FLÁVIA MENDES DA CUNHA HOLANDA

Estudo da associação entre paracoccidioidomicose e os polimorfismos dos genes *IL12B* (posição 3' UTR +1188 A/C), *IL12RB1* (posição 11014 A/G no éxon 7) e *IFNG* (posição + 874 T/A)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Programa: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Maria Aparecida Shikanai Yasuda

**SÃO PAULO
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Holanda, Flávia Mendes da Cunha

Estudo da associação entre paracoccidiodomicose e os polimorfismos dos genes *IL12B* (posição 3' UTR +1188 A/C), *IL12RB1* (posição 11014 A/G no éxon 7) e *IFNG* (posição + 874 T/A) / Flávia Mendes da Cunha Holanda. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Maria Aparecida Shikanai Yasuda.

Descritores: 1.Paracoccidiodomicose 2.Citocinas 3.Polimorfismo de nucleotídeo único 4.Interferon gama 5.Receptores de interleucina-12

USP/FM/DBD-432/15

À Deus, pois sem Ele nada seria possível.

À minha mãe Celi, pelo carinho, amor, pela luta por me educar e criar, por acreditar e me ajudar em todos os meus sonhos e por sempre estar ao meu lado.

Ao meu esposo Mateus, por me fornecer seu ombro principalmente nos momentos difíceis, pela amizade, pelo companheirismo, por me apoiar nos meus sonhos e nas minhas decisões, pelo seu senso de humor, pelo grande amor, carinho e pela paciência e pela imensa felicidade que me traz.

À minha irmã Jéssica, por todo carinho, compreensão e amizade.

Aos meus avós Eunice e Vicente, pelo amor, afeto e ajuda incondicionais durante toda minha vida.

Aos pacientes, que tão gentilmente aceitaram participar deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. **Maria Aparecida Shikanai Yasuda**, pela oportunidade de aprendizado, sugestões inteligentes, competência e paciência.

Aos meus amigos **Felipe Delatorre Busser** e **Paula Keiko Sato** (componentes do grupo “Pb, é nós!”), que me proporcionaram momentos muito agradáveis, pela nossa amizade e pelo auxílio na execução deste trabalho, principalmente a Paula, que sempre se mostrou disponível nas minhas dúvidas e em me escutar, pelos conselhos muito sábios quando estava quase enlouquecendo e também por ser minha “co-orientadora”.

À **Vera Lúcia Teixeira Freitas** pelo auxílio científico, em algumas análises estatísticas, na padronização das técnicas e pela disponibilidade.

À **Célia Regina Furuchó**, pela realização das técnicas de CIE e auxílio em algumas análises estatísticas, bem como pela amizade que formamos, por sempre tentar fazer enxergar outro lado de certas situações, pelos conselhos, por estar disposta a me escutar.

À **Márcia Andrea Ferreira**, por me auxiliar na captação de indivíduos do grupo controle, e me acalmar nas horas tensas.

À **Constancia Lima Diogo Lorente**, por me auxiliar na técnica de ELISA, e me acalmar nas horas tensas.

Aos companheiros de laboratório do **LIM-48**: Caroline Medeji R. de Oliveira, Claudia de A. Fonseca Contardi, Daiane Tomomi Ferreira, Daniel Valério da S. Moreira, Dra. Marta Heloisa Lopes, Érika Y. Shimoda Nakanishi, Jamille R. de Oliveira, Marcello M. C. Magri, Marjorie V. Batista, Sheila S. V. da

Silva Moraes e Vivian Caso Coelho por me ajudarem nas dificuldades do dia-a-dia, pelo companheirismo e por fazerem o cotidiano muito agradável e feliz.

Às minhas famílias **Mendes da Cunha** e **Carvalho**, pelo amor, carinho, por sempre me incentivar e por todo apoio depositado em mim.

À Dra. **Márcia Yoshida** pelas informações de alguns pacientes.

À Dra. **Aya Sadahiro** pelas informações de alguns pacientes e também por ter extraído o DNA de alguns indivíduos do grupo controle e de pacientes.

