



MESTRADO EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS E SAÚDE

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**POLIMORFISMO Thr399Ile DE TLR4 EM PACIENTES**  
**COM ASPERGILOSE INVASIVA E CONTROLES**

**WESLEY VIEIRA NAVES**

**GOIÂNIA**



MESTRADO EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS E SAÚDE

**WESLEY VIEIRA NAVES**

**POLIMORFISMO Thr399Ile DE TLR4 EM PACIENTES  
COM ASPERGILOSE INVASIVA E CONTROLES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

**Orientadora: Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi**

**GOIÂNIA – GOIÁS**  
**Setembro de 2019**

N323p Naves, Wesley Vieira

Polimorfismo Thr399Ile de TLR4 em pacientes com aspergilose invasiva e controles / Wesley Vieira Naves.-- 2019.

63 f.: il.

Texto em português, com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas, Goiânia, 2019

Inclui referências: f. 50-59

1. Polimorfismo (Genética). 2. Aspergilose pulmonar. I.Saddi, Vera Aparecida. II.Pontifícia Universidade Católica de Goiás - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde - 2019. III. Título.

CDU: Ed. 2007 -- 577.21(043)

582.282.123.4

616.24-002.828

DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE  
DEFENDIDA EM 12 DE SETEMBRO DE 2019 E CONSIDERADA  
Aprovado PELA BANCA EXAMINADORA:

1) Vera Aparecida Saddi

Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi / PUC Goiás (Presidente/Orientadora)

2) Hellen da Silva Cintra de Paula

Profa. Dra. Hellen da Silva Cintra de Paula / IFG (Membro Externo)

3) Flávia

Profa. Dra. Flávia Melo Rodrigues / PUC Goiás (Membro)

4)

Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles / PUC Goiás (Suplente)

## **DEDICATÓRIA**

*A Deus, aquele que me concedeu forças, nunca permitindo com que eu fracassasse ou desistisse, sendo meu maior refúgio em meio às dificuldades.*

*Aos meus Pais, que não mediram esforços ao oferecer o melhor para minha vida, ensinando-me a vivê-la com dignidade e perseverança, sempre buscando a realização dos meus sonhos.*

*Aos meus familiares e amigos que foram fundamentais para que eu pudesse chegar onde cheguei.*

*A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, o meu muito obrigado!*

## AGRADECIMENTOS

*A Professora Dra. Vera Aparecida Saddi, minha orientadora, por todo apoio e profissionalismo. Obrigado por sempre me incentivar, me repreender e me defender quando julgou que eu mereci. Sou grato por todos os ensinamentos que me proporcionastes, pela amizade que me premiastes e por eu ter chegado até aqui, pois sem o seu incentivo nada disso seria possível. Ao longo desse período, pude ser lapidado enquanto profissional e ser humano, através da sua sabedoria, humanidade, profissionalismo, dedicação e respeito. Sempre serás, para mim, um grande e bom exemplo de profissional biomédico e de um ser humano íntegro. Obrigado pela oportunidade de ter usufruído um pouco dos seus conhecimentos!*

*À Pontifícia Universidade Católica de Goiás de modo geral, ao Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde (MCAS) e a todos os Docentes e colaboradores do Programa, por abrirem as portas e terem sido peças chaves para o meu crescimento profissional.*

*Ao Hospital Araújo Jorge (HAJ), da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), pela oportunidade concedida de desenvolver o meu trabalho no Laboratório de Biologia Tumoral e Transplante de Medula Óssea (TMO), juntamente ao setor de Hematologia e TMO. Obrigado pela disponibilidade!*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), em parceria com Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter me proporcionado uma bolsa de estudo, a qual foi crucial para a conclusão do meu mestrado.*

*Aos Professores e Pesquisadores: Dra. Hellen da Silva Cintra de Paula, Dr. Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva, Dr. Cesar Sam Tiago Vilanova-Costa, Dr. Adriano de Moraes Arantes, Ms. Daiane de Oliveira Cunha e Ms. Núria Alonso Lopes Cid, obrigado pela disponibilidade, parceria e por toda e qualquer ajuda prestada para a realização desta pesquisa.*

*As colegas do MCAS, Jéssica Enocência Porto Ramos, Thaís Aparecida Gomes de Almeida, Nathalia Amaral Nogueira e a técnica em laboratório Ana Paula Maia, por todos os conhecimentos compartilhados para realização deste trabalho, sou grato imensamente por ter me acolhido e me ajudado quando precisei.*

*Aos amigos, Rodrigo José Arnoso Santos, Mateus Silva Santos e Débora Evylen Rodrigues da Silva, pela amizade, apoio, atenção e por não terem medidos esforços para me ajudarem na realização do presente estudo. Aprendi muito em nossas conversas e vocês são amigos muito especiais que carrego em minha vida, desejo que esse carinho perdure em toda minha existência.*

*Aos meus familiares, em especial aos meus irmãos Willian Junio Vieira Naves e Winícius Vieira Naves, avós Ercílio Vieira, Maria Helena Vieira e Dolores Felipe de Farias, tias e tios, carinhosamente Tia-avó Laura Lucídia Vieira e aos primos e primas, meu muito obrigado por sempre fazerem parte disso tudo e por sempre estarem torcendo pela minha vitória.*

*Aos meus Pais Izomar Naves de Almeida e Sandra Helena Vieira Naves, por serem a razão de tudo, por todos os ensinamentos dados, por todos os momentos que me repreenderam sempre pensando no meu melhor, buscando incansavelmente meus voos mais altos, me preparando e me ensinando a ser forte para as lutas que a vida me proporcionaria e por sempre fazerem dos meus sonhos os seus.*

*A todos, meu Muito Obrigado!*

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
AI	Aspergilose invasiva
ALR	Receptor tipo AIM2 (do inglês, <i>absent in melanoma 2</i> )
AP-1	Proteína ativadora 1
CLC	Receptor de Lectina do tipo C
EORTC	do inglês, <i>European Organization for Research and Treatment of Cancer / Invasive Fungal Infections Cooperativo Group</i>
FISH	Técnica molecular de hibridação “ <i>in situ</i> ” por fluorescência
GM	Galactomanana
HAJ	Hospital Araújo Jorge
HCT	Transplante de células hematopoiéticas
IRF	Fator de resposta ao interferon
Kb	quilobases
LAS	Laboratório da Área da Saúde da PUC-Goiás
LPS	Lipopolissacarídeo
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
MD-2	Fator de diferenciação mielóide 2
MyD-88	Fator 88 de diferenciação mielóide
NBD1 e 2	Domínio de ligação de nucleotídeos no gene da fibrose cística
NF-kB	Fator nuclear Kappa B
NK	Célula natural <i>Killer</i>
NLR	Recetores tipo NOD (do inglês, <i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors</i> ).
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RLR	Receptores semelhantes a RIG-I (receptores tipo gene I indutíveis pelo ácido retinóico)



SNP	Polimorfismos genéticos de base única
SOT	Transplante de órgãos sólidos
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCTH	Transplante de células tronco-hematopoiéticas
TIR	Receptor de interleucina
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TMO	Transplante de medula óssea
TRIF	Proteína adaptadora

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotomicrografia eletrônica mostrando imagem de *Aspergillus fumigatus*.16**
- Figura 2. Estrutura do complexo TLR4 / MD-2 após ligação de lipopolissacarídeo22**
- Figura 3. Via de sinalização de TLR4 no reconhecimento de antígenos ..... 23**
- Figura 4. Esquema mostrando a localização do gene TLR4 no cromossomo 9 ..... 24**
- Figura 5. Localização geral dos SNPs na proteína TLR4..... 25**
- Figura 6. Influência do polimorfismo Asp229Gly (rs4986790) de TLR4 na resposta imunológica à aspergilose invasiva ..... 30**
- Figura 7. Fluxograma com levantamento e seleção dos casos ..... 37**
- Figura 8. Gel de poliacrilamida a 8% mostrando padrão molecular de 100pb (ladder) e produtos de PCR tratados com enzimas de restrição HinfI para os fragmentos de 407pb (polimorfismo Thr399Ile) ..... 43**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Artigos selecionados investigando as associações dos polimorfismos rs4986790 e rs4986791 do gene TLR4 com diferentes condições patológicas na população brasileira. ....Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 2. Frequências alélicas dos polimorfismos rs4986790 e rs4986791 do gene TLR4 na população brasileira .....Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 3. Investigações das frequências alélicas e gênicas para o polimorfismo rs4986791 de TLR4 em indivíduos com aspergilose invasiva associados ao transplante células tronco-hematopoiética, em diferentes países ..... 33**
- Tabela 4. Característica da enzima de restrição para Thr399Ile (rs4986791)..... 39**
- Tabela 5. Análise descritiva das características sócio-demográficas do grupo de pacientes imunodeprimidos com diagnóstico de aspergilose invasiva. ....Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 6. Dados clínicos e patológicos dos pacientes imunodeprimidos com aspergilose invasiva. .... 41**
- Tabela 7. Características sócio-demográficas e clinicopatológicas de pacientes selecionados no grupo controle..... 42**
- Tabela 8. Frequência alélica do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 em pacientes imunodeprimidos com aspergilose invasiva e controles..... 43**
- Tabela 9. Frequência genotípica de Thr399Ile (rs4986791) em grupo caso e grupo controle. .... 44**

## SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO .....	13
II – REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
II.1 – <i>Aspergillus</i> sp. e aspergilose invasiva.....	16
II. 2 – Aspectos Ambientais do <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	18
II. 3 - Resposta imune inata .....	19
II.4 – Papel de TLR4 na resposta imune inata .....	21
II.5 – Polimorfismos genéticos de TLR4 e suas consequências estruturais e funcionais.....	24
II.6 – Frequência dos polimorfismos rs4986790 e rs4986791 de TLR4 na população brasileira .....	26
II.7 - Associação entre os polimorfismos de rs4986790 e rs4986791 e aspergilose invasiva em pacientes hematológicos. ....	30
III – OBJETIVOS.....	35
III.1- Objetivo Geral .....	35
III.2- Objetivos Específicos .....	35
IV – MATERIAL e MÉTODOS .....	36
IV.1- Aspectos éticos da pesquisa .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
IV.2 - Seleção dos casos e controles.....	36
IV.3 – Dados sóciodemográficos e clinicopatológicos.....	38
IV.4 – Análise molecular do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 .....	38
IV.5 - Análises estatísticas.....	39
V- RESULTADOS .....	40
V.1- Características sóciodemográficas e clínico patológicas entre os pacientes estudados e controles.....	40
V.2 – Frequência do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 na população estudada .....	43
VI- DISCUSSÃO .....	45
VII - CONCLUSÕES .....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
ANEXOS.....	59
Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás .....	60
Anexo 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás .....	61

.....	61
Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	62
.....	63

## RESUMO

*Aspergillus sp.* são fungos amplamente difundidos no meio ambiente e estão presentes no solo, ar, sistemas animais, água doce e habitats marinhos, podendo ainda crescer em plantas e na decomposição da matéria orgânica. Esses fungos causam uma grande variedade de distúrbios respiratórios sendo a aspergilose invasiva (AI) uma infecção fúngica bastante prevalente em indivíduos imunocomprometidos. Estudos mostram que polimorfismos do gene Toll-like 4 (TLR4) podem influenciar as vias de sinalização da resposta imunológica inata, aumentando a susceptibilidade do indivíduo para desenvolver a AI. O objetivo deste estudo foi comparar a frequência do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) do gene TLR4 em indivíduos imunocomprometidos e controles normais. Um grupo de 22 indivíduos imunocomprometidos submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas no Serviço de Transplante do Hospital Araújo Jorge foi incluído no grupo de casos. O grupo controle foi formado por 100 indivíduos sem história de comprometimento imunológico, atendidos no Laboratório da Área da Saúde da PUC Goiás. Após a avaliação dos dados clínicos dos pacientes, uma amostra de sangue total foi coletada para avaliação dos polimorfismos genéticos por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP). Foram investigados indivíduos de ambos os sexos, com idade entre três a 74 anos, residentes da região Centro-Oeste do Brasil. O polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) foi investigado no grupo de casos e controles. No grupo de pacientes com aspergilose invasiva, o alelo selvagem (C) foi detectado em 21 casos (95,5%), enquanto o alelo mutante (T) foi encontrado em apenas um caso (4,5%). No grupo controle, o alelo selvagem (C) foi detectado em 93 indivíduos (93,0%), enquanto o alelo mutante (T) foi encontrado em sete indivíduos (7,0%). Diferenças significativas não foram detectadas nas frequências alélicas entre casos e controles. Nossos resultados não demonstraram associação significativa entre o polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) e o diagnóstico de aspergilose invasiva em indivíduos imunodeprimidos. Outros estudos envolvendo maior número de participantes são necessários a fim de elucidar esta associação.

Palavras-chave: Receptor Toll-Like. Polimorfismos Genéticos. Galactomanana. Aspergilose Pulmonar Invasiva.

## ABSTRACT

*Aspergillus sp.* are fungi that are widespread in the environment and are present in soil, air, animal systems, freshwater and marine habitats and that can also grow on plants and on decomposition of organic matter. These fungi cause a wide variety of respiratory disorders and invasive aspergillosis (AI) is a very prevalent fungal infection in immunocompromised individuals. Studies show that Toll-like 4 (TLR4) gene polymorphisms may influence the innate immune response signaling pathways, increasing the susceptibility of individuals to develop AI. The aim of this study was to compare the frequency of the Thr399Ile rs4986791 TLR4 gene polymorphism in immunocompromised individuals and normal controls. A group of 22 immunocompromised individuals undergoing hematopoietic stem cell transplantation at the Araújo Jorge Hospital Transplant Service was included in the case group. The control group consisted of 100 individuals with no history of immunological impairment, assisted at the Health Laboratory PUC Goiás. After evaluation of the patient's clinical data, whole blood sample was collected to evaluate genetic polymorphisms by using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Individuals of both sexes were investigated, aged between three and 74 years, residing in the Midwest region of Brazil. Thr399Ile (rs4986791) polymorphism was investigated in the case and control group. In the group of patients with invasive aspergillosis, the wild type allele (C) was detected in 21 cases (95.5%), while the mutant allele (T) was found in only one case (4,5%). In the control group, the wild type allele (C) was detected in 93 individuals (93.0%), while the mutant allele (T) was found in seven individuals (7,0%). Significant differences in the allelic frequencies were not detected between cases and controls. Our results didn't demonstrate a significant association between Thr399Ile polymorphism (rs4986791) and the diagnosis of invasive aspergillosis in immunosuppressed individuals. Further studies involving a larger number of participants are needed to elucidate this association.

Keywords: Toll-Like Receptors. Genetic polymorphisms. Galactomannan. Invasive Pulmonary Aspergillosis.

## I – INTRODUÇÃO

A aspergilose invasiva (AI) é uma infecção fúngica causada por espécies de fungos filamentosos, do gênero *Aspergillus spp.*, que invadem células endoteliais, alojam no pulmão e disseminam para outros órgãos do corpo, através da corrente sanguínea. A infecção ocorre por meio da inalação de conídios, presentes na atmosfera (FERREIRA *et al.*, 2015). A AI é um sério problema para pacientes imunodeprimidos e tem-se observado um significativo aumento nas taxas de morbidade e mortalidade decorrentes das infecções fúngicas invasivas, sobretudo em pacientes recém-nascidos prematuros e outras populações imunocomprometidas (RIBEIRO, 2011). Aproximadamente, 72 a 94% dos indivíduos imunodeprimidos que foram submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas morrem com aspergilose pulmonar invasiva (SANTOS, 2011; SATLIN *et al.*, 2015).

As infecções fúngicas invasivas são comuns e muitas vezes letais, cursando com mortalidade três a quatro dias depois da inoculação e sem terapia antifúngica específica, com óbito chegando a 100% após sete dias (HOPE *et al.*, 2017). Um bom diagnóstico de AI utiliza: (1) testes laboratoriais, a fim de detectar antígenos galactomananos circulantes “GM” no soro; (2) pesquisa de DNA do fungo em amostras patológicas; (3) exames microbiológicos; e (4) exames de imagem, uma vez que diagnósticos complicados e tardios caracterizam o mal prognóstico desta infecção (HEDHILI *et al.*, 2017).

