amostras de uma placa de 96 poços; **(B)** Curva de amplificação do genótipo heterozigoto (C/T); **(C)** Curva de amplificação do genótipo homozigoto para o alelo T (T/T); **(D)** Curva de amplificação do genótipo homozigoto para o alelo C (C/C).

Embora os ensaios de genotipagem por sondas TaqMan utilizem sondas alelo-específicas, é importante considerar que as diferentes sondas para cada alelo de um SNV diferem entre si apenas em uma única base nitrogenada, enquanto o restante da sequência flanqueadora é idêntica. Dessa forma, segundo informações disponibilizadas pela Thermo Fisher Scientific (2014), dependendo do contexto da sequência ao redor da variante, pode ocorrer ligação residual da sonda não correspondente ao alelo presente, resultando em uma amplificação de menor intensidade desse fluoróforo, mesmo em amostras homozigotas. Isso ocorre em menor ou maior grau para cada sonda, dependendo das características químicas da sequência, por exemplo, o conteúdo de GC e a posição da base polimórfica na sequência.

Nesse contexto, a amplificação da sonda não correspondente tende a ser fraca ou residual, enquanto a fluorescência correspondente ao alelo verdadeiro apresenta um sinal mais forte e predominante. Assim, a definição do genótipo não se baseia na ausência absoluta do sinal da sonda oposta, mas na razão da intensidade dos fluoróforos e na formação de clusters (Thermo Fisher Scientific, 2014). É por essa razão que na amplificação dos SNVs rs4713693, rs2910164 e rs895819 pode-se observar a presença de curvas residuais nas amostras homozigotas exemplificadas nas **Figuras 02, 03 e 04**, respectivamente, ao passo que, nas curvas de amplificação do alelo rs6505162, podemos observar que as amplificações residuais apresentam fluorescência menos significativa.

### 6.2.1. Análise da variante rs6505162

Após ajuste pelas variáveis sexo e idade, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas distribuições genótípicas do SNV rs6505162 entre os grupos controle e pacientes, resultado que permaneceu não significativo após correção para múltiplas comparações pelo método de Bonferroni (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Resultados das análises de associação do SNV rs6505162 com TBP segundo diferentes modelos genéticos, após o ajuste por “sexo” e “idade” e valor de  $p$  com e sem correção de Bonferroni.

| Modelo               | Controles<br>n (%) | TBP<br>n (%) | OR (IC95%) <sup>adj</sup> | $p$ -<br>valor <sup>adj</sup> | $p$ -<br>valor <sup>bonf</sup> | AIC <sup>adj</sup> |
|----------------------|--------------------|--------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| <b>Codominante</b>   |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| C/C                  | 116 (27,2)         | 118 (25,8)   | 1,00                      | 0,9087                        | 1,000                          | 1154,1             |
| A/C                  | 218 (51,1)         | 234 (51,2)   | 0,99 (0,71–1,37)          |                               |                                |                    |
| A/A                  | 93 (21,8)          | 105 (23,0)   | 1,06 (0,72–1,58)          |                               |                                |                    |
| <b>Dominante</b>     |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| C/C                  | 116 (27,2)         | 118 (25,8)   | 1,00                      | 0,9567                        | 1,000                          | 1152,3             |
| A/C–A/A              | 311 (72,8)         | 339 (74,2)   | 1,01 (0,74–1,38)          |                               |                                |                    |
| <b>Recessivo</b>     |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| C/C–A/C              | 334 (78,2)         | 352 (77,0)   | 1,00                      | 0,6684                        | 1,000                          | 1152,1             |
| A/A                  | 93 (21,8)          | 105 (23,0)   | 1,08 (0,77–1,50)          |                               |                                |                    |
| <b>Overdominante</b> |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| C/C–A/A              | 209 (48,9)         | 223 (48,8)   | 1,00                      | 0,7571                        | 1,000                          | 1152,2             |
| A/C                  | 218 (51,1)         | 234 (51,2)   | 0,96 (0,73–1,26)          |                               |                                |                    |
| <b>Log-aditivo</b>   |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| 0,1,2                | 427 (48,3)         | 457 (51,7)   | 1,03 (0,84–1,26)          | 0,7719                        | 1,000                          | 1152,2             |

**Legenda:** TBP: tuberculose pulmonar; OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%; AIC: *Akaike information criterion*; *adj*: valores ajustados pelas variáveis “sexo” e “idade”;  $p$ -valor<sup>bonf</sup>: valor de  $p$  após correção de Bonferroni.

Também foi testada separadamente a possível associação desse SNV com os dois subgrupos que compõem o grupo controle: contatos sem TBP e doadores. Da mesma forma que

na análise conjunta dos controles, não foi observada associação significativa em nenhuma dessas comparações (**Tabela 03**).

**Tabela 3.** Resultados das análises de associação do SNV rs6505162 com TBP, considerando separadamente os subgrupos controle (contatos saudáveis e doadores), com valores ajustados por “sexo” e “idade” e valor de *p* corrigido por Bonferroni.

| Modelo                       | TBP<br>n (%) | Contatos<br>n (%) | OR(IC95%)<br>Contatos | <i>p</i> -valor<br>Contatos | <i>p</i> -<br>valor <sup>bonf</sup> | Doadores<br>n (%) | OR(IC95%)<br>Doadores | <i>p</i> -valor<br>Doadores | <i>p</i> -<br>valor <sup>bonf</sup> |
|------------------------------|--------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Codominante</b>           | <b>N=457</b> | <b>N=299</b>      |                       |                             |                                     | <b>N=128</b>      |                       |                             |                                     |
| C/C                          | 118 (25,8)   | 78 (26,1)         | 1,00                  | 0,9829                      | 1,000                               | 38 (29,7)         | 1,00                  | 0,6132                      | 1,000                               |
| A/C                          | 234 (51,2)   | 152 (50,8)        | 0,97 (0,67–1,39)      |                             |                                     | 66 (51,6)         | 1,10 (0,68–1,77)      |                             |                                     |
| A/A                          | 105 (23,0)   | 69 (23,1)         | 0,98 (0,63–1,52)      |                             |                                     | 24 (18,8)         | 1,34 (0,74–2,43)      |                             |                                     |
| <b>Dominante</b>             |              |                   |                       |                             |                                     |                   |                       |                             |                                     |
| C/C                          | 118 (25,8)   | 78 (26,1)         | 1,00                  | 0,8637                      | 1,000                               | 38 (29,7)         | 1,00                  | 0,5053                      | 1,000                               |
| A/C–A/A                      | 339 (74,2)   | 221 (73,9)        | 0,97 (0,69–1,37)      |                             |                                     | 90 (70,3)         | 1,17 (0,74–1,83)      |                             |                                     |
| <b>Recessivo</b>             |              |                   |                       |                             |                                     |                   |                       |                             |                                     |
| C/C–A/C                      | 352 (77,0)   | 230 (76,9)        | 1,00                  | 0,9909                      | 1,000                               | 104 (81,2)        | 1,00                  | 0,3646                      | 1,000                               |
| A/A                          | 105 (23,0)   | 69 (23,1)         | 1,00 (0,70–1,44)      |                             |                                     | 24 (18,8)         | 1,26 (0,76–2,10)      |                             |                                     |
| <b>Overdominante</b>         |              |                   |                       |                             |                                     |                   |                       |                             |                                     |
| C/C–A/A                      | 223 (48,8)   | 147 (49,2)        | 1,00                  | 0,8727                      | 1,000                               | 62 (48,4)         | 1,00                  | 0,8859                      | 1,000                               |
| A/C                          | 234 (51,2)   | 152 (50,8)        | 0,98 (0,72–1,32)      |                             |                                     | 66 (51,6)         | 0,97 (0,65–1,46)      |                             |                                     |
| <b>Log-aditivo<br/>0,1,2</b> | 457          | 299 (39,6)        | 0,99 (0,80–1,23)      | 0,9198                      | 1,000                               | 128 (21,9)        | 1,15 (0,86–1,55)      | 0,3382                      | 1,000                               |

**Legenda:** TBP: tuberculose pulmonar; OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%. A tabela apresenta os resultados das análises de associação do SNV rs6505162 com os subgrupos do grupo controle analisados separadamente: contatos saudáveis e doadores. Os valores apresentados já são ajustados pelas variáveis “sexo” e “idade”; *p*-valor<sup>bonf</sup>: valor de *p* após correção de Bonferroni.

Na análise realizada para verificar se algum genótipo ou modelo genético estaria associado à carga bacilar, não foi identificada qualquer associação entre esse SNV e o padrão da baciloscopia (**Tabela 04**).

**Tabela 4.** Associação do SNV rs6505162 com a carga bacilar sob diferentes modelos genéticos, com valores de *p* antes e após correção de Bonferroni.

| Modelo                      | Paucibacilar<br>n (%) | Multibacilar<br>n (%) | OR (IC95%)       | <i>p</i> -valor | <i>p</i> -<br>valor <sup>bonf</sup> | AIC   |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|-----------------|-------------------------------------|-------|
| <b>Codominante</b>          |                       |                       |                  |                 |                                     |       |
| C/C                         | 10 (37,0)             | 25 (28,1)             | 1,00             | 0,6483          | 1,000                               | 131,0 |
| A/C                         | 11 (40,7)             | 44 (49,4)             | 1,60 (0,60–4,29) |                 |                                     |       |
| A/A                         | 6 (22,2)              | 20 (22,5)             | 1,33 (0,41–4,30) |                 |                                     |       |
| <b>Dominante</b>            |                       |                       |                  |                 |                                     |       |
| C/C                         | 10 (37,0)             | 25 (28,1)             | 1,00             | 0,3811          | 1,000                               | 129,1 |
| A/C–A/A                     | 17 (63,0)             | 64 (71,9)             | 1,51 (0,61–3,73) |                 |                                     |       |
| <b>Recessivo</b>            |                       |                       |                  |                 |                                     |       |
| C/C–A/C                     | 21 (77,8)             | 69 (77,5)             | 1,00             | 0,9782          | 1,000                               | 129,9 |
| A/A                         | 6 (22,2)              | 20 (22,5)             | 1,01 (0,36–2,86) |                 |                                     |       |
| <b>Overdominante</b>        |                       |                       |                  |                 |                                     |       |
| C/C–A/A                     | 16 (59,3)             | 45 (50,6)             | 1,00             | 0,4266          | 1,000                               | 129,2 |
| A/C                         | 11 (40,7)             | 44 (49,4)             | 1,42 (0,59–3,40) |                 |                                     |       |
| <b>Log-aditivo</b><br>0,1,2 | 27 (23,3)             | 89 (76,7)             | 1,19 (0,65–2,18) | 0,5607          | 1,000                               | 129,5 |

**Legenda:** OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%; AIC: *Akaike information criterion*. O modelo estatístico considerou a forma multibacilar como desfecho, tendo a forma paucibacilar como referência. Os valores de OR indicam o risco de ser multibacilar segundo cada modelo genético; *p*-valor<sup>bonf</sup>: valor de *p* após correção de Bonferroni.

A variante rs6505162 está localizada no pré-miR-423, um miRNA previamente implicado na modulação da autofagia na infecção pelo *M. tuberculosis* (Tu et al., 2019), além de ter sido encontrado superexpresso em pacientes com tuberculose (Hashimoto et al., 2020; Hurtado et al., 2024). Estudos realizados com a população amazônica (Pará) associaram a variante rs6505162 tanto com a proteção contra a TBP (Leal et al., 2022), quanto com o risco de desenvolvimento de TB multidroga resistente (Athayde et al., 2024), sugerindo um papel complexo dessa variante no contexto da doença.

Considerando o aspecto funcional, poderia se esperar que o alelo C pudesse conferir algum grau de proteção contra a tuberculose, uma vez que esse alelo foi associado a menor produção do miR-423 maduro (Su et al., 2015), e que o miR-423 é capaz de favorecer a infecção pelo *M. tuberculosis* ao prejudicar a maturação do autofagossomo (Tu et al., 2019). No entanto, no presente estudo não foi encontrada associação entre a variante rs6505162 e a tuberculose pulmonar na população estudada, em nenhum dos modelos genéticos avaliados, assim como no trabalho de Zhang et al. (2021b), o qual também não identificou associação dessa variante com a tuberculose pulmonar em indivíduos recrutados na China.

Quanto a análise de associação de rs6505162 com a carga bacilar (paucibacilar ou multibacilar), também não foram identificadas associações com essa característica clínica no

presente estudo. Embora um estudo tenha identificado que o alelo C dessa variante contribui para um melhor *clearance* viral em indivíduos infectados com HBV (Al-Qahtani et al., 2017), esses achados não foram reproduzidos no contexto da tuberculose pulmonar. Essa diferença pode ser explicada, em partes, por fatores populacionais, uma vez que o trabalho de Al-Qahtani et al. foi realizado com pacientes iranianos, e, principalmente, pelas diferentes entidades clínicas envolvidas, já que os efeitos de SNVs sobre fenótipos são altamente dependentes tanto da população de estudo quanto do agente etiológico analisado.

Apesar de o estudo de Leal et al. (2022) ter identificado associação de rs6505162 com a TBP em indivíduos recrutados no Pará, uma população geograficamente próxima à estudada na presente tese, os resultados foram distintos. Uma possível explicação refere-se a diferenças no desenho do estudo, incluindo tamanho amostral, pois no trabalho de Leal et al. (2022) foram incluídos 190 pacientes com tuberculose, e 172 indivíduos do grupo controle, enquanto em nesse estudo, foram incluídos 457 pacientes e 427 indivíduos no grupo controle, o que pode impactar as análises de associação e os resultados obtidos.

Além do tamanho amostral, outras causas que podem interferir na reprodutibilidade de estudos de associação genética incluem falhas técnicas como erros de genotipagem ou de classificação dos indivíduos nos grupos analisados. Ademais, fatores populacionais e contextuais também podem impactar na reprodutibilidade, por exemplo, o efeito de um SNV, mesmo que verdadeiramente associado com uma determinada doença, pode depender de interações com outros genes, que, caso possuam uma frequência diferente entre as populações, resulta em achados diferentes, além disso, a interação gene/ambiente também pode ocorrer, onde o efeito de um determinado SNV só ocorre sob certas condições ambientais (Li; Meyre, 2012).

### **6.2.2. Análise da variante rs4713693**

Ao se considerar os genótipos obtidos após o ajuste pelas variáveis “sexo” e “idade”, foi observado uma associação inicial nos modelos dominante ( $p = 0,0278$ ; OR = 0,73; IC95% = 0,55–0,97) e log-aditivo ( $p = 0,0291$ ; OR = 0,79; IC95% = 0,64–0,98). Entretanto, após a aplicação da correção de Bonferroni, essas associações não permaneceram estatisticamente significativas (**Tabela 05**).

**Tabela 4.** Resultados das análises de associação do SNV rs4713693 com TBP segundo diferentes modelos genéticos, após o ajuste por “sexo” e “idade” e valor de  $p$  com e sem correção de Bonferroni.

| Modelo               | Controles<br>n (%) | TBP<br>n (%) | OR (IC95%) <sup>adj</sup> | $p$ -<br>valor <sup>adj</sup> | $p$ -<br>valor <sup>bonf</sup> | AIC <sup>adj</sup> |
|----------------------|--------------------|--------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| <b>Codominante</b>   |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| T/T                  | 174 (40,6)         | 224 (49,0)   | 1,00                      | 0,0798                        | 1,000                          | 1150,8             |
| C/T                  | 208 (48,5)         | 191 (41,8)   | 0,75 (0,56–1,00)          |                               |                                |                    |
| C/C                  | 47 (11,0)          | 42 (9,2)     | 0,67 (0,41–1,08)          |                               |                                |                    |
| <b>Dominante</b>     |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| T/T                  | 174 (40,6)         | 224 (49,0)   | 1,00                      | <b>0,0278</b>                 | 0,556                          | 1149,0             |
| C/T–C/C              | 255 (59,4)         | 233 (51,0)   | <b>0,73 (0,55– 0,97)</b>  |                               |                                |                    |
| <b>Recessivo</b>     |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| T/T–C/T              | 382 (89,0)         | 415 (90,8)   | 1,00                      | 0,2680                        | 1,000                          | 1152,6             |
| C/C                  | 47 (11,0)          | 42 (9,2)     | 0,77 (0,48–1,22)          |                               |                                |                    |
| <b>Overdominante</b> |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| T/T–C/C              | 221 (51,5)         | 266 (58,2)   | 1,00                      | 0,1254                        | 1,000                          | 1151,5             |
| C/T                  | 208 (48,5)         | 191 (41,8)   | 0,80 (0,61–1,06)          |                               |                                |                    |
| <b>Log-aditivo</b>   |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| 0,1,2                | 429 (48,4)         | 457 (51,6)   | <b>0,79 (0,64–0,98)</b>   | <b>0,0291</b>                 | 0,582                          | 1149,1             |

**Legenda:** TBP: tuberculose pulmonar; OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%; AIC: *Akaike information criterion*; *adj*: valores ajustados pelas variáveis “sexo” e “idade”;  $p$ -valor<sup>bonf</sup>: valor de  $p$  após correção de Bonferroni.

Realizou-se posteriormente a análise comparando individualmente o grupo de pacientes com cada um dos dois subgrupos que compõem os controles: contatos e doadores. Observou-se um padrão inicial de associação na comparação entre pacientes e contatos nos modelos codominante (OR = 0,69; IC95%: 0,50–0,96;  $p$  = 0,0413), dominante (OR = 0,68; IC95%: 0,50–0,92;  $p$  = 0,0132) e log-aditivo (OR = 0,75; IC95%: 0,59–0,95;  $p$  = 0,0149); entretanto, essas associações não permaneceram significativas após a correção de Bonferroni. Também não foram observadas associações na comparação entre pacientes e doadores (**Tabela 6**).

**Tabela 5.** Resultados das análises de associação do SNV rs4713693 com TBP, considerando separadamente os subgrupos controle (contatos saudáveis e doadores), com valores ajustados por “sexo” e “idade” e valor de  $p$  corrigido por Bonferroni.

| Modelo                      | TBP n (%)  | Contatos n (%) | OR(IC95%)<br>Contatos   | $p$ -valor<br>Contatos | $p$ -<br>valor <sup>bonf</sup> | Doadores n (%) | OR(IC95%)<br>Doadores | $p$ -valor<br>Doadores | $p$ -<br>valor <sup>bonf</sup> |
|-----------------------------|------------|----------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------|----------------|-----------------------|------------------------|--------------------------------|
| <b>Codominante</b>          | N=457      | N=301          |                         |                        |                                | N=128          |                       |                        |                                |
| T/T                         | 224 (49,0) | 120 (39,9)     | 1,00                    | <b>0,0413</b>          | 0,826                          | 54 (42,2)      | 1,00                  | 0,6593                 | 1,000                          |
| C/T                         | 191 (41,8) | 146 (48,5)     | <b>0,69 (0,50–0,96)</b> |                        |                                | 62 (48,4)      | 0,82 (0,54–1,27)      |                        |                                |
| C/C                         | 42 (9,2)   | 35 (11,6)      | 0,61 (0,36–1,04)        |                        |                                | 12 (9,4)       | 0,83 (0,40–1,74)      |                        |                                |
| <b>Dominante,</b>           |            |                |                         |                        |                                |                |                       |                        |                                |
| T/T                         | 224 (49,0) | 120 (39,9)     | 1,00                    | <b>0,0132</b>          | 0,264                          | 54 (42,2)      | 1,00                  | 0,3616                 | 1,000                          |
| C/T–C/C                     | 233 (51,0) | 181 (60,1)     | <b>0,68 (0,50–0,92)</b> |                        |                                | 74 (57,8)      | 0,83 (0,55–1,25)      |                        |                                |
| <b>Recessivo</b>            |            |                |                         |                        |                                |                |                       |                        |                                |
| T/T–C/T                     | 415 (90,8) | 266 (88,4)     | 1,00                    | 0,2279                 | 1,000                          | 116 (90,6)     | 1,00                  | 0,8122                 | 1,000                          |
| C/C                         | 42 (9,2)   | 35 (11,6)      | 0,73 (0,44–1,21)        |                        |                                | 12 (9,4)       | 0,92 (0,45–1,85)      |                        |                                |
| <b>Overdominante</b>        |            |                |                         |                        |                                |                |                       |                        |                                |
| T/T–C/C                     | 266 (58,2) | 155 (51,5)     | 1,00                    | 0,0808                 | 1,000                          | 66 (51,6)      | 1,00                  | 0,4382                 | 1,000                          |
| C/T                         | 191 (41,8) | 146 (48,5)     | 0,76 (0,56–1,03)        |                        |                                | 62 (48,4)      | 0,85 (0,57–1,28)      |                        |                                |
| <b>Log-aditivo</b><br>0,1,2 | 457        | 301 (39,6)     | <b>0,75 (0,59–0,95)</b> | <b>0,0149</b>          | 0,298                          | 128 (21,9)     | 0,88 (0,64–1,20)      | 0,4178                 | 1,000                          |

**Legenda:** TBP: tuberculose pulmonar; OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%. A tabela apresenta os resultados das análises de associação do SNV rs4713693 com os subgrupos do grupo controle analisados separadamente: contatos saudáveis e doadores. Os valores apresentados já são ajustados pelas variáveis “sexo” e “idade”;  $p$ -valor<sup>bonf</sup>: valor de  $p$  após correção de Bonferroni.

Em seguida foi realizada a análise dessa variante para avaliar sua possível associação com a carga bacilar, e verificou-se que essa associação não ocorre (**Tabela 7**).

**Tabela 6.** Associação do SNV rs4713693 com a carga bacilar sob diferentes modelos genéticos, com valores de  $p$  antes e após correção de Bonferroni.

| Modelo                      | Paucibacilar n (%) | Multibacilar n (%) | OR (IC95%)       | $p$ -<br>valor | $p$ -<br>valor <sup>bonf</sup> | AIC   |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|------------------|----------------|--------------------------------|-------|
| <b>Codominante</b>          |                    |                    |                  |                |                                |       |
| T/T                         | 12 (44,4)          | 46 (51,7)          | 1,00             | 0,4179         | 1,000                          | 130,1 |
| C/T                         | 10 (37,0)          | 35 (39,3)          | 0,91 (0,35–2,35) |                |                                |       |
| C/C                         | 5 (18,5)           | 8 (9,0)            | 0,42 (0,12–1,51) |                |                                |       |
| <b>Dominante</b>            |                    |                    |                  |                |                                |       |
| T/T                         | 12 (44,4)          | 46 (51,7)          | 1,00             | 0,5095         | 1,000                          | 129,4 |
| C/T–C/C                     | 15 (55,6)          | 43 (48,3)          | 0,75 (0,31–1,78) |                |                                |       |
| <b>Recessivo</b>            |                    |                    |                  |                |                                |       |
| T/T–C/T                     | 22 (81,5)          | 81 (91,0)          | 1,00             | 0,1910         | 1,000                          | 128,2 |
| C/C                         | 5 (18,5)           | 8 (9,0)            | 0,43 (0,13–1,46) |                |                                |       |
| <b>Overdominante</b>        |                    |                    |                  |                |                                |       |
| T/T–C/C                     | 17 (63,0)          | 54 (60,7)          | 1,00             | 0,8304         | 1,000                          | 129,8 |
| C/T                         | 10 (37,0)          | 35 (39,3)          | 1,10 (0,45–2,68) |                |                                |       |
| <b>Log-aditivo</b><br>0,1,2 | 27 (23,3)          | 89 (76,7)          | 0,70 (0,38–1,30) | 0,2667         | 1,000                          | 128,6 |

**Legenda:** OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%; AIC: *Akaike information criterion*. O modelo estatístico considerou a forma multibacilar como desfecho, tendo a forma paucibacilar como referência. Os valores de OR indicam o risco de ser multibacilar segundo cada modelo genético;  $p$ -valor<sup>bonf</sup>: valor de  $p$  após correção de Bonferroni.

A variante rs4713693 está no *enhancer* que interfere na expressão do miR-1275. Esse miRNA já foi encontrado superexpresso em cultura de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* (Das et al., 2013). Apesar de limitados estudos envolvendo esse miRNA e a tuberculose, um trabalho realizado com modelo de infecção por Influenza A mostrou que o miR-1275 é capaz de modular negativamente a via de sinalização envolvendo *MAPK3* e *IRAK1*, comprometendo a inflamação (Buggele et al., 2012).

Em cânceres o miR-1275 tem sido implicado em vias de sinalização como *MAPK*, *ERK/JNK* e *Wnt*, influenciando processos como apoptose, proliferação celular e progressão tumoral (Chong et al., 2022). Tais vias, também estão relacionadas com a TBP, por interferirem na produção de citocinas-chave, como IL-1 $\beta$ , TNF e IL-6, IL-12 e IFN- $\gamma$ , além de promover a apoptose de macrófagos infectados por *M. tuberculosis* (Villaseñor et al., 2017).

Já em um estudo com câncer pancreático, foi identificado que ambientes de hipóxia reduzem a produção de miR-1275 em células Natural Killers (NK-92), o que leva a redução da atividade citotóxica dessas células, com a diminuição da produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e perforina nessas células (Ou et al., 2023). Esses achados apresentam características paralelas com a TBP, pois a hipóxia também é uma característica das lesões granulomatosas do tecido pulmonar, causado pelo *M. tuberculosis*, além disso, a ação das células NK são fundamentais para o controle da infecção.