Aos médicos: Dra. **Adriana Kono** e Dr. **Gil Benard**, às enfermeiras e demais funcionários do Ambulatório de Micoses Sistêmicas da Divisão de Moléstias Infecciosas - HCFMUSP.

À **Roseli**, secretária do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, pela sua paciência e por sempre estar disposta a me ajudar.

À Dra. **Maria Luiza Moretti**, ao Dr. **Paulo Ricardo Criado** e ao responsável pelo setor da Enfermaria da Otorrinolaringologia do HCFMUSP por me auxiliar a complementar o número de pacientes.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro do projeto.

“Sem Deus, o universo não é
explicável satisfatoriamente.”

(Albert Einstein)

Este estudo foi realizado com apoio financeiro da Fundação de apoio à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2012/25192-7), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação Faculdade de Medicina.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. – São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação - DBD/FMUSP, 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. CASUÍSTICA, MATERIAIS & MÉTODOS	15
3.1 Casuística e Critérios de inclusão	16
3.2 Critérios de exclusão	17
3.3 Características das amostras	17
3.4 Material Biológico e extração de DNA pelo método de precipitação por sal	21
3.5 SNP na posição +874 T/A do gene <i>IFNG</i>	22
3.6 SNP na posição +1188 A/C da região 3'UTR do gene <i>IL12B</i>	24
3.7 Identificação do polimorfismo no gene <i>IL12RB1</i>	24
3.8 Preparo do CFA ("Cell-Free Antigen") de <i>P. brasiliensis</i>	25
3.9 Cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)	26
3.10 ELISA ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay") para detecção de IL-12p40 em sobrenadantes de cultura	27
3.11 Detecção de IFN- γ e IL-12p70 pelo ensaio CBA ("Cytometric Bead Array")	29
3.12 Análises estatísticas	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Estudo do SNP na posição +874 T/A do gene <i>IFNG</i>	33
4.1.1 PCR-ARMS	33

4.1.2	Frequência genotípica do SNP na posição +874 T/A do gene <i>IFNG</i>	36
4.1.3	Frequência alélica do SNP na posição +874 T/A do gene <i>IFNG</i>	38
4.2	Estudo do SNP na posição +1188 A/C na região 3'UTR do gene <i>IL12B</i>	40
4.2.1	PCR-RFLP	40
4.2.2	Frequência genotípica do SNP na posição +1188 A/C da região 3'UTR do gene <i>IL12B</i>	42
4.2.3	Frequência alélica do SNP na posição +1188 A/C da região 3'UTR do gene <i>IL12B</i>	43
4.3	Estudo do SNP na posição 11014 A/G no éxon 7 do gene <i>IL12RB1</i>	45
4.3.1	PCR-RFLP	45
4.3.2	Frequência genotípica do SNP na posição 11014 A/G no éxon 7 do gene <i>IL12RB1</i>	47
4.3.3	Frequência alélica do SNP na posição 11014 A/G no éxon 7 do gene <i>IL12RB1</i>	49
4.4	Frequências dos genótipos e alelos dos SNPs dos genes <i>IFNG</i> , <i>IL12B</i> e <i>IL12RB1</i> segundo sexo	51
4.5	Frequências dos genótipos e alelos dos SNPs dos genes <i>IFNG</i> , <i>IL12B</i> e <i>IL12RB1</i> segundo etnia	54
4.6	Estudo da cinética de IFN- γ , IL-12p40 e IL-12p70 em sobrenadantes de cultura de PBMCs	59
4.7	Relação dos SNPs <i>IFNG</i> , <i>IL12B</i> e <i>IL12RB1</i> e a secreção das citocinas de IFN- γ , IL-12p40 e IL-12p70 em sobrenadantes de cultura de PBMCs	63
4.7.1	SNPs <i>IFNG</i> , <i>IL12B</i> e <i>IL12RB1</i> a secreção das citocinas de IFN- γ , IL-12p40 e IL-12p70: relação com as formas clínicas	63
4.7.2	SNPs <i>IFNG</i> , <i>IL12B</i> e <i>IL12RB1</i> a secreção das citocinas de IFN- γ , IL-12p40 e IL-12p70: relação com as fases da doença curada-tratada e ativa	64
4.7.2.1	SNP <i>IFNG</i> e secreção de citocina	64
4.7.2.2	SNP <i>IL12B</i> e secreção de citocina	68
4.7.2.3	SNP <i>IL12RB</i> e secreção de citocina	71
5.	DISCUSSÃO	75
6.	CONCLUSÕES	89
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ARMS	Sistema de amplificação mutacional refratária ("Amplification Refractory Mutational System")
CBA	("Cytometric Bead Array")
CIE	Contraímunoeletroforese
CFA	Antígeno Livre de Células ("Cell-Free Antigen")
CO	Grupo controle de indivíduos sadios
CN	Controle negativo, ensaio de CBA
CT	Grupo de pacientes com paracoccidioidomicose curada/tratada
CTAB	Brometo de cetil trimetilamônio ("Cetyl trimethylammonium bromide")
DA	Grupo de pacientes com paracoccidioidomicose ativa
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)
DTAB	Brometo de dodecil amônio trimetilo ("Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide")
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra acético ("Ethylenediaminetetraacetic Acid")
ELISA	Ensaio imunoenzimático ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay")
gp43	Glicoproteína de 43 kDa de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
HGH	Gene do Hormônio do Crescimento Humano ("Human Growth Hormone")
IFN- γ	Interferon gama
IFNG	Gene de IFN- γ
IL	Interleucina
IL-12p40	Subunidade p40 da interleucina-12
IL-12p35	Subunidade p35 da interleucina-12
IL-12p70	IL-12 biologicamente ativa, junção das subunidades p40 e p35
IL-12R	receptor da IL-12