A profilaxia está associada ao uso de drogas antifúngicas como o fluconazol e o voriconazol para pacientes de alto risco (SATLIN *et al.*, 2015) e estes tratamentos podem variar de acordo com o grau de imunossupressão, uma característica comum dos pacientes que desenvolvem a AI (HOPE *et al.*, 2017). Pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos (SOT), ou transplantes de células hematopoiéticas (HCT) e aqueles com leucemia aguda, apresentam maior suscetibilidade à doença (SEROY *et al.*, 2017).

A defesa contra microrganismos é mediada por reações iniciais da imunidade inata, através de barreiras físicas e químicas, células sensoras de antígenos como células fagocitárias, células dendríticas e células assassinas naturais (natural killer – NK), proteínas do sangue e citocinas reguladoras, que desempenham um papel fundamental no reconhecimento e na eliminação da AI (GARTH; STEELE, 2017).

Receptores do tipo Toll-like (TLRs) são glicoproteínas presentes na membrana plasmática e endossomal de leucócitos. Apresentam função importante na defesa do hospedeiro no primeiro passo da reação inflamatória, mediando efeitos antimicrobianos. Apresentam em suas regiões extracelulares, abundância em leucinas e cisteínas, que estão envolvidas na



interação com o ligante. Em humanos, existem dez diferentes TLR funcionais, denominados TLR1 a TLR10, sendo que os TLR 1, 2, 4, 5 e 6 estão presentes na membrana citoplasmática e os TLR 3, 7, 8, 9 e 10 na membrana do retículo endoplasmático intracelular (JIANG *et al.*, 2016).

Os receptores Toll-Like são responsáveis pelo reconhecimento de estruturas microbianas e pela geração de sinais que levam à produção de citocinas pró-inflamatórias essenciais para a ativação da resposta imune inata (FERRAZ *et al.*, 2011). Receptores Toll-like apresentam domínios de receptores de IL-1 (TIR) nas caudas citoplasmáticas, que são essenciais à sinalização. Os domínios de interleucinas encontrados nestes receptores promovem o recrutamento de leucócitos e macrófagos para o local da infecção, mediando a inflamação (MEDVEDEV, 2013). A IL-2 liberada por linfócitos Th1 promove a ativação dos linfócitos B e a proliferação de células T, favorecendo a ativação dos macrófagos. Já, as IL-4 e IL-5 produzidas pelos linfócitos Th2 ativam a produção de IgE, induzindo reações de hipersensibilidade imediata. A IL-12 produzida por macrófagos e células dendríticas promove a diferenciação dos linfócitos T em Th1 e a ativação das células NK (ALAZAWI *et al.*, 2016).

O reconhecimento de ligantes microbianos por TLR4 leva à ativação de diversas vias de sinalização, que acionam os fatores de transcrição, induzindo a expressão de genes importantes para o desenvolvimento de resposta inflamatória (FRAZÃO *et al.*, 2013). A ativação destas vias inclui a transcrição do fator nuclear KB (NF-KB) e da proteína ativadora 1 (AP-1), moléculas necessárias para a resposta inflamatória. Inclui ainda a ativação do fator de resposta ao interferon 3 (IRF3) e do IRF7, principais fatores ativados por esta via e responsáveis pela resposta imune inata (VIEIRA-SOUSA *et al.*, 2019).

Alterações genéticas tem papel decisivo no aparecimento de várias doenças humanas. Os polimorfismos genéticos de nucleotídeos únicos (SNPs) são variações na sequência de DNA que podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição (LIMA, DE *et al.*, 2006). Deste modo, variações genéticas como SNPs, ocasionados pela troca de um único nucleotídeo na sequência do DNA, podem indicar se alguns indivíduos apresentam maior predisposição a determinadas infecções e desenvolvimento de doenças e respostas diferentes frente aos estímulos ambientais (SKEVAKI; PARARAS, 2015).

O TLR4 desempenha um papel importante na ativação e regulação das respostas imunes inatas e adquiridas, através do reconhecimento de estruturas fúngicas e de agentes microbianos patogênicos, lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas (JIAO *et al.*, 2016). SNPs na região de codificação de TLR4 tem sido associado ao aumento na incidência de

diferentes doenças infecciosas e inflamatórias (MEDVEDEV, 2013). Os SNPs D299G e T399I, resultante da troca de ácido aspártico por glicina na posição 299 e de treonina por isoleucina na posição 399, estão associados na resposta embotada ao LPS inalado e à diminuição da produção de citocinas mediada por LPS em células epiteliais das vias aéreas e macrófagos alveolares (ARBOUR *et al.*, 2000).

A identificação genética desses polimorfismos de TLR4, permite identificar precocemente os indivíduos com maior risco de contrair infecções microbianas e desta forma realizar uma profilaxia apropriada. Na aspergilose invasiva, o diagnóstico se inicia a partir de um elevado grau de suspeita, uma vez que se trata de um fungo ubíquo na natureza que pode estar presente na água e no ar das unidades hospitalares (BATISTA, 2015).

O desenvolvimento da AI pode ser o resultado de múltiplos fatores predisponentes, mas a imunossupressão é um fator de risco predominante, tornando esta infecção fúngica invasiva uma das mais letais nos seres humanos (GIACOMAZZI *et al.*, 2016). Como as células do sistema imune inato mediam as reações iniciais de defesa contra-ataques de microrganismos e os TLR desempenham um papel importante no reconhecimento e eliminação desses microrganismos, polimorfismos nesses genes podem resultar em proteínas variantes com maior ou menor capacidade de reconhecimento de antígenos e sinalização intracelular para ativação da resposta imunológica (GARTH; STEELE, 2017).

Este estudo poderá contribuir com a identificação da predisposição genética à aspergilose invasiva, identificando os polimorfismos presentes no TLR4 que influenciam na ocorrência – de maior frequência - dessa patologia em pacientes imunodeprimidos.

## II – REFERENCIAL TEÓRICO

### II.1 – *Aspergillus* sp. e aspergilose invasiva

A aspergilose invasiva (AI) é a mais frequente das micoses pulmonares e possui como agente etiológico – o *Aspergillus* sp. (PEIXINHO *et al.*, 2003). O gênero *Aspergillus* compreende ampla diversidade de espécies de fungos filamentosos, hialinos, sapróbios, com capacidade de adaptação a diferentes *habitats*, sendo encontrados em abundância no ar, solo e água (SALES, 2009). Atualmente, esse gênero inclui cerca de 350 espécies, que recentemente foram agrupadas em seis subgêneros e 22 seções ou complexos de espécies relacionadas (KOCSUBÉ *et al.*, 2016). A grande maioria das infecções fúngicas superficiais e invasivas por *Aspergillus* sp envolve diversas espécies pertencentes a basicamente quatro complexos: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus* (SEGAL, 2013).

O *Aspergillus fumigatus* (figura 1) é o fungo filamentoso mais prevalente em infecções fúngicas em humanos, sendo a principal causa da aspergilose, uma condição que pode manifestar como invasiva, alérgica e crônica (CARVALHO *et al.*, 2008). A porta de entrada mais comum desse fungo é através da inalação de esporos nos seios nasais e no trato respiratório (CUNHA *et al.*, 2018). Uma vez inalados, na ausência de defesas apropriadas pelo sistema imunológico do hospedeiro, os esporos aumentam, germinam e se disseminam por via hematogênica (CUNHA, 2017; BANZI *et al.*, 2019). Assim, a aspergilose invasiva é uma infecção comum em vias respiratórias de doentes imunodeprimidos (PEIXINHO *et al.*, 2003). A imunodepressão é uma condição clínica ocasionada por doenças secundárias, ou provocada por algum tratamento. Por isso, pacientes imunodeprimidos possuem maior risco de infecções fúngicas (RIBEIRO, 2011).

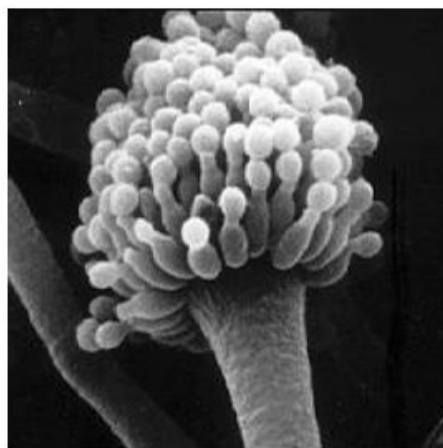


Figura 1. Fotomicrografia eletrônica mostrando imagem de *Aspergillus fumigatus*. Fonte: CARVALHO (2013).

Indivíduos com infecções fúngicas graves, geralmente requerem admissão hospitalar e podem apresentar uma variedade de manifestações clínicas que representam diferentes diagnósticos e tratamentos terapêuticos, no entanto, as infecções fúngicas oportunistas geralmente estão associadas a doenças subjacentes e procedimentos médicos que podem causar imunodepressão no hospedeiro (GIACOMAZZI *et al.*, 2016). A aspergilose tornou-se a micose invasiva mais prevalente entre pacientes portadores de doenças malignas hematológicas e/ou submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas (GIRMENIA *et al.*, 2001). A doença se desenvolve principalmente em pacientes com neoplasias hematológicas ou neutropenia, naqueles tratados com corticosteroides ou drogas imunossupressoras e em submetidos a transplante de medula óssea ou órgão sólido, sendo que, o contexto neutropenia é o maior fator de risco para o desenvolvimento da infecção por *Aspergillus* e pode ser considerado um fator de complicação relativamente frequente entre pacientes submetidos a transplantes (CUNHA *et al.*, 2018).

Desse modo, a AI é uma grande ameaça no tratamento de pacientes transplantados (CUNHA *et al.*, 2011). O diagnóstico da AI se inicia a partir de um elevado grau de suspeita, uma vez que o *Aspergillus* é um fungo ubíquo na natureza que pode estar presente na água e no ar das unidades hospitalares (PAULUSSEN *et al.*, 2017). A Classificação dos pacientes com AI é definida de acordo com os critérios estabelecidos pelo EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer), que inclui os pacientes com aspergilose provada, provável e possível, baseado na combinação de sinais e sintomas clínicos, cultura, histopatologia e detecção de componentes do fungo como o antígeno galactomanana (GM), polissacarídeo presente na parede celular de fungos do gênero *Aspergillus*, circulantes no soro devido ao crescimento das hifas nos tecidos do hospedeiro e detectado por ELISA e tomografia computadorizada, demonstrando a presença de infiltrados pulmonares (BATISTA, 2015).

O tratamento da AI está associado com o uso de drogas antifúngicas como o fluconazol e o voriconazol para pacientes de alto risco (SATLIN *et al.*, 2015) e estes tratamentos podem variar de acordo com o grau de imunossupressão, característica comum dos pacientes que desenvolvem a AI (HOPE *et al.*, 2017). Porém, recomenda-se que o tratamento seja iniciado precocemente (enquanto a avaliação diagnóstica ainda está em andamento) em casos de alta suspeita, a fim de favorecer a sobrevivência e a segurança do indivíduo; a resposta terapêutica é monitorada através da avaliação dos sinais, sintomas e achados radiológicos em intervalos regulares (SALES, 2009).

As células do sistema imune inato medeiam as reações iniciais de defesa contra ataques de microrganismos e os TLR desempenham um papel importante no reconhecimento e eliminação desses microrganismos, de modo que, polimorfismos nos TLRs podem resultar em proteínas variantes com maior ou menor capacidade de reconhecimento de antígenos e sinalização intracelular para ativação da resposta imunológica (GARTH; STEELE, 2017). Indivíduos transplantados sofrem alterações drásticas no sistema imune inato e o reconhecimento imunológico torna-se menos efetivo em comparação com indivíduos saudáveis (KESH *et al.*, 2005). Neste sentido, a presença de polimorfismos em TLR pode ser uma possível justificativa ao fato de alguns pacientes imunodeprimidos desenvolverem à aspergilose invasiva e outros não.

## II. 2 – Aspectos Ambientais do *Aspergillus fumigatus*

A origem evolutiva dos mecanismos que determinam a virulência do *Aspergillus fumigatus* no meio ambiente é pouco conhecida (VANDEVEERDONK *et al.*, 2017). As espécies de *Aspergillus* são difundidas no ambiente e estão presentes nos solos, ar, sistemas animais, em água doce e habitats marinho, crescendo em plantas e na decomposição da matéria orgânica. São encontrados em ambientes internos (superfícies de edifícios, ar, eletrodomésticos, etc.), em água potável e poeira (PAULUSSEN *et al.*, 2017).

O *A. fumigatus* é um fungo que tem a capacidade de crescer e sobreviver no ambiente em meio a diferentes temperaturas (25 a 37°C) e ph (KWON-CHUNG; SUGUI, 2013). As taxas de crescimento do *A. fumigatus* é uma das mais rápidas entre as espécies existentes no reino fúngico, sendo um fator característico da sua espécie - saprotrófica (fungos que se alimentam absorvendo substâncias orgânicas, normalmente provenientes de matéria orgânica em decomposição), que tem a capacidade de promover sua colonização em diferentes nichos ecológicos (PAULUSSEN *et al.*, 2017).

A organização estrutural da parede celular interna no *A. fumigatus*, é composta por um esqueleto fibrilar insolúvel ramificado por quitina, galactomanano e glucano. A parede celular é composto principalmente por glucano e polissacarídeos, contendo galactose, galactomanano e galactosaminogalactano (VANDEVEERDONK *et al.*, 2017). Assim, os *Aspergillus* produzem conídios (esporos), que são formados por uma estrutura especial no topo de uma hifa fértil e podem dispersar facilmente no ar, inclusive de ambientes hospitalares (PILANIYA *et al.*, 2015). Os conídios podem germinar em hifas curtas conhecidas como tubos germinativos dentro de 4 a 6 horas (VANDEVEERDONK *et al.*, 2017).

Os seres humanos, podem inalar cerca de 100 a 1000 conídios por dia e esses conídios podem atingir os alvéolos pulmonares devido ao seu tamanho pequeno (2-3 $\mu$ m) (LATGE, 1999). As células epiteliais e macrófagos alveolares presentes nas vias aéreas do sistema respiratório humano, auxiliam na remoção dos conídios inalados (KOSMIDIS; DENNING, 2015). Porém, em macrófagos de humanos, o *A. fumigatus* é capaz de germinar no fagossomo e promover a necrose de macrófagos no tecido (VANDEVEERDONK *et al.*, 2017).

O *Aspergillus* causam, uma grande variedade de distúrbios respiratórios, dependendo do estado imunológico do paciente (PILANIYA *et al.*, 2015). Em indivíduos imunodeprimidos as células de defesa do sistema imune não conseguem eliminar os conídios inalados, de modo que, os conídios do fungo permanecem nos pulmões, podendo germinar para outras regiões e desenvolver uma infecção invasiva, designada aspergilose pulmonar invasiva (API) (KOSMIDIS; DENNING, 2015). O corpo humano possui temperatura fisiológica de 37°C, formando um microambiente ideal para o crescimento de *Aspergillus sp.* (VANDEVEERDONK *et al.*, 2017)).

O *A. fumigatus* não apresenta requisitos nutricionais específicos, seu metabolismo consegue adaptar a uma variedade de compostos orgânicos e metais pesados (HARTMANN *et al.*, 2011). Essa capacidade adaptativa pode ser um dos fatores que favorece a infecção do *Aspergillus* no tecido pulmonar humano, uma vez que, as trocas gasosas realizadas no pulmão são, cruciais durante os estágios iniciais da aspergilose (VANDEVEERDONK *et al.*, 2017). Além disso, a presença do *A. fumigatus* no pulmão, pode inibir a formação de vasos sanguíneos, contribuindo para a hipóxia pulmonar (PILANIYA *et al.*, 2015).

### **II. 3 - Resposta imune inata**

O sistema imunológico tem como finalidade reconhecer os organismos invasores, impedir sua disseminação e finalmente eliminá-los do corpo (HUSE, 2019). A defesa contra microrganismos é mediada por reações iniciais da imunidade inata, por meio de barreiras físicas e químicas, células sensoras de antígenos incluindo células fagocitárias, dendríticas e células natural killer - NK, além de proteínas do sangue e citocinas reguladoras, que desempenham um papel fundamental no reconhecimento e na eliminação de patógenos (GARTH; STEELE, 2017).