Nas análises ajustadas do presente estudo, encontrou-se associação do alelo C com proteção no modelo genético dominante (C/T+C/C vs. T/T) contra a TBP ( $p = 0,0278$ ; OR = 0,73; 95%IC = 0,55– 0,97), o que indica que os portadores de pelo menos uma cópia do alelo C teriam uma redução de 27% na *odds* de desenvolverem a doença em comparação com os não portadores. Esse foi o modelo genético que melhor explicou a associação, por apresentar o menor valor de AIC entre os modelos avaliados (AIC: 1149,0). Além disso, no modelo log-aditivo também foi encontrada associação com proteção contra a TBP ( $p = 0,0291$ ; OR = 0,79; 95%IC = 0,64–0,98). Entretanto, após a aplicação da correção de Bonferroni, essas associações não permaneceram estatisticamente significativas.

No modelo dominante os portadores de pelo menos uma cópia do alelo de menor frequência são agrupados, e comparados aos homozigotos do alelo de referência, indicando que uma única cópia do alelo é suficiente para influenciar o risco à doença. Já o modelo log-aditivo assume que cada cópia a mais do alelo de menor frequência (0, 1, 2) aumenta ou diminui a log-odds de desenvolver a doença (Zeng et al., 2015; Liu et al., 2021b).

Embora a associação com efeito protetor do alelo C tenha sido observado nos modelos dominantes e log-aditivo, essa associação não foi detectada no modelo recessivo e não se manteve após a correção para múltiplas comparações. No modelo dominante, com o agrupamento dos heterozigotos e homozigotos do alelo C, ocorre o aumento do poder estatístico da análise. Por sua vez, o modelo recessivo compara exclusivamente os indivíduos homozigotos C/C com os portadores do alelo T (T/T+C/T), diminuindo o poder estatístico, pela baixa frequência do genótipo C/C na população estudada. Além disso, é possível que o efeito de proteção se manifeste predominantemente em heterozigose, e a adição de uma segunda cópia do alelo C não resulte em um efeito mais potente. Nesse contexto, o modelo log-aditivo é capaz de perceber principalmente a diferença entre T/T (0) e C/T (1). Mesmo que o efeito C/C (2) não seja tão forte, o fato de o heterozigoto já apresentar proteção permite que esse modelo detecte a associação (Zeng et al., 2015; Liu et al., 2021b).

Na comparação separada entre pacientes e contatos sem TBP, observou-se um padrão inicial de associação com proteção, além dos modelos previamente citados nas análises gerais (dominante e log-aditivo), também no modelo codominante (T/C vs. T/T) ( $p = 0,0413$ ; OR = 0,69 95%IC = 0,50–0,96), ressaltando o papel do genótipo heterozigoto na modulação do efeito exercido por essa variante. Entretanto, após a correção de Bonferroni, essas associações não permaneceram significativas. Também nenhuma associação foi observada na análise comparativa entre pacientes e doadores de sangue, em nenhum dos modelos testados, esse fato pode ter ocorrido pois o subgrupo de doadores era menor ( $n = 128$ ) o que impacta os resultados obtidos nas análises de associação por reduzir o poder estatístico. Além disso, diferentemente dos contatos sem TBP, que apresentam exposição conhecida ou provável ao bacilo, os doadores representam uma população sem histórico de contato documentado ao *M. tuberculosis*. Dessa forma, caso o efeito protetor do alelo C esteja relacionado à resposta do hospedeiro frente à infecção ou à progressão da doença após exposição, a comparação com indivíduos possivelmente não expostos pode prejudicar a detecção da associação genética.

Esse conjunto de achados permite hipotetizar que a presença do alelo C na região do DNA indutora da expressão do miR-1275, poderia alterar a quantidade do miRNA maduro produzido, o que afetaria as respostas imunológicas já descritas em associação com esse miRNA, como modulação da produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MAPK dentre outras, conferindo maior resistência ao adoecimento. Entretanto, como as associações observadas não permaneceram significativas após a correção para múltiplas comparações, esses achados devem ser interpretados com cautela. Além disso, nenhum trabalho realizado até o momento associou

os alelos de rs4713693 com a maior produção de miR-1275, o que configura esse tipo de estudo como um campo promissor.

Neste estudo, não foi identificada associação entre a variante rs4713693 com a carga bacilar, mesmo tendo sido detectada associação com a proteção contra a doença. Isso pode ocorrer pois, embora a variante influencie a suscetibilidade ao adoecimento, ela não necessariamente interfere no controle da carga bacilar quando a doença já está instalada. Estudos prévios apontam nesse sentido, indicando que variantes genéticas associadas à suscetibilidade à tuberculose nem sempre afetam a gravidade clínica da doença, uma vez que esses desfechos podem envolver vias genéticas e imunológicas distintas (McHenry et al., 2023).

São raros os estudos que abordam o SNV rs4713693, o que constitui um dos pontos fortes desta tese, ao contribuir para compreensão do possível impacto dessa variante na TBP, uma doença altamente prevalente no estado do Amazonas. De forma compatível com os achados presentes nesse estudo, Nakabayashi et al. (2011) identificou o alelo T associado ao risco de desenvolvimento de doença de Graves, assim, o alelo C, em contraposição, pode ser considerado protetor nessa doença autoimune, de maneira semelhante ao padrão de associação observado nas análises iniciais da TBP na população aqui investigada, embora sem significância após a correção de Bonferroni.

### **6.2.3. Análise da variante rs2910164.**

Para o SNV rs2910164, não foram observadas diferenças significativas nas distribuições genóticas entre os grupos controle e de pacientes, indicando ausência de associação dessa variante com o desenvolvimento da TBP no presente estudo (**Tabela 08**).

**Tabela 8.** Resultados das análises de associação do SNV rs2910164 com TBP segundo diferentes modelos genéticos, após o ajuste por “sexo” e “idade” e valor de  $p$  com e sem correção de Bonferroni.

| Modelo               | Controles n (%) | TBP n (%)  | OR (IC95%) <sup>adj</sup> | $p$ -valor <sup>adj</sup> | $p$ -valor <sup>bonf</sup> | AIC <sup>adj</sup> |
|----------------------|-----------------|------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------|
| <b>Codominante</b>   |                 |            |                           |                           |                            |                    |
| G/G                  | 186 (43,4)      | 211 (46,2) | 1,00                      |                           |                            |                    |
| C/G                  | 193 (45,0)      | 196 (42,9) | 0,92 (0,69–1,23)          | 0,6985                    | 1,000                      | 1155,2             |
| C/C                  | 50 (11,7)       | 50 (10,9)  | 0,83 (0,52–1,32)          |                           |                            |                    |
| <b>Dominante</b>     |                 |            |                           |                           |                            |                    |
| G/G                  | 186 (43,4)      | 211 (46,2) | 1,00                      | 0,4633                    | 1,000                      | 1153,3             |
| C/G–C/C              | 243 (56,6)      | 246 (53,8) | 0,90 (0,68–1,19)          |                           |                            |                    |
| <b>Recessivo</b>     |                 |            |                           |                           |                            |                    |
| G/G–C/G              | 379 (88,3)      | 407 (89,1) | 1,00                      | 0,5247                    | 1,000                      | 1153,5             |
| C/C                  | 50 (11,7)       | 50 (10,9)  | 0,87 (0,56–1,35)          |                           |                            |                    |
| <b>Overdominante</b> |                 |            |                           |                           |                            |                    |
| G/G–C/C              | 236 (55,0)      | 261 (57,1) | 1,00                      | 0,7402                    | 1,000                      | 1153,8             |
| C/G                  | 193 (45,0)      | 196 (42,9) | 0,95 (0,72–1,26)          |                           |                            |                    |
| <b>Log-aditivo</b>   |                 |            |                           |                           |                            |                    |
| 0,1,2                | 429 (48,4)      | 457 (51,6) | 0,91 (0,74–1,12)          | 0,3978                    | 1,000                      | 1153,2             |

**Legenda:** TBP: tuberculose pulmonar; OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%; AIC: *Akaike information criterion*; *adj*: valores ajustados pelas variáveis “sexo” e “idade”;  $p$ -valor<sup>bonf</sup>: valor de  $p$  após correção de Bonferroni.

Também foi testada separadamente a possível associação do rs2910164 com os dois subgrupos que compõem o grupo controle: contatos saudáveis e doadores. Da mesma forma que na análise conjunta dos controles, não foi observada associação significativa em nenhuma dessas comparações (**Tabela 09**).

**Tabela 7.** Resultados das análises de associação do SNV rs2910164 com TBP, considerando separadamente os subgrupos controle (contatos saudáveis e doadores), com valores ajustados por “sexo” e “idade” e valor de  $p$  corrigido por Bonferroni.

| Modelo               | TBP n (%)    | Contatos n (%) | OR(IC95%)<br>Contatos | $p$ -valor<br>Contatos | $p$ -valor <sup>bonf</sup> | Doadores n (%) | OR(IC95%)<br>Doadores | $p$ -valor<br>Doadores | $p$ -valor <sup>bonf</sup> |
|----------------------|--------------|----------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|----------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|
| <b>Codominante</b>   | <b>N=457</b> | <b>N=301</b>   |                       |                        |                            |                |                       |                        |                            |
| G/G                  | 211 (46,2)   | 131 (43,5)     | 1,00                  |                        |                            | 55 (43,0)      | 1,00                  |                        |                            |
| C/G                  | 196 (42,9)   | 134 (44,5)     | 0,94 (0,68–1,30)      | 0,6665                 | 1,000                      | 59 (46,1)      | 0,91 (0,59–1,40)      | 0,8936                 | 1,000                      |
| C/C                  | 50 (10,9)    | 36 (12,0)      | 0,79 (0,48–1,32)      |                        |                            | 14 (10,9)      | 0,89 (0,45–1,78)      |                        |                            |
| <b>Dominante</b>     |              |                |                       |                        |                            |                |                       |                        |                            |
| G/G                  | 211 (46,2)   | 131 (43,5)     | 1,00                  | 0,5294                 | 1,000                      | 55 (43,0)      | 1,00                  | 0,6379                 | 1,000                      |
| C/G–C/C              | 246 (53,8)   | 170 (56,5)     | 0,91 (0,67–1,23)      |                        |                            | 73 (57,0)      | 0,91 (0,60–1,37)      |                        |                            |
| <b>Recessivo</b>     |              |                |                       |                        |                            |                |                       |                        |                            |
| G/G–C/G              | 407 (89,1)   | 265 (88,0)     | 1,00                  | 0,4166                 | 1,000                      | 114 (89,1)     | 1,00                  | 0,8406                 | 1,000                      |
| C/C                  | 50 (10,9)    | 36 (12,0)      | 0,82 (0,51–1,32)      |                        |                            | 14 (10,9)      | 0,93 (0,48–1,80)      |                        |                            |
| <b>Overdominante</b> |              |                |                       |                        |                            |                |                       |                        |                            |
| G/G–C/C              | 261 (57,1)   | 167 (55,5)     | 1,00                  | 0,9079                 | 1,000                      | 69 (53,9)      | 1,00                  | 0,7291                 | 1,000                      |
| C/G                  | 196 (42,9)   | 134 (44,5)     | 0,98 (0,72–1,33)      |                        |                            | 59 (46,1)      | 0,93 (0,62–1,40)      |                        |                            |
| <b>Log-aditivo</b>   |              |                |                       |                        |                            |                |                       |                        |                            |
| 0,1,2                | 457          | 301 (39,7)     | 0,91 (0,72–1,14)      | 0,3948                 | 1,000                      | 128 (21,9)     | 0,93 (0,69–1,27)      | 0,6545                 | 1,000                      |

**Legenda:** TBP: tuberculose pulmonar; OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%. A tabela apresenta os resultados das análises de associação do SNV rs2910164 com os subgrupos do grupo controle analisados separadamente: contatos saudáveis e doadores. Os valores apresentados já são ajustados pelas variáveis “sexo” e “idade”;  $p$ -valor<sup>bonf</sup>: valor de  $p$  após correção de Bonferroni.

Na análise realizada para verificar se algum genótipo ou modelo genético desse SNV estaria associado à carga bacilar, não foi identificada qualquer associação entre rs2910164 e o padrão da baciloscopia (**Tabela 10**).

**Tabela 8.** Associação do SNV rs2910164 com a carga bacilar sob diferentes modelos genéticos, com valores de *p* antes e após correção de Bonferroni.

| Modelo               | Paucibacilar<br>n (%) | Multibacilar<br>n (%) | OR (IC95%)       | <i>p</i> -valor | <i>p</i> -<br>valor <sup>bonf</sup> | AIC   |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|-----------------|-------------------------------------|-------|
| <b>Codominante</b>   |                       |                       |                  |                 |                                     |       |
| G/G                  | 13 (48,1)             | 42 (47,2)             | 1,00             | 0,9843          | 1,000                               | 131,8 |
| C/G                  | 11 (40,7)             | 36 (40,4)             | 1,01 (0,40–2,54) |                 |                                     |       |
| C/C                  | 3 (11,1)              | 11 (12,4)             | 1,13 (0,27–4,70) |                 |                                     |       |
| <b>Dominante</b>     |                       |                       |                  |                 |                                     |       |
| G/G                  | 13 (48,1)             | 42 (47,2)             | 1,00             | 0,9305          | 1,000                               | 129,9 |
| C/G–C/C              | 14 (51,9)             | 47 (52,8)             | 1,04 (0,44–2,46) |                 |                                     |       |
| <b>Recessivo</b>     |                       |                       |                  |                 |                                     |       |
| G/G–C/G              | 24 (88,9)             | 78 (87,6)             | 1,00             | 0,8604          | 1,000                               | 129,8 |
| C/C                  | 3 (11,1)              | 11 (12,4)             | 1,13 (0,29–4,38) |                 |                                     |       |
| <b>Overdominante</b> |                       |                       |                  |                 |                                     |       |
| G/G–C/C              | 16 (59,3)             | 53 (59,6)             | 1,00             | 0,9785          | 1,000                               | 129,9 |
| C/G                  | 11 (40,7)             | 36 (40,4)             | 0,99 (0,41–2,37) |                 |                                     |       |
| <b>Log-aditivo</b>   |                       |                       |                  |                 |                                     |       |
| 0,1,2                | 27 (23,3)             | 89 (76,7)             | 1,05 (0,56–1,97) | 0,8834          | 1,000                               | 129,9 |

**Legenda:** OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%; AIC: *Akaike information criterion*. O modelo estatístico considerou a forma multibacilar como desfecho, tendo a forma paucibacilar como referência. Os valores de OR indicam o risco de ser multibacilar segundo cada modelo genético; *p*-valor<sup>bonf</sup>: valor de *p* após correção de Bonferroni.

A variante rs2910164 está localizada na região precursora do miR-146, podendo alterar a estrutura do pre-mi-RNA e, consequentemente, a eficiência de seu processamento. Estudos demonstram que o alelo C está associado tanto à redução (Jazdzewski et al., 2008; Ali et al., 2024) quanto ao aumento da produção do miR-146a maduro (Morales-González et al., 2025), dependendo do modelo experimental, evidenciando a complexidade funcional dessa variante. Tal característica sugere que o efeito biológico do rs2910164 sobre a expressão do miR-146a não é uniforme, sendo dependente do contexto celular e das condições biológicas específicas em que cada miRNA é expresso, o que pode dificultar a detecção de associações reproduzíveis em estudos genéticos com diferentes grupos populacionais.

Em modelos de infecção micobacteriana, o miR-146a tem sido descrito como um importante regulador negativo da resposta inflamatória, atuando principalmente por meio da atenuação de vias de sinalização NF-κB e MAPK. Esse mecanismo resulta na redução da produção de óxido nítrico, e das citocinas IL-6 e TNF-α, além de interferir positivamente na autofagia (Li et al., 2016; Sheikhpour et al., 2025). Essa dualidade reforça o papel do miR-146a

como um modulador fino da resposta imune, e evidencia a complexidade de se estabelecer relações diretas entre variantes associados à sua expressão, e desfechos clínicos na TBP.

Alguns estudos de expressão gênica indicam que o miR-146a encontra-se aumentado em pacientes com TB recrutados em diferentes localidades da Ásia (Chakrabarty et al., 2019; Rusmariza et al., 2025), estando também aumentado nos pacientes com desfecho terapêutico desfavorável, sugerindo potencial como biomarcador do miR-146a (Wang; Xu, 2025). Entretanto, resultados divergentes também foram reportados, como em um estudo conduzido com indivíduos sérvios, em que foi encontrada redução da expressão do miR-146a em amostras de células mononucleares derivadas do sangue periférico (Buha et al., 2022), ressaltando a influência das questões populacionais nesses tipos de estudo.

Na presente tese, não foram encontradas associações entre a variante rs2910164 e a tuberculose pulmonar em nenhum dos modelos analisados, além disso, apesar das evidências funcionais indicarem que o miR-146a pode favorecer a sobrevivência de *M. tuberculosis*, bem como evidências científicas apontarem que os diferentes alelos dessa variante interferem com a produção da molécula madura, também não foram encontradas associações entre esse miRNA e a carga bacilar. Esses achados podem ser explicados, em parte, pelo fato de que o miR-146a atua como regulador negativo da inflamação, cujo papel não necessariamente se reflete na carga bacilar dos indivíduos infectados.

Diferentes estudos com rs2910164 apresentaram associação com TBP de forma dependente da população. O alelo G foi associado com proteção contra a TBP em indivíduos da população Han chinesa, enquanto esteve associado ao aumento do risco entre os chineses tibetanos (Li et al., 2011). De modo semelhante, Zhang et al. (2015) também identificou a associação do alelo C e do genótipo C/C com o maior risco de TBP em populações chinesas específicas, enquanto nos subgrupos Uygur e Han, não foram observadas diferenças significativas (Zhang et al., 2015). Esses achados ressaltam o papel central do contexto genético-populacional nos estudos de associação. Populações, ainda que próximas, podem apresentar resultados divergentes para um mesmo SNV.

Nesse estudo, assim como no trabalho de Leal et al. (2022), conduzido em indivíduos com TB recrutados no Pará, não foi observada associação entre a variante rs2910164 e a TB, corroborando os achados apresentados nesta tese. Resultados semelhantes foram descritos por Naderi et al. (2015) em indivíduos iranianos com TBP; por Wang et al. (2016) em indivíduos com TBP recrutados na província de Jiangsu na China (Wang et al., 2016); por Zhang et al.

(2021b), em indivíduos com TBP recrutados na província Zhejiang, China; e por Buha et al. (2022) em uma população sérvia, em que também não foi identificada associação dessa variante com a doença, corroborando a hipótese de que o impacto funcional dessa variante está fortemente ligado a fatores genéticos, ambientais e imunológicos específicos de cada população.

#### 6.2.4. Análise da variante rs895819.

Para o SNV rs895819, não foram observadas diferenças significativas nas distribuições genótípicas entre os grupos controle e de pacientes, mesmo após ajustes por “sexo” e “idade” indicando ausência de associação no presente estudo (**Tabela 11**).

**Tabela 9.** Resultados das análises de associação do SNV rs895819 com TBP segundo diferentes modelos genéticos, após o ajuste por “sexo” e “idade” e valor de  $p$  com e sem correção de Bonferroni.

| Modelo                      | Controles<br>n (%) | TBP<br>n (%) | OR (IC95%) <sup>adj</sup> | $p$ -<br>valor <sup>adj</sup> | $p$ -<br>valor <sup>bonf</sup> | AIC <sup>adj</sup> |
|-----------------------------|--------------------|--------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| <b>Codominante</b>          |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| T/T                         | 184 (42,9)         | 216 (47,3)   | 1,00                      | 0,3609                        | 1,000                          | 1153,8             |
| C/T                         | 194 (45,2)         | 186 (40,7)   | 0,82 (0,61–1,10)          |                               |                                |                    |
| C/C                         | 51 (11,9)          | 55 (12,0)    | 0,82 (0,52–1,29)          |                               |                                |                    |
| <b>Dominante</b>            |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| T/T                         | 184 (42,9)         | 216 (47,3)   | 1,00                      | 0,1534                        | 1,000                          | 1151,8             |
| C/T–C/C                     | 245 (57,1)         | 241 (52,7)   | 0,82 (0,62–1,08)          |                               |                                |                    |
| <b>Recessivo</b>            |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| T/T–C/T                     | 378 (88,1)         | 402 (88,0)   | 1,00                      | 0,6452                        | 1,000                          | 1153,7             |
| C/C                         | 51 (11,9)          | 55 (12,0)    | 0,90 (0,59–1,39)          |                               |                                |                    |
| <b>Overdominante</b>        |                    |              |                           |                               |                                |                    |
| T/T–C/C                     | 235 (54,8)         | 271 (59,3)   | 1,00                      | 0,2555                        | 1,000                          | 1152,6             |
| C/T                         | 194 (45,2)         | 186 (40,7)   | 0,85 (0,64–1,12)          |                               |                                |                    |
| <b>Log-aditivo</b><br>0,1,2 | 429 (48,4)         | 457 (51,6)   | 0,88 (0,71–1,07)          | 0,2030                        | 1,000                          | 1152,3             |

**Legenda:** TBP: tuberculose pulmonar; OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%; AIC: *Akaike information criterion*; *adj*: valores ajustados pelas variáveis “sexo” e “idade”;  $p$ -valor<sup>bonf</sup>: valor de  $p$  após correção de Bonferroni.

Também foi avaliada, de forma independente, a associação com cada um dos subgrupos que integram o grupo controle: contatos e doadores. Foi observada apenas associação com proteção contra TBP no modelo dominante no subgrupo de doadores ( $p = 0,0348$ ; OR = 0,64; IC95% = 0,42–0,97); entretanto, após a correção de Bonferroni, a associação não permaneceu significativa. Na análise do subgrupo contatos também não foram observadas associações (**Tabela 12**).

**Tabela 10.** Resultados das análises de associação do SNV rs895819 com TBP, considerando separadamente os subgrupos controle (contatos saudáveis e doadores), com valores ajustados por “sexo” e “idade” e valor de *p* corrigido por Bonferroni.

| Modelo                       | TBP<br>n (%) | Contatos<br>n (%) | OR(IC95%)<br>Contatos | <i>p</i> -valor<br>Contatos | <i>p</i> -<br>valor <sup>bonf</sup> | Doadores<br>n (%) | OR(IC95%)<br>Doadores   | <i>p</i> -valor<br>Doadores | <i>p</i> -<br>valor <sup>bonf</sup> |
|------------------------------|--------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Codominante</b>           | <b>N=457</b> | <b>N=301</b>      |                       |                             |                                     | <b>N=128</b>      |                         |                             |                                     |
| T/T                          | 216 (47,3)   | 136 (45,2)        | 1,00                  | 0,7914                      | 1,000                               | 48 (37,5)         | 1,00                    | 0,1055                      | 1,000                               |
| C/T                          | 186 (40,7)   | 129 (42,9)        | 0,91 (0,66–1,25)      |                             |                                     | 65 (50,8)         | 0,63 (0,41–0,98)        |                             |                                     |
| C/C                          | 55 (12,0)    | 36 (12,0)         | 0,88 (0,53–1,45)      |                             |                                     | 15 (11,7)         | 0,68 (0,34–1,34)        |                             |                                     |
| <b>Dominante</b>             |              |                   |                       |                             |                                     |                   |                         |                             |                                     |
| T/T                          | 216 (47,3)   | 136 (45,2)        | 1,00                  | 0,5001                      | 1,000                               | 48 (37,5)         | 1,00                    | <b>0,0348</b>               | 0,696                               |
| C/T–C/C                      | 241 (52,7)   | 165 (54,8)        | 0,90 (0,66–1,22)      |                             |                                     | 80 (62,5)         | <b>0,64 (0,42–0,97)</b> |                             |                                     |
| <b>Recessivo</b>             |              |                   |                       |                             |                                     |                   |                         |                             |                                     |
| T/T–C/T                      | 402 (88,0)   | 265 (88,0)        | 1,00                  | 0,7376                      | 1,000                               | 113 (88,3)        | 1,00                    | 0,6490                      | 1,000                               |
| C/C                          | 55 (12,0)    | 36 (12,0)         | 0,92 (0,57–1,48)      |                             |                                     | 15 (11,7)         | 0,86 (0,45–1,63)        |                             |                                     |
| <b>Overdominante</b>         |              |                   |                       |                             |                                     |                   |                         |                             |                                     |
| T/T–C/C                      | 271 (59,3)   | 172 (57,1)        | 1,00                  | 0,6424                      | 1,000                               | 63 (49,2)         | 1,00                    | 0,0695                      | 1,000                               |
| C/T                          | 186 (40,7)   | 129 (42,9)        | 0,93 (0,68–1,27)      |                             |                                     | 65 (50,8)         | 0,69 (0,46–1,03)        |                             |                                     |
| <b>Log-aditivo<br/>0,1,2</b> | 457          | 301 (39,7)        | 0,93 (0,74–1,16)      | 0,5126                      | 1,000                               | 128 (21,8)        | 0,76 (0,56–1,03)        | 0,0755                      | 1,000                               |

**Legenda:** TBP: tuberculose pulmonar; OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%. A tabela apresenta os resultados das análises de associação do SNV rs895819 com os subgrupos do grupo controle analisados separadamente: contatos saudáveis e doadores. Os valores apresentados já são ajustados pelas variáveis “sexo” e “idade”; *p*-valor<sup>bonf</sup>: valor de *p* após correção de Bonferroni.