IL-12R β 1	subunidade β 1 do receptor de IL-12
IL-12R β 2	subunidade β 2 do receptor de IL-12
<i>IL12B</i>	Gene da subunidade p40 da IL-12
<i>IL12RB1</i>	Gene da subunidade β 1 do receptor de IL-12
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico ("Peripheral Blood Mononuclear Cells")
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ("Polymerase Chain Reaction")
PE	Ficoeritrina ("Phycoeritrin")
PHA	Fitoehemaglutinina ("Phytoheamagglutinin")
<i>n</i>	Número
<i>N</i>	Número de alelos
ND	Não-detectável, níveis de citocinas abaixo do limite da curva-padrão
RFLP	Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição ("Restriction Fragment Length Polymorphism")
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo ("Single nucleotide polymorphism")
RD	Reagente-diluyente
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida ("Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis")
Teste χ^2	Teste de Qui-quadrado
Teste χ^2 LR	Teste de Qui-quadrado de Razão de Verossimilhança
UTR	Região não-transcrita ("Untranslated region")

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
<i>g</i>	Giros-aceleração
M	Molar
mL	Mililitro
μL	Microlitro
pM	Picomolar
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
pb	Pares de base
pg	Pictogramas
kDa	Quilo-Dalton
U/tubo	Unidades por tubo