Os fagócitos ou células fagocíticas, são células do sistema imune que compreendem os eosinófilos, neutrófilos e basófilos, que tem função de neutralização, englobamento e destruição de partículas, incluindo os agentes infecciosos, bem como a iniciação e a coordenação de outras fases da resposta imunológica (COCHET; PERI, 2017). Os neutrófilos são importantes células da imunidade inata que atuam nas fases mais iniciais das respostas inflamatórias, migrando do sangue para os tecidos com o objetivo de ingerir e destruir microrganismos (fagocitose) e combater a infecção, sendo também os componentes mais abundantes dentre os leucócitos circulantes e destinados a responder rapidamente e em grande número toda vez que houver alguma lesão tecidual (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Os macrófagos e seus precursores circulantes, os monócitos, exercem papéis centrais na imunidade inata e na adquirida e são células efetoras importantes para a eliminação de microrganismos (GINHOUX; JUNG, 2014).

Os macrófagos são células imunes inatas vitais e representam a primeira linha de defesa contra qualquer invasão, representando um papel central na patogênese bacteriana (MCCLEAN; TOBIN, 2016). Os macrófagos auxiliam na regulação da inflamação potencializando a ativação de linfócitos T e B pela expressão de moléculas coestimuladoras e liberando citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e quimiocinas (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Assim, a inflamação é uma resposta do hospedeiro à lesão ou infecção tecidual que recruta células imunes reguladoras. Apesar de seu papel protetor no sistema de defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos estranhos, a resposta inflamatória descontrolada (por exemplo, sépsis) leva a danos nos tecidos, órgãos e até mesmo à morte (ALAZAWI *et al.*, 2016).

A imunidade inata dos mamíferos depende de uma família de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) que detectam moléculas microbianas conservadas, denominadas “padrões moleculares associados aos patógenos” (PAMPs) (PERKINS *et al.*, 2016). Os PRRs ligados aos PAMPs microbianos ativam as vias inflamatórias, por meio de vias de sinalização com ativação do fator nuclear B (NF- $\kappa$ B), para a transcrição de citocinas e interleucinas que terminam ativando linfócitos T e combatendo as infecções (FERRAZ *et al.*, 2011). A família PRR inclui o receptor Toll-like (TLR), o receptor de lectina do tipo C (CLR), o receptor RIG-I-like (RLR), o receptor tipo AIM2 (ALR) e os receptores tipo NOD (NLR) contendo um domínio de ligação aos nucleotídeos (NBD) e um domínio de repetição C-terminal rico em leucina envolvido no reconhecimento com o ligante.

Os TLR e CLR estão localizados na membrana citoplasmática ou nas membranas endossômicas, enquanto RLR, ALR e NLR são citoplasmáticos (COCHET; PERI, 2017).

Em geral, a ativação de TLRs por seus ligantes é o primeiro evento molecular da imunidade inata, precedendo e desencadeando a produção de citocinas, inflamação e resposta imune adaptativa (ROY *et al.*, 2016). Os TLR apresentam domínios de receptores de IL-1 (TIR) nas caudas citoplasmáticas, que são essenciais à sinalização. A IL-2 liberada pelos linfócitos Th1 promove a ativação dos linfócitos B e a proliferação de células T, favorecendo a ativação dos macrófagos. Já, as IL-4 e IL-5 produzidas pelos linfócitos Th2 induzem a produção de IgE, responsável pelas reações de hipersensibilidade imediata. Logo, a IL-12 produzida por macrófagos e células dendríticas promove a diferenciação dos linfócitos T em Th1 e a ativação das células NK (FERRAZ *et al.*, 2011).

#### **II.4 – Papel de TLR4 na resposta imune inata**

Receptores do tipo Toll-like (TLRs) são moléculas glicoproteicas de superfície do tipo I com uma única hélice transmembranar que liga o domínio N-terminal responsável pela ligação do ligante com o domínio de sinalização C-terminal do receptor, e estão presentes nas membranas citoplasmáticas e endossomais das células de defesa do hospedeiro (CZERKIES *et al.*, 2014). Os TLR foram identificados inicialmente em 1988, como responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e na geração de sinais, que levam à produção de citocinas próinflamatórias essenciais para a ativação da resposta imune inata (FRAZÃO *et al.*, 2013).

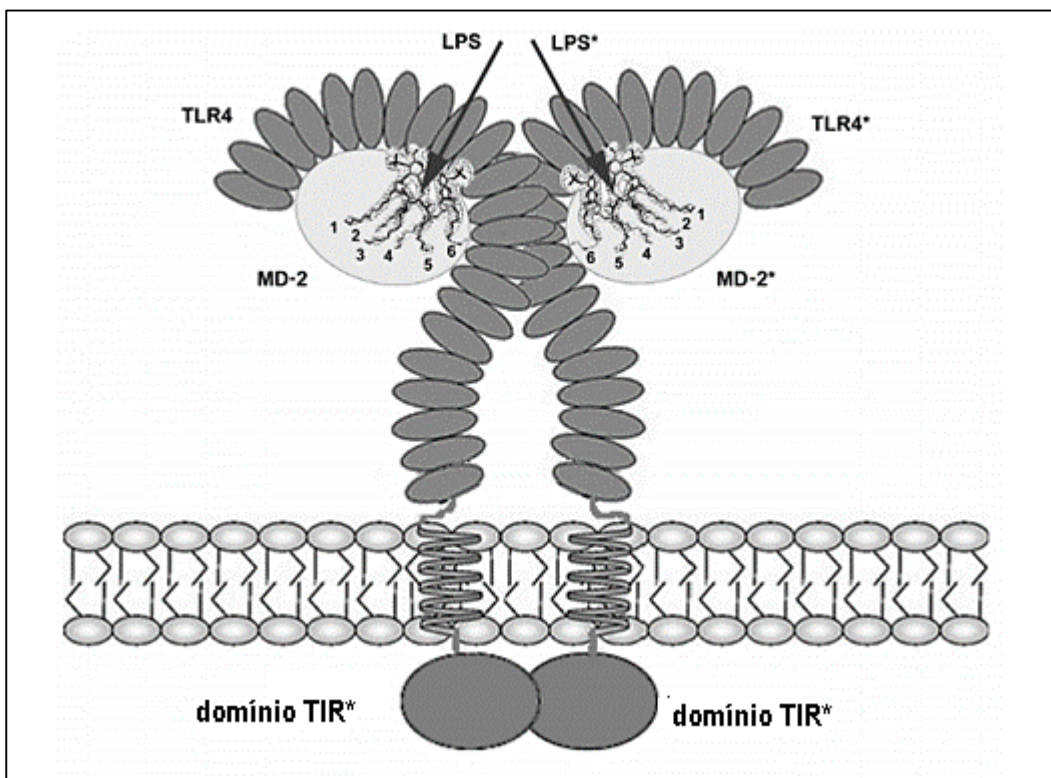
Em 1997, foram reconhecidos dez diferentes TLR funcionais em humanos, denominados TLR1 a TLR10, sendo que os TLR 1, 2, 4, 5 e 6 estão presentes na membrana citoplasmática, de modo que eles contêm domínios extracelulares, enquanto que os TLR 3, 7, 8, 9 e 10 estão localizados intracelularmente, ou seja, nos endossomos e não possuem domínios extracelulares (FERRAZ *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2016).

O TLR tipo 4 foi o primeiro homólogo descrito em humanos e revolucionou o campo da imunidade inata, permitindo o entendimento de como patógenos e micróbios são reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro (VIJAY, 2018). O TLR4 reconhece os lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular de bactérias gram-negativas, assim como a galactomanana e o glucoronoxilmanano fúngicos, além da proteína F de alguns vírus e outros constituintes do hospedeiro como os oligossacarídeos do ácido hialurônico e o fibrinogênio (ELSHABRAWY *et al.*, 2017).



TLR4 é expresso principalmente na superfície de células hematopoiéticas, incluindo monócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas e macrófagos (COCHET; PERI, 2017). Apresenta em sua região extracelular, abundância em leucinas e cisteínas, que estão envolvidas na interação com o ligante. As interleucinas produzidas em resposta à ativação desses receptores promovem o recrutamento de leucócitos e outros macrófagos para o local da infecção, mediando a inflamação local (MEDVEDEV, 2013).

O TLR4 é o único receptor tipo toll que precisa de uma proteína acessória (fator de diferenciação mielóide 2, MD-2) para ser ativado e dessa forma ativar a resposta imune (BILLOD *et al.*, 2016). A resposta imune mediada pela ativação de TLR4 e seu co-receptor MD-2 começa com a ligação de um lipopolissacarídeo (LPS) pelo grupamento de diferenciação 14 (CD14), que o entrega a MD-2, formando um complexo final (TLR4/MD-2/LPS) (figura 02) (BILLOD *et al.*, 2016). O CD14, funciona como um catalizador do LPS ao MD-2, após a transferência de LPS para o MD-2, o LPS e o MD-2 interage com o TLR4 (FERWERDA *et al.*, 2008).



**Figura 2. Estrutura do complexo TLR4 / MD-2 após ligação de lipopolissacarídeo.** Fonte: CZERKIES et al (2014).

O reconhecimento de ligantes microbianos e fúngicos por TLR4 leva à ativação de diversas vias de sinalização que por sua vez ativam os fatores de transcrição, induzindo a

expressão de genes importantes para o desenvolvimento de respostas inflamatórias, que conduzem de forma rápida à montagem de um Centro Organizador Supramolecular (SMOC) (FRAZÃO *et al.*, 2013). Este centro de organização é o principal sítio sub-celular onde os sinais de TLR4 promovem a ativação do fator nuclear B (NF- $\kappa$ B) e da proteína ativadora 1 (AP-1), que gera a expressão gênica inflamatória (AP-1, NF- $\kappa$ B, IFR3, STAT1), como demonstrado na figura 03 (CRUZ-MACHADO, 2010).

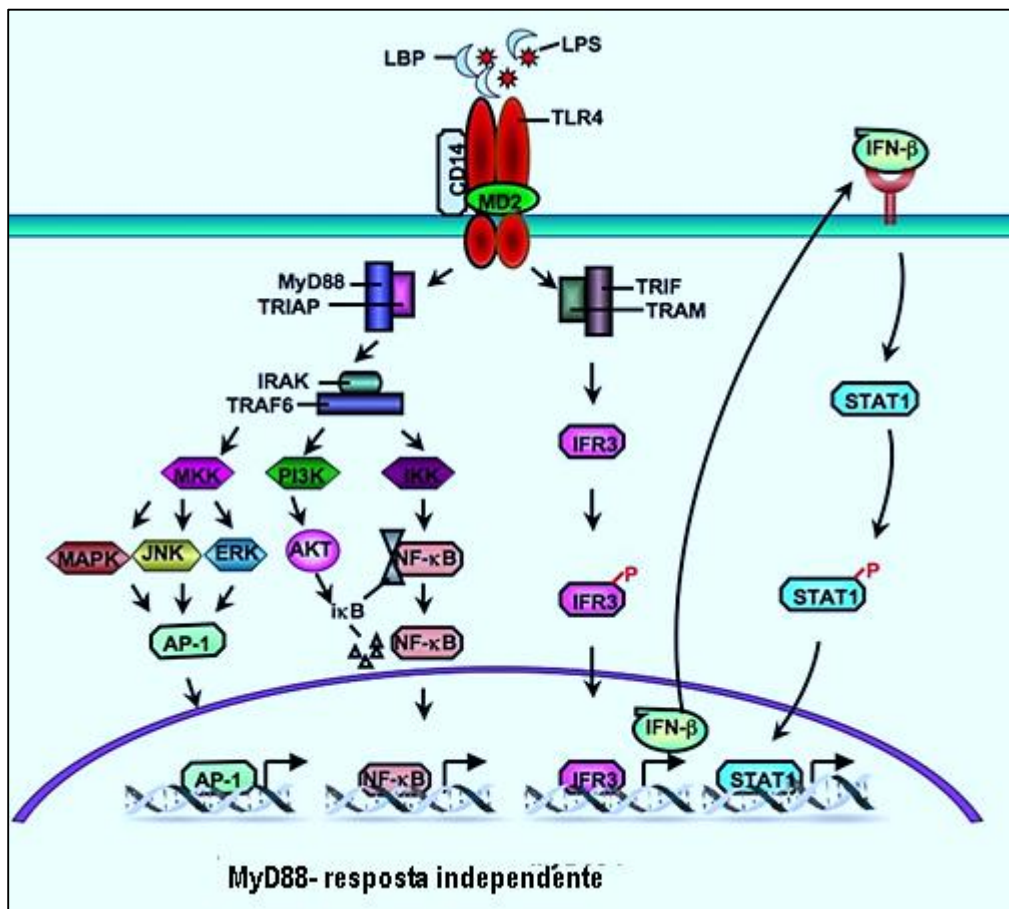


Figura 3. Via de sinalização de TLR4 no reconhecimento de antígenos. Fonte: Guo; Friedman *et al.* (2010).

Antes de iniciar a sinalização, várias proteínas receptoras proximais interagem com TLR4 e regulam a ligação ao LPS, gerando um processo de endocitose de TLR4 (ROSADINI; KAGAN, 2017). Após ativação dessa cascata de sinalização intracelular, o reconhecimento do PAMP é mediado pelo fator de diferenciação mieloide-88 (MyD88) (TAGHAVI *et al.*, 2017). O MyD88, é uma molécula chave adaptadora que transmite sinais intracelulares iniciados, presentes em quase todos os TLRs, exceto no TLR3 (CZERKIES *et al.*, 2014), além de ser considerada uma proteína de regulação do complexo formado com TLR4 (WU *et al.*, 2013).

Outra via de sinalização, dependente da proteína adaptadora TRIF, pode ser iniciada apenas por TLR4 e TLR3. O TRIF possui papel importante na ativação da fase tardia do NFκB, enquanto a via dependente de MyD88 leva à ativação rápida de NFκB após a ligação de LPS (CZERKIES *et al.*, 2014). A transdução de sinal ao longo de ambas as vias é necessária para uma ativação completa da produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao LPS (KAWAI; AKIRA, 2010). Todavia, juntamente com a cascata de sinalização pró-inflamatória, moléculas anti-inflamatórias ou reguladoras da inflamação também são ativadas no processo de sinalização, através da indução de vários estímulos que mediam a indução de citocinas pró-inflamatórias (ROY *et al.*, 2016).

## II.5 – Polimorfismos genéticos de TLR4 e suas consequências estruturais e funcionais

Polimorfismos genéticos são alterações genéticas que diferem das mutações devido a sua frequência, que é superior a 1%. A grande maioria dos polimorfismos genéticos de nucleotídeos únicos (SNPs) resulta no aparecimento de dois alelos, os quais estão representados por uma substituição de uma base por outra (LIMA, DE *et al.*, 2006). Essas alterações, ocorrem uma vez a cada 200 pares de bases no genoma humano, de modo que são esperados aproximadamente 6.000.000 SNPs no genoma (KWOK; CHEN, 2003).

Em 1998, o gene TLR4 foi localizado no cromossomo 9q32 –q33 por hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (figura 04). O gene, possui aproximadamente 17 quilobases (kb), com quatro éxons, separados por três íntrons em sua estrutura (JIAO *et al.*, 2016). É caracterizado como um importante receptor de patógenos que reconhece, além de estruturas fúngicas e de agentes microbianos patogênicos, lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas (ROCK *et al.*, 1998).