Na análise feita para verificar se algum genótipo ou modelo genético desse SNV estaria associado à carga bacilar, não foi identificada qualquer associação entre rs895819 e o padrão da baciloscopia (**Tabela 13**).

**Tabela 11.** Associação do SNV rs895819 com a carga bacilar sob diferentes modelos genéticos, com valores de *p* antes e após correção de Bonferroni.

| Modelo                       | Paucibacilar<br>n (%) | Multibacilar<br>n (%) | OR (IC95%)       | <i>p</i> -valor | <i>p</i> -<br>valor <sup>bonf</sup> | AIC   |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|-----------------|-------------------------------------|-------|
| <b>Codominante</b>           |                       |                       |                  |                 |                                     |       |
| T/T                          | 11 (40,7)             | 45 (50,6)             | 1,00             | 0,3713          | 1,000                               | 129,9 |
| C/T                          | 14 (51,9)             | 33 (37,1)             | 0,58 (0,23–1,43) |                 |                                     |       |
| C/C                          | 2 (7,4)               | 11 (12,4)             | 1,34 (0,26–6,96) |                 |                                     |       |
| <b>Dominante</b>             |                       |                       |                  |                 |                                     |       |
| T/T                          | 11 (40,7)             | 45 (50,6)             | 1,00             | 0,3697          | 1,000                               | 129,1 |
| C/T–C/C                      | 16 (59,3)             | 44 (49,4)             | 0,67 (0,28–1,61) |                 |                                     |       |
| <b>Recessivo</b>             |                       |                       |                  |                 |                                     |       |
| T/T–C/T                      | 25 (92,6)             | 78 (87,6)             | 1,00             | 0,4566          | 1,000                               | 129,3 |
| C/C                          | 2 (7,4)               | 11 (12,4)             | 1,76 (0,37–8,49) |                 |                                     |       |
| <b>Overdominante</b>         |                       |                       |                  |                 |                                     |       |
| T/T–C/C                      | 13 (48,1)             | 56 (62,9)             | 1,00             | 0,1737          | 1,000                               | 128,0 |
| C/T                          | 14 (51,9)             | 33 (37,1)             | 0,55 (0,23–1,30) |                 |                                     |       |
| <b>Log-aditivo<br/>0,1,2</b> | 27 (23,3)             | 89 (76,7)             | 0,90 (0,48–1,69) | 0,7441          | 1,000                               | 129,8 |

**Legenda:** OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%; AIC: *Akaike information criterion*. O modelo estatístico considerou a forma multibacilar como desfecho, tendo a forma paucibacilar como referência. Os valores

de OR indicam o risco de ser multibacilar segundo cada modelo genético;  $p$ -valor<sup>bonf</sup>: valor de  $p$  após correção de Bonferroni.

A variante rs895819 localiza-se no pre-miRNA-27a. Estudos apontam que o alelo C e o genótipo C/C, estão associados a uma menor produção do miR-27a (Yang et al., 2022; Ragia et al., 2024). Estudos de expressão demonstraram que o miR-27a encontra-se aumentado no soro de pacientes com TBP, estando essa maior expressão associada a piores desfechos clínicos em pacientes chineses (Zheng et al., 2023). De forma semelhante, um estudo utilizando modelos murinos e amostras de pacientes com TBP também identificou o aumento da expressão do miR-27a (Liu et al., 2018).

Em contraste, diferentes estudos conduzidos em cultura de macrófagos infectados identificaram a redução da expressão do miR-27a (Furci et al., 2013; Wang et al. 2017). Esses achados sugerem que o modelo experimental exerce impacto significativo sobre os resultados, uma vez que estudos *in vivo* tendem a demonstrar superexpressão do miR-27a, enquanto modelos com macrófagos infectados frequentemente apontam para resultados opostos, possivelmente porque nos modelos de cultura de células o ambiente é experimentalmente mais controlado, ao passo que estudos com amostras humanas envolvem interações entre múltiplos miRNAs, dentre outros genes e demais moléculas regulatórias que participam da resposta imunológica contra a TB.

Os mecanismos pelos quais a miR-27a pode interferir na imunopatogenia da TB incluem a modulação na polarização de macrófagos para o fenótipo M2, de caráter anti-inflamatório (Ahluwalia et al. 2017). O mir-27a também pode comprometer a autofagia favorecendo a proliferação micobacteriana (Liu et al., 2018). Além de interferir na via TLR-MyD88-NF- $\kappa$ B atuando como regulador negativo da inflamação (Wang et al., 2017).

Na presente tese, nas análises gerais, não foram encontradas associações entre rs895819 e a TBP, tampouco com a carga bacilar entre os indivíduos estudados. Existem poucos estudos na disponíveis avaliando o impacto dessa variante na tuberculose. Em um recente estudo caso-controle com população recrutada no Irã, foi identificado que o alelo C e o genótipo C/C estão associados ao risco de desenvolvimento de TBP (Arabshahi et al., 2025). Por outro lado, no estudo conduzido por Zhang et al. (2021b) com indivíduos chineses, não foi observada associação entre o rs895819 e a população geral estudada, entretanto, quando estratificado por sexo, observou-se a associação do modelo dominante dessa variante (CC+C/T) e a redução do risco de TBP no sexo feminino.

Considerando que o alelo C está associado a uma menor produção do miR-27a, e que a redução de miRNA pode resultar em maior atividade inflamatória via TLR-MyD88-NF- $\kappa$ B (Wang et al., 2017) e aumento da autofagia (Liu et al., 2018), esses dados sugerem um possível papel protetor do alelo C, em concordância com os achados de Zhang et al. (2021b). Por outro lado, uma vez que a menor produção do miR-27a pode levar a maior produção de macrófagos permissivos (Ahluwalia et al. (2017), essa variante pode estar ligada ao risco em certos contextos, o que pode justificar os achados de Arabshahi et al., (2025).

Esse aparente antagonismo reforça a complexidade das vias regulatórias mediadas por miRNAs, nas quais uma mesma molécula pode modular múltiplas vias de sinalização, resultando em efeitos distintos a depender do contexto genético, imunológico e ambiental. Assim, a ausência de associação observada na população avaliada nesta tese pode refletir particularidades da população recrutada no Amazonas, bem como interações genéticas e ambientais específicas da região, conforme discutido por Li; Meyre (2012), que destacam a influência dessas variáveis nos resultados obtidos em diferentes coortes.

A associação observada na análise entre doadores e pacientes no modelo dominante ( $p = 0,0348$ ; OR = 0,64; 95%IC = 0,42–0,97) se assemelha ao achado de Zhang et al. (2021b), que encontrou efeito protetor no mesmo modelo genético. No entanto, a detecção dessa associação restrita a esse subgrupo deve ser interpretada com cautela, uma vez que a correção para múltiplas comparações não manteve significância estatística. Além disso, o menor tamanho amostral pode aumentar a probabilidade de associações espúrias, somado ao fato de o grupo de doadores apresentar características particulares, como menor exposição, bem como melhor estado geral de saúde, o que é mandatório para ser aceito como doador de sangue e pode influenciar os resultados. Dessa forma, a confirmação desse achado requer a ampliação do tamanho amostral e a replicação em outras coortes independentes, a fim de se obter resultados mais robustos e confiáveis.

### 6.3. Análise da interação entre SNVs

Analizou-se a interação entre os SNVs para verificar se havia sinergismo entre eles na associação com risco ou proteção contra TBP. Com o intuito de preservar a robustez estatística, foram consideradas apenas interações de segunda ordem (pares de SNVs), pois interações entre mais SNVs simultaneamente reduziriam bastante o número de indivíduos por combinação de genótipos, comprometendo a confiabilidade dos resultados. A interação significativa está apresentada na **Tabela 14**.

**Tabela 12.** Interação entre genótipos dos SNVs e sua associação com TBP ajustado por “sexo” e “idade”.

| Interação SNVs                       | N. (%)                                     | OR (exp(Estimate)) | IC 95%    | p-valor        | p-valor <sup>bonf</sup> |
|--------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------|-----------|----------------|-------------------------|
| <b>rs6505162A/C:<br/>rs895819C/C</b> | Controles: 31 (7,2)<br>Pacientes: 19 (4,2) | 0,13               | 0,04–0,42 | <b>0,00086</b> | <b>0,0466</b>           |

**Legenda:** N.(%): número de indivíduos com a combinação genotípica indicada e sua porcentagem dentro do grupo controle ou de pacientes; OR: *Odds ratio*; IC95%: intervalo de confiança de 95%. Os valores de OR foram obtidos pela exponenciação do coeficiente  $\beta$  (Estimate), que indica a magnitude com que a combinação dos genótipos altera a odds de desenvolver TBP. p-valor<sup>bonf</sup>: valor de  $p$  após correção de Bonferroni.

Uma vez que a TBP é uma doença multifatorial que envolve diversos genes em sua imunopatogênese, variantes genéticas individuais podem apresentar um efeito modesto ou inconsistente quando analisadas isoladamente (análise univariada), logo, a ausência de associação nas análises individuais dos SNVs não significa que tais genes não possuam associação com a TBP, uma vez que o efeito dessa variante na suscetibilidade ao adoecimento pode ocorrer a partir da interação entre vários genes atuando em redes regulatórias (Azad et al., 2012).

A análise de interações genéticas possui desafios metodológicos importantes, principalmente em função da necessidade de uma tamanho amostral bastante elevado para garantir número suficiente de indivíduos portadores de combinações genotípicas específicas, o que é essencial para a detecção robusta das interações SNV-SNV. Em razão dessa limitação, no presente estudo apenas a interação entre o genótipo A/C da variante rs6505162 e o genótipo C/C da variante rs895819 apresentou associação estatisticamente significativa com proteção contra a tuberculose pulmonar ( $p^{\text{bonf}} = 0,0466$ ; OR = 0,13; IC95% = 0,04-0,42). Outras duas interações que atingiram significância estatística foram excluídas da análise por apresentarem frequência inferior a 10 indivíduos portadores da combinação genotípica avaliada, uma vez que

tamanhos amostrais muito pequenos aumentam substancialmente o risco de resultados pouco confiáveis.

Interessantemente, as variantes que interagem conferindo proteção no presente estudo não apresentaram associações significativas com a TBP nas análises univariadas, exemplificando que interações entre SNVs podem ser determinantes para a detecção de efeitos imunológicos relevantes que não são observados quando analisados separadamente. Esse efeito interativo reflete o fato de que, em ambiente fisiológico, os genes não atuam de forma isolada, mas sim de maneira integrada, regulando-se mutuamente e modulando vias biológicas comuns ou complementares, o que pode resultar na amplificação ou atenuação da resposta do hospedeiro. Como exemplo, tanto o miR-423 onde está localizada o rs6505162, quanto o miR-27a, associado à variante rs895819, participam da modulação do processo de autofagia, uma via central na resposta imune contra o *M. tuberculosis*.

O alelo C, presente na interação SNV-SNV identificada nesse estudo na variante rs6505162 (A/C), tem sido associada à redução da produção do miR-423 maduro (Su et al., 2015). Esse miRNA, por sua vez favorece a replicação micobacteriana ao comprometer a autofagia (Tu et al., 2019), logo, a presença desse alelo tem potencial protetor na TBP. Paralelamente, o genótipo C/C da outra variante envolvida na interação, rs895819, também está ligado a menor produção do miR-27a (Ragia et al., 2024), o qual, em quantidades elevadas modula negativamente o *Cacna2d3* comprometendo a maturação de autofagossomos (Liu et al., 2018), portanto, o efeito interativo aqui detectado possui plausibilidade biológica, que converge para a modulação da autofagia, de acordo com dados disponíveis na literatura.

Diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de investigar interações entre SNVs, demonstrando que análises univariadas frequentemente não detectam associações significativas, enquanto modelos de interações revelam efeitos genéticos importantes. O estudo de Abhimanyu et al. (2023) encontrou interações SNV-SNV significativas entre variantes de genes de citocinas, incluindo *IL1RA*, *IL4*, *IL12* e *TNFB*, afetando a suscetibilidade à TBP. De forma semelhante, Collins et al., (2013) identificou uma interação entre 3 SNV de genes distintos: rs2305619 (*PTX3*), rs187084 (*TLR9*), e rs11465421 (*DC-Sign*), também aumentando a suscetibilidade à TBP, sendo que o efeito individual de cada uma dessas variantes não foi associado à doença. Esses achados em conjunto reforçam o papel das interações gene-gene, inclusive entre genes localizados em diferentes regiões do genoma, atuando de maneira integrada em redes imunológicas, modulando a suscetibilidade à doença.

#### 6.4. Frequência alélica e comparação populacional das variantes

Avaliando a associação dos alelos das variantes estudadas e o desenvolvimento da TBP, observou-se que o alelo de menor frequência (alelo C) de rs4713693 esteve associado à proteção contra TBP ( $p = 0,0218$ ; OR = 0,79; IC95% = 0,65-0,97), confirmando os resultados identificados nas análises de associação dos modelos genéticos, em que o modelo dominante e o modelo log-aditivo indicaram que os indivíduos portadores de ao menos uma cópia desse alelo possuem menor chance de desenvolvimento de TBP. Em contraste, os alelos de menor frequência das variantes rs6505162 (alelo A), rs2910164 (alelo C), e rs895819 (alelo C) não apresentaram associação com TBP nas análises alélicas apresentadas na **Tabela 15**, em concordância com a ausência de associação identificada previamente nos modelos genéticos.

**Tabela 13.** Frequências alélicas das variantes rs4713693, rs6505162, rs2910164 e rs895819 nos grupo de pacientes e de controles, e análise de associação com TBP.

| SNV ID           | Alelo | Tuberculose         | Controles           | <i>p</i> -valor | <i>p</i> -valor <sup>bonf</sup> | OR          | IC95%            |
|------------------|-------|---------------------|---------------------|-----------------|---------------------------------|-------------|------------------|
|                  |       | <b>n=914 alelos</b> | <b>n=858 alelos</b> |                 |                                 |             |                  |
| <b>rs4713693</b> | T     | 639 (0,70)          | 556 (0,65)          |                 |                                 |             |                  |
|                  | C     | 275 (0,30)          | 302 (0,35)          | <b>0,0218</b>   | 0,0872                          | <b>0,79</b> | <b>0,65-0,97</b> |
|                  |       | <b>n=914 alelos</b> | <b>n=854 alelos</b> |                 |                                 |             |                  |
| <b>rs6505162</b> | C     | 470 (0,51)          | 450 (0,53)          |                 |                                 |             |                  |
|                  | A     | 444 (0,49)          | 404 (0,47)          | 0,5930          | 1,000                           | 1,05        | 0,87-1,27        |
|                  |       | <b>n=914 alelos</b> | <b>n=858 alelos</b> |                 |                                 |             |                  |
| <b>rs2910164</b> | G     | 618 (0,68)          | 565 (0,66)          |                 |                                 |             |                  |
|                  | C     | 296 (0,32)          | 293 (0,34)          | 0,4308          | 1,000                           | 0,92        | 0,76-1,13        |
|                  |       | <b>n=914 alelos</b> | <b>n=858 alelos</b> |                 |                                 |             |                  |
| <b>rs895819</b>  | T     | 618 (0,68)          | 562 (0,66)          |                 |                                 |             |                  |
|                  | C     | 296 (0,32))         | 296 (0,34)          | 0,3644          | 1,000                           | 0,91        | 0,75-1,11        |

**Legenda:** SNV ID: identificação do SNV; OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%. Em negrito os valores estatisticamente significativos e os alelos de menor frequência; *p*-valor<sup>bonf</sup>: valor de *p* após correção de Bonferroni.

As frequências dos alelos dos SNVs analisados no grupo controle foram superiores a 0,30 em todos os SNVs estudados. Essas frequências foram comparadas às frequências

populacionais de diferentes grupos ao redor do mundo disponibilizadas pela plataforma Ensembl.org, com o objetivo de contextualizar a amostra estudada, no sentido de verificar se o grupo controle do nosso estudo apresenta padrões alélicos compatíveis com alguma outra população, além de demonstrar que as frequências observadas são plausíveis (**Tabela 16**).

**Tabela 14.** Frequência dos alelos dos SNVs rs4713693, rs6505162, rs2910164 e rs895819 na população estudada e em outras populações do mundo.

| População estudada |        |             | Outras populações |        |             |                |              |        |
|--------------------|--------|-------------|-------------------|--------|-------------|----------------|--------------|--------|
| SNV ID             | Alelos | Controles   | Global            | África | Américas    | Leste asiático | Sul asiático | Europa |
| rs6505162          | C      | 0,53        | 0,50              | 0,23   | 0,54        | 0,82           | 0,44         | 0,56   |
|                    | A      | <b>0,47</b> | 0,50              | 0,77   | <b>0,46</b> | 0,18           | 0,56         | 0,44   |
| rs4713693          | T      | 0,65        | 0,60              | 0,45   | 0,64        | 0,74           | 0,69         | 0,54   |
|                    | C      | <b>0,35</b> | 0,40              | 0,55   | <b>0,36</b> | 0,26           | 0,31         | 0,46   |
| rs2910164          | G      | 0,66        | 0,74              | 0,60   | 0,69        | 0,38           | 0,73         | 0,77   |
|                    | C      | <b>0,34</b> | 0,26              | 0,40   | <b>0,31</b> | 0,62           | 0,27         | 0,23   |
| rs895819           | T      | 0,66        | 0,64              | 0,52   | 0,62        | 0,72           | 0,68         | 0,68   |
|                    | C      | <b>0,34</b> | 0,36              | 0,48   | <b>0,38</b> | 0,28           | 0,32         | 0,32   |

Legenda: SNV ID: identificação do SNV. Em negrito, estão as frequência do alelo menor na população controle do estudo e na população das Américas, segundo a plataforma Ensembl.org.

Na análise alélica, observou-se associação inicial entre o SNV rs4713693 e a TBP, com menor frequência do alelo T entre os pacientes em comparação aos controles ( $p = 0,0218$ ; OR = 0,79; IC95% = 0,65–0,97). Entretanto, após a aplicação da correção de Bonferroni considerando os quatro SNVs avaliados, essa associação não permaneceu estatisticamente significativa. Para os demais SNVs (rs6505162, rs2910164 e rs895819), não foram observadas associações com a doença, tanto antes quanto após a correção para múltiplas comparações.

Evidências funcionais sugerem que o miR-1275 desempenha papel relevante na resposta imune. Segundo Das et al., (2013) o miR-1275 está aumentado em culturas de macrófagos THP-1 infectados com cepas virulentas de *M. tuberculosis*. O aumento de miR-1275 está associado a menor resposta inflamatória devido a regulação negativa exercida nos genes *MAPK* e *IRAK4*, importantes para a resposta mediada pelos TLRs e para a produção de mediadores inflamatórios (Buggele et al., 2012). Por outro lado, a hipóxia, uma condição encontrada em granulomas maduros na TBP (Qualls; Murray, 2016), induz nas células Natural Killers a menor produção do miR-1275, o que leva a menor atividade citotóxica, e produção em menores níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Ou et al., 2023).

Ambas as células (macrófagos e células NK) são fundamentais para uma resposta imunológica eficaz contra o bacilo da TB, através de suas funções inflamatórias diretas, ou pela atuação sinérgica, por exemplo, as células NK promovem a ação bactericida dos macrófagos a partir da produção de IFN- $\gamma$ , citocina chave na resposta contra o bacilo intracelular. Dessa forma, ainda que estudos indiquem efeitos aparentemente opostos, em que o aumento do miR-1275 em macrófagos pode modular negativamente a inflamação, enquanto a redução de miR-1275 leva a redução da ação citotóxica em células NK, esses achados precisam ser interpretados à luz dos diferentes modelos experimentais e tipos celulares estudados.

Além disso, um mesmo estímulo pode induzir diferentes níveis de expressão do mesmo miRNA em células distintas, assim como a ação desse miRNA pode ser diferente em cada tipo celular (contexto célula-específico) (O'Brien et al., 2018). Dessa forma, a avaliação específica do impacto do alelo C de rs4713693 sobre a expressão do miR-1275 em diferentes modelos celulares, bem como sobre a produção de citocinas inflamatórias-chave, é um campo promissor para pesquisas futuras.

Em relação as análises alélicas realizadas para as demais variantes, rs6505162, rs2910164 e rs895819, não foram observadas associações individuais com a TBP. Esse achado é consistente com as análises realizadas nos modelos genéticos, entretanto, conforme discutido previamente nessa tese e descrito em outros trabalhos na literatura, a ausência de associação em análises isoladas não implica, necessariamente, a ausência absoluta de efeito biológico. Isso ocorre porque o impacto de determinadas variantes pode depender da ação conjunta entre diferentes genes ou alelos. Nesse sentido, o, presente estudo identificou uma interação com efeito protetor entre as variantes rs6505162 e rs895819, reforçando a importância de abordagens que considerem interações gênicas nas análises de associação.

Quanto às frequências alélicas das variantes estudadas, os dados obtidos para o grupo controle no presente estudo mostraram-se semelhantes àqueles disponíveis no banco Ensembl.org para populações das Américas. Essa concordância indica que as frequências genóticas e alélicas observadas são consistentes com dados populacionais de referência, não sugerindo a presença de problemas sistemáticos relevantes na inclusão de participantes ou erros na determinação dos genótipos.

Observa-se que o rs6505162 apresenta uma grande heterogeneidade entre as populações. Enquanto na população estudada a distribuição alélica foi equilibrada (C=0,53; A=0,47), nas populações africanas há predominância do alelo A (0,77), ao passo que no Leste

asiático o alelo C é predominante (0,82). Essa inversão do alelo mais frequente sugere forte diferença na distribuição genética entre os continentes, possivelmente decorrente de processos históricos e evolutivos.

Comparando-se os dados da frequência alélica com dados previamente publicados no Brasil, apenas resultados para a variante rs6505162 e rs2910164 estão disponíveis. No estudo realizado por Leal et al. (2022), a frequência dos alelos encontrado na população controle recrutada no estado do Pará para a variante rs6505162 foi de 0,49 para o alelo A e 0,51 para o alelo C, ao passo que nessa tese, a frequência para A foi de 0,47, e para o alelo C foi de 0,53. Esses valores próximos indicando um grau de reprodutibilidade entre os estudos, e sugerem similaridade genética entre as populações analisadas.

Em relação a variante rs2910164, no estudo de Leal et al. (2022), a frequência alélica para o alelo C foi de 0,34, enquanto para o alelo G foi de 0,66. Esses valores são idênticos aos encontrados no presente estudo, indicando elevada proximidade genética entre a população recrutada no Pará, e a recrutada no Amazonas. Em contraste, o estudo de César-de-Mello et al., (2014), identificou, em um grupo controle recrutado no Rio de Janeiro, frequências de 0,74 para o alelo G, e de 0,26 para o alelo C, evidenciando uma maior discrepância em relação às populações da região Sudeste em comparação a população da região Amazônica.

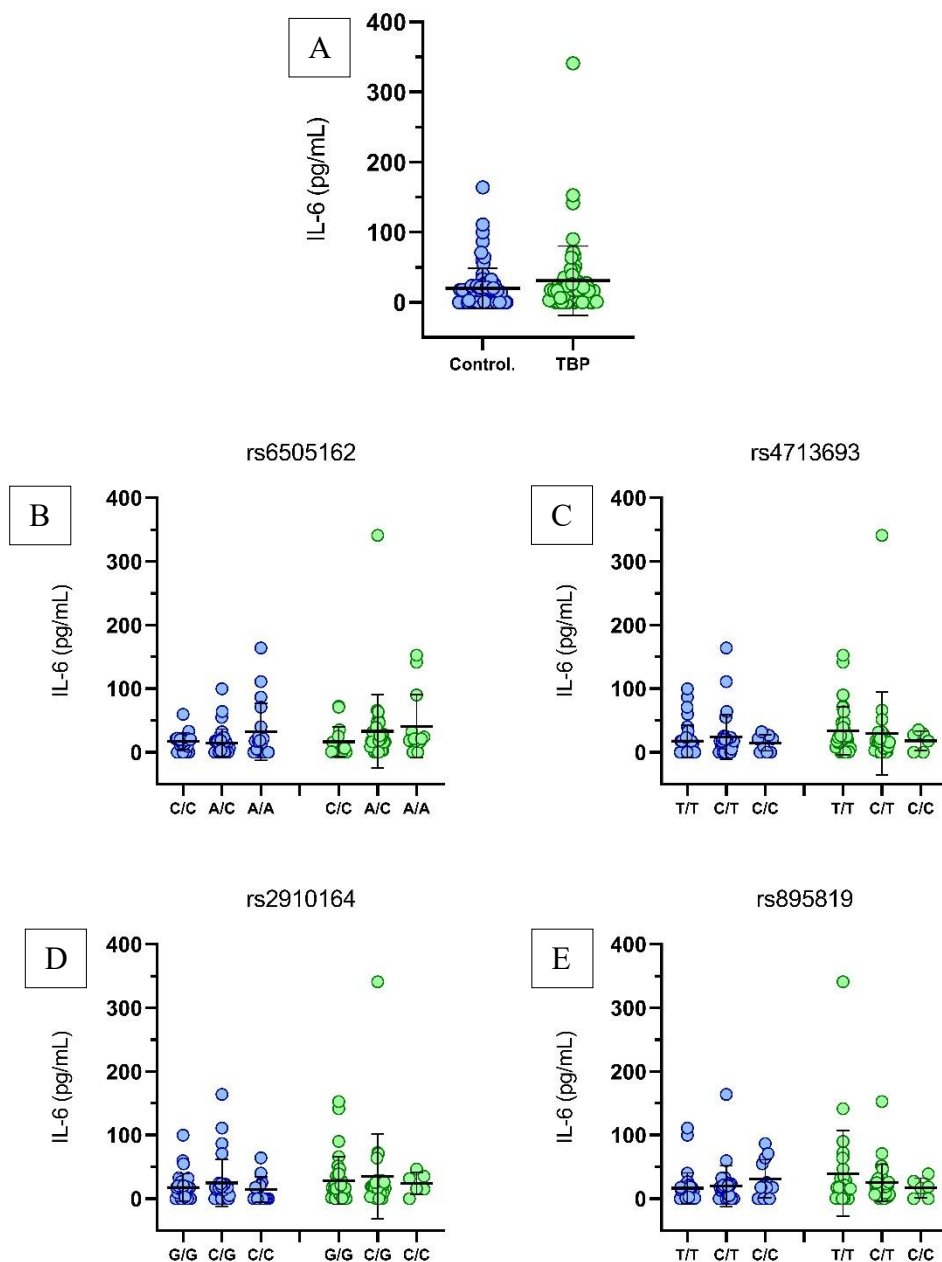
Quanto as variantes rs895819 (C = 0,34; T = 0,66) e rs4713693 (C = 0,35; T = 0,65), não foram localizados estudos prévios que descrevam suas frequências alélicas em populações da região Amazônica ou em outras populações brasileiras, desse modo, os dados apresentados na presente tese representam as primeiras estimativas dessas frequências no contexto nacional, podendo servir como referência para futuros estudos genéticos conduzidos no Brasil.