LISTA DE TABELAS

1 - Distribuição das amostras* de DNA (n= 277) segundo os grupos controle (n= 121) e pacientes (n=156) e as diferentes formas clínicas da paracoccidiodomicose	18
2 - Distribuição dos pacientes com paracoccidiodomicose e controles segundo o sexo	19
3 - Distribuição dos pacientes com paracoccidiodomicose (n= 156) e controles (n= 121) segundo a idade	19
4 - Distribuição dos pacientes com paracoccidiodomicose e controles segundo a faixa etária nos ensaios ELISA e CBA.	20
5 - Distribuição dos pacientes com paracoccidiodomicose e controles segundo a etnia	20
6 - Distribuição dos pacientes com formas clínicas da paracoccidiodomicose segundo a etnia	21
7 - Distribuição genotípica das frequências do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A em indivíduos controles e pacientes com paracoccidiodomicose	36
8 - Distribuição genotípica das frequências do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A entre pacientes com a forma crônica e aguda da paracoccidiodomicose	36
9 - Distribuição genotípica das frequências do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A em pacientes com a forma multifocal e a unifocal da paracoccidiodomicose crônica	37
10 - Distribuição alélica das frequências do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A em indivíduos controles (n= 121) e pacientes com paracoccidiodomicose (n= 156)	38
11 - Distribuição alélica das frequências do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A em pacientes com a forma crônica (n= 116) e aguda (n= 40) da paracoccidiodomicose	39
12 - Distribuição alélica das frequências do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A em pacientes com a forma multifocal (n= 99) e a forma unifocal (n= 17) da paracoccidiodomicose crônica	39
13 - Distribuição genotípica das frequências do SNP <i>IL12B</i> +1188 A/C na região 3'UTR entre indivíduos controles e pacientes com paracoccidiodomicose	42
14 - Distribuição genotípica das frequências do SNP <i>IL12B</i> +1188 A/C na região 3'UTR segundo as formas clínicas crônica e aguda da paracoccidiodomicose	42

- 15 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12B*+1188 A/C na região 3'UTR em pacientes com a forma multifocal e unifocal da paracoccidiodomicose crônica 43
- 16 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IL12B* +1188 A/C na região 3'UTR em indivíduos controles (n= 121) e pacientes com paracoccidiodomicose (n= 156) 43
- 17 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IL12B* +1188 A/C na região 3'UTR em pacientes com paracoccidiodomicose, segundo as formas clínicas crônica (n= 116) e aguda (n= 40) 44
- 18 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IL12B* +1188 A/C na região 3'UTR em pacientes com a forma multifocal (n= 99) e unifocal (n= 17) da paracoccidiodomicose crônica 44
- 19 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 em indivíduos controles e pacientes com paracoccidiodomicose 47
- 20 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 segundo as formas clínicas da paracoccidiodomicose (crônica e aguda) 47
- 21 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 segundo a forma crônica da paracoccidiodomicose (multifocal e unifocal) 48
- 22 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 em indivíduos controles (n= 121) e pacientes com paracoccidiodomicose (n= 156) 49
- 23 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 em pacientes das formas clínicas crônica (n= 116) e aguda (n= 40) da paracoccidiodomicose 49
- 24 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 em pacientes com a forma multifocal (n= 99) e unifocal (n= 17) da paracoccidiodomicose crônica 50
- 25 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IFNG* +874 T/A segundo o sexo 51
- 26 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12B*+1188 A/C na região 3'UTR segundo o sexo 52
- 27 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12RB* 11014 A/G no éxon 7 segundo o sexo 52
- 28 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12RB* 11014 A/G no éxon 7 em pacientes do sexo masculino com a forma crônica multifocal e unifocal 53
- 29 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12RB* 11014 A/G no éxon 7 em pacientes com paracoccidiodomicose crônica unifocal segundo o sexo 53