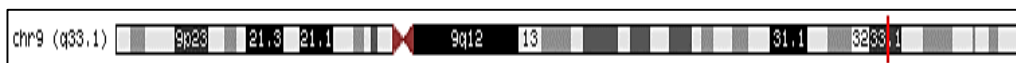
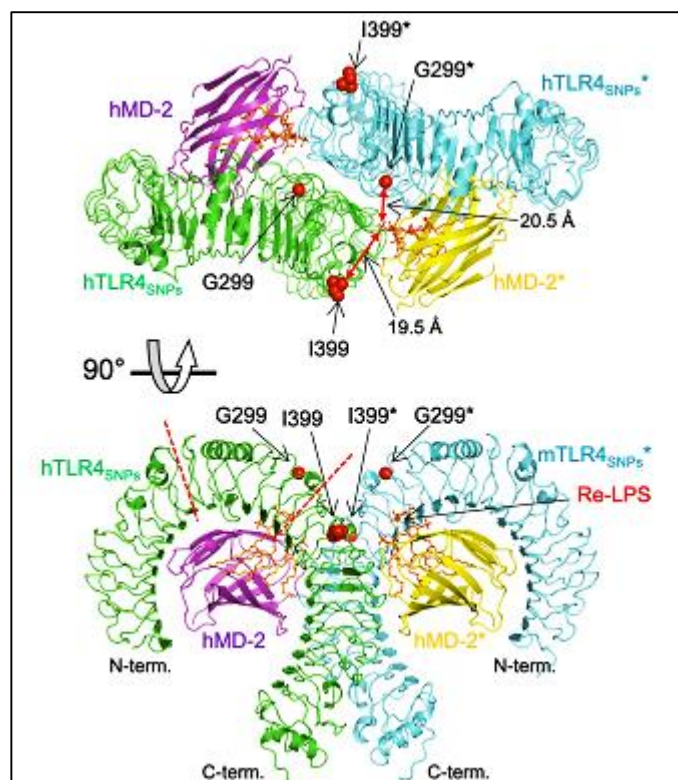


Figura 4. Esquema mostrando a localização do gene TLR4 no cromossomo 9. Fonte: OMIM *et al.* (2019).

Existem 920 SNPs descritos no gene TLR4 humano e muitos estão associados à diminuição da resposta imune, resultante do menor reconhecimento de ligantes polissacarídeos e menor interação com proteínas envolvidas na transdução de sinais (JIAO *et al.*, 2016; OLIVEIRA; SILVA, 2012). O gene TLR4 humano é altamente polimórfico e seus polimorfismos podem influenciar na expressão ou função da proteína (figura 05) (PROENÇA *et al.*, 2015).

O polimorfismo T399I (rs4986791), também conhecidos como Thr399Ile, é identificado na região de codificação de TLR4 (extremidade C-terminal) e resulta na troca de treonina por isoleucina na posição 399 (CUNHA, 2017; MEDVEDEV, 2013). Está descrito no quarto exon do gene TLR4 e afeta o domínio extracelular da molécula mediadora da inflamação (PIRES-NETO *et al.*, 2015; NORDE *et al.*, 2016). Ressalta-se que o primeiro polimorfismo identificado nos TLR foi o alelo Asp299Gly do TLR4, associado à redução da resposta imunológica frente a alguns agentes microbianos (FERRAZ *et al.*, 2011).



**Figura 5. Localização geral dos SNPs na proteína TLR4.** Fonte: Ohto et al, 2012 (OHTO *et al.*, 2012).

O RNA mensageiro (RNAm) de TLR4 é expresso em células mielóides (monócitos e macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos, plaquetas, células dendríticas e granulócitos), células B e células endoteliais (MEDZHITOV *et al.*, 1997). A presença do SNPs

rs4986791 na região codificante de TLR4 pode afetar a estrutura da proteína e resultar em proteínas com atividade alterada (JABER *et al.*, 2005; ROCK *et al.*, 1998).

Os SNPs presentes no domínio extracelular do receptor TLR4 afetam a função da proteína correlata pois a alteração nos aminoácidos compromete a estrutura do receptor, afetando a modulação da via de sinalização e o reconhecimento do microrganismo (OHTO *et al.*, 2012; ROCK *et al.*, 1998). A desregulação da sinalização desse receptor pode causar consequências significativas no processo inflamatório mediante o reconhecimento fúngico por TLR4, provavelmente devido a uma falha no estímulo de células reguladoras e produção de citocina IL-10 (MEDVEDEV, 2013; OLIVEIRA, 2012).

Os dois polimorfismos não-sinônimos descritos em TLR4, Asp299Gly e Thr399Ile, foram os primeiros descritos em indivíduos com resposta imunológica reduzida frente à inalação de lipopolissacarídeos bacterianos (ARBOUR *et al.*, 2000). No entanto, estudos de revisão da literatura que investigaram os polimorfismos (rs4986790 e rs4986791) de TLR4 e a suscetibilidade à diferentes doenças (sepse, doença aterosclerótica, asma, infecção por *Candida*, periodontite crônica, vírus respiratório sincicial (RSV), transplante e doença de Crohn) não fornecem evidências precisas sobre as consequências funcionais da presença dos polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) e Thr399Ile (rs4986791) em TLR4 (FERWERDA *et al.*, 2008).

Entretanto, um estudo com células transfectadas com TLR4 contendo os dois polimorfismos demonstrou uma atividade de NF- $\kappa$ B diminuída em comparação com aquelas que apresentavam TLR4 normal, sugerindo que os polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) e Thr399Ile (rs4986791) devem afetar o fenótipo (especialmente, por causa da sua localização entre o ligante e a área de reconhecimento do receptor), levando a produção reduzida de citocinas pela resposta imune inata e favorecendo um retardamento da resposta inflamatória (ARBOUR *et al.*, 2000).

## **II.6 – Frequência do polimorfismo rs4986791 de TLR4 na população brasileira**

Estudos desenvolvidos em diferentes regiões geográficas do Brasil investigaram a frequência do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 em diferentes grupos da população brasileira e permitiram a análise entre o polimorfismo e diferentes condições patológicas, conforme demonstrado na tabela 1. Esses estudos resumem o quadro investigativo dos polimorfismos de TLR4 na população brasileira nos últimos dez anos.

**Tabela 1. Artigos selecionados investigando as associações do polimorfismo rs4986791 do gene TLR4 em diferentes condições patológicas na população brasileira.**

Autor	Ano / Local	Casuística	rs4986791		Valor de p no estudo
			Casos	Controles	
			Frequência alelica	Frequência alelica	
Alvarez <i>et al.</i> (ALVAREZ <i>et al.</i> , 2017)	2017 / São Paulo	181 casos de indivíduos lactantes ( $\leq 2$ anos) internados com bronqueolite viral aguda e 536 controles (entre 19 e 25 anos) sem histórico de doença crônica pulmonar	C = 0,97 T = 0,03	C = 0,95 T = 0,05	p=0,152
Tolentino <i>et al.</i> (TOLENTINO <i>et al.</i> , 2016)	2016 / Rio de Janeiro	128 casos sendo 67 diagnosticados com doença de Crohn e 61 com colite ulcerativa, 83 controles sem diagnóstico de doença	Pacientes DC C= 0,96 T= 0,04  Pacientes CU C= 0,98 T= 0,02	C= 0,96 T= 0,04	p=0,80
Pires-Neto <i>et al.</i> (PIRES-NETO <i>et al.</i> , 2015)	2015 / Pará	121 casos diagnosticado com hepatite tipo B e C crônicos e 299 controles sem histórico de hepatite tipo B e C	HBV C = 0,99 T = 0,01  HCV C = 0,97 T = 0,03	C = 0,96 T = 0,04	p= 0,567
Proença <i>et al.</i> (PROENÇA <i>et al.</i> , 2015)	2015 / São Paulo	194 casos de diagnóstico de câncer colo retal e 240 controles doadores de sangue	C = 0,10 T = 0,90	C = 0,10 T = 0,90	p=0,860
Oliveira <i>et al.</i> (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2013)	2013 / São Paulo	229 casos diagnosticados com gastrite crônica e com área metaplásica e 240 controles doadores de sangue sem histórico de doença	Câncer G C =0,98 T = 0,02 Gast Cron C = 0,99 T = 0,01	C = 0,99 T = 0,01	p=0,645

Lima-Neto <i>et al.</i> (LIMA-NETO <i>et al.</i> , 2012)	2012 / São Paulo	102 casos diagnosticados com infarto agudo do miocárdio e 108 controles sem histórico de infarto	-	-	p=0,621
Oliveira <i>et al.</i> (OLIVEIRA; SILVA, 2012)	2012 / São Paulo	208 casos diagnosticados com gastrite crônica e 174 confirmados para câncer gástrico. 225 controles sem histórico de doença gástrica	Câncer G C = 0,97 T = 0,03	C = 0,99 T = 0,01	p= 0,91
Fallavena <i>et al.</i> (FALLAVENA <i>et al.</i> , 2012)	2012 / Rio Grande do Sul	524 indivíduos adultos gravemente doentes, internados em uma unidade de terapia intensiva	Gast Cron C = 0,98 T = 0,02	-	p=0,804
Lima-Neto <i>et al.</i> (LIMA-NETO <i>et al.</i> , 2009)	2009 / São Paulo	102 casos de infarto agudo do miocárdio e 108 controles sem histórico de infarto	C= 0,97 T= 0,03	C= 0,98 T= 0,02	p=0,948

---

As investigações incluíram indivíduos com idades entre zero a 60 anos, de ambos os sexos e que residiam nos seguintes estados: São Paulo e Rio de Janeiro (região sudeste), Rio Grande do Sul (região sul) e Pará (região norte). As condições patológicas investigadas nos estudos incluíram bronqueolite viral aguda, doença de Crohn e colite ulcerativa, hepatite B e C, gastrite crônica e câncer gástrico, câncer colorretal e infarto agudo do miocárdio.

Com relação ao polimorfismo rs49866791, a frequência do alelo selvagem C variou de 90 a 99%, com média de 97% nos casos (indivíduos da população brasileira com diferentes doenças), e de 90 a 99%, com média de 97% nos controles (indivíduos da população brasileira sem histórico das doenças investigadas). A frequência do alelo mutante T variou de 1 a 10%, com média de 3% nos casos (indivíduos da população brasileira com diferentes doenças) e de 1 a 10%, com média de 3% nos controles (indivíduos da população brasileira sem histórico das doenças investigadas).

O intervalo, média e desvio padrão das frequências alélicas descritas nos estudos que investigaram a associação do polimorfismo rs4986791 em diferentes doenças na população brasileira estão demonstradas na tabela 2. Não houve associação significativa do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 e as demais doenças investigadas na população brasileira.

**Tabela 2. Frequências alélicas do polimorfismo rs4986791 do gene TLR4 na população brasileira.**

Gene	SNP	Troca de Aminoácido	Alelo	Frequência (%) casos			Frequência (%) controles			p*
				Intervalo	Média/ DP	N	Intervalo	Média / DP	N	
TLR4	rs4986791	Thr388Ile	Selvagem C	90,0-99,0	97,0 (± 0,2)	692	90,0-99,0	97,0 (± 0,3)	2210	<0,0001
			Mutante T	0,1-10,0	0,3 (± 0,2)	356	0,1-10,0	0,3 (± 0,3)	440	

\*Qui-quadrado

Apesar da falta de associação significativa do polimorfismo rs4986791 de TLR4 nos estudos que investigaram a presença desse SNPs de TLR4 em diferentes doenças na população brasileira, os estudos informam que a presença do polimorfismo Thr399Ile pode influenciar alterações fisiológicas, contribuindo para o desenvolvimento de processos crônicos de inflamação e infecção (PROENÇA *et al.*, 2015; NORDE *et al.*, 2016).

A associação entre o polimorfismos rs4986791 de TLR4 e a atividade inflamatória não modifica o curso da infecção hepática em indivíduos da população brasileira com hepatite B e C, pois não foi encontrado diferença nas frequências alélicas e genotípicas entre os indivíduos infectados com hepatite e controles (PIRES-NETO *et al.*, 2015).



Os estudos que investigaram o polimorfismo rs4986791 de TLR4 na população brasileira foram desenvolvidos em diferentes estados e a região sudeste foi predominante com aproximadamente 78,6% de estudos. A região sudeste é caracterizada por ser de maior estimativa populacional brasileira, com forte processo de migração e alta miscigenação, fator que interfere na formação genética dos indivíduos e gera uma diversidade genética na população (IBGE, 2017; THOMPSON, 2016). No entanto, nenhum desses estudos investigou a associação do polimorfismo rs4986791 na população da região centro-oeste do Brasil.

## II.7 - Associação entre o polimorfismo rs4986791 e aspergilose invasiva em pacientes hematológicos.

O TLR4 está envolvido no reconhecimento de ligantes fúngicos, incluindo a manana (derivado de *Candida albicans*) e o glucuronoxilomanano (derivado de *Cryptococcus neoformans*), apresentando destaque no reconhecimento imune inato de espécies de *Aspergillus* (BOCHUD *et al.*, 2008). O TLR4 é um receptor que detecta o lipopolissacarídeo, um componente de bactérias gram-negativas que favorece o choque séptico e apresenta um importante papel na defesa do sistema imunológico frente aos ataques microbianos (PAMER, 2008). O polimorfismo rs4986791 interfere na transdução do sinal gerado por TLR4 e afeta a resposta imune frente a invasões microbianas, influenciando susceptibilidade às infecções. Por essa razão, o comprometimento da resposta imune pode aumentar a susceptibilidade do indivíduo para AI (figura 06) (KOLDEHOFF *et al.*, 2013).

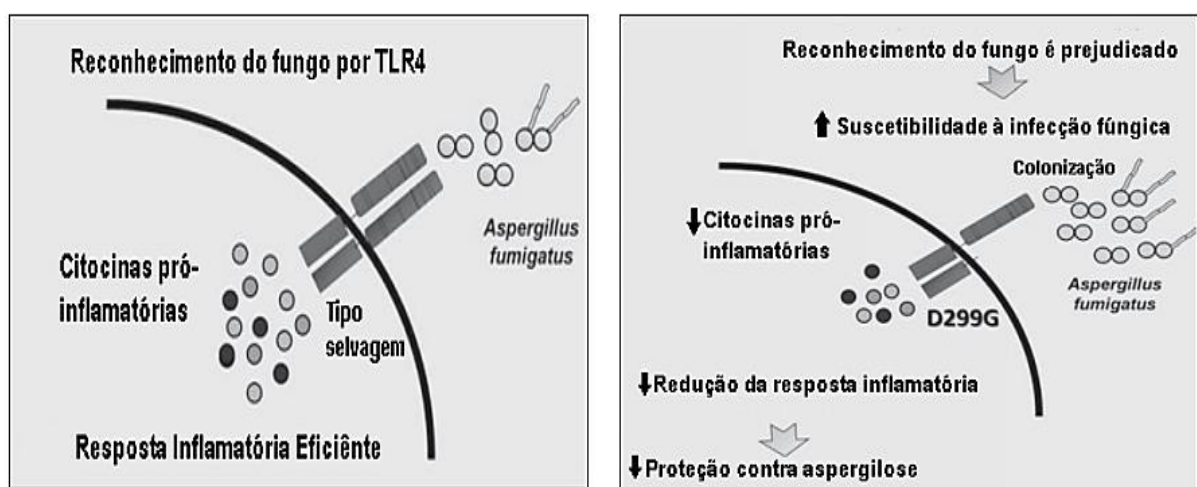


Figura 6. Influência do polimorfismo Asp229Gly (rs4986790) de TLR4 na resposta imunológica à aspergilose invasiva. Fonte: (CUNHA *et al.*, 2011) (CUNHA *et al.*, 2011).

Estudos desenvolvidos em diferentes países investigaram as frequências alélicas e gênicas para o polimorfismo rs4986791 de TLR4 em indivíduos imunodeprimidos com aspergilose invasiva e controles (tabela 3). O primeiro estudo foi realizado nos Estados Unidos em 2005, indicando que a análise de genes que codificam moléculas envolvidas na imunidade inata poderia identificar um subgrupo de indivíduos mais vulneráveis à infecção após transplante de células tronco-hematopoiéticas: 22 indivíduos com AI e 105 controles sem AI. Este estudo sugeriu que novas pesquisas fossem realizadas a fim de descrever o papel dos fatores clinicamente conhecidos para a aspergilose invasiva e determinar a associação entre fatores genéticos e tempo até o início da AI em indivíduos imunocomprometidos (KESH *et al.*, 2005).