## **6.5. Quantificação das citocinas IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ e IL-18**

A quantificação da IL-6 entre os grupos de pacientes e de controles não apresentou diferença estatisticamente significativa, embora o valor de  $p$  encontrado ( $p = 0,0582$ ) tenha ficado próximo do valor estipulado previamente como significativo. A concentração média da IL-6 entre os pacientes foi de 30,71 pg/mL, e a mediana desse grupo foi 18,35 pg/mL, enquanto do grupo controle a concentração média foi 19,96 pg/mL e a mediana foi 17,09 pg/mL.

Avaliou-se a concentração da IL-6 nos indivíduos com base nos diferentes genótipos de cada um dos 4 SNVs, rs6505162, rs4713693, rs2910164 e rs895819, não sendo observadas diferenças significativas (**Figura 5**).

**Figura 5.** Concentração plasmática de IL-6 nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde), bem como segundo os diferentes genótipos dos SNVs analisados.

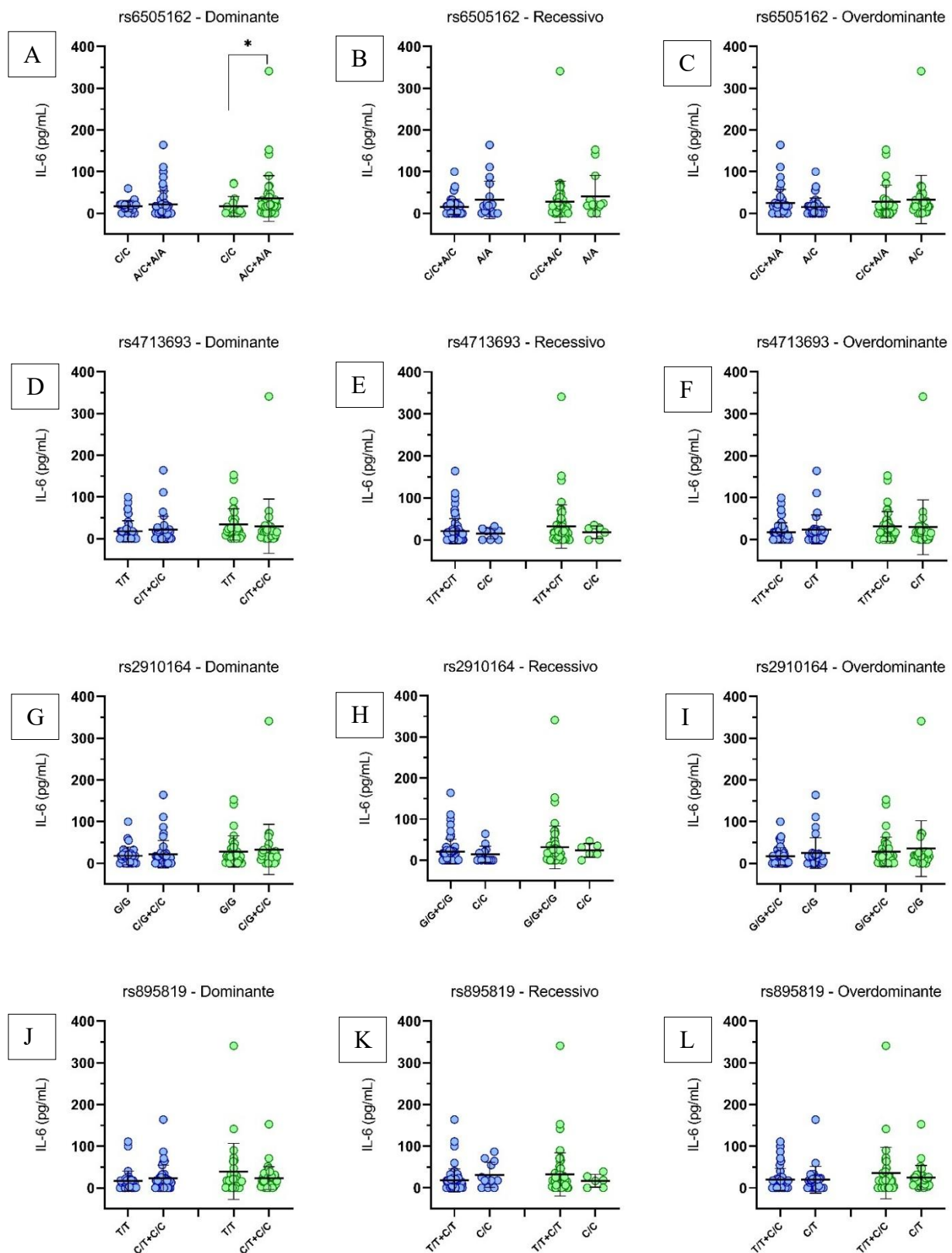


**Legenda:** (A) Comparação da concentração plasmática de IL-6 entre o grupo controle e o grupo TBP, realizada por meio do teste de Mann-Whitney. Círculos azuis representam indivíduos do grupo controle (N=75) e círculos verdes representam os pacientes (N = 63). (B-E) Comparação da concentração plasmática de IL-6 entre os diferentes genótipos dos SNVs analisados separadamente para pacientes e controles conduzidas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. **(B) SNV rs6505162:** Controles: C/C (N = 21); A/C (N = 35); A/A (N = 19). Pacientes: C/C (N = 16); A/C (N = 33); A/A (N = 14). **(C) SNV rs4713693:** Controles: T/T (N = 36); C/T (N = 30); C/C (N = 9). Pacientes: T/T (N = 31); C/T (N = 26); C/C (N = 6). **(D) SNV rs2910164:** Controles: G/G (N = 32); C/G (N = 30); C/C (N = 13). Pacientes: G/G (N = 32); C/G (N = 25); C/C (N = 6). **(E) SNV**

**rs895819:** Controles: T/T (N = 36); C/T (N = 27); C/C (N = 12). Pacientes: T/T (N = 28); C/T (N = 29); C/C (N = 6). Control.: grupo controle; TBP: tuberculose pulmonar.

Testou-se também a existência de diferenças nas concentrações de IL-6 em função dos diferentes modelos genéticos (**Figura 6**), avaliadas separadamente nos grupos de pacientes e controles. Para o SNV rs6505162, observou-se que no modelo dominante os pacientes portadores de ao menos uma cópia do alelo A (A/C+A/A) apresentaram maior concentração da IL-6 (35,52 pg/mL) quando comparados aos homozigotos do alelo C (16,57 pg/mL) ( $p = 0,0130$ ). Nos demais modelos genéticos avaliados para esse SNV, não foram observadas associações entre os genótipos e a concentração da IL-6. Adicionalmente, nenhum dos outros SNVs analisados apresentou associação com a concentração dessa citocina, independentemente do modelo genético testado.

**Figura 6.** Concentração plasmática de IL-6 distribuída de acordo com os modelos genéticos dominantes, recessivos e overdominantes para cada SNV, estratificada nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde).

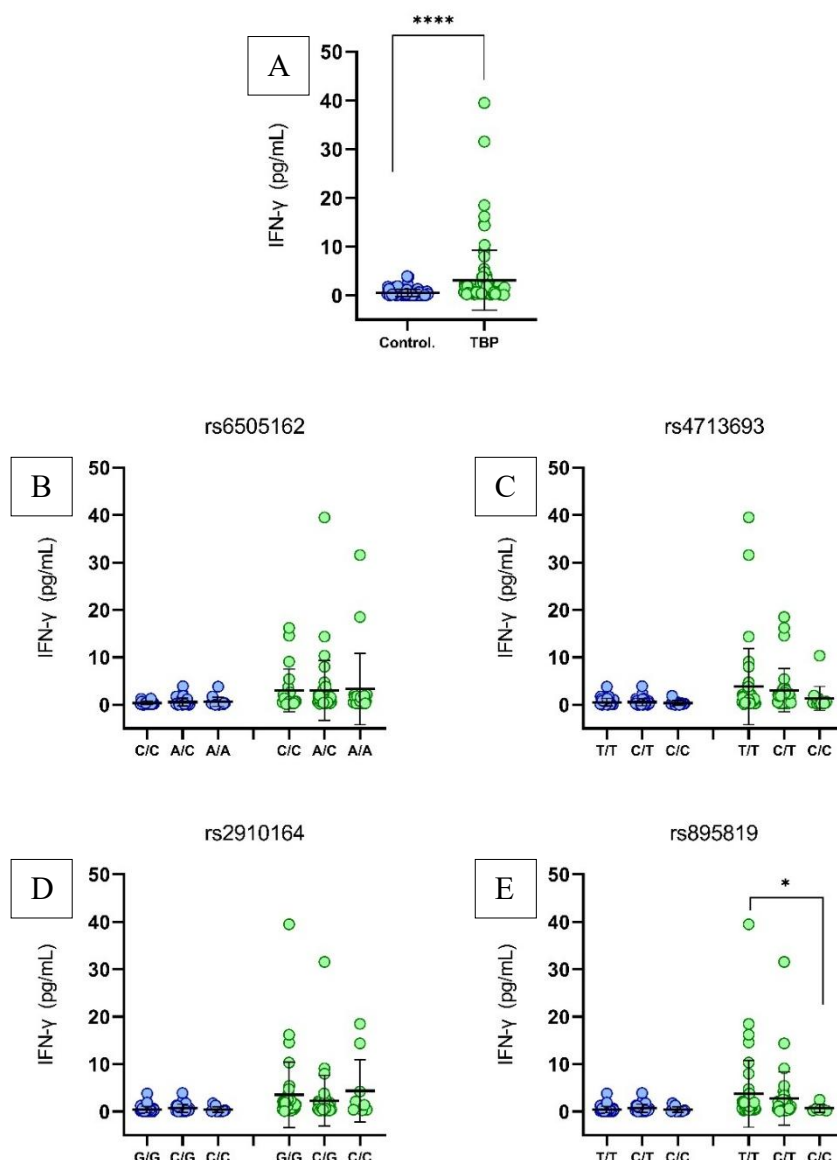


**Legenda:** Concentração plasmática de IL-6 no grupo controle e no grupo com TBP, distribuída de acordo com os modelos genéticos dominante, recessivo e overdominante para os SNVs analisados. Cada ponto representa um

indivíduo; controles estão representados de azul e pacientes em verde. As comparações entre os grupos foram realizadas por teste de Mann-Whitney. Linhas e asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (A-C) SNV rs6505162; (D-F) SNV rs4713693; (G-I) SNV rs2910164; (J-L) SNV rs895819.

A comparação da quantificação de IFN- $\gamma$  entre o grupo de pacientes e o grupo controle (**Figura 7**) apresentou uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). A concentração média de IFN- $\gamma$  entre os pacientes foi de 3,11 pg/mL, e a mediana foi 1,72 pg/mL, enquanto no grupo controle a concentração média foi de 0,53 pg/mL e a mediana foi 0,29 pg/mL. Na análise da concentração de IFN- $\gamma$  estratificada pelos diferentes genótipos dos 4 SNVs avaliados (rs6505162, rs4713693, rs2910164 e rs895819), observou-se associação significativa apenas para o rs895819, com maior concentração de IFN- $\gamma$  em indivíduos portadores do genótipo T/T (3,73 pg/mL) em comparação aos homozigotos C/C (0,72 pg/mL) ( $p = 0,0462$ ).

**Figura 7.** Concentração plasmática de IFN- $\gamma$  nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde), bem como segundo os diferentes genótipos dos SNVs analisados.

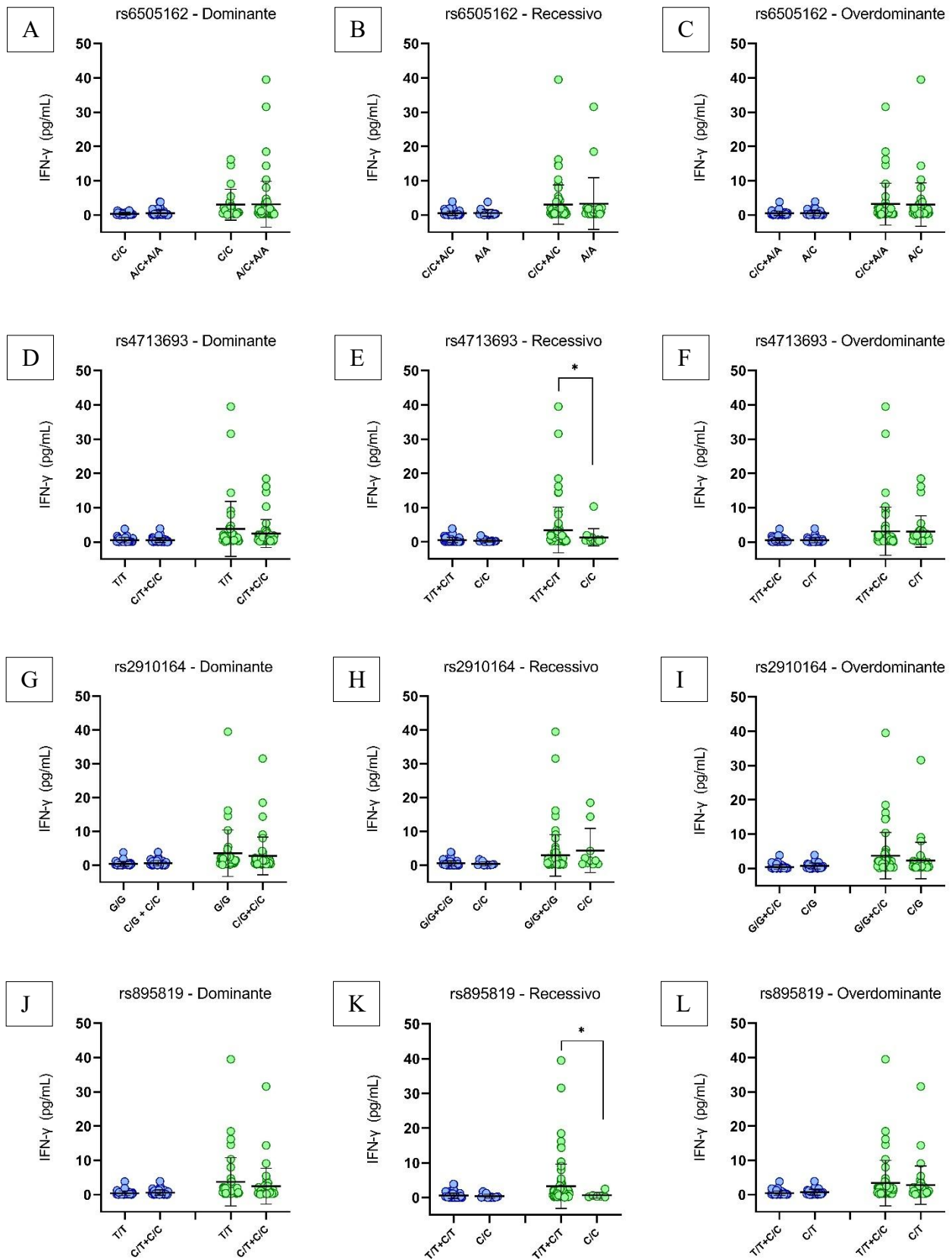


**Legenda:** (A) Comparação da concentração plasmática de IFN- $\gamma$  entre o grupo controle e o grupo com TBP. A análise estatística foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney. Círculos azuis representam indivíduos do grupo controle (N=76) e círculos verdes representam os pacientes (N = 86). (B-E) Comparação da concentração plasmática de IFN- $\gamma$  entre os diferentes genótipos dos SNVs analisados, com as análises realizadas separadamente para pacientes e controles. As comparações foram conduzidas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. **(B) SNV rs6505162.** Pacientes: C/C (N = 22); A/C (N = 43); A/A (N = 21). Controles: C/C (N = 24); A/C (N = 36); A/A (N = 16). **(C) SNV rs4713693.** Pacientes: T/T (N = 39); C/T (N = 32); C/C (N = 15). Controles: T/T (N = 30); C/T (N = 32); C/C (N = 14). **(D) SNV rs2910164.** Pacientes: G/G (N = 39); C/G (N = 37); C/C (N = 10). Controles: G/G (N = 38); C/G (N = 27); C/C (N = 11). **(E) SNV rs895819.** Pacientes: T/T (N = 43); C/T (N = 37); C/C (N = 6). Controles: T/T (N = 31); C/T (N = 31); C/C (N = 14). Linhas e asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ). Control.: controles; TBP: tuberculose pulmonar.

Na análise da concentração de IFN- $\gamma$  estratificada de acordo com os diferentes modelos genéticos para cada SNV (**Figura 8**), foram observadas associações estatisticamente significativas apenas em modelos recessivos. Para o SNV rs4713693, o modelo recessivo mostrou diferença significativa na concentração do IFN- $\gamma$  ( $p = 0,0146$ ), com maiores níveis nos pacientes portadores do alelo T (T/T+C/T) (3,48 pg/mL) em comparação aos pacientes homozigotos C/C (1,35 pg/mL).

De forma semelhante, para o SNV rs895819, o modelo recessivo também apresentou associação significativa com a concentração de IFN- $\gamma$  ( $p = 0,0218$ ), sendo observada maior concentração da citocina nos pacientes portadores do genótipo T/T+C/T (3,29 pg/mL) em relação aos pacientes homozigotos C/C (0,72 pg/mL). Para os demais modelos genéticos, bem como para os outros SNVs (rs6505162 e rs2910164), não foram identificadas associações significativas com a concentração de IFN- $\gamma$  tanto no grupo controle quanto de pacientes.

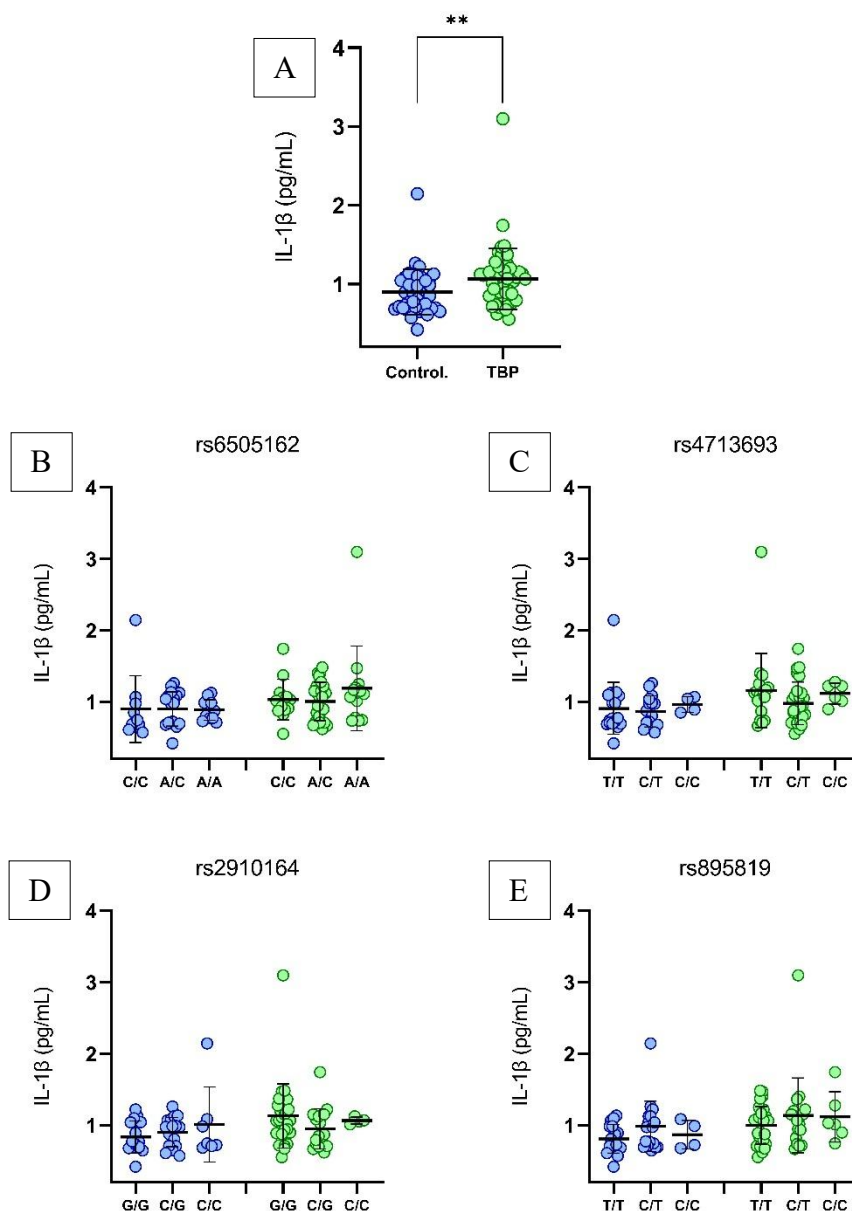
**Figura 8.** Concentração plasmática de IFN- $\gamma$  distribuída de acordo com os modelos genéticos dominantes, recessivos e overdominantes para cada SNV, estratificada nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde).



**Legenda:** Concentração plasmática de IFN- $\gamma$  no grupo controle e no grupo de pacientes com TBP, distribuída de acordo com os modelos genéticos dominante, recessivo e overdominante para os SNVs analisados. Cada ponto representa um indivíduo; controles estão representados de azul e pacientes em verde. As comparações entre os grupos foram realizadas por teste não paramétrico de Mann-Whitney. Linhas e asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (A-C) SNV rs6505162; (D-F) SNV rs4713693; (G-I) SNV rs2910164; (J-L) SNV rs895819.