Uma associação do haplótipo S4 com a aspergilose invasiva foi confirmada quando foram comparados pacientes com aspergilose invasiva e pacientes-controles (BOCHUD *et al.*, 2008). O haplótipo S4 é definido pela presença de quatro SNPs (wt/wt, Asp299Gly/wt, Thr399Ile/wt e Asp299Gly/Thr399Ile), entre eles os polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile, que estão dentro ou próximos do gene TLR4 e alteram a sequência de aminoácidos para a forma hiporesponsiva a lipopolissacarídeos (FERWERDA *et al.*, 2008). A associação do haplótipo S4 com a aspergilose invasiva foi significativa apenas em pacientes receptores de transplantes halogênicos, que necessitam de maior terapia imunossupressora para prevenir a doença do enxerto contra o hospedeiro, sugerindo que os SNP de TLR4 estão associados com o risco aumentado de aspergilose invasiva em indivíduos imunodeprimidos (BOCHUD *et al.*, 2008; PAMER, 2008).

SNPs de TLR4 foram associados com a susceptibilidade à infecção fúngica ou viral, podendo representar fatores de riscos no transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH) (CARVALHO *et al.*, 2009). Os polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) e Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 foram associados à aspergilose pulmonar em indivíduos submetidos ao TCTH, pois favorecem o desenvolvimento de colonização fúngica, uma vez que, o TLR4 é um importante componente do sistema imune inato responsável pela resposta ao fungo (CARVALHO *et al.*, 2009; BOER *et al.*, 2011).

Apesar de apresentarem estado de imunodepressão, nem todos os indivíduos imunologicamente comprometidos que realizaram TCTH acabam desenvolvendo a infecção (CUNHA *et al.*, 2011). A avaliação significativa para o desenvolvimento da AI é a neutropenia (diminuição dos neutrófilos), pois o período prolongado de neutropenia em alguns indivíduos, constitui o fator mais importante para o desenvolvimento de infecções oportunistas e, dessa

forma, poderá aumentar o índice de mortalidade entre os pacientes que realizaram transplante hematológico (SILLING *et al.*, 1999). No entanto, como consequência da neutropenia, outros componentes da resposta imune inata podem exercer papel proeminente na defesa contra à infecção fúngica invasiva, além disso, SNPs em TLR e citocinas podem atuar em diferentes momentos da resposta imunológica modulando a resistência à aspergilose invasiva, de modo que, esses SNPs podem constituir uma assinatura genética do hospedeiro quanto a susceptibilidade à AI (BOER *et al.*, 2011).

A relação entre AI e morte em pacientes imunodeprimidos com malignidade hematológica é fortemente caracterizada (VANDERVELDEN *et al.*, 2011). Aproximadamente 72 a 94% dos pacientes transplantados com AI morrem pela infecção - segundo dados epidemiológicos, estimando que 9,3 a 16,9% de todas as mortes em pacientes no primeiro ano após o transplante são atribuídas à aspergilose invasiva (SANTOS, 2011; SATLIN *et al.*, 2015). No entanto, os avanços nos manejos médicos favoreceram a detecção das infecções fúngicas invasivas nos países desenvolvidos e, conseqüentemente, aumentaram a profilaxia para a aspergilose no ambiente hospitalar (AKI *et al.*, 2015).

O aumento da susceptibilidade à aspergilose e a deficiência imunológica pós-transplante foram observados em outro estudo realizado na Alemanha em 2013. Nesse estudo, as variantes genéticas de TLR4 foram investigadas em relação ao diagnóstico de AI em doadores e transplantados de células-tronco hematopoiéticas. Os resultados mostraram que os indivíduos portadores de variantes genéticas em TLR4 apresentaram uma recuperação imune tardia frente à AI após o TCTH, sugerindo que TLR4 desempenha um importante papel na regulação do sistema imunológico, uma vez que, as infecções fúngicas oportunistas continuam sendo uma importante causa de mortalidade e morbidade em indivíduos imunocomprometidos (KOLDEHOFF *et al.*, 2013).

**Tabela 3. Investigações das frequências alélicas para o polimorfismo rs4986791 de TLR4 em indivíduos com aspergilose invasiva associados ao transplante células tronco-hematopoiética, em diferentes países.**

Referência	Local/Ano	Casuística	Casos	rs4986791 Controles	Valor de <i>p</i> nos estudos
(AKI <i>et al.</i> , 2015).	Japão/2015	27 indivíduos diagnosticado com AI, sem controles	Oito pacientes homozigotos (C/C)	--	--
(GRUBE <i>et al.</i> , 2013).	Alemanha/2013	41 caso de AI após TCTH e 131 controles sem AI após transplante	C= 94,0 T= 6,0	C= 96,0 T= 4,0	0,27
(BOER <i>et al.</i> , 2011).	Bélgica/2011	44 casos diagnosticados com AI submetidos a TCTH e 64 controles receptores de TCTH sem AI	C= 94,0 T= 6,0	C= 96,0 T= 4,0	0,06
(BOCHUD <i>et al.</i> , 2008).	Estados Unidos/2008	103 casos de diagnóstico de AI após transplante halogênico e 263 controles sem AI	--	--	0.02
(KESH <i>et al.</i> , 2005).	Estados Unidos/2005	22 casos diagnosticados com AI e 105 controles não afetados por AI	C= 90,1 T= 9,1	C= 92,4 T= 7,6	--

Alguns critérios clínicos e microbiológicos são adotados para o diagnóstico das infecções fúngicas invasivas em indivíduos com câncer ou submetidos a transplantes de órgãos sólidos e de células-tronco hematopoiéticas: neutropenia prolongada, uso de imunossupressores, uso prolongado de corticoides e sinais e sintomas de doença de enxerto contra o hospedeiro, resultado positivo para o antígeno do *Aspergillus* (teste da galactomanana) em amostras de sangue ( duas ou mais coletas), resultado positivo de cultura e tomografia computadorizada apresentando sinais de infecção do trato respiratório (infiltrados pulmonares) (ASCIOGLU *et al.*, 2002; HEDHILI *et al.*, 2017).

As técnicas de biologia molecular também têm grande potencial no auxílio de diagnóstico da AI. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de diagnóstico alternativo, pouco invasivo e tem sido cada vez mais utilizada, a fim de diagnosticar a AI durante a fase inicial da infecção, momento em que o paciente tem baixa carga fúngica e quando a terapia seria mais eficaz (FERREIRA *et al.*, 2015). A verificação da predisposição genética à AI permite identificar precocemente os indivíduos com maior risco de contrair infecção fúngica invasiva e desta forma prevenir a aspergilose, por meio dos tratamentos antifúngicos apropriados (BATISTA, 2015).

Os resultados entre os estudos que investigaram em diferentes países a associação do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) com o diagnóstico de aspergilose invasiva em indivíduos imunodeprimidos são conflitantes, pois apenas um estudo descrito por Bochud *et al.*, 2008, encontrou associação entre SNPs no gene TLR4 e aspergilose invasiva em transplante de células tronco-hematopoiéticas. O SNP rs4986791 de TLR4 não foi associado significativamente nesses estudos. Na literatura consultada, nenhuma investigação das frequências alélicas e gênicas para os polimorfismos rs4986790 e rs4986791 de TLR4 associados a aspergilose invasiva em indivíduos imunodeprimidos foi realizada no Brasil.

### **III – OBJETIVOS**

#### **III.1- Objetivo Geral**

Avaliar o polimorfismo genético Thr399Ile (rs4986791) em TLR4 associado à aspergilose invasiva em pacientes hematológicos imunodeprimidos.

#### **III.2- Objetivos Específicos**

- Avaliar a frequência do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 em pacientes hematológicos imunodeprimidos com aspergilose invasiva e em controles no centro-oeste.
- Comparar a frequência do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 nos dois grupos.
- Investigar a possível associação do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 com a predisposição à aspergilose invasiva.

## IV – MATERIAL e MÉTODOS

### IV.1 - Seleção dos casos e controles

A identificação do grupo de casos foi realizada a partir de resultados de exame de detecção de galactomanana no Laboratório de Biologia Tumoral e Transplante de Medula Óssea do Hospital Araújo Jorge (HAJ), da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG). A galactomanana é um polissacarídeo componente da parede celular do *Aspergillus*, sendo liberada durante seu crescimento. O método de detecção de galactomanana é um teste de ELISA sanduíche, que utiliza anticorpos monoclonais (EB-A2) que reconhecem cepas de *Aspergillus fumigatus*. A detecção da galactomanana em amostras biológicas é usada para o monitoramento de pacientes suscetíveis ao desenvolvimento de aspergilose invasiva e para a avaliação da terapia realizada em pacientes já diagnosticados.

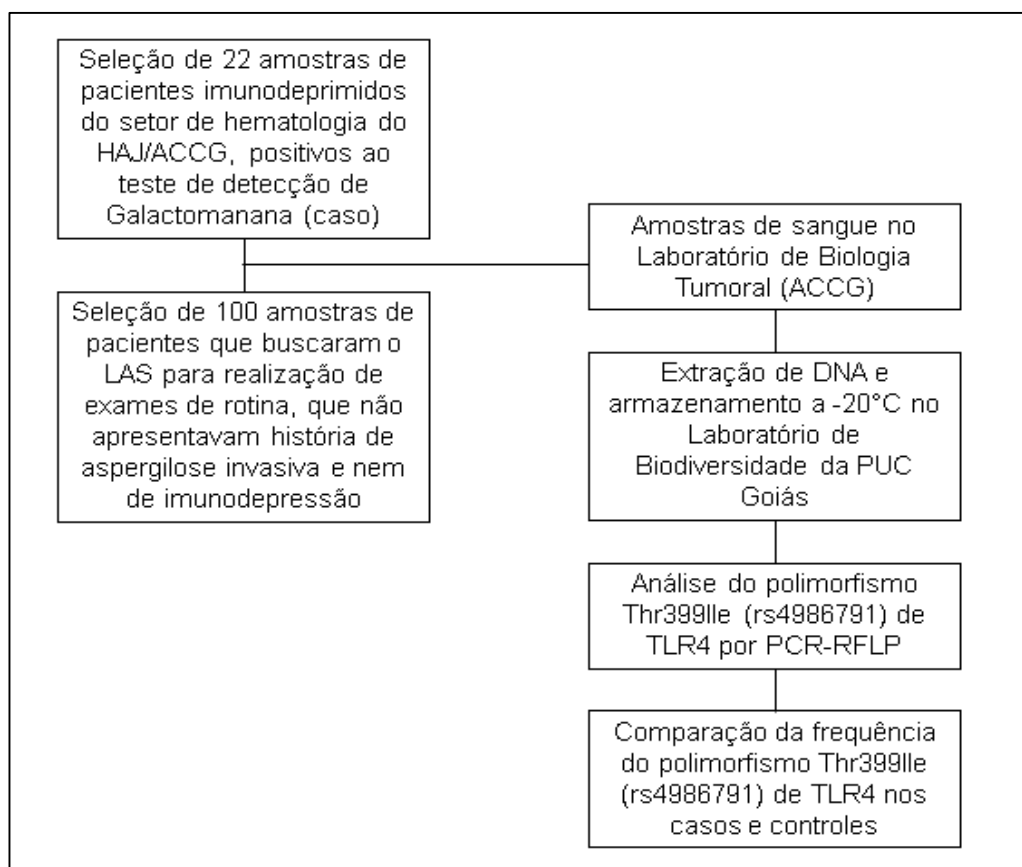
As 22 amostras do grupo caso com pelo menos dois resultados positivos para detecção de galactomanana foram selecionados e as informações clínicas dos pacientes obtidas por meio dos livros de registros e prontuários do setor de hematologia do HAJ-ACCG, na cidade de Goiânia, Goiás, Brasil. As informações clínicas de cada paciente foram coletadas a partir da revisão de prontuários médicos. Os pacientes com resultados positivos para detecção de galactomanana tiveram uma amostra de sangue coletada e usada para as análises dos polimorfismos genéticos. O diagnóstico de aspergilose invasiva foi confirmado segundo os critérios clínicos e microbiológicos estabelecidos pelo *European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group* (EORTC) (ASCIUGLU *et al.*, 2002), onde para um bom diagnóstico de AI utiliza: (1) testes laboratoriais, a fim de detectar antígenos galactomananos circulantes “GM” no soro; (2) DNA do fungo em amostras patológicas, para detecção de ácidos nucleicos; (3) exames microbiológicos e (4) exames de imagem (HEDHILI *et al.*, 2017). Os pacientes incluídos no estudo foram aqueles que aceitaram participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), para análise dos polimorfismos genéticos de susceptibilidade à aspergilose invasiva (Anexo III).

O grupo controle foi formado por pacientes que buscaram o Laboratório da Área da Saúde da PUC-Goiás (LAS) da PUC-Goiás para realização de exames de rotina. O número de amostras do grupo controle foi escolhido por conveniência, uma vez que não foram encontrados na literatura dados relativos aos polimorfismos de TLR4 na população do centro-oeste do Brasil. Os indivíduos selecionados eram maiores de 18 anos, nascidos e residentes na região Centro-Oeste do Brasil, pertencentes a diferentes grupos étnicos e não apresentavam história

de aspergilose invasiva e nem de imunodepressão. O grupo foi convidado a participar do estudo durante os exames de rotina e aqueles que concordaram, assinaram o TCLE (Anexo III), autorizando a utilização da amostra sanguínea para análise molecular polimorfismos genéticos e fornecendo dados sóciodemográficos. A escolha do grupo controle foi definida no sentido de evitar maiores riscos e desconfortos aos participantes, uma vez que procuraram o Laboratório Clínico da PUC-GO para realização de exames de rotina e desta forma, já seriam submetidos à coleta de sangue periférico. O número final de participantes para o grupo de casos foi 22 e de controles foram 100 (figura 07).

### **Extração de DNA das amostras de sangue:**

A extração de DNA a partir do sangue periférico coletado de cada participante foi realizada com o auxílio de kit comercial PureLink DNA Mini Kit (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. Após a extração, o DNA genômico foi quantificado por meio de um NanoDrop ND-2000 UV-vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). O produto de extração foi armazenado em microtubos a  $-20^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Biodiversidade da PUC Goiás até a realização dos ensaios de PCR.



**Figura 7. Fluxograma com levantamento e seleção dos casos.**



## **IV.2 – Dados sóciodemográficos e clinicopatológicos**

Os dados sóciodemográficos colhidos nos grupos casos e controles incluíram: nome, sexo, idade, cor e naturalidade. As informações clínicas e patológicas colhidas no grupo caso foram: doença hematológica maligna, fator de neutropenia, uso de antifúngicos, resultado de Elisa para detecção de galactomana, resultado de TC de tórax, resultado de cultura, uso de drogas imunossupressoras, realização de transplante e diagnóstico para aspergilose invasiva. No grupo controle, as informações clínicas patológicas colhidas incluíram: uso de medicação e diagnóstico para algum tipo de doença crônica.

## **IV.3 – Análise molecular do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4**

A avaliação dos polimorfismos do gene TLR4 foi realizada a partir da amplificação da região gênica de interesse por PCR convencional, seguida de análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP). Todas as reações foram acompanhadas de controles positivo e negativo para verificação da eficácia da amplificação. A presença e a integridade do DNA foram verificadas por meio da amplificação dos fragmentos do gene TLR4 contendo o polimorfismo rs4986791. Após o término da PCR, os produtos da amplificação foram analisados por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e revelados pela coloração com nitrato de prata. Um marcador de peso molecular (ladder) de 50 pb (Invitrogen) foi utilizado para análise das bandas formadas.

A região polimórfica do gene TLR4 foi amplificado com o iniciador descrito por Zaharieva *et al.* (2017). A PCR foi realizada em um volume de reação de 25µl contendo Tampão 10×, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 0,075 mM de cada primer, 0,6U de Taq DNA polimerase e 100ng/µl de DNA. As amplificações por PCR foram realizadas em um termociclador com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min. O ciclo térmico foi repetido 30 vezes: desnaturação a 95°C por 30s, emparelhamento por 60s a 60°C para Thr399Ile e extensão a 72°C por 60s. Uma extensão final de cinco minutos a 72°C.