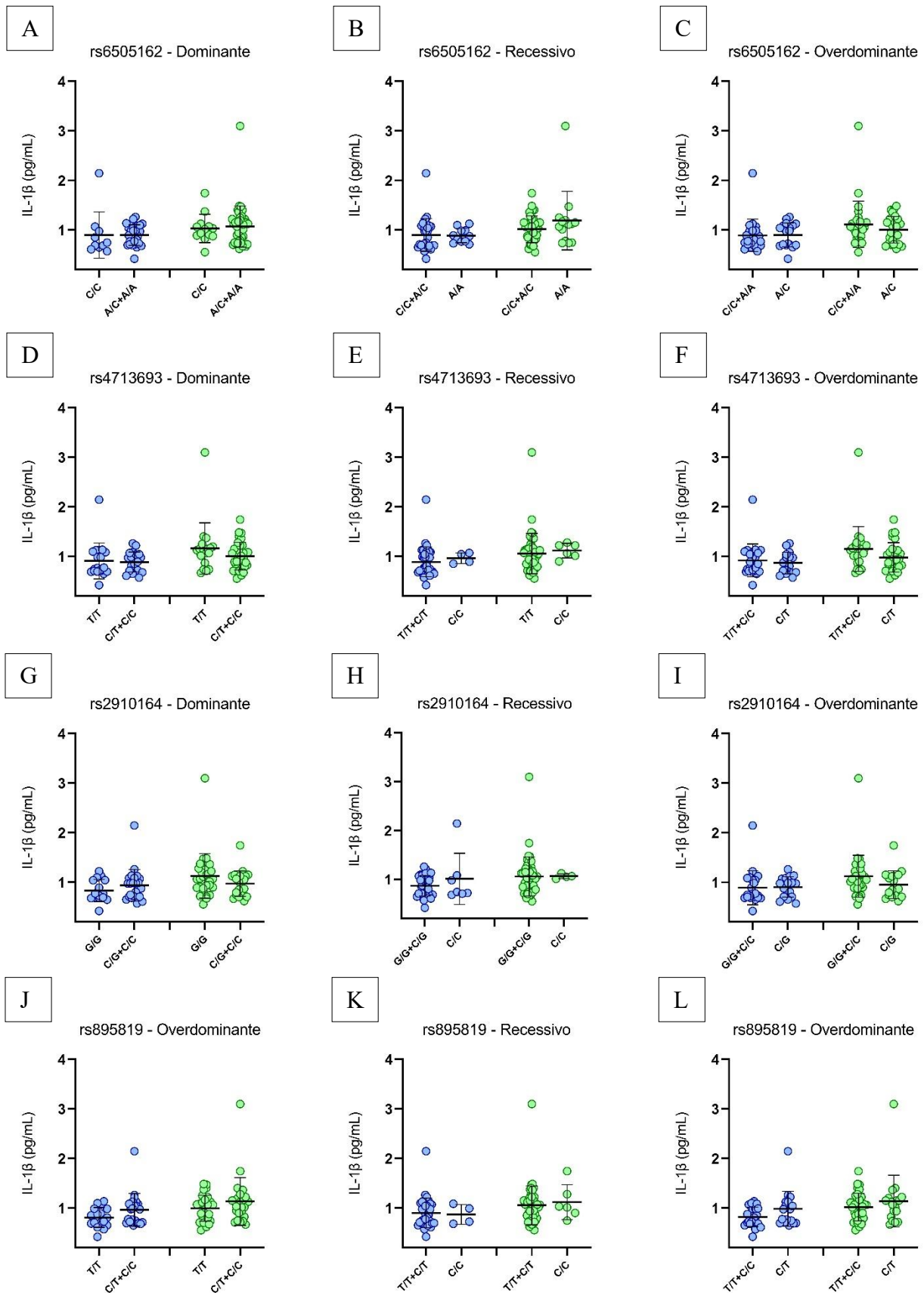
A comparação da quantificação de IL-1 $\beta$  entre o grupo de pacientes e o grupo controle (**Figura 9**) apresentou diferença significativa ( $p = 0,0054$ ). A concentração média de IL-1 $\beta$  entre os pacientes foi de 1,06 pg/mL e a mediana foi 1,05 pg/mL, enquanto do grupo controle, a concentração média foi 0,90 pg/mL e a mediana foi 0,85 pg/mL. Também foi analisada a concentração dessa citocina entre os diferentes genótipos que compõem cada SNV (**Figura 9**) e entre os diferentes modelos genéticos (**Figura 10**), não sendo detectada associações significativas em nenhuma dessas análises.

**Figura 9.** Concentração plasmática de IL-1 $\beta$  nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde), bem como segundo os diferentes genótipos dos SNVs analisados.



**Legenda:** (A) Comparação da concentração plasmática de IL-1 $\beta$  entre o grupo controle e o grupo com TBP. A análise estatística foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney. Círculos azuis representam indivíduos do grupo controle (N=39) e círculos verdes representam os pacientes (N = 52). (B-E) Comparação da concentração plasmática de IL-1 $\beta$  entre os diferentes genótipos dos SNVs analisados, com as análises realizadas separadamente para pacientes e controles. As comparações foram conduzidas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Linhas e asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (B) SNV rs6505162. Pacientes: C/C (N = 13); A/C (N = 25); A/A (N = 14). Controles: C/C (N = 10); A/C (N = 18); A/A (N = 11). (C) SNV rs4713693. Pacientes: T/T (N = 19); C/T (N = 27); C/C (N = 6). Controles: T/T (N = 19); C/T (N = 16); C/C (N = 4). (D) SNV rs2910164. Pacientes: G/G (N = 31); C/G (N = 17); C/C (N = 4). Controles: G/G (N = 15); C/G (N = 17); C/C (N = 7). (E) SNV rs895819. Pacientes: T/T (N = 27); C/T (N = 20); C/C (N = 6). Controles: T/T (N = 17); C/T (N = 17); C/C (N = 4). Control.: controles; TBP: tuberculose pulmonar.

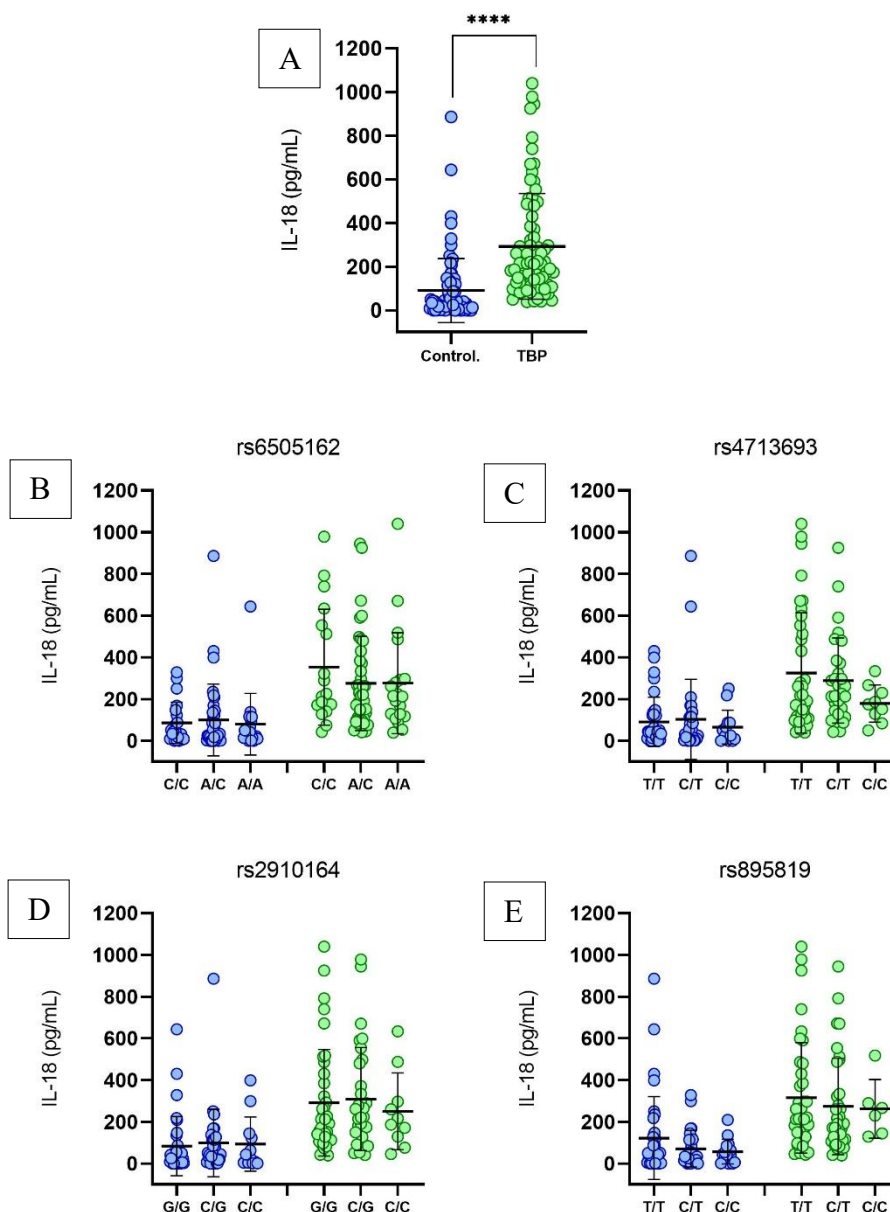
**Figura 10.** Concentração plasmática de IL-1 $\beta$  distribuída de acordo com os modelos genéticos dominantes, recessivos e overdominantes para cada SNV, estratificada nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde).



**Legenda:** Concentração plasmática de IL-1 $\beta$  no grupo controle e no grupo de pacientes com TBP, distribuída de acordo com os modelos genéticos dominante, recessivo e overdominante para os SNVs analisados. Cada ponto representa um indivíduo; controles estão representados de azul e pacientes em verde. As comparações entre os grupos foram realizadas por teste não paramétrico de Mann-Whitney. Linhas e asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (A-C) SNV rs6505162; (D-F) SNV rs4713693; (G-I) SNV rs2910164; (J-L) SNV rs895819.

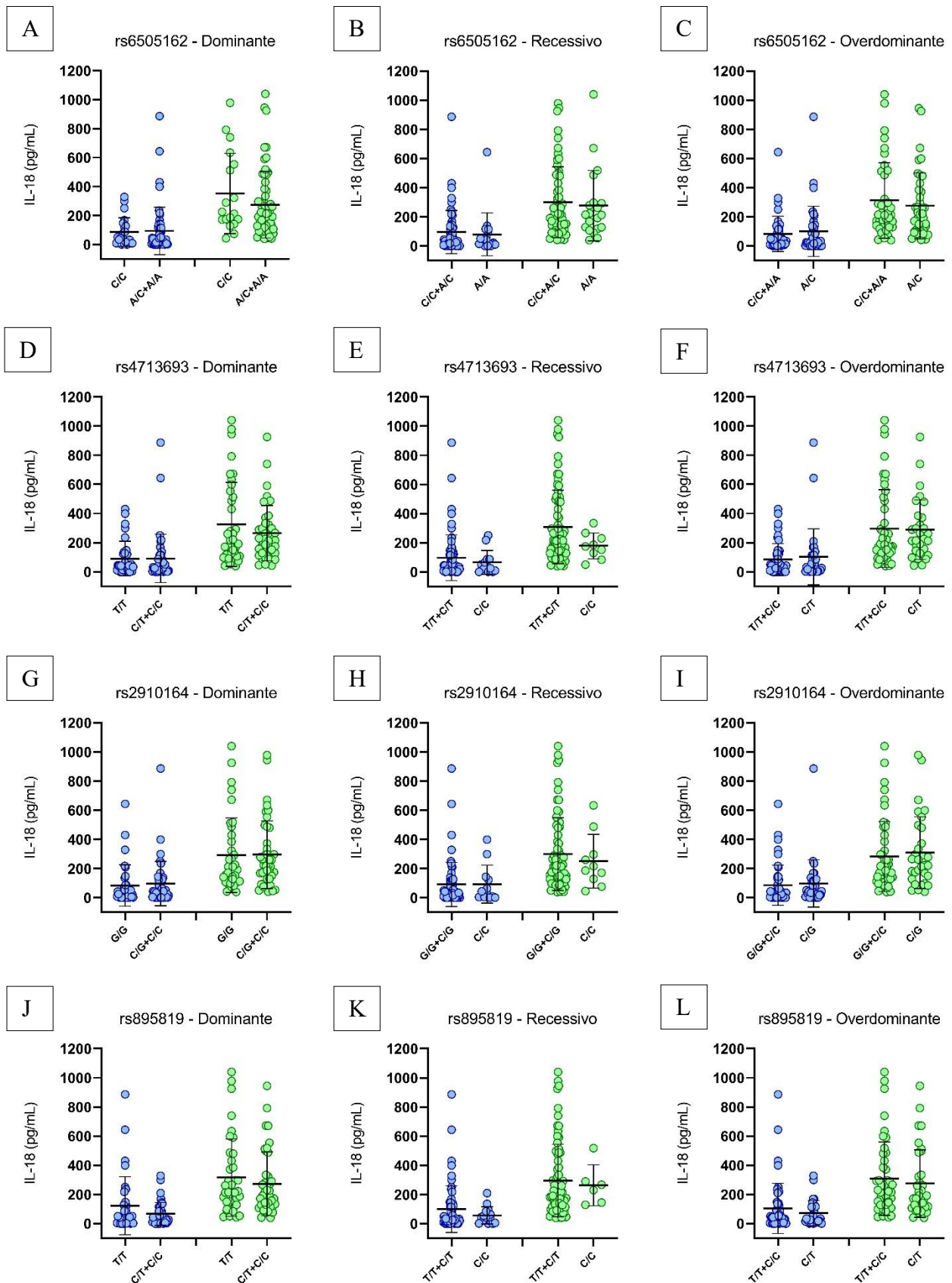
Na comparação da quantificação de IL-18 entre o grupo de pacientes e o grupo controle (**Figura 11**) foi detectada diferença significativa entre os grupos controle e com TBP ( $p < 0,0001$ ). A concentração média de IL-18 entre os pacientes foi de 293,17 pg/mL, e a mediana foi 213,63, enquanto no grupo controle a concentração média foi 91,10 pg/mL e a mediana foi 36,69 pg/mL. Entretanto, nas análises entre a associação da concentração da IL-18 com os genótipos de cada SNV (**Figura 11**), ou com os modelos genéticos, nenhuma associação estatística foi identificada (**Figura 12**).

**Figura 11.** Concentração plasmática de IL-18 nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde), bem como segundo os diferentes genótipos dos SNVs analisados.



**Legenda:** (A) Comparação da concentração plasmática de IL-18 entre o grupo controle e o grupo com TBP. A análise estatística foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney. Círculos azuis representam indivíduos do grupo controle (N=76) e círculos verdes representam os pacientes (N=78). (B-E) Comparação da concentração plasmática de IL-18 entre os diferentes genótipos dos SNVs analisados, com as análises realizadas separadamente para pacientes e controles. As comparações foram conduzidas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Linhas e asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (A) SNV rs6505162. Pacientes: C/C (N = 18); A/C (N = 40); A/A (N = 20). Controles: C/C (N = 22); A/C (N = 36); A/A (N = 18). (B) SNV rs4713693. Pacientes: T/T (N = 37); C/T (N = 32); C/C (N = 9). Controles: T/T (N = 33); C/T (N = 30); C/C (N = 13). (C) SNV rs2910164. Pacientes: G/G (N = 37); C/G (N = 31); C/C (N = 10). Controles: G/G (N = 33); C/G (N = 31); C/C (N = 12). (D) SNV rs895819. Pacientes: T/T (N = 38); C/T (N = 34); C/C (N = 6). Controles: T/T (N = 34); C/T (N = 28); C/C (N = 14). Control.: controles; TBP: tuberculose pulmonar.

**Figura 12.** Concentração plasmática de IL-18 distribuída de acordo com os modelos genéticos dominantes, recessivos e overdominantes para cada SNV, estratificada nos grupos controle (em azul) e de pacientes (em verde).



**Legenda:** Concentração plasmática de IL-18 no grupo controle e no grupo de pacientes com TBP, distribuída de acordo com os modelos genéticos dominante, recessivo e overdominante para os SNVs analisados. Cada ponto representa um indivíduo; controles estão representados de azul e pacientes em verde. As comparações entre os grupos foram realizadas por teste não paramétrico de Mann-Whitney. Linhas e asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (A-C) SNV rs6505162; (D-F) SNV rs4713693; (G-I) SNV rs2910164; (J-L) SNV rs895819.

No geral, as concentrações das citocinas investigadas foram maiores entre os pacientes com TBP em comparação aos controles. Esse resultado já era esperado, e é altamente compatível com a ativação de múltiplas vias de sinalização induzidas pela infecção por *M. tuberculosis*, incluindo TLRs, MAPK e NF- $\kappa$ B, culminando em uma resposta inflamatória com maiores concentrações de IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-18.

Essas análises foram conduzidas com caráter exploratório, com o objetivo de contextualizar possíveis perfis imunológicos associados às variantes genéticas investigadas, não representando testes funcionais diretos. Dessa forma, os resultados devem ser interpretados com cautela, não tendo sido aplicada correção para múltiplas comparações, sendo utilizados principalmente para apoiar a discussão biológica dos achados imunogenéticos.

Em relação à IL-6, evidências acumuladas em modelos murinos e humanos, evidenciam que essa citocina possui um papel importante no desempenho da resposta imunológica antituberculose, bem como na imunopatogênese da doença. Dados indicam que a IL-6 pode ser protetora, como em modelos experimentais com animais *knockout* para IL-6, que possuíam maior suscetibilidade à TB e maior mortalidade frente à infecção, bem como menor produção de IFN- $\gamma$  (Ladel et al., 1997). Ao mesmo tempo em que concentrações muito altas de IL-6 têm sido relacionada com lesões cavitárias e exacerbação inflamatória (Oh et al., 2018). Logo, a atuação da IL-6 na TB não é linear, podendo exercer um efeito protetor no início do processo infeccioso, mas deletério à medida que a infecção se cronifica.

A associação da IL-6 com o genótipo rs6505162 (miR-423) identificada nesse estudo, em que, no modelo dominante (A/C+A/A vs. C/C), pacientes portadores de ao menos uma cópia do alelo A tiveram maior concentração plasmática de IL-6 detectada em comparação aos portadores do genótipo C/C, pode ser interpretada com base em uma hipótese mecanística plausível envolvendo a regulação da biogênese do miR-423 por essa variante genética.

Segundo os trabalhos de Su et al. (2015) em células HEC-1b (adenocarcinoma do endométrio) e de Zhao et al. (2015) em células MDA-MB-231 (câncer de mama humano), o

alelo A induz a maior produção do miR-423 maduro. Adicionalmente, no estudo de Dai et al. (2020a) foi identificado que o miR-423 tem como alvo o gene *TNIP2*, que é um regulador negativo da via NF-κB. Desse modo, sugere-se que níveis aumentados de miR-423 poderiam favorecer a ativação dessa via pró-inflamatória e, conseqüentemente, a produção de citocinas inflamatórias.

Embora até o momento não tenha sido identificado nenhum estudo indicando a atuação direta desse SNV no contexto da TB, pois os estudos identificados nesse sentido têm maior enfoque em modelos de câncer, os achados identificados nessa tese permitem inferir que o alelo A de rs6505162 possa contribuir para um perfil inflamatório mais intenso, possivelmente mediado pela maior expressão de miR-423 e maior ativação de vias mediadas por NF-κB, com a conseqüente produção aumentada do IL-6. No entanto, esse mecanismo carece de elucidação em modelos de infecção pelo *M. tuberculosis*.

O miR-423 tem sido descrito em alguns estudos positivamente relacionado com a produção de IL-6, por exemplo, em um estudo sobre o papel do miR-423 no glioma, Tang et al. (2024) identificou que astrócitos humanos transfectados com mimetizador de miR-423-3p tiveram maior produção de IL-6 e IL-8, e essa resposta foi mediada pelo processo de autofagia induzido por esse miRNA. Já em um estudo com pacientes portadores de periodontite grave, Constantini et al. (2023) identificou que as concentrações de IL-6 e de miR-423-5p se encontram aumentadas, e positivamente correlacionadas, no fluido gengival dos pacientes, especialmente naqueles com maior gravidade. Por outro lado, em um estudo com pacientes asmáticos, foi identificado que a circulação sérica de IL-6 não está positivamente correlacionada com os níveis do miR-423-5p (Qiu et al., 2022), reforçando o caráter contexto-dependente dessa interação e a necessidade de investigações específicas na TB.

Em relação ao IFN-γ, sua atuação na resposta imunológica na tuberculose é central, sendo a citocina chave na ativação de macrófagos e no controle da infecção intracelular. Na presente tese, identificamos a associação de rs895819 (miR-27a) com a concentração plasmática dessa citocina, onde os pacientes homozigotos para o alelo T tiveram maiores níveis detectados em comparação aos homozigotos para o alelo C. Além disso, no modelo recessivo, os portadores de ao menos uma cópia do alelo T (C/C vs. T/T+C/T) também tiveram maior produção de IFN-γ detectada.

Alguns mecanismos já descritos na literatura podem embasar a hipótese para esse achado. O alelo C já foi descrito em diferentes estudos interferindo na biossíntese do miR-27a

e levando a menor produção dessa molécula em comparação ao alelo T (Yang et al., 2022; Ragia et al., 2024). Em outro estudo, identificou-se que o miR-27a é capaz de atuar na polarização de macrófagos M1/M2, tendo como alvo o fator de transcrição IRF-4, que é importante para a polarização M2, de modo que a repressão desse fator pelo miR-27a pode contribuir para a manutenção do fenótipo M1 (Ahluwalia et al., 2017).

O fenótipo M1, ou macrófagos classicamente ativados, possuem alta capacidade de eliminação de patógenos intracelulares. Essas células respondem ao IFN- $\gamma$  produzido principalmente por células NK e T CD4<sup>+</sup> ativando seus mecanismos microbicidas, como a produção de espécies reativas, a acidificação do lisossomo e a potencialização do processamento e apresentação antigênicos via HLA-II. Paralelamente, macrófagos M1 também contribuem com a produção de IFN- $\gamma$  nas infecções micobacterianas (Jun Wang et al., 1999), além de serem fonte de IL-12, retroalimentando positivamente as resposta Th1 e levando a maior produção global dessa citocina (Leopold Wager et al., 2014; Khan et al., 2016).

Desse modo, hipotetizamos que o alelo T de rs895819 proporciona maiores níveis do miR-27a maduro, o qual regula negativamente o fator de transcrição importante para a polarização M2, sustentando o fenótipo M1, e, conseqüentemente, levando a maiores níveis gerais de produção do IFN- $\gamma$ . Entretanto, assim como já mencionado para o rs6505162, tal mecanismo envolvendo o rs895819 carece de validação direta no contexto da infecção pelo *M. tuberculosis*.

Entretanto, apesar do mecanismo supracitado, estudos tem apontado resultados opostos. Em um trabalho com células THP-1 infectadas com a cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, foi identificado que a transfecção com miR-27a levou à diminuição da produção celular de IFN- $\gamma$  (Wang et al., 2017). De forma semelhante, outros estudos em diferentes modelos patológicos relataram associação do miR-27a com a redução da produção dessa citocina, como no trabalho de Luo et al. (2024) em câncer de pulmão, no qual um cluster de miRNAs que inclui o miR-27a bloqueia a produção do IFN- $\gamma$  por células T, e no estudo em glioblastoma de Weber et al. (2024), no qual inibidores do miR-27a aumentaram a produção dessa citocina.

Esses dados contrastantes com o nosso pressuposto, especialmente no trabalho de Wang et al., (2017), que usou uma modelo celular infectado com o bacilo, podem ser explicados pela complexidade da ação do miRNA *in vivo*, em que a molécula não atua isoladamente, mas em conjunto com diversas outras moléculas reguladoras na modulação da produção de citocinas. Nesse sentido, um estudo conduzido por Cruz et al. (2017) demonstrou que, embora em nível

celular a superexpressão de miR-27a esteja associada a menores níveis de IFN- $\gamma$ , os níveis circulantes e teciduais dessa citocina estavam elevados, em razão do comprometimento de células T regulatórias mediado por este miRNA, resultando em uma produção desregulada e exacerbada de IFN- $\gamma$  (Cruz et al., 2017). Esse conjunto de dados demonstra que estudos *in vivo* com o miR-27a na TB, especialmente no que se refere a atuação da variante rs895819 nesse processo, é um campo promissor.

Quanto aos rs6505162 e rs895819, essas variantes não apresentaram associação com a TB quando analisadas isoladamente, entretanto, na análise de interação gênica, ambas em conjunto estiveram associadas à proteção contra a doença. A identificação dessas variantes associadas com a produção de citocinas inflamatórias como IL-6 e IFN- $\gamma$ , reforça a hipótese de que essas variantes, podem interferir na resposta imunológica contra a TB. Esses achados evidenciam que variantes gênicas, mesmo não afetando diretamente a suscetibilidade à doença de forma isolada, podem atuar de maneira combinada com outros genes, modulando a concentração de citocinas e contribuindo para o desfecho imunopatológico da infecção.

Em relação as variantes rs4713693 (miR-1275), neste trabalho foi identificado que o perfil homozigoto para o alelo C no modelo recessivo (C/C vs. T/T+C/T ) está associado a menor produção de IFN- $\gamma$  em comparação aos portadores de ao menos uma cópia do alelo T no grupo de pacientes. Poucos estudos têm sido realizados envolvendo essa variante, de modo que não foram identificados trabalhos indicando se algum dos alelos interfere diretamente na quantidade produzida de miR-1275.

A modulação de miR-1275 na produção de IFN- $\gamma$  já foi descrita por Ou et al. (2023), em estudo com câncer de pâncreas no qual a presença de microambiente com hipóxia modulou negativamente a expressão de miR-1275 em células NK, levando à redução da produção não apenas de IFN- $\gamma$ , mas também de perforinas e de TNF- $\alpha$ . Esse mecanismo ocorre pois o miR-1275 tem como alvo a *AXIN2* componente da via Wnt/  $\beta$ -catenina, e está associada a inibição da produção dessas citocinas. Em contraste, em um estudo *in vitro* com macrófagos THP-1 infectados com *M. tuberculosis*, o miR-1275 foi encontrado com expressão aumentada quando comparado à infecção com uma cepa avirulenta (Das et al., 2013).

Logo, uma vez que a *AXIN2* é um gene amplamente expresso e envolvido em programas moleculares associados ao perfil M2 de macrófagos (Yang et al., 2018b), pode-se hipotetizar que uma concentração aumentada de miR-1275, como a identificada por Das et al. em macrófagos infectados, leve a uma maior repressão pós-transcricional da *AXIN2*, resultando,

consequentemente, na maior produção de citocinas, especialmente IFN- $\gamma$ . Por sua vez, no contexto do alelo C, a hipótese é que esse alelo seria responsável por induzir a menor expressão de miR-1275, o que conduziria a menor repressão da AXIN2 e, consequentemente, a menores níveis séricos de IFN- $\gamma$  encontrado nos portadores desse alelo em homozigose. Entretanto, essa hipótese precisa de validação experimental, pois a ação moduladora de miR-1275 no gene *AXIN2* foi avaliada em contexto oncológico, e a modulação mediada pelos miRNAs não é uniforme em todos os tipos celulares e contextos fisiopatológicos.

O presente estudo também identificou que o alelo C de rs4713693 esteve inicialmente está associado à proteção contra a TBP ( $p = 0,0218$ ; OR = 0,79; IC95% = 0,65-0,97), o que não foi mantido após correção de Bonferroni. Paralelamente, o genótipo C/C foi associado a menores níveis detectados de IFN- $\gamma$  no plasma dos pacientes com a doença ativa já diagnosticada. Esses achados podem parecer antagônicos à primeira vista, pois, dada a importância central do IFN- $\gamma$  na resposta contra *M. tuberculosis*, seria esperado que a presença desse alelo associado à proteção nas análises preliminares, pudesse levar à produção de maiores concentrações dessa citocina. Entretanto, isso pode ocorrer pelo fato de que a atuação de um gene nem sempre é linear ao longo do curso de uma doença, podendo exercer efeitos distintos em diferentes fases do processo infeccioso, por exemplo, conferindo a resistência ao desenvolvimento da doença ativa, mas não necessariamente modulando de forma favorável a resposta inflamatória sistêmica quando a TB já estiver estabelecida. Essa interpretação também é corroborada pela ausência de associação do alelo C de rs4713693 com a carga bacilar nos pacientes avaliados.

Além disso, alguns trabalhos na literatura apresentaram achados parcialmente semelhantes aos observados nesta tese. Rolandelli et al., (2016) identificou que o genótipo A/A do SNV rs2275913 do gene *IL17A* está associado à proteção contra a TBP em uma coorte argentina, entretanto, esse mesmo genótipo está associado a concentrações menores de IFN- $\gamma$  entre os pacientes, bem como associado a maior carga bacilar e maior gravidade clínica. De forma complementar, Barletta-Naveca et al. (2018), embora não tenha identificado associação entre o rs5743618 de *TLR1* e a suscetibilidade à TB, demonstrou que essa variante está associada à carga bacilar dos pacientes, evidenciando a noção de que variantes genéticas podem não influenciar o risco de adoecimento, mas modular desfechos clínicos na doença.

A variante rs2910164 (miR-146a), no presente estudo, não apresentou associação com a concentração de nenhuma citocina detectada no plasma dos indivíduos avaliados. Apesar

dessa variante já ter sido associada com a produção de diferentes níveis de expressão de miR-146a, e esse miRNA ter sido implicado na modulação do inflamassoma NLRP3, e, consequentemente, relacionado à produção de IL-1 $\beta$  e IL-18, tais evidências provêm de modelos experimentais de doenças. Diante da via do NLRP3 na regulação dessas citocinas, seria esperado observar associação semelhante no contexto da TB, contudo, tal relação não foi identificada nesse estudo. Uma possível explicação é que, na TB, o miR-146a não exerce o mesmo papel identificado em outros tipos de doenças. Ademais é possível que a variante rs2910164 não provoque alterações funcionais suficientes para resultar em diferenças detectáveis nas concentrações plasmáticas dessas citocinas. Dessa forma, o papel do específico do miR-146a na modulação do inflamassoma em modelos de TB permanece uma lacuna no conhecimento que demanda mais investigações.

## 7. CONCLUSÃO

A TBP é uma doença multifatorial, cuja ocorrência e progressão resultam da interação complexa entre fatores sociais, ambientais, imunológicos e genéticos. No presente estudo, conduzido em uma população recrutada no estado do Amazonas, foi possível confirmar que fatores comportamentais, como tabagismo e etilismo, estão associados a maior risco de desenvolvimento da doença, enquanto a vacinação com a BCG, embora não seja determinante na proteção contra a forma pulmonar em adultos, integra o conjunto de elementos que podem modular a suscetibilidade individual à TBP.

No que diz respeito aos dados imunogenéticos, os resultados desta tese reforçam o papel dos miRNAs como reguladores da resposta imune contra *M. tuberculosis*, especificamente quando analisadas as interações SNV-SNV. Demonstrou-se também que a variante genética rs4713693, localizada em um elemento regulatório do gene *MIR1275*, embora inicialmente associada à proteção contra a TBP, não manteve significância após a correção de Bonferroni, indicando que esse SNV pode não impactar a suscetibilidade à TBP de forma individual. O genótipo C/C dessa variante também foi associado a níveis reduzidos de IFN- $\gamma$  em pacientes com a doença ativa.

As demais variantes estudadas, rs6505162 (*MIR423*), rs2910164 (*MIR146A*) e rs895819 (*MIR27A*) não apresentaram associação com a TBP no presente estudo, além disso, nenhuma das quatro variantes analisadas apresentou associação com a carga bacilar da doença. Entretanto, isso não significa que esses SNVs não impactam o desenvolvimento ou progressão da doença, uma vez que em ambiente fisiológico, diversos genes e moléculas atuam em conjunto na determinação dos desfechos de diversas doenças, mesmo que em análises individuais tais associações não sejam detectadas.

Nesse contexto, este estudo demonstrou que variantes genéticas podem atuar de forma combinada, por meio de interações SNV-SNV (rs6505162 A/C: rs895819 C/C;  $p^{\text{Bonferroni}} = 0,0466$ ; OR = 0,13; IC95% = 0,04-0,42). Esse achado reforça a importância de abordagens que considerem a interação entre múltiplos genes, o que reflete de maneira mais realista a complexidade de redes regulatórias envolvidas na resposta imune na TBP.

Observou-se ainda que SNVs em miRNAs, mesmo na ausência de associação direta com a suscetibilidade à doença, podem modular a concentração de citocinas inflamatórias, como IL-6 e IFN- $\gamma$ , contribuindo para a manutenção da resposta imunológica e, potencialmente, para diferentes desfechos clínicos da infecção. Esses resultados indicam que a influência

genética na tuberculose não se limita à suscetibilidade, estendendo-se também à regulação da resposta inflamatória após a doença ser estabelecida.

O presente trabalho contribui com dados inéditos sobre as frequências alélicas de variantes de miRNAs em uma população recrutada no Amazonas, área ainda pouco explorada em estudos genéticos no Brasil envolvendo essa temática. Todos os alelos de menor frequência das variantes analisadas apresentaram frequência superior a 0,30 nesse estudo, tais valores mostraram-se consistentes com dados populacionais de referência e com estudos prévios conduzidos na região Norte, e no caso de rs895819 e rs4713693, os dados apresentados constituem as primeiras estimativas de frequência no Brasil. Esses dados ampliam o conhecimento científico acerca do papel de SNVs em miRNAs na tuberculose pulmonar, e podem servir como base para investigações futuras, incluindo estudos funcionais e análises em outras populações, visando aprofundar a compreensão do papel dos miRNAs e de suas variantes genéticas na interação entre o *M. tuberculosis* e o hospedeiro.

## 8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Uma das limitações deste estudo refere-se à ausência de testes imunológicos específicos, como IGRA ou PPD, para confirmação da ausência de infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* no grupo controle. Essa abordagem não foi adotada devido ao custo elevado do IGRA e às limitações inerentes ao PPD, como reações cruzadas com a vacinação por BCG e exposição a micobactérias ambientais. Ainda assim, os controles incluídos não apresentavam sintomas respiratórios ou diagnóstico prévio de TBP, e as frequências genótípicas observadas encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, além de compatíveis com dados populacionais de referência, sugerindo adequada representatividade da amostra e reduzindo a probabilidade de viés relevante na seleção dos participantes.

Além disso, embora o tamanho amostral tenha sido adequado para as análises principais, a avaliação de interações entre variantes genéticas pode demandar amostras ainda maiores para detectar efeitos de menor magnitude, e garantir maior confiabilidade dos resultados encontrados.

Por fim, não foram realizados estudos funcionais para avaliar diretamente o impacto biológico das variantes analisadas sobre a expressão dos miRNAs ou sobre vias imunológicas específicas. Dessa forma, os achados apresentados devem ser interpretados como evidências de associação genética, que necessitam de validação em outras populações e em modelos experimentais funcionais, a fim de elucidar os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos observados.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Estudos futuros podem incluir análises funcionais para avaliar o impacto desses SNVs investigados sobre a expressão dos miRNAs correspondentes, bem como sobre a regulação de genes-alvo e a produção de citocinas relevantes na resposta ao *Mycobacterium tuberculosis*. Ensaio em modelos de cultura de celular, como macrófagos ou PBMCs, poderão esclarecer se diferentes genótipos estão associados a alterações na expressão dos miRNAs e na resposta inflamatória.

Outra perspectiva consiste na ampliação do tamanho amostral, especialmente para as análises de interação SNV-SNV. Amostras maiores permitirão aumentar o número de indivíduos com as combinações genóticas avaliadas, possibilitando resultados mais robustos e maior poder estatístico para a detecção dessas interações. A inclusão de outras amostragens independentes também pode ser importante para validação dos achados em diferentes populações.

Estudos futuros podem integrar as variantes genéticas com fenótipos clínicos e imunológicos mais detalhados, como a gravidade da doença e o desfecho clínico, além de explorar redes regulatórias envolvendo múltiplos miRNAs e análises de interação gene-gene, contribuindo para melhor compreensão do papel dessas variantes na suscetibilidade à TBP.

## 10. ORÇAMENTO E FONTE DE FINANCIAMENTO

Este projeto teve apoio financeiro do Laboratório de Imunologia Molecular (LIM) e do Laboratório de Micobacteriologia do INPA, com projetos aprovados pela FAPEAM CAPES e CNPq cuja verba já foi liberada. Além de bolsa de estudos concedidas pela CAPES entre março de 2023 e outubro de 2024, e bolsa CNPq entre maio de 2025 e março de 2026.

| ITENS            | Descrição dos materiais para Identificação dos SNVs e Citocinas | VALOR R\$<br>(REAIS) |
|------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------|
| 01               | Oligonucleotídeos e sondas TaqMan                               | 9.560,00             |
| 02               | TaqMan Genotyping Master Mix 1x 10mL                            | 9.500,00             |
| 03               | MicroAmp Optical Adhesive Film Kit                              | 470,00               |
| 04               | MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (20 plates)             | 2.530,00             |
| 05               | Material para coleta de amostras                                | 1.012,50             |
| 06               | Kit para citocinas                                              | 10.660,20            |
| 07               | Kit para pesquisa de anticorpos                                 | 5.890,00             |
| 08               | Placas de alta ligação para ELISA                               | 1.750,00             |
| <b>Total R\$</b> |                                                                 | <b>41.372,70</b>     |

## 11. CRONOGRAMA

|                                                               | Ano (meses) |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------------------------------------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|---|---|---|---|---|---|---|
|                                                               | 2023        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 2024 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 2025 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | 2026 |   |   |   |   |   |   |   |
| Atividades                                                    | M           | A | M | J | J | A | S | O | N | D | J | F    | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D | J    | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D    | J | F | M |   |   |   |   |
| Atualização e leitura de artigos científicos                  | x           | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x    | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x    | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x    | x | x | x | x | x |   |   |
| Realização das disciplinas obrigatórias e optativas do PPGIBA |             |   |   | x | x | x | x | x | x | x |   |      |   |   | x | x | x | x | x | x | x | x | x    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |
| Realização do estágio em docência                             |             |   |   |   |   | x | x | x | x | x |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |
| Coleta e processamento das amostras biológicas                | x           | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x    | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x    | x | x | x | x | x | x | x |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |
| Extração do DNA das amostras biológicas                       | x           | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x    | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x    | x | x | x | x | x | x | x |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |
| Genotipagem por qPCR dos SNVs de miRNA                        |             |   |   |   |   |   |   |   | x | x | x | x    | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x    | x | x | x | x | x | x |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |
| Dosagem de citocinas por ProQuantum                           |             |   |   |   |   |   |   |   |   | x | x | x    | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x    | x | x | x |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |
| Análise estatística dos resultados obtidos                    |             |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |
| Elaboração do manuscrito para Defesa                          |             |   |   |   |   |   |   |   | x | x | x | x    | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x    | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x    | x | x | x | x | x |   |   |
| Elaboração do artigo científico                               |             |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   | x | x | x |
| Defesa da tese de doutorado                                   |             |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   | x |

## 12. EQUIPE DO PROJETO

| Ordem | Nome                                                                                                | Título                            | Função                                                                                                                                                                   |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1     | <b>Marcos Henrique Gurgel Rodrigues</b><br>Farmacêutico<br>Área de atuação:<br>Imunologia           | Doutorando<br>PPGIBA/ICB/UFA<br>M | Executou: coleta de amostras, extração de DNA humano e qPCR, discriminação alélica, ensaios de quantificação de citocinas, análise e interpretação dos resultados.       |
| 2     | <b>Aya Sadahiro</b><br>Docente UFAM-ICB<br>Área de atuação:<br>Imunologia e Microbiologia           | Doutor                            | Coordenou e participou de todas as atividades do projeto pesquisa.                                                                                                       |
| 3     | <b>Mauricio Morishi Ogusku</b><br>(Pesquisador - INPA) Área de atuação<br>Micobacteriologia         | Doutor                            | Prestou assessoria nos exames baciloscópicos, cultivo e nos ensaios de biologia molecular.                                                                               |
| 4     | <b>Luciana Botinelly Fujimoto</b><br>Docente UFAM-FM<br>Área de atuação:<br>Patologia               | Doutor                            | Prestou colaboração para avaliar os dados epidemiológicos e clínicos da TB.                                                                                              |
| 5     | <b>Joycenea da Silva Matsuda</b> Pesquisadora da<br>ILMD-Fiocruz/AM e Médica Pneumologista<br>SUSAM | Mestre                            | Prestou colaboração na seleção dos pacientes com Tuberculose.                                                                                                            |
| 6     | <b>Mariana Brasil de Andrade Figueira</b><br>Farmacêutica<br>Área de atuação:<br>Imunologia         | Doutora                           | Colaborou no processamento e organização das amostras clínicas.<br>Auxiliou nos ensaios de genotipagem e quantificação de citocinas.<br>Auxiliou nas análises dos dados. |
| 7     | <b>Gilberto Ferreira Bazé Júnior</b><br>Farmacêutico<br>Área de atuação:<br>Imunologia              | Mestre                            | Colaborou na coleta, processamento e organização das amostras clínicas.<br>Auxiliou nos ensaios de genotipagem e quantificação de citocinas.                             |

|    |                                                                                           |                               |                                                                                                                                           |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8  | <b>Alliny Almeida Queiroz</b><br>Biotecnóloga<br>Área de atuação:<br>Imunologia           | Mestre                        | Colaborou na coleta, processamento e organização das amostras clínicas. Auxiliou nos ensaios de genotipagem e quantificação de citocinas. |
| 9  | <b>Laianne Lopes Rocha</b><br>Bióloga<br>Área de atuação:<br>Imunologia                   | Doutora                       | Colaborou no processamento e organização das amostras clínicas.                                                                           |
| 10 | <b>Renata Gualberto da Cunha</b><br>Odontóloga Área de atuação:<br>Patologia e Imunologia | Doutoranda<br>PPGIBA/ICB/UFAM | Colaborou no processamento e organização das amostras clínicas. Auxiliou nos ensaios de genotipagem e quantificação de citocinas.         |

### 13. REFERÊNCIAS

- ABATE, Ebba et al. Polymorphisms in CARD8 and NLRP3 are associated with extrapulmonary TB and poor clinical outcome in active TB in Ethiopia. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 3126, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40121-8>
- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. *Imunologia celular e molecular*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.
- ABBASNIA, Shadi et al. Mycobacterium tuberculosis and host interactions in the manifestation of tuberculosis. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, v. 36, p. 100458, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2024.100458>
- AHLUWALIA, Pankaj Kumar et al. Perturbed microRNA expression by Mycobacterium tuberculosis promotes macrophage polarization leading to pro-survival foam cell. *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 107, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00107>
- AHMAD, Faraz et al. Macrophage: a cell with many faces and functions in tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 747799, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.747799>
- AKAMATSU, Sakura et al. Differences in serum microRNA profiles in hepatitis B and C virus infection. *Journal of Infection*, v. 70, n. 3, p. 273-287, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.10.017>
- AKIRA, Shizuo. The role of IL-18 in innate immunity. *Current opinion in immunology*, v. 12, n. 1, p. 59-63, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(99\)00051-5](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(99)00051-5)
- ALCANTARA, Cheldon Ann et al. Neutrophils in Mycobacterium tuberculosis. *Vaccines*, v. 11, n. 3, p. 631, 2023. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030631>
- ALI, Sajjad et al. Genetic variants rs2910164, rs4636297 and rs895819 may contribute to the onset of acute myocardial infarction in Pakistani population. *Plos one*, v. 19, n. 1, p. e0296025, 2024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296025>
- AL-QAHTANI, A. A. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in micro RNA s with susceptibility to hepatitis B virus infection and HBV-related liver complications: A study in a Saudi Arabian population. *Journal of viral hepatitis*, v. 24, n. 12, p. 1132-1142, 2017. <https://doi.org/10.1111/jvh.12749>

AMARAL, Eduardo P. et al. Pulmonary infection with hypervirulent Mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *PLoS pathogens*, v. 10, n. 7, p. e1004188, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004188>

AMARAL, Eduardo P.; LASUNSKAIA, Elena B.; D'IMPERIO-LIMA, Maria Regina. Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. *Microbes and infection*, v. 18, n. 1, p. 11-20, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.09.005>

ARABSHAHI, Alireza et al. MicroRNA-27a gene polymorphism (rs895819) association with risk of pulmonary tuberculosis (PTB): A case–control study. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, v. 26, n. 1, p. 120, 2025. <https://doi.org/10.1186/s43042-025-00750-3>

AREESHI, Mohammed Y. et al. IFN- $\gamma$ + 874 A> T (rs2430561) gene polymorphism and risk of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Archives of medical science: AMS*, v. 17, n. 1, p. 177, 2019. <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.88481>

ARRIAGA, A. K. et al. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 128, n. 2, p. 229-237, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01832.x>

ATHAYDE, A. C. et al. Impact of MicroRNA (miR453, miR608, miR499, miR423) on the Risk of Developing MDR-TB in an Amazonian Mixed-Race Population. *Journal of Infectious Diseases & Therapy*, v. 12, n. S8, p. 002, 2024. <https://doi.org/10.4173/2332-0877.24.S8.002>

AUGENSTREICH, Jacques et al. Phthiocerol dimycocerosates from Mycobacterium tuberculosis increase the membrane activity of bacterial effectors and host receptors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 10, p. 420, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00420>

AZAD, Abul K.; SADEE, Wolfgang; SCHLESINGER, Larry S. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infection and immunity*, v. 80, n. 10, p. 3343-3359, 2012. <https://doi.org/10.1128/IAI.00443-12>

BALCEWICZ-SABLINSKA, M. Katarzyna et al. Pathogenic Mycobacterium tuberculosis evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-

α. The journal of Immunology, v. 161, n. 5, p. 2636-2641, 1998. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.161.5.2636>

BARLETTA-NAVECA, Raphaela Honorato et al. Toll-like receptor-1 single-nucleotide polymorphism 1805T/G is associated with predisposition to multibacillary tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1455, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01455>

BARLIANA, Melisa Intan et al. Genetic polymorphism related to ethambutol outcomes and susceptibility to toxicity. *Frontiers in Genetics*, v. 14, p. 1118102, 2023. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1118102>

BARREIRA, Draurio. Os desafios para a eliminação da tuberculose no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 27, p. e00100009, 2018. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742018000100009>

BARTLOMIEJCZYK, M. A. et al. Interaction of lectin pathway of complement-activating pattern recognition molecules with *Mycobacteria*. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 178, n. 2, p. 310-319, 2014. <https://doi.org/10.1111/cei.12416>.

BAYKAN, Ali H. et al. Extrapulmonary tuberculosis: an old but resurgent problem. *Insights into Imaging*, v. 13, n. 1, p. 39, 2022. <https://doi.org/10.1186/s13244-022-01172-0>

BECKWITH, Kai S. et al. Plasma membrane damage causes NLRP3 activation and pyroptosis during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature communications*, v. 11, n. 1, p. 2270, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16143-6>

BEHARKA, Alison A. et al. Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *The Journal of immunology*, v. 169, n. 7, p. 3565-3573, 2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.7.3565>

BERRY, Matthew PR et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature*, v. 466, n. 7309, p. 973-977, 2010. <https://doi.org/10.1038/nature09247>

BOMBARDA, Sidney et al. Imagem em tuberculose pulmonar. *Jornal de Pneumologia*, v. 27, p. 329-340, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0102-35862001000600007>

BONI, Funmilayo Grâce et al. Cytokine storm in tuberculosis and IL-6 involvement. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 97, p. 105166, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105166>

BOOM, W. Henry et al. The knowns and unknowns of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of clinical investigation*, v. 131, n. 3, 2021. <https://doi.org/10.1172/JCI136222>

BOSE, Mridula; GIRI, Astha; VARMA-BASIL, Mandira. Comparative genetic association analysis of human genetic susceptibility to pulmonary and lymph node tuberculosis. *Genes*, v. 14, n. 1, p. 207, 2023. <https://doi.org/10.3390/genes14010207>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de HIV, Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Boletim Epidemiológico - Tuberculose 2025. Número especial. Brasília: Ministério da Saúde, 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Manual de recomendações para o diagnóstico laboratorial de tuberculose e micobactérias não tuberculosas de interesse em saúde pública no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.

BRASIL. Ministério do Planejamento e Orçamento. Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística – IBGE. Indicadores IBGE: Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua Segundo Trimestre de 2024. Brasília: Ministério do Planejamento e Orçamento, 2024.

BUGGELE, William A.; JOHNSON, Karen E.; HORVATH, Curt M. Influenza A virus infection of human respiratory cells induces primary microRNA expression. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 37, p. 31027-31040, 2012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.387670>

BUHA, Ivana et al. Association between active pulmonary tuberculosis and miRNA-146a: A preliminary study from Serbia. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 16, n. 08, p. 1317-1322, 2022. <https://doi.org/10.3855/jidc.16721>

BUKHARI, M. et al. TLR 8 gene polymorphism and association in bacterial load in southern Punjab of Pakistan: an association study with pulmonary tuberculosis. *International journal of immunogenetics*, v. 42, n. 1, p. 46-51, 2015. <https://doi.org/10.1111/iji.12170>

CAI, Yi et al. Single-cell transcriptomics of blood reveals a natural killer cell subset depletion in tuberculosis. *EBioMedicine*, v. 53, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102686>

- CARAUX-PAZ, Pauline et al. Tuberculosis in the elderly. *Journal of Clinical Medicine*, v. 10, n. 24, p. 5888, 2021. <https://doi.org/10.3390/jcm10245888>
- CASANOVA, Jean-Laurent; MACMICKING, John D.; NATHAN, Carl F. Interferon- $\gamma$  and infectious diseases: Lessons and prospects. *Science*, v. 384, n. 6693, p. eadl2016, 2024. <https://doi.org/10.1126/science.adl2016>
- CAVALCANTI, Yone Vila Nova et al. Role of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-10 in the development of pulmonary tuberculosis. *Pulmonary medicine*, v. 2012, n. 1, p. 745483, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/745483>
- CEZAR-DE-MELLO, Paula FT et al. Pre-miR-146a (rs2910164 G> C) single nucleotide polymorphism is genetically and functionally associated with leprosy. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 8, n. 9, p. e3099, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003099>
- CHAKRABARTY, Sanjiban et al. Host and MTB genome encoded miRNA markers for diagnosis of tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 116, p. 37-43, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2019.04.002>
- CHAN, Edward D. et al. Tobacco exposure and susceptibility to tuberculosis: is there a smoking gun?. *Tuberculosis*, v. 94, n. 6, p. 544-550, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.08.010>
- CHEN, Jianglong et al. MiR-146a-5p mimic inhibits NLRP3 inflammasome downstream inflammatory factors and CLIC4 in neonatal necrotizing enterocolitis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 8, p. 594143, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.594143>
- CHEN, Wei-Wei et al. Genetic polymorphisms of miR-149 associated with susceptibility to both pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, v. 23, n. 7, p. 442-447, 2019. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2019.0003>
- CHONG, Zhi Xiong et al. Unveiling the tumour-regulatory roles of miR-1275 in cancer. *Pathology-Research and Practice*, v. 230, p. 153745, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153745>
- CHOY, Ernest; ROSE-JOHN, Stefan. Interleukin-6 as a multifunctional regulator: inflammation, immune response, and fibrosis. *Journal of Scleroderma and Related Disorders*, v. 2, n. 2\_suppl, p. S1-S5, 2017. <https://doi.org/10.5301/jsrd.5000265>