Para detecção do polimorfismo rs4986791 de TLR4, os produtos de PCR foram submetidos a digestão com enzima de restrição. O fragmento de 407 pares de bases foi digerido com a enzima HinfI (Promega), resultando em dois fragmentos de 378 e 29 pares de bases quando o polimorfismo (rs4986791) estava presente (tabela 4). As bandas resultantes da digestão foram analisadas em gel de poliacrilamida a 8% corado por nitrato de prata. Um marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb da marca Invitrogen foi utilizado para análise das bandas formadas.

**Tabela 4. Característica da enzima de restrição para Thr399Ile (rs4986791).**

<b>Polimorfismo TLR4</b>	<b>Enzima de restrição</b>	<b>Sequência reconhecida</b>	<b>Fragmentos de restrição, pb</b>
Thr399Ile (rs4986791)	Hinf I	5'GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTGGGAGAA3' 5'ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGAGTTAAATGCT3'	Alelo selvagem: 407 Alelo recessivo: 378+29

Abreviações: TLR4 – Receptor Toll-like 4; pb – pares de base.

FONTE: ZAHARIEVA et al, 2017 (ZAHARIEVA *et al.*, 2017).

#### **IV.4 - Análises estatísticas**

A análise estatística foi realizada com o pacote estatístico BioEstat v. 5.3 (Ayres *et al.*, 2007), desenvolvido pela Universidade Federal do Pará. Foi realizado o teste exato de Fischer, estatística descritiva e qui-quadrado (teste t) para avaliar as diferenças nas frequências entre os grupos casos e controles. Valores de *p* menores que 0.05 foram considerados significativos.

#### **IV.5- Aspectos éticos da pesquisa**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) (Protocolo n° 45376215.0.3001.0031/2015) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (Protocolo n° 45376215.0.0000.0037/2015). (Anexo I e II).

## V- RESULTADOS

### V.1- Características sócio-demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com teste positivo para galactomanana

O grupo de casos foi composto por 22 pacientes que forneceram amostras de sangue previamente testados para detecção de galactomanana por ELISA no período de 2013 a 2019, com resultado positivo, e que possuíam dados clínicos em prontuários médicos do HAJ. A idade do grupo variou de 3 a 74 anos e a média das idades foi de 32,8 anos. Foram investigados ambos os sexos, no entanto, houve maior número (63,6%) de indivíduos do sexo masculino. Os pacientes inseridos no grupo de estudo apresentavam níveis socioeconômicos e de escolaridade diferentes, com características raciais distintas. A maioria deles era residente na cidade de Goiânia ou em regiões metropolitanas do estado de Goiás.

**Tabela 1. Análise descritiva das características sócio-demográficas do grupo de pacientes imunodeprimidos com diagnóstico de aspergilose invasiva.**

VARIÁVEL	N=22 (%)	<i>p</i> *
<b>SEXO</b>		
Masculino	14 (63,6)	0,2008
Feminino	08 (36,4)	
<b>IDADE AO DIAGNÓSTICO</b>		
<30	07 (31,8)	0,1860
30 a 59	11 (50,0)	
≥ 60	04 (18,2)	
<b>RAÇA (COR)</b>		
Branco	09 (40,9)	0,0476
Preto	02 (9,1)	
Pardo	11 (50,0)	
<b>ESTADO</b>		
Goiás	21 (95,4)	< 0,0001
Minas Gerais	01 (4,6)	

\*Qui-quadrado

Todos os pacientes pertencentes ao grupo caso apresentavam doenças hematológicas malignas (leucemias linfóide e mielóide do tipo aguda e crônica, mielomas, linfoma de Hodgkin e outros), sendo que 90,9% desse grupo faziam uso de drogas imunossupressoras como quimioterápicos (para destruir ou bloquear o crescimento das células cancerosas). Além do resultado quantitativo para galactomanana (valor de referência: 0,5), foi analisado a TC do Tórax (presença de infiltrados pulmonares), o exame de cultura microbiológica e a neutropenia

(diminuição dos neutrófilos) de cada paciente no diagnóstico de aspergilose invasiva. Dentre os 22 pacientes do grupo de casos, 19 deles (86,4%) já faziam o uso de antifúngicos. Os dados clínicos e patológicos dos pacientes com diagnóstico positivo para AI estão descritos na tabela 6.

**Tabela 2. Dados clínicos e patológicos dos pacientes imunodeprimidos com aspergilose invasiva.**

VARIÁVEL	N=22 (%)	p*
<b>RESULTADO QUANTITATIVO PARA DETECÇÃO DE GALACTOMANA</b>		
Positivo	18 (81,8)	0,0028
Confirmar	04 (18,2)	
<b>DOENÇA HEMATOLÓGICA MALIGNA</b>		
Sim	22 (100)	< 0,0001
Não	00	
<b>NEUTROPENIA</b>		
Grave	06 (27,3)	0,7275
Moderada	09 (40,9)	
Não	07 (31,8)	
<b>USO DE ANTIFÚNGICO</b>		
Sim	19 (86,7)	0,0006
Não	03 (13,6)	
<b>INFILTRADO PULMONAR EM TUMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE TÓRAX</b>		
Alterado	20 (90,9)	0,0001
Não alterado	02 (9,1)	
<b>CULTURA</b>		
Positivo	17 (77,3)	< 0,0001
Negativo	03 (13,6)	
Não Realizado	02 (9,1)	
<b>USO DE DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS</b>		
Sim	20 (90,9)	0,0001
Não	02 (9,1)	
<b>TRANSPLANTADO</b>		
Sim	18 (81,8)	0,0028
Não	04 (18,2)	
<b>DIAGNÓTICO DE ASPERGILOSE INVASIVA</b>		
Possível	01 (4,6)	< 0,0001
Provável	03 (13,6)	
Comprovada	18 (81,8)	

\*Qui-quadrado

## V.2- Características dos participantes do grupo controle

A idade dos selecionados no grupo controle foi superior a 18 anos e a média das idades foi de 38,4 anos e desvio padrão  $\pm 15,8$  ( $p=0,5945$ ). Os participantes eram residentes da região Centro-Oeste do Brasil, sendo 92,0% pertencentes ao estado de Goiás, de diferentes grupos étnicos. Os pacientes do sexo feminino e de cor parda foram predominantes. Além disso, aproximadamente, 54% do grupo faziam o uso de medicamentos e cerca de 45% relataram possuir doenças crônicas (diabetes *mellitus*, hipertensão, anemia falciforme e depressão). Dados do grupo controle são descritos na tabela 7.

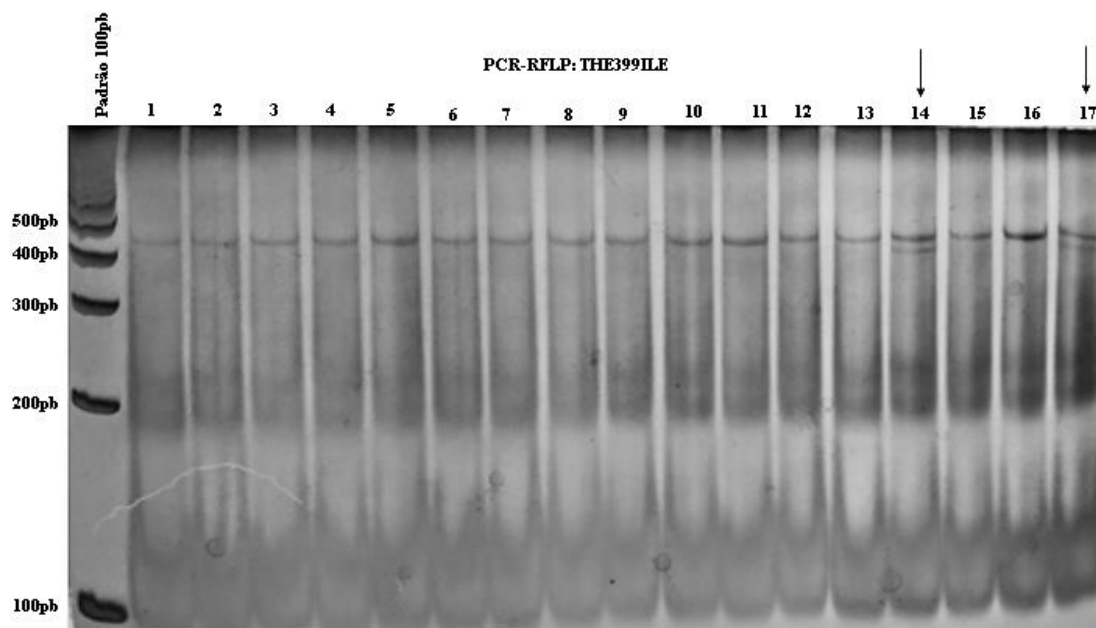
**Tabela 3. Características sócio-demográficas e clinicopatológicas de pacientes selecionados no grupo controle**

VARIÁVEL	N=100 (%)	$p^*$
<b>SEXO</b>		
Masculino	27 (27,0)	< 0,0001
Feminino	73 (73,0)	
<b>IDADE (ANOS)</b>		
<30	30 (30,0)	0,5945
30 a 59	38 (38,0)	
$\geq 60$	32 (32,0)	
<b>RAÇA (COR)</b>		
Branco	36 (36,0)	< 0,0001
Preto	16 (16,0)	
Pardo	41 (41,0)	
Amarelo	05 (5,0)	
Não Lançado	02 (2,0)	
<b>ESTADO</b>		
Goiás	92 (92,0)	< 0,0001
Tocantins	02 (2,0)	
Mato Grosso	01 (1,0)	
Distrito Federal	05 (5,0)	
<b>USO DE MEDICAÇÃO</b>		
Sim	54 (54,0)	0,4237
Não	46 (46,0)	
<b>RELATARAM DOENÇA</b>		
Diabetes	06 (6,0)	< 0,0001
Hipertensão	16 (16,0)	
Depressão	03 (3,0)	
Outros	10 (10,0)	
Não relatado	65 (65,0)	

\*Qui-quadrado

### V.3 – Frequência do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 na população estudada

Para análise do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791), foi amplificado um fragmento de 407 pares de base, que foi digerido pela enzima *HinfI*, resultando em dois fragmentos, sendo um de 378 pares de base e outro com 29 pares de base. No gel de poliacrilamida a 8% são vistos dois indivíduos heterozigotos (CT) para o polimorfismo rs4986791 (Figura 08).



**Figura 8.** Gel de poliacrilamida a 8% mostrando padrão molecular de 100pb (ladder) e produtos de PCR tratados com enzimas de restrição *HinfI* para os fragmentos de 407pb (polimorfismo Thr399Ile). O polimorfismo rs4986791 foi detectado nas amostras 14 e 17 (indicadas pelas setas), que apresentaram dois fragmentos: 407 e 378 pares de bases.

Com relação ao polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4, a frequência do alelo selvagem C foi de 97,7% nos casos e 96,5% nos controles. A diferença na frequência do alelo C não variou significativamente entre os grupos estudados ( $p=0,171$ ). A frequência do alelo mutante T foi de 2,3% nos casos e 3,5% nos controles. A diferença na frequência do alelo mutante T não foi significativa entre os grupos de casos e controles ( $p=0,171$ ). Resultados detalhados na tabela 8.

**Tabela 4. Frequência alélica do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 em pacientes imunodeprimidos com aspergilose invasiva e controles**

		Casos (n) %	Controles (n) %	<i>p</i> *
Alelos	Selvagem C	43 (97,7)	193 (96,5)	0,171
	Mutante T	1 (2,3)	7 (3,5)	
	Total	44	200	

\*Qui-quadrado. Legenda: C – alelo selvagem do polimorfismo Thr399Ile; T – alelo recessivo do polimorfismo Thr399Ile; p – valor de significância.

Das 22 amostras do grupo de casos investigados para Thr399Ile (rs4986791), uma (4,5%) era heterozigoto (CT) e 95,5% eram homozigotos para o genótipo selvagem (CC), não havendo indivíduos homozigotos - TT. Já nas 100 amostras do grupo controle, sete (7,0%) eram heterozigotos (CT) e 93 (93,0%) eram homozigotos para o genótipo selvagem (CC), não havendo indivíduos homozigotos - TT. Não foi encontrada diferença significativa na frequência genotípica do polimorfismo rs4986791 de TLR4 entre pacientes imunodeprimidos com aspergilose invasiva e controles da região centro-oeste do Brasil ( $p=0,577$ ) (Tabela 9).

**Tabela 5. Frequência genotípica de Thr399Ile (rs4986791) em grupo caso e grupo controle.**

Genotípica	Thr399Ile (rs4986791)			<i>p</i> *
	Heterozigoto (CT)	Homozigoto (CC)	Homozigoto (TT)	
Casos (n=22)	4,5%	95,5%	0,0%	0,577
Controles (n=100)	7,0%	93,0%	0,0%	

\*Qui-quadrado

## VI- DISCUSSÃO

A infecção fúngica invasiva, causada por *Aspergillus fumigatus*, está associada às altas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes com neoplasias hematológicas ou em estado de neutropenia (imunodepressão), naqueles submetidos a transplante de medula óssea ou órgãos sólidos (CUNHA *et al.*, 2018). O diagnóstico de aspergilose invasiva ( $p < 0,0001$ ) estabelecido no grupo caso (pacientes imunodeprimidos), aponta que a presença do *Aspergillus* em ambientes hospitalares pode favorecer à aspergilose invasiva em doentes com graves problemas de imunodepressão (CARVALHO, 2013).

A escolha do grupo caso nesse estudo, levou em consideração o fator de neutropenia dos indivíduos envolvidos, a fim de verificar a condição patológica de imunodepressão desses participantes, diagnosticados com aspergilose invasiva. O fator mais importante para o desenvolvimento de aspergilose invasiva (AI) é a neutropenia (PILANIYA *et al.*, 2015). Porém, os indivíduos investigados no grupo caso não apresentaram valor significativo para estado de neutropenia ( $p = 0,7275$ ). No entanto, alguns pacientes com níveis semelhantes de imunodepressão desenvolvem a doença e outros não (GONÇALVES *et al.*, 2016).

Uma possível justificativa de apenas alguns indivíduos imunodeprimidos desenvolverem a AI, pode ser dada devido a presença de SNPs em TLR4, que compromete o reconhecimento do lipopolissacarídeo presente na parede celular das bactérias gram-negativas e nas superfícies dos fungos (AKI *et al.*, 2015), uma vez que, o TLR4 reconhece a galactomanana nos conídios inalados do *A. fumigatus* (ELSHABRAWY *et al.*, 2017).

Este estudo avaliou a frequência do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) do gene TLR4 em indivíduos imunodeprimidos diagnosticados com aspergilose invasiva e em controles sem histórico de AI. Nenhuma diferença significativa ( $p = 0,171$ ) foi detectada entre os grupos. Durante o levantamento bibliográfico não foi identificado nenhum estudo na população brasileira que avaliou a frequência do polimorfismo rs4986791 em indivíduos imunodeprimidos com diagnóstico de AI. Além disso, nenhum estudo sobre a frequência desse polimorfismo foi encontrado investigando a população da região centro-oeste do Brasil.

Por ser o primeiro estudo a investigar a frequência do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 em indivíduos imunodeprimidos diagnosticados com aspergilose invasiva e controles da região centro-oeste, nossos resultados revelaram a frequência do heterozigoto CT em 4,5% casos (indivíduos com AI) e em 7,0% dos controles avaliados na região centro-oeste do Brasil. Diferenças significativas entre as frequências não foram identificadas nos dois grupos.



As frequências encontradas em relação ao polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 não são diferentes daquelas observadas em outros estudos realizados na população brasileira e em diferentes países (conforme apontou a tabela 2 do estudo). No entanto, a revisão sistemática realizada (tabela 1 do estudo) para verificar a frequência do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 em diferentes condições patológicas na população brasileira, apontou associação estatística significativa entre as frequências do alelo selvagem e mutante nos grupos casos e controles ( $p < 0,0001$ ).

Os estudos realizados na população brasileira demonstraram que o polimorfismo rs4986791 pode estar envolvido na redução da resposta imunológica frente ao reconhecimento de agentes microbianos, tais como espécies do gênero *Aspergillus* (CARVALHO, 2013). Esta associação não foi evidenciada em pacientes imunodeprimidos da região centro-oeste do Brasil com aspergilose invasiva ( $p=0,171$ ).

As alterações em TLR4 desencadeadas pela presença do SNP Thr399Ile (rs4986791), levam à alteração do local de ligação do receptor ao ligante (KUTIKHIN, 2011). Bochud *et al.* (2008), apontou que existe uma relação conjunta entre os polimorfismos Thr399Ile (rs4986791) e Asp299Gly (rs4986790) de TLR4. Em seu estudo, a associação do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) é significativa quando avaliado junto ao haplótipo S4, quando quatro SNPs são detectados em um indivíduo, observa-se uma forma hiporresponsiva de TLR4 com haplótipo S4 que parece aumentar a suscetibilidade à aspergilose invasiva (BOCHUD *et al.*, 2008).

Uma possível justificativa para que o resultado significativo apontado pelo cálculo estatístico da revisão sistemática seja diferente das investigações da frequência do polimorfismo rs4986791 em casos de aspergilose invasiva, pode ser justificado por essa relação conjunta dos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile, apontada por Bochud *et al.* (2008), pois os estudos que investigaram a presença do polimorfismo Thr399Ile na população brasileira, investigaram em conjunto vários outros SNPs que podem também influenciar na alteração de TLR4.

Era esperado que a frequência do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 fosse maior no grupo caso quando comparado com o grupo controle, devido à imunodepressão e a aspergilose invasiva. Para Grube *et al.*, 2013, a associação entre os SNPs de TLR4 e a incidência de AI se aplica particularmente ao estado de imunodeficiência prolongada após o TCTH e considerando, ainda, que a reconstituição imune tardia após o transplante depende do tipo de terapia imunossupressora realizado.

No tratamento de doenças hematológicas malignas é utilizada a quimioterapia, terapia imunossupressora, que tem como alvo células cancerígenas e células de divisão rápida, como

os neutrófilos, que assumem um importante papel na defesa do hospedeiro contra a aspergilose invasiva. Para realizar o TCTH no tratamento de neoplasias hematológicas, são utilizadas altas doses de quimioterapia, a fim de destruir a capacidade da medula óssea do paciente em produzir células cancerígenas. Conseqüentemente, essa terapia pode impedir a formação de novas células-tronco hematopoiéticas, comprometendo o sistema imunológico e promovendo uma resposta ineficiente frente aos conídios de *Aspergillus fumigatus* inalados (VANDEVEERDONK *et al.*, 2017).

Nesse estudo, pretendíamos identificar os indivíduos com o risco elevado de desenvolver a aspergilose invasiva, antes mesmo da sua instalação e mostrar que estudos dos polimorfismos dos genes que codificam os TLR4, poderiam levar à aplicação de metodologias e técnicas moleculares em serviços de saúde, capazes de reduzir o elevado custo e a toxicidade do tratamento da aspergilose invasiva, identificando de maneira precoce a patologia, entretanto, esta hipótese não foi confirmada.

Uma das limitações deste estudo é o fato de que as alterações genéticas no gene TLR4, geralmente, agem em conjunto com outras alterações genéticas ou fatores adquiridos, e assim, influenciam a resposta fisiológica ao lipopolissacarídeo inalado (ARBOUR *et al.*, 2000), o que incita estudos com maior número de polimorfismos e genes investigados.

Os indivíduos inseridos nos grupos caso-controles pertenciam à região centro-oeste. Essa é uma região com forte variação etnográfica e influenciada pelas demais regiões do Brasil (sul, sudeste, norte e nordeste), que apresentam na população interações de origens africanas e europeias em seu processo histórico de formação (IBGE, 2017). Esse processo de miscigenação pode desencadear diversos efeitos mutagênicos nos indivíduos, e que podem ser transmitidos/herdados pelas gerações seguintes, influenciando na interpretação sobre como o SNP rs4986791 pode agir frente as respostas do sistema imune inato aos estímulos microbianos. A característica racial evidencia a diversidade genética na população, fator que interfere na formação de cada indivíduo (THOMPSON, 2016).

Mesmo os indivíduos do grupo controle não tendo história clínica de aspergilose invasiva, faziam o uso de medicamentos (54%) e relataram o diagnóstico de diferentes doenças crônicas (35%), tais como: diabetes mellitus, anemia falciforme, depressão e outras. Esse contexto clínico e patológico do grupo controle pode favorecer o imunocomprometimento nos indivíduos envolvidos, de modo que, os nossos achados podem, de certa forma, ser influenciados por essas doenças.

Além disso, os indivíduos imunologicamente comprometidos selecionados no grupo caso fizeram o uso de drogas antifúngicas (Fluconazol, Voriconazol, Anfotericina B e outros) em seu tratamento profilático (86,4% dos indivíduos inseridos no grupo caso), fator que pode interferir na quantidade de infecções por AI, uma vez que, esses fármacos agem especialmente na parede celular do fungo, fornecendo resultados significativos no combate à infecção fúngica (JR. *et al.*, 2005).

Portanto, enfatizamos a necessidade de novos estudos com maior número de indivíduos envolvidos e recomendamos, a investigação da associação do haplótipo S4 em indivíduos imunodeprimidos da população brasileira com diagnóstico de aspergilose invasiva, a fim de verificar a ação da resposta imunológica mediada por TLR4 frente aos diferentes patógenos, em especial, frente à aspergilose invasiva.

## VII - CONCLUSÕES

Esse estudo avaliou a frequência do polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) de TLR4 em pacientes imunodeprimidos com aspergilose invasiva e controles da região centro-oeste do Brasil. Com relação ao polimorfismo Thr399Ile (rs4986791), a frequência do alelo selvagem C foi de 97,7% nos casos e 96,5% nos controles, enquanto a frequência do alelo mutante T foi de 2,3% nos casos e 3,5% nos controles. Diferenças significativas nas frequências dos alelos selvagem C e mutante T não foram detectadas entre os grupos de casos e controles. Contudo, neste estudo o polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) do gene TLR4 não esteve associado à aspergilose invasiva em pacientes imunodeprimidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKI, K.; OKUBO, Y.; NANJO, H.; et al. Genomic analysis of single nucleotide polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in Japanese patients with invasive aspergillosis. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 68, n. 4, p. 330–332, 2015.

ALAZAWI, W.; PIRMADJID, N.; LAHIRI, R.; BHATTACHARYA, S. Inflammatory and immune responses to surgery and their clinical impact. **Annals of Surgery**, v. 264, n. 1, p. 73–80, 2016.

ALVAREZ, A. E.; AUGUSTO, F.; MARSON, L.; et al. Association between single nucleotide polymorphisms in TLR4, TLR2, TLR9, VDR, NOS2 and CCL5 genes with acute viral bronchiolitis. **Gene**, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.022>>. .

ARBOUR, N. C.; LORENZ, E.; SCHUTTE, B. C.; et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nature Genetics**, v. 25, n. 2, p. 187–191, 2000.

ASCIIOGLU, S.; REX, J. H.; PAUW, B. DE; et al. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 1, p. 7–14, 2002.

BANZI, R.; CUSI, C.; RANDAZZO, C.; et al. Galactomannan detection in broncho-alveolar lavage fluid for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. **Cochane Database of Systematic Reviews**, , n. 10, p. 1–53, 2019.

BATISTA, M. V. **Aspergilose invasiva em pacientes imunodeprimidos: comparação entre as provas de galactomanana, 1, 3 $\beta$  D-glucana, dados tomográficos e desfecho clínico.**, 2015. São Paulo: Universidade de São Paulo.

BILLOD, J. M.; LACETERA, A.; GUZMÁN-CALDENTEY, J.; MARTÍN-SANTAMARÍA, S. Computational Approaches to Toll-Like Receptor 4 Modulation. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1–24, 2016.

BOCHUD, P.-Y.; CHIEN, J. W.; MARR, K. A.; et al. Toll-like Receptor 4 Polymorphisms and Aspergillosis in Stem-Cell Transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 359,

n. 17, p. 1766–1777, 2008.

BOER, M. G. J. DE; JOLINK, H.; HALKES, C. J. M.; et al. Influence of polymorphisms in innate immunity genes on susceptibility to invasive aspergillosis after stem cell transplantation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. 2–7, 2011.

CARVALHO, A.; CUNHA, C.; CAROTTI, A.; et al. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and susceptibility to infections in allogeneic stem cell transplantation. **Experimental Hematology**, v. 37, n. 9, p. 1022–1029, 2009. ISEH - Society for Hematology and Stem Cells. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2009.06.004>>. .

CARVALHO, A.; PASQUALOTTO, A. C.; PITZURRA, L.; et al. Polymorphisms in Toll-Like Receptor Genes and Susceptibility to Pulmonary Aspergillosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 4, p. 618–621, 2008.

CARVALHO, L. I. C. **Aspergillus e aspergilose - desafios no combate da doença** Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, 2013. Universidade Fernando Pessoa.

COCHET, F.; PERI, F. The role of carbohydrates in the lipopolysaccharide (LPS)/toll-like receptor 4 (TLR4) Signalling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.

CRUVINEL, W. DE M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; et al. ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434–61, 2010.

CRUZ-MACHADO, S. DA S. Lipopolissacarídeo (lps): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição nfkb. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40–43, 2010.

CUNHA, C.; RODRIGUES, F.; ZELANTE, T.; et al. Genetic susceptibility to aspergillosis in allogeneic stem-cell transplantation. **Medical Mycology**, v. 49, n. SUPPL. 1, p. 137–143, 2011.

CUNHA, D. DE O. **Avaliação epidemiológica de pacientes submetidos ao teste de Galactomanana sérica com suspeita de Aspergilose Invasiva**, 2017. Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

CUNHA, D. DE O.; LEÃO-CORDEIRO, J. A. B.; PAULA, H. DA S. C. DE; et al.

Association between polymorphisms in the genes encoding toll-like receptors and dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis: A systematic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 6, p. 725–730, 2018.

CZERKIES, M.; KWIATKOWSKA, K.; PŁYTYCZ, B. Toll-like receptors and their contribution to innate immunity: Focus on TLR4 activation by lipopolysaccharide. **Advances in Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–23, 2014.

ELSHABRAWY, H. A.; ESSANI, A. E.; SZEKANECZ, Z.; FOX, D. A.; SHAHRARA, S. TLRs, future potential therapeutic targets for RA. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 2, p. 103–113, 2017. Elsevier B.V. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2016.12.003>>. .

FALLAVENA, P. R. V.; JESUS BORGES, T. DE; PASKULIN, D. D.; et al. The Synergy of -260T T CD14 and -308GG TNF- $\alpha$  Genotypes in Survival of Critically Ill Patients. **Human Immunology**, v. 77, n. 1, p. 62–68, 2012.

FERRAZ, E. G.; SILVEIRA, B. B. DE B. DA; SARMENTO, V. A.; SANTOS, J. N. DOS. Receptores Toll-Like : ativação e regulação da resposta imune Toll-Like Receptors : regulation of the immune responses. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 59, n. 3, p. 483–490, 2011.

FERREIRA, A. B.; ASSUNÇÃO, C. B.; SILVEIRA, T. T. S.; et al. Diagnosis of invasive aspergillosis: Application of Polymerase Chain Reaction Techniques (PCR) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Galactomannan (EIA-GM<sup>®</sup>). **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 25, n. 3, p. 393–399, 2015. Disponível em:  
<<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/2238-3182.20150076>>. .

FERWERDA, B.; MCCALL, M. B. B.; VERHEIJEN, K.; et al. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 5-6, p. 346–352, 2008.

FRAZÃO, J. B.; ERRANTE, P. R.; CONDINO-NETO, A. Toll-like receptors' pathway disturbances are associated with increased susceptibility to infections in humans. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 61, n. 6, p. 427–443, 2013.

GARTH, J. M.; STEELE, C. Innate Lung Defense during Invasive Aspergillosis: New

Mechanisms. **Journal of Innate Immunity**, v. 9, n. 3, p. 271–280, 2017.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L. C.; et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145–150, 2016.

GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 6, p. 392–404, 2014. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3671>>. .

GIRMENIA, C.; NUCCI, M.; MARTINO, P. Clinical significance of *Aspergillus* fungaemia in patients with haematological malignancies and invasive aspergillosis. **British Journal of Haematology**, v. 114, n. 1, p. 93–98, 2001.

GONÇALVES, S. S.; SOUZA, A. C. R.; CHOWDHARY, A.; MEIS, J. F.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. **Mycoses**, v. 59, n. 4, p. 198–219, 2016.

GRUBE, M.; LOEFFLER, J.; MEZGER, M.; et al. TLR5 stop codon polymorphism is associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. **Medical Mycology**, v. 51, n. 8, p. 818–825, 2013.

HARTMANN, T.; SASSE, C.; SCHEDLER, A.; et al. Shaping the fungal adaptome - Stress responses of *Aspergillus fumigatus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 5, p. 408–416, 2011. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.008>>. .

HEDHILI, S.; BACCOUCHI, N.; SOUID, H.; JEMLI, B. Comparison of real-time PCR , nested PCR , and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay in sera for diagnosis of invasive aspergillosis. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 714, p. 7, 2017. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.07.005>>. .

HOPE, W. W.; MCENTEE, L.; LIVERMORE, J.; et al. crossm Pharmacodynamics of the Orotomides against *Aspergillus fumigatus* : New Opportunities for Treatment of Multidrug-Resistant Fungal Disease. , v. 8, n. 4, p. 1–17, 2017.

HUSE, M. Mechanical forces in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n.



11, p. 679–690, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri.2017.74>>. .

IBGE. Estimativas da população residente no Brasil e unidades da federação. , 2017.

JABER, B. L.; PEREIRA, B. J. G.; BONVENTRE, J. V.; BALAKRISHNAN, V. S. Polymorphism of host response genes: Implications in the pathogenesis and treatment of acute renal failure. **Kidney International**, v. 67, n. 1, p. 14–33, 2005.

JIANG, S.; LI, X.; HESS, N. J.; GUAN, Y.; TAPPING, R. I. TLR10 is a Negative Regulator of Both MyD88-Dependent and Independent TLR Signaling. **J Immunol**, v. 196, n. 9, p. 3834–3841, 2016.

JIAO, Y.; ZHAO, J.; HU, B.; et al. Toll-like receptor 4 gene is associated with recurrent spontaneous miscarriage in Uygur and Han women in Xinjiang. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, n. 5, p. 3268–3274, 2016.

JR., I. D. DOS S.; SOUZA, I. A. M.; BORGES, R. G.; et al. Características gerais da ação , do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, n. 3, p. 189–197, 2005.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ni.1863>>. .

KESH, S.; MENSAH, N. Y.; PETERLONGO, P.; et al. TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1062, p. 95–103, 2005.

KOCSUBÉ, S.; PERRONE, G.; MAGISTÀ, D.; et al. Aspergillus is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. **Studies in Mycology**, v. 85, p. 199–213, 2016.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3399>>. .

KOLDEHOFF, M.; BEELEN, D. W.; ELMAAGACLI, A. H. Increased susceptibility for aspergillosis and post-transplant immune deficiency in patients with gene variants of TLR4

after stem cell transplantation. **Transplant Infectious Disease**, v. 15, n. 5, p. 533–539, 2013.

KOSMIDIS, C.; DENNING, D. W. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis.

**Postgraduate Medical Journal**, v. 91, n. 1077, p. 403–410, 2015.

KUTIKHIN, A. G. Impact of Toll-like receptor 4 polymorphisms on risk of cancer. **HIM**, v. 72, n. 2, p. 193–206, 2011. Elsevier Inc. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2010.11.003>>. .

KWOK, P.-Y.; CHEN, X. Detection of Single Nucleotide Polymorphisms 43 Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. **Curr. Issues Mol. Biol**, v. 5, p. 43–60, 2003.

KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. Aspergillus fumigatus-What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1–4, 2013.

LATGE, J. P. Aspergillus fumigatus and aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 310–+, 1999. Disponível em: <<Go to ISI>://000079712600008>. .