- COLLINS, Ryan L. et al. Multifactor dimensionality reduction reveals a three-locus epistatic interaction associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis. *BioData mining*, v. 6, n. 1, p. 4, 2013. <https://doi.org/10.1186/1756-0381-6-4>
- COOPER, Andrea M.; MAYER-BARBER, Katrin D.; SHER, Alan. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal immunology*, v. 4, n. 3, p. 252-260, 2011. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.13>
- COSTANTINI, Erica et al. TNF $\alpha$ , IL-6, miR-103a-3p, miR-423-5p, miR-23a-3p, miR-15a-5p and miR-223-3p in the crevicular fluid of periodontopathic patients correlate with each other and at different stages of the disease. *Scientific reports*, v. 13, n. 1, p. 126, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26421-6>
- COULOMBE, François et al. Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *Journal of Experimental Medicine*, v. 206, n. 8, p. 1709-1716, 2009. <https://doi.org/10.1084/jem.20081779>
- CRUZ, Leilani O. et al. Excessive expression of miR-27 impairs Treg-mediated immunological tolerance. *The Journal of clinical investigation*, v. 127, n. 2, p. 530-542, 2017. <https://doi.org/10.1172/JCI88415>
- CUFRE, Mónica et al. Variants of human DECTIN-1 rs16910526 are linked to differential reactive oxygen species production and susceptibility to tuberculosis. *Journal of Biomedical Science*, v. 31, n. 1, p. 77, 2024. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-01067-w>
- DA SILVA, Mayara Natália Santana et al. Association between SNPs in microRNAs and microRNAs-machinery genes with susceptibility of leprosy in the amazon population. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 18, p. 10628, 2022. DOI: 10.3390/ijms231810628
- DABITAO, Djeneba; BISHAI, William R. Sex and gender differences in tuberculosis pathogenesis and treatment outcomes. *Sex and Gender Differences in Infection and Treatments for Infectious Diseases*, p. 139-183, 2023. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-35139-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-031-35139-6_6)
- DAI, Jiali et al. Association of microRNA-27a rs895819 polymorphism with the risk of cancer: An updated meta-analysis. *Gene*, v. 728, p. 144185, 2020b. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144185>

DAI, Ting et al. miR-423 promotes breast cancer invasion by activating NF- $\kappa$ B signaling. *OncoTargets and therapy*, p. 5467-5478, 2020a. <https://doi.org/10.2147/OTT.S236514>

DAI, Zhi-Ming et al. The role of microRNA-608 polymorphism on the susceptibility and survival of cancer: a meta-analysis. *Aging (Albany NY)*, v. 10, n. 6, p. 1402, 2018. <https://doi.org/10.18632/aging.101476>

DAS, Kishore; SAIKOLAPPAN, Sankaralingam; DHANDAYUTHAPANI, Subramanian. Differential expression of miRNAs by macrophages infected with virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, v. 93, p. S47-S50, 2013. [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(13\)70010-6](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(13)70010-6)

DAVULURI, Kusuma Sai; CHAUHAN, Devendra S. microRNAs associated with the pathogenesis and their role in regulating various signaling pathways during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, p. 1009901, 2022. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1009901>

DE LIMA, D. Souza et al. Inflammasome genetics contributes to the development and control of active pulmonary tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 41, p. 240-244, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.015>

DE PAUS, Roelof A. et al. Inhibition of the type I immune responses of human monocytes by IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ . *Cytokine*, v. 61, n. 2, p. 645-655, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.12.005>

DE SOUSA, Francisca Dayse Martins et al. Low levels of TNFA gene expression seem to favor the development of pulmonary tuberculosis in a population from the Brazilian Amazon. *Immunobiology*, v. 228, n. 2, p. 152333, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2023.152333>

DOMINGO-GONZALEZ, Racquel et al. Cytokines and chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbiology spectrum*, v. 4, n. 5, p. 10.1128/microbiolspec.tbtb2-0018-2016, 2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0018-2016>

DUTTA, Rajesh Kumar et al. IL-6 inhibits IFN- $\gamma$  induced autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infected macrophages. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 44, n. 6, p. 942-954, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.021>

DYER, Sarah C. et al. Ensembl 2025. *Nucleic acids research*, v. 53, n. D1, p. D948-D957, 2025. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1071>

- EKLUND, Daniel et al. Human gene variants linked to enhanced NLRP3 activity limit intramacrophage growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of infectious diseases*, v. 209, n. 5, p. 749-753, 2014. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit572>
- EL-ASHRY, Amira H. et al. Influence of Micro-RNA-423 Gene Variation on Risk and Characteristics of Breast Cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, v. 23, n. 11, p. 3771, 2022. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.11.3771>
- ESTEBAN, Jaime; MUÑOZ-EGEA, Maria-Carmen. *Mycobacterium bovis* and other uncommon members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections*, p. 753-765, 2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0021-2016>
- ETNA, Marilena P. et al. *Mycobacterium tuberculosis*-induced miR-155 subverts autophagy by targeting ATG3 in human dendritic cells. *PLoS pathogens*, v. 14, n. 1, p. e1006790, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006790>
- FAIRBAIRN, Ian P. et al. ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X7-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 6, p. 3300-3307, 2001. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.6.3300>
- FARIDGOHAR, Majid; NIKOUEINEJAD, Hassan. New findings of Toll-like receptors involved in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Pathogens and global health*, v. 111, n. 5, p. 256-264, 2017. <https://doi.org/10.1080/20477724.2017.1351080>
- FENG, Yuanyu et al. Pyroptosis in inflammation-related respiratory disease. *Journal of physiology and biochemistry*, v. 78, n. 4, p. 721-737, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13105-022-00909-1>
- FERGUSON, J. Scott et al. Surfactant protein D inhibition of human macrophage uptake of *Mycobacterium tuberculosis* is independent of bacterial agglutination. *The Journal of Immunology*, v. 168, n. 3, p. 1309-1314, 2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.3.1309>
- FERLUGA, Janez et al. Natural and trained innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology*, v. 225, n. 3, p. 151951, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151951>

FIGUEIRA, Mariana Brasil de Andrade et al. Single-nucleotide variants in the AIM2–absent in melanoma 2 gene (rs1103577) associated with protection for tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 604975, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.604975>

FISHILEVICH, Simon et al. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. Database, v. 2017, p. bax028, 2017. <https://doi.org/10.1093/database/bax028>

FRANCHI, Luigi et al. Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cellular microbiology*, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01059.x>

FU, Xiangdong et al. Genetic analysis and preliminary function the secretion of inflammatory cytokines and MMP9 expression by targeting TIMP3 in *Mycobacterium tuberculosis*–infected THP-1 human macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 477, n. 2, p. 167-173, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.038>

Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas – Dra. Rosemary Costa Pinto. Painei epidemiológico – Tuberculose [Internet]. Manaus (AM): FVS-RCP; [acessado em 16 fev 2026]. Disponível em: [https://www.fvs.am.gov.br/indicadorSalaSituacao\\_view/126/2](https://www.fvs.am.gov.br/indicadorSalaSituacao_view/126/2)

FURCI, Lucinda et al. Alteration of human macrophages microRNA expression profile upon infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Mycobacteriology*, v. 2, n. 3, p. 128-134, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2013.04.006>

GALLO, Daniela et al. Immunological drivers in graves' disease: NK cells as a master switcher. *Frontiers in Endocrinology*, v. 11, p. 406, 2020. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00406>

GAYNOR, Cecilia D. et al. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. *The Journal of immunology*, v. 155, n. 11, p. 5343-5351, 1995. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.155.11.5343>

GHANAVI, Jalaledin et al. The role of interferon-gamma and interferon-gamma receptor in tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. *The International Journal of Mycobacteriology*, v. 10, n. 4, p. 349-357, 2021. [https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy\\_186\\_21](https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_186_21)

GOLDEN, Marjorie P.; VIKRAM, Holenarasipur R. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *American family physician*, v. 72, n. 9, p. 1761-1768, 2005. PMID: 16300038

- GOYAL, Surabhi; KLASSERT, Tilman E.; SLEVOGT, Hortense. C-type lectin receptors in tuberculosis: what we know. *Medical microbiology and immunology*, v. 205, n. 6, p. 513-535, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00430-016-0470-1>
- GU, Wei et al. MiR-608 exerts anti-inflammatory effects by targeting ELANE in monocytes. *Journal of Clinical Immunology*, v. 40, n. 1, p. 147-157, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00702-8>
- GUNASEKARAN, Harinisri et al. A systematic review and meta-analysis of circulating serum and plasma microRNAs in TB diagnosis. *BMC Infectious Diseases*, v. 24, n. 1, p. 402, 2024. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09232-0>
- GUPTA, Karan et al. Interleukin-18 cytokine gene polymorphism 137G/C (rs187238) and susceptibility to tuberculosis in north India. *Monaldi Archives for Chest Disease*, 2026. <https://doi.org/10.4081/monaldi.2025.3545>
- GUPTE, Akshay N. et al. Baseline IL-6 is a biomarker for unfavourable tuberculosis treatment outcomes: a multisite discovery and validation study. *European Respiratory Journal*, v. 59, n. 4, 2022. <https://doi.org/10.1183/13993003.00905-2021>
- HADJ, I. et al. Tuberculous gummas with sporotrichoid pattern in a 57-year-old female: A case report and review of the literature. *International Journal of Mycobacteriology*, v. 3, n. 1, p. 66-70, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2013.10.007>
- HALL, Noémi Borsay et al. Polymorphisms in TICAM2 and IL1B are associated with TB. *Genes & Immunity*, v. 16, n. 2, p. 127-133, 2015. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.77>
- HASHIMOTO, Shoji et al. Developing a diagnostic method for latent tuberculosis infection using circulating miRNA. *Translational Medicine Communications*, v. 5, n. 1, p. 25, 2020. <https://doi.org/10.1186/s41231-020-00078-7>
- HE, Yuan; HARA, Hideki; NÚÑEZ, Gabriel. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends in biochemical sciences*, v. 41, n. 12, p. 1012-1021, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.002>
- HENDAWY, Shima R. et al. Micro RNA-423 rs6505162 C>A polymorphism in colorectal cancer: Relation to susceptibility and metastasis. *Human Gene*, v. 44, p. 201409, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.humgen.2025.201409>

- HERRERA, María Teresa et al. Human pulmonary tuberculosis: understanding the immune response in the bronchoalveolar system. *Biomolecules*, v. 12, n. 8, p. 1148, 2022. <https://doi.org/10.3390/biom12081148>
- HOSSAIN, Md Murad; NORAZMI, Mohd-Nor. Pattern recognition receptors and cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection—the double-edged sword?. *BioMed research international*, v. 2013, n. 1, p. 179174, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/179174>
- HOUBEN, Rein MGJ; DODD, Peter J. The global burden of latent tuberculosis infection: a re-estimation using mathematical modelling. *PLoS medicine*, v. 13, n. 10, p. e1002152, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002152>.
- HUANG, Lu; NAZAROVA, Evgeniya V.; RUSSELL, David G. *Mycobacterium tuberculosis*: bacterial fitness within the host macrophage. *Microbiology spectrum*, v. 7, n. 2, p. 10.1128/microbiolspec. bai-0001-2019, 2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0001-2019>
- HURTADO, Joaquin et al. Serum-derived host miR-423-5p and miR-378a-3p as molecular markers for severe tuberculosis: a promising prognostic tool for survival. *Frontiers in Tuberculosis*, v. 2, p. 1441258, 2024. <https://doi.org/10.3389/ftubr.2024.1441258>
- ISHIKAWA, Eri; MORI, Daiki; YAMASAKI, Sho. Recognition of mycobacterial lipids by immune receptors. *Trends in immunology*, v. 38, n. 1, p. 66-76, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.009>
- JARUGA, Barbara et al. IFN- $\gamma$ /STAT1 acts as a proinflammatory signal in T cell-mediated hepatitis via induction of multiple chemokines and adhesion molecules: a critical role of IRF-1. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 287, n. 5, p. G1044-G1052, 2004. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00184.2004>
- JAZDZEWSKI, Krystian et al. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 20, p. 7269-7274, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802682105>
- JIA, Wenrui et al. Association of microRNA-423 rs6505162 C>A polymorphism with susceptibility and metastasis of colorectal carcinoma. *Medicine*, v. 97, n. 6, p. e9846, 2018. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000009846>

JO, Eun-Kyeong et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & molecular immunology*, v. 13, n. 2, p. 148-159, 2016. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.95>

JOYNT, Anya T. et al. Evaluation of both exonic and intronic variants for effects on RNA splicing allows for accurate assessment of the effectiveness of precision therapies. *PLoS genetics*, v. 16, n. 10, p. e1009100, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009100>

JUNG, Bock-Gie; VANKAYALAPATI, Ramakrishna; SAMTEN, Buka. Mycobacterium tuberculosis stimulates IL-1 $\beta$  production by macrophages in an ESAT-6 dependent manner with the involvement of serum amyloid A3. *Molecular immunology*, v. 135, p. 285-293, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.04.022>

KANABALAN, Renuga Devi et al. Human tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. *Microbiological research*, v. 246, p. 126674, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126674>

KAPLANSKI, Gilles. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunological reviews*, v. 281, n. 1, p. 138-153, 2018. <https://doi.org/10.1111/imr.12616>

KAUSHIK, Sandeep R. et al. Low circulatory Fe and Se levels with a higher IL-6/IL-10 ratio provide nutritional immunity in tuberculosis. *Frontiers in immunology*, v. 13, p. 985538, 2023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.985538>

KE, RuiSheng et al. Functional mechanism and clinical implications of MicroRNA-423 in human cancers. *Cancer medicine*, v. 9, n. 23, p. 9036-9051, 2020. <https://doi.org/10.1002/cam4.3557>

KHAN, Taj Ali et al. Interferon-gamma improves macrophages function against M. tuberculosis in multidrug-resistant tuberculosis patients. *Chemotherapy research and practice*, v. 2016, n. 1, p. 7295390, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7295390>

KLEINNIJENHUIS, Johanneke et al. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Immunology Research*, v. 2011, n. 1, p. 405310, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/405310>

KLEINSTEUBER, Katja et al. Decreased expression of miR-21, miR-26a, miR-29a, and miR-142-3p in CD4<sup>+</sup> T cells and peripheral blood from tuberculosis patients. *PloS one*, v. 8, n. 4, p. e61609, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061609>

KONG, Lu et al. ROS generation is involved in titanium dioxide nanoparticle-induced AP-1 activation through p38 MAPK and ERK pathways in JB6 cells. *Environmental toxicology*, v. 37, n. 2, p. 237-244, 2022. <https://doi.org/10.1002/tox.23393>

KRISHNAN, Nitya; ROBERTSON, Brian D.; THWAITES, Guy. Pathways of IL-1 $\beta$  secretion by macrophages infected with clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Tuberculosis*, v. 93, n. 5, p. 538-547, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.05.002>

KUMAR, Nathella Pavan et al. Acute phase proteins are baseline predictors of tuberculosis treatment failure. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 731878, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.731878>

LADEL, Christoph H. et al. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infection and immunity*, v. 65, n. 11, p. 4843-4849, 1997. <https://doi.org/10.1128/iai.65.11.4843-4849.1997>

LEAL, Diana Feio da Veiga Borges et al. Genetic Variants of MicroRNA and DROSHA Genes in Association with the Risk of Tuberculosis in the Amazon Population. *Frontiers in Genetics*, v. 13, p. 850058, 2022. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.850058>

LEE, Hyunmin; ZHANG, Zhaolei; KRAUSE, Henry M. Long noncoding RNAs and repetitive elements: junk or intimate evolutionary partners?. *Trends in Genetics*, v. 35, n. 12, p. 892-902, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.09.006>

LEFKIR, Yaya et al. Involvement of the AP-1 adaptor complex in early steps of phagocytosis and macropinocytosis. *Molecular biology of the cell*, v. 15, n. 2, p. 861-869, 2004. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-06-0365>

LEU, Jia-Shiun et al. SP110b controls host immunity and susceptibility to tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 195, n. 3, p. 369-382, 2017. <https://doi.org/10.1164/rccm.201601-0103OC>

LI, A.; MEYRE, D. Challenges in reproducibility of genetic association studies: lessons learned from the obesity field. *International journal of obesity*, v. 37, n. 4, p. 559-567, 2013. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.82>

- LI, Dingdong et al. Genetic study of two single nucleotide polymorphisms within corresponding microRNAs and susceptibility to tuberculosis in a Chinese Tibetan and Han population. *Human immunology*, v. 72, n. 7, p. 598-602, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2011.03.004>
- LI, Miao et al. microRNA-146a promotes mycobacterial survival in macrophages through suppressing nitric oxide production. *Scientific reports*, v. 6, n. 1, p. 23351, 2016b. <https://doi.org/10.1038/srep24555>
- LI, Ying et al. Pri-let-7a-1 rs10739971 polymorphism is associated with gastric cancer prognosis and might affect mature let-7a expression. *OncoTargets and therapy*, p. 3951-3962, 2016a. <https://doi.org/10.2147/OTT.S100481>
- LI, Zihao et al. Impact of MASP2 gene polymorphism and gene-tea drinking interaction on susceptibility to tuberculosis. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 6544, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86129-x>
- LIU, Cui Hua; LIU, Haiying; GE, Baoxue. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cellular & molecular immunology*, v. 14, n. 12, p. 963-975, 2017. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.88>
- LIU, Feng et al. MicroRNA-27a controls the intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* by regulating calcium-associated autophagy. *Nature communications*, v. 9, n. 1, p. 4295, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06836-4>
- LIU, Han-Ming et al. Recessive/dominant model: Alternative choice in case-control-based genome-wide association studies. *PLoS One*, v. 16, n. 7, p. e0254947, 2021b. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254947>
- LIU, Jinwen et al. Identification of circ\_0089153/miR-608/EGFR p53 axis in ameloblastoma via MAPK signaling pathway. *Oral Diseases*, v. 28, n. 3, p. 756-770, 2022. <https://doi.org/10.1111/odi.13788>
- LIU, Kunmei et al. MicroRNA-106a inhibits autophagy process and antimicrobial responses by targeting ULK1, ATG7, and ATG16L1 during mycobacterial infection. *Frontiers in immunology*, v. 11, p. 610021, 2021a. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.610021>

- LIU, Peng et al. NOD-like receptor signaling in inflammation-associated cancers: from functions to targeted therapies. *Phytomedicine*, v. 64, p. 152925, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152925>
- LIU, Philip T. et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D–dependent antimicrobial pathway in leprosy. *Nature medicine*, v. 18, n. 2, p. 267-273, 2012. <https://doi.org/10.1038/nm.2584>
- LLIBRE, Alba et al. Tuberculosis alters immune-metabolic pathways resulting in perturbed IL-1 responses. *Frontiers in immunology*, v. 13, p. 897193, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.897193>
- LOONEY, Monika et al. Key macrophage responses to infection with *Mycobacterium tuberculosis* are co-regulated by microRNAs and DNA methylation. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 685237, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.685237>
- LOPEZ-CASTEJON, Gloria; BROUGH, David. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 22, n. 4, p. 189-195, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- LU, Juan; ZHU, Danhua; LI, Lanjuan. Biological functions and molecular mechanisms of mir-608 in cancer. *Frontiers in Oncology*, v. 12, p. 870983, 2022. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.870983>
- LUCAMBIO, Fernando. Seleção de modelos Critério de Informação de Akaike. Universidade Federal do Paraná: Departamento de Estatística, Novembro 2020. Material didático.
- LUO, Hao et al. The miR-23a/27a/24–2 cluster drives immune evasion and resistance to PD-1/PD-L1 blockade in non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer*, v. 23, n. 1, p. 285, 2024. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02201-w>
- LY, Angel; LIU, Jun. Mycobacterial virulence factors: surface-exposed lipids and secreted proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 11, p. 3985, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21113985>
- LYU, Jiwon et al. Understanding the development of tuberculous granulomas: insights into host protection and pathogenesis, a review in humans and animals. *Frontiers in Immunology*, v. 15, p. 1427559, 2024. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1427559>

- MA, Xin et al. Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PloS one*, v. 2, n. 12, p. e1318, 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001318>
- MACHOWSKA, Magdalena; GALKA-MARCINIAK, Paulina; KOZLOWSKI, Piotr. Consequences of genetic variants in miRNA genes. *Computational and structural biotechnology journal*, v. 20, p. 6443-6457, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.11.036>
- MAJLESSI, Laleh et al. Release of mycobacterial antigens. *Immunological reviews*, v. 264, n. 1, p. 25-45, 2015. <https://doi.org/10.1111/imr.12251>
- MANDAL, Raju K. et al. Association of MBL2 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis susceptibility: trial sequence meta-analysis as evidence. *Infection and drug resistance*, p. 185-210, 2019. <https://doi.org/10.2147/IDR.S188980>
- MARÇÔA, R. et al. Tuberculosis and gender—Factors influencing the risk of tuberculosis among men and women by age group. *Pulmonology*, v. 24, n. 3, p. 199-202, 2018. . <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2018.10.002>
- MCHENRY, Michael L. et al. Tuberculosis severity associates with variants and eQTLs related to vascular biology and infection-induced inflammation. *PLoS Genetics*, v. 19, n. 3, p. e1010387, 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010387>
- MISHRA, Abhishek et al. Pattern recognition receptors and coordinated cellular pathways involved in tuberculosis immunopathogenesis: emerging concepts and perspectives. *Molecular immunology*, v. 87, p. 240-248, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.001>
- MORALES-GONZÁLEZ, Sarai et al. The miR-146a Single Nucleotide Polymorphism rs2910164 Promotes Proliferation, Chemoresistance, Migration, Invasion, and Apoptosis Suppression in Breast Cancer Cells. *Cells*, v. 14, n. 8, p. 612, 2025. <https://doi.org/10.3390/cells14080612>
- MORENO, Victor; GONZALEZ, Juan R.; PELEGRI, Dolors. SNPs-Based Whole Genome Association Studies [R package SNPAssoc version 2.1-2]. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=SNPAssoc>>. Acesso em: 21 fev. 2026.
- MORTAZ, Esmaeil et al. Interaction of pattern recognition receptors with Mycobacterium tuberculosis. *Journal of clinical immunology*, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0103-7>

- MOULE, Madeleine G.; CIRILLO, Jeffrey D. Mycobacterium tuberculosis dissemination plays a critical role in pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 10, p. 65, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00065>
- MUNDRA, Akaash et al. Pathogenicity of type I interferons in Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 4, p. 3919, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24043919>
- MURAKAMI, Masaaki; KAMIMURA, Daisuke; HIRANO, Toshio. Pleiotropy and specificity: insights from the interleukin 6 family of cytokines. *Immunity*, v. 50, n. 4, p. 812-831, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.027>
- MURPHY, Kenneth. *Imunobiologia de Janeway*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 868 p.
- NADERI, Mohammad et al. Lack of association between miRNA-146a rs2910164 and miRNA-499 rs3746444 gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis. *International journal of molecular and cellular medicine*, v. 4, n. 1, p. 40, 2015. PMID: 25815281
- NAKABAYASHI, Kazuhiko et al. Identification of independent risk loci for Graves' disease within the MHC in the Japanese population. *Journal of human genetics*, v. 56, n. 11, p. 772-778, 2011. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.99>
- NAQVI, Nilofer et al. BCG's role in strengthening immune responses: Implications for tuberculosis and comorbid diseases. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 127, p. 105703, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2024.105703>
- NAVYA, Nagendra et al. Are they there yet? Linkage of patients with tuberculosis to services for tobacco cessation and alcohol abuse—a mixed methods study from Karnataka, India. *BMC Health Services Research*, v. 19, n. 1, p. 90, 2019. <https://doi.org/1186/s12913-019-3913-8>
- NCBI. FKBP4 FKBP prolyl isomerase 4 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2288>>. Acesso em: 10 fev. 2026.
- NGUYEN, Huy; GAZY, Nicky; VENKETARAMAN, Vishwanath. A role of intracellular Toll-like receptors (3, 7, and 9) in response to Mycobacterium tuberculosis and co-infection with HIV. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 17, p. 6148, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21176148>

- NI, Bin et al. Mycobacterium tuberculosis decreases human macrophage IFN- $\gamma$  responsiveness through miR-132 and miR-26a. *The Journal of Immunology*, v. 193, n. 9, p. 4537-4547, 2014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400124>
- NISA, Annuurun et al. Different modalities of host cell death and their impact on Mycobacterium tuberculosis infection. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 323, n. 5, p. C1444-C1474, 2022. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00246.2022>
- NISIHARA, Renato et al. Mannose-binding lectin (MBL) deficiency and tuberculosis infection in patients with ankylosing spondylitis. *Clinical Rheumatology*, v. 37, n. 2, p. 555-558, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3813-4>
- NOVIKOV, Aleksey et al. Mycobacterium tuberculosis triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1 $\beta$  production in human macrophages. *The journal of immunology*, v. 187, n. 5, p. 2540-2547, 2011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100926>
- O'BRIEN, Jacob et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, v. 9, p. 402, 2018. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- OCEJO-VINYALS, J. G. et al. Human toll-like receptor 1 T1805G polymorphism and susceptibility to pulmonary tuberculosis in northern Spain. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: the Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, v. 17, n. 5, p. 652-654, 2013. <https://doi.org/10.5588/ijtld.12.0767>
- OH, Jee Youn et al. Elevated interleukin-6 and bronchiectasis as risk factors for acute exacerbation in patients with tuberculosis-destroyed lung with airflow limitation. *Journal of Thoracic Disease*, v. 10, n. 9, p. 5246, 2018. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.08.29>
- OLMO-FONTÁNEZ, Angélica M.; TURNER, Joanne. Tuberculosis in an aging world. *Pathogens*, v. 11, n. 10, p. 1101, 2022. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101101>
- OU, Zhenglin et al. Hypoxia mediates immune escape of pancreatic cancer cells by affecting miR-1275/AXIN2 in natural killer cells. *Frontiers in immunology*, v. 14, p. 1271603, 2023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1271603>

PANDEY, Anupama et al. Association of NOS2A Gene Polymorphisms with Susceptibility to Tuberculosis in Manipuri Population of Northeast India. *Biochemical Genetics*, p. 1-17, 2025. <https://doi.org/10.1007/s10528-024-11015-w>

PENG, Zhangli; YUE, Yan; XIONG, Sidong. Mycobacterial PPE36 modulates host inflammation by promoting E3 ligase smurf1-mediated MyD88 degradation. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 690667, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.690667>

PERESI, Eliana et al. Citocinas e proteínas de fase aguda do soro como marcadores de regressão da resposta inflamatória ao tratamento da tuberculose pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 34, n. 11, p. 942-949, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132008001100009>

PEROVAL, Marylene Y. et al. A critical role for MAPK signalling pathways in the transcriptional regulation of toll like receptors. *PloS one*, v. 8, n. 2, p. e51243, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051243>

PLATNICH, Jaye M.; MURUVE, Daniel A. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 670, p. 4-14, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.008>

POLADIAN, Nicole et al. Role of NF- $\kappa$ B during Mycobacterium tuberculosis Infection. *International journal of molecular sciences*, v. 24, n. 2, p. 1772, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24021772>

PROCOP, Gary W. et al. *Koneman diagnóstico microbiológico: texto e atlas*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

QIN, Wanhai; SCICLUNA, Brendon P.; VAN DER POLL, Tom. The role of host cell DNA methylation in the immune response to bacterial infection. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 696280, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.696280>

QIU, Ju et al. The lncRNA PVT1/miR-423-5p axis is positively correlated with the severity of bronchial asthma. *Allergologia et Immunopathologia*, v. 50, n. 1, p. 108-115, 2022. <https://doi.org/10.15586/aei.v50i1.472>

QUADIR, Neha et al. Mycobacterium tuberculosis protein MoxR1 enhances virulence by inhibiting host cell death pathways and disrupting cellular bioenergetics. *Virulence*, v. 14, n. 1, p. 2180230, 2023. <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2180230>

QUALLS, Joseph E.; MURRAY, Peter J. Immunometabolism within the tuberculosis granuloma: amino acids, hypoxia, and cellular respiration. In: *Seminars in immunopathology*. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016. p. 139-152. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0534-0>

R CORE TEAM. The R project for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, [2024]. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 17 fev. 2026.

RABAHI, Marcelo Fouad et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* var. *africanum* isolated from a patient with pulmonary tuberculosis in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 85, p. 104550, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104550>

RAGIA, Georgia et al. MIR27A rs895819 CC genotype severely reduces miR-27a plasma expression levels. *Genes*, v. 15, n. 11, p. 1491, 2024. <https://doi.org/10.3390/genes15111491>

RAKITYANSKAYA, Irina A. et al. Perspective chapter: the role of interferon gamma in clinical medicine. In: *Basic and clinical aspects of interferon gamma*. IntechOpen, 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105476>

RAMAKRISHNAN, Lalita. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 5, p. 352-366, 2012. <https://doi.org/10.1038/nri3211>

RAO, Martin et al. Latent TB Infection (LTBI)–*Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and the dynamics of the granuloma battleground. *International journal of infectious diseases*, v. 80, p. S58-S61, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.02.035>

RITTER, Kristina; ROUSSEAU, Jasmin; HÖLSCHER, Christoph. The role of gp130 cytokines in tuberculosis. *Cells*, v. 9, n. 12, p. 2695, 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9122695>

RODRIGUES, Marcos H. G. et al. Single-nucleotide variant in the toll-like receptor 1 gene (rs5743618) associated with protection for pulmonary tuberculosis. *RBAC*, [s. l.], v. 57, n. 2, supl. 1, p. 42-44, 2025.

RODRIGUES, Michele F. et al. Tumour necrosis factor receptors and apoptosis of alveolar macrophages during early infection with attenuated and virulent *Mycobacterium bovis*. *Immunology*, v. 139, n. 4, p. 503-512, 2013. <https://doi.org/10.1111/imm.12097>

RODRIGUEZ-TAKEUCHI, Sara Yukie; RENJIFO, Martin Eduardo; MEDINA, Francisco José. Extrapulmonary tuberculosis: pathophysiology and imaging findings. *Radiographics*, v. 39, n. 7, p. 2023-2037, 2019. <https://doi.org/10.1148/rg.2019190109>

ROLANDELLI, Agustin et al. The IL-17A rs2275913 single nucleotide polymorphism is associated with protection to tuberculosis but related to higher disease severity in Argentina. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 40666, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep40666>

ROMAGNOLI, Alessandra et al. Clinical isolates of the modern *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 evade host defense in human macrophages through eluding IL-1 $\beta$ -induced autophagy. *Cell death & disease*, v. 9, n. 6, p. 624, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0640-8>

ROTHCHILD, Alissa C. et al. MiR-155–regulated molecular network orchestrates cell fate in the innate and adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 41, p. E6172-E6181, 2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608255113>

ROY CHOWDHURY, Roshni et al. A multi-cohort study of the immune factors associated with *M. tuberculosis* infection outcomes. *Nature*, v. 560, n. 7720, p. 644-648, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0439-x>

RUSMARIZA, Ovi et al. Diagnostic Potential of miR-146a-5p in Differentiating Active and Latent Tuberculosis Infections: A Cross-sectional Study. *The International Journal of Mycobacteriology*, v. 14, n. 4, p. 382-389, 2025. [https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy\\_189\\_25](https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_189_25)

RUSSELL, David G. et al. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature immunology*, v. 10, n. 9, p. 943-948, 2009. <https://doi.org/10.1038/ni.1781>

SAADAT, Mostafa. The importance of examining the Hardy-Weinberg Equilibrium in genetic association studies. *Molecular Biology Research Communications*, v. 13, n. 1, p. 1, 2024. <https://doi.org/10.22099/mbrc.2023.48386.1872>

SAHU, Sanjaya Kumar et al. MicroRNA 26a (miR-26a)/KLF4 and CREB-C/EBP $\beta$  regulate innate immune signaling, the polarization of macrophages and the trafficking of *Mycobacterium tuberculosis* to lysosomes during infection. *PLoS pathogens*, v. 13, n. 5, p. e1006410, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006410>

SAIGA, Hiroyuki et al. Critical role of AIM2 in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *International immunology*, v. 24, n. 10, p. 637-644, 2012. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxs062>

SAKULA, Alex. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax*, v. 37, n. 4, p. 246-251, 1982. <https://doi.org/10.1136/thx.37.4.246>

SASINDRAN, Smitha J.; TORRELLES, Jordi B. Mycobacterium tuberculosis infection and inflammation: what is beneficial for the host and for the bacterium?. *Frontiers in microbiology*, v. 2, p. 2, 2011. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00002>

SAUNDERS, Matthew A.; LIANG, Han; LI, Wen-Hsiung. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 9, p. 3300-3305, 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611347104>

SAWYER, Andrew J. et al. Spatial mapping reveals granuloma diversity and histopathological superstructure in human tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine*, v. 220, n. 6, p. e20221392, 2023. <https://doi.org/10.1084/jem.20221392>

SCHAPER, Fred; ROSE-JOHN, Stefan. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 26, n. 5, p. 475-487, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.004>

SCHMOK, Erik et al. Suppressor of cytokine signaling 3 in macrophages prevents exacerbated interleukin-6-dependent arginase-1 activity and early permissiveness to experimental tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1537, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01537>

SCHNEIDER, Bianca E. et al. A role for IL-18 in protective immunity against Mycobacterium tuberculosis. *European journal of immunology*, v. 40, n. 2, p. 396-405, 2010. <https://doi.org/10.1002/eji.200939583>

SCHOREY, Jeffrey S.; SCHLESINGER, Larry S. Innate immune responses to tuberculosis. *Microbiology spectrum*, v. 4, n. 6, p. 10.1128/microbiolspec.tbtb2-0010-2016, 2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0010-2016>

SCHURZ, Haiko et al. TLR1, 2, 4, 6 and 9 variants associated with tuberculosis susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, v. 10, n. 10, p. e0139711, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139711>

SEMINO, Claudia et al. Progressive waves of IL-1 $\beta$  release by primary human monocytes via sequential activation of vesicular and gasdermin D-mediated secretory pathways. *Cell death & disease*, v. 9, n. 11, p. 1088, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1121-9>

SHANMUGANATHAN, Gaithrri et al. Role of interferons in Mycobacterium tuberculosis infection. Clinics and practice, v. 12, n. 5, p. 788-796, 2022. <https://doi.org/10.3390/clinpract12050082>

SHARMA, Aditya et al. Tuberculosis caused by Mycobacterium africanum, United States, 2004–2013. Emerging infectious diseases, v. 22, n. 3, p. 396, 2016. <https://doi.org/10.3201/eid2203.151505>

SHARMA, Monika et al. Ethnicity based comprehensive evaluation of polymorphism in interferon-gamma gene and its association with pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis risk: An updated trial sequential meta-analysis. The International Journal of Mycobacteriology, v. 10, n. 3, p. 243-254, 2021. [https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy\\_108\\_21](https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_108_21)

SHAYKHIEV, Renat et al. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. The Journal of immunology, v. 183, n. 4, p. 2867-2883, 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900473>

SHEIKHPOUR, Mojgan et al. Nano delivery of MiR-146a and its effect study on genes involved in apoptosis and autophagy pathways in lung cancer and tuberculosis. BMC biotechnology, v. 25, n. 1, p. 81, 2025. <https://doi.org/10.1186/s12896-025-01019-8>

SHEN, Wenhao et al. Association between polymorphisms in mannose-binding lectin 2 gene with pulmonary tuberculosis susceptibility. Hereditas, v. 157, n. 1, p. 33, 2020. <https://doi.org/10.1186/s41065-020-00146-w>

SIA, Jonathan Kevin; RENGARAJAN, Jyothi. Immunology of Mycobacterium tuberculosis infections. Microbiology spectrum, v. 7, n. 4, p. 10.1128/microbiolspec.gpp3-0022-2018, 2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018>

SILVA, M. R. et al. Drug addiction and alcoholism as predictors for tuberculosis treatment default in Brazil: a prospective cohort study. Epidemiology & Infection, v. 145, n. 16, p. 3516-3524, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0950268817002631>

SILVÉRIO, Diogo et al. Advances on the role and applications of interleukin-1 in tuberculosis. MBio, v. 12, n. 6, p. e03134-21, 2021. <https://doi.org/10.1128/mBio.03134-21>

SIMMONS, Jason D. et al. Immunological mechanisms of human resistance to persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature Reviews Immunology*, v. 18, n. 9, p. 575-589, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0025-3>

SINIGAGLIA, Alessandro et al. Tuberculosis-associated microRNAs: from pathogenesis to disease biomarkers. *Cells*, v. 9, n. 10, p. 2160, 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9102160>

SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÕES (SBIm). Vacina BCG. 2025. Disponível em: <https://familia.sbim.org.br/vacinas/vacinas-disponiveis/vacina-bcg>. Acesso em: 17 fev. 2026.

SONG, C.-H. et al. IL-18 production in human pulmonary and pleural tuberculosis. *Scandinavian journal of immunology*, v. 56, n. 6, p. 611-618, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2002.01143.x>

STRZELAK, Agnieszka et al. Tobacco smoke induces and alters immune responses in the lung triggering inflammation, allergy, asthma and other lung diseases: a mechanistic review. *International journal of environmental research and public health*, v. 15, n. 5, p. 1033, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijerph15051033>

SU, Xing et al. The polymorphism of rs6505162 in the MIR423 coding region and recurrent pregnancy loss. *Reproduction*, v. 150, n. 1, p. 65-76, 2015. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0007>

SUGAWARA, Isamu et al. Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 5, p. 2585-2589, 1999. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.5.2585-2589.1999>

SUI, Xinbing et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer letters*, v. 344, n. 2, p. 174-179, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.11.019>

SUN, Yu et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, v. 35, n. 6, p. 600-604, 2015. <https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1030412>

SZABO, Gyongyi; SAHA, Banishree. Alcohol's effect on host defense. *Alcohol research: current reviews*, v. 37, n. 2, p. 159, 2015. <https://doi.org/10.35946/arcr.v37.2.01>

TANG, Ziyi et al. Inhibition of hypoxic exosomal miR-423-3p decreases glioma progression by restricting autophagy in astrocytes. *Cell death & disease*, v. 16, n. 1, p. 265, 2025. <https://doi.org/10.1038/s41419-025-07576-2>

THAKUR, Manoj; MUNIYAPPA, K. Macrophage activation highlight an important role for NER proteins in the survival, latency and multiplication of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, v. 138, p. 102284, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2022.102284>

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Homozygous vs. Heterozygous Samples in qPCR -- Ask TaqMan #23 [video]. 21 de mar de 2014. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=sjGj7OkRpQA> Acesso em: 17 fev. 2026.

THOMAS, Henry Fabian; BUECKER, Christa. What is an enhancer?. *BioEssays*, v. 45, n. 10, p. 2300044, 2023. <https://doi.org/10.1002/bies.202300044>

TOMINAGA, Kouji et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1 $\beta$  for IFN- $\gamma$  production from human T cells. *International immunology*, v. 12, n. 2, p. 151-160, 2000. <https://doi.org/10.1093/intimm/12.2.151>

TU, Huihui et al. Elevated pulmonary tuberculosis biomarker miR-423-5p plays critical role in the occurrence of active TB by inhibiting autophagosome-lysosome fusion. *Emerging microbes & infections*, v. 8, n. 1, p. 448-460, 2019. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1590129>

TULADHAR, Shraddha; KANNEGANTI, Thirumala-Devi. NLRP12 in innate immunity and inflammation. *Molecular aspects of medicine*, v. 76, p. 100887, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100887>

UFIMTSEVA, Elena et al. *Mycobacterium tuberculosis* shape and size variations in alveolar macrophages of tuberculosis patients. 2019. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2019.PA4605>

ÜNSAL, E. B. R. U. et al. Potential role of interleukin 6 in reactive thrombocytosis and acute phase response in pulmonary tuberculosis. *Postgraduate medical journal*, v. 81, n. 959, p. 604-607, 2005. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2004.030544>

VARSHNEY, Deepika et al. Systematic review and meta-analysis of human Toll-like receptors genetic polymorphisms for susceptibility to tuberculosis infection. *Cytokine*, v. 152, p. 155791, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155791>

- VECCHIE, Alessandra et al. IL-18 and infections: Is there a role for targeted therapies?. *Journal of cellular physiology*, v. 236, n. 3, p. 1638-1657, 2021. <https://doi.org/10.1002/jcp.30008>
- VILLASEÑOR, Tomás et al. Activation of the Wnt pathway by *Mycobacterium tuberculosis*: a Wnt–Wnt situation. *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 50, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00050>
- VYNNYCKY, Emilia; FINE, Paul EM. Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. *American journal of epidemiology*, v. 152, n. 3, p. 247-263, 2000. <https://doi.org/10.1093/aje/152.3.247>
- WAGER, CM Leopold; WORMLEY JR, F. L. Classical versus alternative macrophage activation: the Ying and the Yang in host defense against pulmonary fungal infections. *Mucosal immunology*, v. 7, n. 5, p. 1023-1035, 2014. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.65>
- WANG, Baikui et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG promotes M1 polarization in murine bone marrow-derived macrophages by activating TLR2/MyD88/MAPK signaling pathway. *Animal Science Journal*, v. 91, n. 1, p. e13439, 2020. <https://doi.org/10.1111/asj.13439>
- WANG, Jianyun et al. MicroRNA-27a restrains the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection by targeting IRAK4, a promoter of the NF- $\kappa$ B pathway. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 10, n. 9, p. 9894, 2017. PMID: 31966878
- WANG, Jiaxin et al. Association between IL-1 gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility in the Chinese Tibetan population. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 11, n. 11, p. 5441, 2018. PMID: 31949628
- WANG, Jun et al. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *The Journal of clinical investigation*, v. 103, n. 7, p. 1023-1029, 1999. <https://doi.org/10.1172/JCI6224>
- WANG, Li-Huan; XU, Ming-Li. Non-invasive diagnosis of pulmonary tuberculosis and predictive potential for treatment outcomes via miR-146a and miR-155 levels. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 112, n. 2, p. 116795, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2025>
- WANG, Lulu et al. MicroRNAs as immune regulators and biomarkers in tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 1027472, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1027472>

- WANG, Min et al. Genetic polymorphisms of IL-17A, IL-17F, TLR4 and miR-146a in association with the risk of pulmonary tuberculosis. *Scientific reports*, v. 6, n. 1, p. 28586, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep28586>
- WANG, Ruipeng et al. Natural killer cell-produced IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *Journal of leukocyte biology*, v. 91, n. 2, p. 299-309, 2012. <https://doi.org/10.1189/jlb.0611308>
- WATSON, James D.; BAKER, Tania A.; BELL, Stephen P.; GANN, Alexander; LEVINE, Michael; HARRISON, Stephen C. *Biologia molecular do gene*. 7. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2015. xxxiv, 878 p. ISBN 9788582712085.
- WEBER, Augusto Ferreira et al. In silico, in vitro, and ex vivo analysis reveals miR-27a-3p and miR-155-5p as key microRNAs for glioblastoma progression: Insights into Th1 differentiation and apoptosis induction. *The FASEB Journal*, v. 38, n. 24, p. e70255, 2024. <https://doi.org/10.1096/fj.202401538R>
- WHO. *Global tuberculosis report 2025*. Geneva: World Health Organization; 2025. ISBN 978-92-4-011692-4.
- WODELO, Wycliff et al. Polymorphisms in immune genes and their association with tuberculosis susceptibility: an analysis of the African population. *The Application of Clinical Genetics*, p. 33-46, 2024. <https://doi.org/10.2147/TACG.S457395>
- WU, Shouquan et al. Genetic polymorphisms of IL1B, IL6, and TNF $\alpha$  in a Chinese Han population with pulmonary tuberculosis. *BioMed research international*, v. 2018, n. 1, p. 3010898, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3010898>
- WU, Zhongwen et al. Inductive microRNA-21 impairs anti-mycobacterial responses by targeting IL-12 and Bcl-2. *FEBS letters*, v. 586, n. 16, p. 2459-2467, 2012.
- WU, Zuoqiao; NICOLL, Mary; INGHAM, Robert J. AP-1 family transcription factors: a diverse family of proteins that regulate varied cellular activities in classical hodgkin lymphoma and ALK+ ALCL. *Experimental hematology & oncology*, v. 10, n. 1, p. 4, 2021. <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00197-9>
- XIONG, Hanchu et al. FKBP-related ncRNA-mRNA axis in breast cancer. *Genomics*, v. 112, n. 6, p. 4595-4607, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.08.017>

- XU, Fang et al. High prevalence of extrapulmonary tuberculosis in dairy farms: Evidence for possible gastrointestinal transmission. *PLoS One*, v. 16, n. 3, p. e0249341, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249341>
- YANG, Fang et al. MiR-21 is remotely governed by the commensal bacteria and impairs anti-TB immunity by down-regulating IFN- $\gamma$ . *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 512581, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.512581>
- YANG, Rui et al. IL-12+ IL-18 cosignaling in human macrophages and lung epithelial cells activates cathelicidin and autophagy, inhibiting intracellular mycobacterial growth. *The Journal of Immunology*, v. 200, n. 7, p. 2405-2417, 2018a. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900859>
- YANG, Yang et al. Crosstalk between hepatic tumor cells and macrophages via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes M2-like macrophage polarization and reinforces tumor malignant behaviors. *Cell death & disease*, v. 9, n. 8, p. 793, 2018b. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0818-0>
- YANG, Yifeng et al. A functional SNP rs895819 on pre-miR-27a is associated with bipolar disorder by targeting NCAM1. *Communications Biology*, v. 5, n. 1, p. 309, 2022. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03263-6>
- YI, Yong-Xiang et al. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism contributes to pulmonary tuberculosis susceptibility: evidence from a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, v. 8, n. 11, p. 20690, 2015. PMID: 26884992
- YIN, Jun et al. Hsa-miR-34b/c rs4938723 T> C and hsa-miR-423 rs6505162 C> A polymorphisms are associated with the risk of esophageal cancer in a Chinese population. *PloS one*, v. 8, n. 11, p. e80570, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080570>
- YUK, Jae-Min et al. TNF in human tuberculosis: a double-edged sword. *Immune network*, v. 24, n. 1, p. e4, 2024. <https://doi.org/10.4110/in.2024.24.e4>
- ZENG, Ping et al. Statistical analysis for genome-wide association study. *Journal of biomedical research*, v. 29, n. 4, p. 285, 2014. <https://doi.org/10.7555/JBR.29.20140007>
- ZHANG, Bingbing et al. Association between IL-18, IFN- $\gamma$  and TB susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Palliative Medicine*, v. 10, n. 10, p. 108780886-108710886, 2021a. <https://doi.org/10.21037/apm-21-2582>

ZHANG, Guoliang et al. A functional single-nucleotide polymorphism in the promoter of the gene encoding interleukin 6 is associated with susceptibility to tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*, v. 205, n. 11, p. 1697-1704, 2012b. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis266>

ZHANG, Jingwei et al. Genetic polymorphisms in PXR and NF- $\kappa$ B1 influence susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced liver injury. *PloS one*, v. 14, n. 9, p. e0222033, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222033>

ZHANG, Jun-Xian et al. Mannose-binding lectin 2 gene polymorphisms and their association with tuberculosis in a Chinese population. *Infectious Diseases of Poverty*, v. 9, n. 02, p. 38-49, 2020. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00664-9>

ZHANG, Mingwu et al. Associations of genetic variants of miRNA coding regions with pulmonary tuberculosis risk in China. *Epidemiology & Infection*, v. 149, p. e208, 2021b. <https://doi.org/10.1017/S0950268821002004>

ZHANG, Quan-Bo et al. Mice with miR-146a deficiency develop severe gouty arthritis via dysregulation of TRAF 6, IRAK 1 and NALP3 inflammasome. *Arthritis research & therapy*, v. 20, n. 1, p. 45, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1546-7>

ZHANG, Xing et al. Association of the miR-146a, miR-149, miR-196a2 and miR-499 polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis in the Chinese Uygur, Kazak and Southern Han populations. *BMC Infectious Diseases*, v. 15, n. 1, p. 41, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0771-9>

ZHANG, Xing et al. Polymorphic allele of human MRC1 confer protection against tuberculosis in a Chinese population. *International journal of biological sciences*, v. 8, n. 3, p. 375, 2012a. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4047>

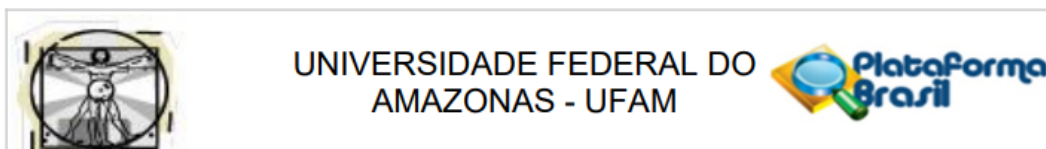
ZHANG, Yuxiang et al. Toll-like receptor-1,-2, and-6 polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, v. 8, n. 5, p. e63357, 2013.

ZHAO, Huanhuan et al. Genetic analysis and preliminary function study of miR-423 in breast cancer. *Tumor Biology*, v. 36, n. 6, p. 4763-4771, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3126-7>

- ZHAO, Zhenzhen et al. A new droplet digital PCR assay: improving detection of paucibacillary smear-negative pulmonary tuberculosis. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 122, p. 820-828, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.07.041>
- ZHAO, Zhonghua et al. MiR-21-5p regulates mycobacterial survival and inflammatory responses by targeting Bcl-2 and TLR4 in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *FEBS letters*, v. 593, n. 12, p. 1326-1335, 2019. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13438>
- ZHENG, Tian et al. Correlation of elevated serum exosomal miR-27a levels with drug resistance and adverse outcomes in pulmonary tuberculosis. *China Tropical Medicine*. 2023. <https://doi.org/10.13604/j.cnki.46-1064/r.2023.08.19>
- ZHOU, Mingxia et al. Boosting mTOR-dependent autophagy via upstream TLR4-MyD88-MAPK signalling and downstream NF- $\kappa$ B pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury. *EBioMedicine*, v. 35, p. 345-360, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.08.035>
- ZHOU, Yong; ZHANG, Mengtao. Associations between genetic polymorphisms of TLRs and susceptibility to tuberculosis: A meta-analysis. *Innate immunity*, v. 26, n. 2, p. 75-83, 2020. <https://doi.org/10.1177/1753425919862354>

## 14. ANEXOS

**Anexo 1 – Número de parecer da aprovação no comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal do Amazonas.**



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS RELACIONADOS À RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA TUBERCULOSE

**Pesquisador:** Aya Sadahiro

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 19021519.9.0000.5020

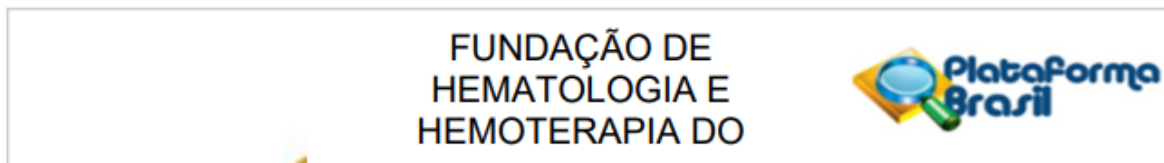
**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Amazonas - UFAM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.178.672

**Anexo 2 – Número de parecer da aprovação no comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Fundação HEMOAM.**



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda: Novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica

**Pesquisador:** Allyson Guimarães da Costa

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 51257921.2.0000.0009

**Instituição Proponente:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.982.395