LIMA, J. M. DE; SERAFIM, P. V. P.; SILVA, I. D. C. G. DA; FORONES, N. M. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 43, n. 1, p. 8–13, 2006.

LIMA-NETO, L. G.; HIRATA, R. D.; LUCHESSI, A. D.; et al. Detection of the TLR4 1196C>T polymorphism by mismatched-polymerase chain reaction using plasmid DNA as internal control in restriction fragment length polymorphism assays. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 13, n. 3, p. 343–7, 2009.

LIMA-NETO, L.; LUCHESSI, D.; NOGUEIRA, V.; et al. CD14 and IL6 polymorphisms are associated with a pro-atherogenic profile in young adults with acute myocardial infarction. **Thromb Thrombolysis**, 2012.

MCCLEAN, C. M.; TOBIN, D. M. Macrophage form, function, and phenotype in mycobacterial infection: Lessons from tuberculosis and other diseases. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 7, p. 1–15, 2016.

MEDVEDEV, A. E. Toll-Like Receptor Polymorphisms, Inflammatory and Infectious Diseases, Allergies, and Cancer. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 33, n. 9, p. 467–484, 2013. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jir.2012.0140>>.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JR, C. A. J. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. July, p. 6–9, 1997.

NORDE, M. M.; SC, M.; OKI, E.; et al. Influence of Toll–Like Receptor 4 Gene Variants and Plasma Fatty Acid Profile on Systemic Inflammation - A Population-Based Cross-Sectional Study. **Nutrition**, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2016.11.004>>. .

OHTO, U.; YAMAKAWA, N.; AKASHI-TAKAMURA, S.; MIYAKE, K.; SHIMIZU, T. Structural analyses of human toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40611–40617, 2012.

OLIVEIRA, J. G. DE; ROSSI, A. F. T.; NIZATO, D. M.; MIYASAKI, K.; SILVA, A. E. Profiles of gene polymorphisms in cytokines and toll-like receptors with higher risk for gastric cancer. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 4, p. 978–988, 2013.

OLIVEIRA, J. G.; SILVA, A. E. Polymorphisms of the TLR2 and TLR4 genes are associated with risk of gastric cancer in a Brazilian population. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 11, p. 1235–1242, 2012.

OMIM. \* 603030 toll-like receptor 4; tlr4. **OMIM Entry**, v. 1, n. 189906, p. 1–14, 2019.

PAMER, E. G. TLR Polymorphisms and the Risk of Invasive Fungal Infections. **NIH Public Access**, v. 185, n. 2, p. 974–981, 2008.

PAULUSSEN, C.; HALLSWORTH, J. E.; ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 296–322, 2017.

PEIXINHO, P.; SABINO, T.; DUARTE, C.; CRUZ, T.; BRAGANÇA, N. Aspergilose pulmonar invasiva. **Acta Médica Portuguesa**, , n. 16, p. 97–99, 2003.

PERKINS, D. J.; PATEL, M. C.; BLANCO, J. C. G.; VOGEL, S. N. Epigenetic Mechanisms Governing Innate Inflammatory Responses. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v.

36, n. 7, p. 454–461, 2016. Disponível em:  
<<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/jir.2016.0003>>. .

PILANIYA, V.; GERA, K.; GOTHIL, R.; SHAH, A. Aspergilose pulmonar invasiva aguda, logo após exposição ocupacional a água poluída barrenta, em indivíduo previamente saudável  
Endereço para correspondência. **J Bras Pneumol**, v. 41, n. 5, p. 473–477, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132015000000108>>. .

PIRES-NETO, O. D. S.; SÁ, K. S. G. DE; SANTANA, B. B.; et al. Lack of association between polymorphisms of the TLR4 gene and infection with the hepatitis b and c viruses. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

PROENÇA, M. A.; OLIVEIRA, J. G. DE; CADAMURO, A. C. T.; et al. TLR2 and TLR4 polymorphisms influence mRNA and protein expression in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 25, p. 7730–7741, 2015.

RIBEIRO, M. P. D. **Epidemiologia de Infecções Fúngicas Invasivas em Receptores de Transplante de Células Tronco Hematopóéticas e em Pacientes com Leucemia Mielóide Aguda ou Mielodisplasia - Resultado de um Estudo Multicêntrico Brasileiro - Epidemiologia de Infecções Fúngica**, 2011. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ROCK, F. L.; HARDIMAN, G.; TIMANS, J. C.; KASTELEIN, R. A.; BAZAN, J. F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 2, p. 588–593, 1998. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.95.2.588>>. .

ROSADINI, C. V.; KAGAN, J. C. Early innate immune responses to bacterial LPS. **Current Opinion in Immunology**, v. 44, p. 14–19, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2016.10.005>>. .

ROY, A.; SRIVASTAVA, M.; SAQIB, U.; et al. Potential therapeutic targets for inflammation in toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v. 40, p. 79–89, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.08.026>>. .

SALES, P. U. Charp 5 - Aspergillosis: from diagnosis to treatment\*. **Continuing Education Course - Mycoses**, v. 35, n. August, p. 1238–1244, 2009.

SANTOS, A. R. DE O. **Aspergilose em pacientes submetidos a transplantes**. 2011.

SATLIN, M. J.; SOAVE, R.; SHORE, T. B.; et al. Epidemiology and outcomes of invasive fungal infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients in the era of antifungal prophylaxis: a single-centre study with focus on emerging pathogens. **Mycoses**, v. 58, p. 325–336, 2015.

SEGAL, B. H. Aspergillosis. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 18, p. 1870–1884, 2013. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0808853>>. .

SEROY, J.; ANTIPOSTA, P.; GRIM, S. A.; et al. *Aspergillus calidoustus* case series and review of the literature. , p. 0–1, 2017.

SILLING, G.; FEGELER, W.; ROOS, N.; ESSINK, M.; BÜCHNER, T. Early empiric antifungal therapy of infections in neutropenic patients comparing fluconazole with amphotericin B/flucytosine. **Mycoses, Supplement**, v. 42, n. 2, p. 101–104, 1999.

SKEVAKI, C.; PARARAS, M. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. **Immunology in the clinic review series**, v. 180, p. 165–177, 2015.

TAGHAVI, M.; KHOSRAVI, A.; MORTAZ, E.; NIKAEIN, D.; ATHARI, S. S. Role of pathogen-associated molecular patterns (PAMPS) in immune responses to fungal infections. **European Journal of Pharmacology**, v. 808, n. November 2015, p. 8–13, 2017. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.11.013>>. .

THOMPSON. **Diversidade Genética Humana : Mutação e Polimorfismo**. 2016.

TOLENTINO, Y. F. M.; ELIA, P. P.; FOGAÇA, H. S.; et al. Common NOD2/CARD15 and TLR4 Polymorphisms Are Associated with Crohn's Disease Phenotypes in Southeastern Brazilians. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 9, p. 2636–2647, 2016.

VANDERVELDEN, W. J. J. M.; BLIJLEVENS, N. M. A.; DONNELLY, P. Genetic variants and the risk for invasive mould disease in immunocompromised hematology patients. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 554–563, 2011.

VANDEVEERDONK, F. L.; GRESNIGT, M. S.; ROMANI, L.; NETEA, M. G.; LATGÉ, J.-P. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. **Nature Reviews**

**Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 661–674, 2017.

VIEIRA-SOUSA, E.; EUSÉBIO, M.; ÁVILA-RIBEIRO, P.; et al. Real-World Long-Term Effectiveness of Tumor Necrosis Factor Inhibitors in Psoriatic Arthritis Patients from the Rheumatic Diseases Portuguese Register. **The Journal of Rheumatology**, p. jrheum.181272, 2019.

VIJAY, K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. **International Immunopharmacology**, v. 59, n. February, p. 391–412, 2018.

WU, T. T.; TAI, Y. T.; CHERNG, Y. G.; et al. GATA-2 Transduces LPS-Induced il-1 $\beta$  Gene Expression in Macrophages via a Toll-Like Receptor 4/MD88/MAPK-Dependent Mechanism. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–10, 2013.

ZAHARIEVA, E. T.; KAMENOV, Z. A.; SAVOV, A. S. TLR4 polymorphisms seem not to be associated with prediabetes and type 2 diabetes but predispose to diabetic retinopathy; TLR4 polymorphisms in glucose continuum. **Endocrine Regulations**, v. 51, n. 3, p. 137–144, 2017.

## **ANEXOS**

## Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE  
AO CÂNCER EM GOIÁS -



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Participante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Associação entre polimorfismos de base única (SNP) dos genes que codificam os receptores celulares Dectina-1 e TLR5 e suscetibilidade à aspergilose invasiva

**Pesquisador:** Antonio Márcio Cordeiro

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 45376215.D.3001.0031

**Instituição Proponente:** Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC/Goiás

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.314.078

#### **Apresentação do Projeto:**

Projeto já analisado e aprovado anteriormente. O documento atual é para inserção de dois pesquisadores ao projeto previamente aprovado. O coordenador da pesquisa justifica a entrada de mais dois pesquisadores colaboradores para o projeto.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Já explicitados anteriormente.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Já comentados no parecer de aprovação do projeto pelos comitês de ética envolvidos.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não se aplica.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não se aplica.

#### **Recomendações:**

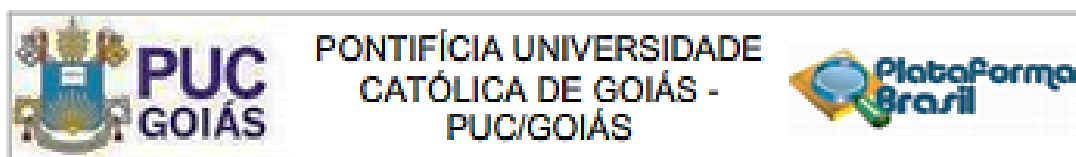
Nenhuma no momento.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Os pesquisadores devem estar atendo ao envio de relatórios parciais e finais da pesquisa.

Endereço: 239  
Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO CEP: 74.605-070  
UF: GO Município: GOIÂNIA  
Telefone: (62)3243-7050 Fax: (62)3243-7050 E-mail: cepcep@accop.org.br

## Anexo 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Associação entre polimorfismos de base única (SNP) dos genes que codificam os receptores celulares Dectina-1 e TLR5 e susceptibilidade à aspergilose invasiva

**Pesquisador:** Antonio Márcio Cordelro

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 45376215.0.0000.0037

**Instituição Proponente:** Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC/Goiás

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.128.820

**Data da Relatoria:** 24/06/2015

#### **Apresentação do Projeto:**

Trata-se de resposta a pendência.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Trata-se de resposta a pendência.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Trata-se de resposta a pendência.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de resposta a pendência.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Trata-se de resposta a pendência.

#### **Recomendações:**

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências foram sanadas.

Projeto de pesquisa aprovado.

#### **Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Av. Universitária, N.º 1.088

**Bairro:** Setor Universitário

**CEP:** 74.202-010

**UF:** GO

**Município:** GOIÂNIA

**Telefone:** (62)3046-1512

**Fax:** (62)3046-1070

**E-mail:** cep@pucgoias.edu.br





PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DE GOIÁS -  
PUC/GOIÁS



Continuação do Parecer: 1.128.828

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

A aprovação deste, conferida pelo CEP, não isenta o Pesquisador de prestar satisfação sobre sua Pesquisa em casos de alteração de amostra ou centros de coparticipação. O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/PUC Goiás, via Plataforma Brasil, relatórios semestrais do andamento do protocolo aprovado, quando do encerramento, as conclusões e publicações.

O CEP PUC Goiás poderá realizar escolhas aleatórias de protocolos de pesquisa aprovados para verificar o cumprimento da Resolução CNS 466/12 e complementares.

GOIANIA, 29 de Junho de 2015

---

**Assinado por:**  
**NELSON JORGE DA SILVA JR.**  
**(Coordenador)**

Endereço: Av. Universitária, N.º 1.058  
Bairro: Setor Universitário CEP: 74.805-010  
UF: GO Município: GOIANIA  
Telefone: (62)3248-1512 Fax: (62)3248-1070 E-mail: cep@pucgoias.edu.br

### Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), em uma pesquisa. Esse consentimento, caso você aceite, não será exclusivo para esta pesquisa, podendo existir a possibilidade de extensão da sua amostra para outros projetos. Após todas as informações esclarecidas, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine este documento ao final, que está em duas vias (uma do pesquisador e a outra sua). Em caso de você não aceitar participar, não há qualquer penalização. Com relação as dúvidas sobre seus direitos você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, localizado na Av. Universitária, Nº 1069, Setor Universitário, Goiânia-Goiás, pelo telefone (062) 39461512 de 8:00 às 17:00 hs ou pelo e-mail: cep@puccgoias.edu.br.

**Título: "Associação de polimorfismos de base única (SNP) nos genes que codificam os receptores celulares Dectina-1 e TLR5 e susceptibilidade à aspergilose invasiva".**

Os pesquisadores responsáveis são o Dr. Antônio Márcio Teodoro Cordeiro Silva, a Dra. Hellen S. Cintra de Paula e a Biomédica Dalane de Oliveira Cunha, que, em caso de dúvidas podem ser contatados pelos telefones (062) 8123-0110, (062) 9688-6875 e (062) 8247-9275.

Sobre a pesquisa:

- O objetivo da pesquisa é desenvolver um estudo que descreva as principais formas de adquirir uma infecção chamada de Aspergilose Invasiva. Também vamos analisar a relação de alterações genéticas (DNA) com a doença.

- Caso você aceite participar da pesquisa, deverá assinar o Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE) e doar uma amostra de sangue. Será coletada uma amostra de até 5 ml do seu sangue. A amostra será transferida para o Laboratório de Oncogenética – ACCG, sob responsabilidade dos pesquisadores.

- A coleta não oferece nenhum risco ou interfere em seu tratamento, mas poderá oferecer um pequeno desconforto. Caso você apresente algum problema médico durante ou após a coleta, o pesquisador lhe prestará assistência total, encaminhando-o para acompanhamento médico com a equipe do setor de hematologia do hospital Araújo Jorge.

- Depois da coleta, serão realizados exames no seu sangue para verificar se existem alterações genéticas no DNA que faça com que você pegue a infecção com mais facilidade do que outras pessoas que não têm a alteração no DNA. Após o período de 5 anos previsto para conclusão do projeto, o material biológico coletado (sangue) será descartado, conforme as normas vigentes de órgão técnicos competentes, mantendo em sigilo a identidade dos sujeitos da pesquisa.

- Seu acompanhamento e tratamento não serão alterados em nada devido ao estudo; Os resultados deste estudo poderão nos ajudar a obter mais conhecimentos genéticos sobre a origem da Aspergilose Invasiva;

- Seus dados pessoais (como nome) serão mantidos em sigilo, sem exposição pública, sendo o(a) senhor(a) identificado apenas por um número;

- Este estudo não acarretará nenhuma despesa ou remuneração financeira para você, mas os achados do estudo possibilitarão o desenvolvimento de medidas de prevenção e tratamento mais eficaz da infecção pelo fungo

*Aspergillus*. Contudo, caso haja alguma despesa gerada por sua participação na pesquisa, será garantido seu ressarcimento integral.

\*O seu consentimento pode ser retirado a qualquer hora sem prejuízo para seu tratamento ou acompanhamento.

Local e data: \_\_\_\_\_

Nome e assinatura do Pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

#### CONSENTIMENTO DO PARTICIPANTE

Eu, \_\_\_\_\_,

RG \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, prontuário \_\_\_\_\_, abaixo assinado, discuti com o pesquisador \_\_\_\_\_ sobre minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e não receberei nenhuma remuneração ao aceitar participar. Concordo voluntariamente em participar da pesquisa "Associação de polimorfismos de base única (SNP) nos genes que codificam os receptores celulares Dectina-1 e TLR5 e susceptibilidade à aspergilose invasiva", descrita acima, como sujeito. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência ou tratamento.

Aceito que meu sangue seja usado em Pesquisas futuras sem necessidade de novo consentimento.

Não aceito que meu sangue seja usado em Pesquisas futuras sem necessidade de novo consentimento.

Goânia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura da participante da pesquisa ou do responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

**Testemunhas (Não ligadas a equipe de pesquisadores):**

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