30 - Distribuição genotípica das frequências do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A segundo etnia (n= 171): amarela, branca e negra/mulata	54
31 - Distribuição alélica das frequências do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A segundo etnia (N= 342): amarela, branca e negra/mulata/parda	55
32 - Distribuição genotípica das frequências do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A dos pacientes segundo etnia (n= 84): amarela, branca e negra/mulata/parda no grupo de pacientes com paracoccidiodomicose	56
33 - Distribuição alélica das frequências do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A segundo etnia (N= 168): amarela (n= 3), branca (n= 48) e negra/mulata/parda (n= 33) em pacientes com paracoccidiodomicose	56
34 - Distribuição genotípica das frequências do SNP <i>IL12B</i> +1188 A/C na região 3'UTR segundo etnia (n= 171): amarela, branca e negra/mulata/parda	57
35 - Distribuição genotípica das frequências do SNP <i>IL12RB1</i> 11014 A/G no éxon 7 segundo etnia (n= 171): amarela, branca e negra/mulata/parda	57
36 - Distribuição alélica das frequências do SNP <i>IL12RB1</i> 11014 A/G no éxon 7 segundo etnia (N= 342): amarela, branca e negra/mulata/parda	58
37 - Distribuição alélica das frequências SNP <i>IL12RB1</i> 11014 A/G no éxon 7 segundo etnia (n= 84): amarela, branca e negra/mulata/parda em pacientes com paracoccidiodomicose	58
38 - Secreção de IFN- γ de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os genótipos do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT	64
39 - Secreção de IFN- γ de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os alelos do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT	65
40 - Secreção de IL-12p40 e p70 de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os alelos do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT	66
41 - Secreção de IFN- γ de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo CFA de acordo com os alelos do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT	67
42 - Secreção de IL-12p40 de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os genótipos do SNP <i>IL12B</i> +1188 A/C, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT	68
43 - Secreção de IL-12p40 de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os alelos do SNP <i>IL12B</i> +1188 A/C, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT	69

-
44 -	Secreção de IFN- γ e IL-12p70 de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os alelos do SNP <i>IL12B</i> , nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT	70
45 -	Secreção de IFN- γ , IL-12p70 e p40 de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os alelos do SNP <i>IL12RB1</i> , nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT	72
46 -	Sumário dos resultados estatisticamente significantes dos SNPs <i>IFNG</i> , <i>IL12B</i> e <i>IL12RB1</i> nos grupos estudados	73
47 -	Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças entre os alelos dos diferentes SNPs nos grupos controle (CO) e de pacientes CT e DA, segundo a secreção das citocinas IFN- γ , IL-12p70 e p40 de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA	74

LISTA DE FIGURAS

1. Padronização da PCR IFNG +874 T/A, gel de agarose 2 %. 34
2. Genótipos resultantes da PCR IFNG +874 T/A com a enzima *GoTaq DNA polymerase*, gel de agarose 2 %. 35
3. PCR 3'UTR *IL12B* +1188 A/C, gel de agarose 2 %. 40
4. Reação de enzima *TaqI* (Fermentas Life Sciences) do produto da PCR 3'UTR *IL12B* +1188 A/C, gel de agarose 3 %. 41
5. PCR *IL12RB1* posição 11014 A/G no éxon 7, gel de agarose 2 %. 45
6. Reação de enzima *PvuII* (Fermentas Life Sciences) do produto PCR *IL12RB1* posição 11014 A/G no éxon 7, gel de agarose 3 %. 46
7. Cinética de IFN- γ , realizada pela técnica de CBA, em sobrenadantes de PBMCs de indivíduos dos grupos controle (CO) ($n= 5$) e de pacientes (DA= 8 e CT= 6) sem estímulo e com estímulo (PHA e CFA) nos períodos de 24, 48, 72 e 144h. 60
8. Cinética dos níveis de IL-12p40, analisada por ELISA, em sobrenadantes de cultura de PBMCs de indivíduos dos grupos controle (CO; $n= 18$) e de pacientes (DA= 11 e CT= 9), sem estímulo e com estímulo (PHA e CFA) nos períodos de 24, 48, 72 e 144h. 61
9. Cinética dos níveis de IL-12p70, analisada por técnica de CBA, em sobrenadantes de cultura de PBMCs de indivíduos dos grupos controle (CO; $n= 5$) e de pacientes (DA= 8 e CT= 6), sem estímulo e com estímulo (PHA e CFA) nos períodos de 24, 48, 72 e 144h. 62

Estudo da associação entre paracoccidioidomicose e os polimorfismos dos genes *IL12B* (posição 3' UTR +1188 A/C), *IL12RB1* (posição 11014 A/G no éxon 7) e *IFNG* (posição + 874 T/A)

Introdução. A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica crônica, endêmica na América Latina, principalmente Brasil, sendo a oitava causa de morte entre as doenças infecciosas crônicas recorrentes. A PCM infecção é caracterizada por uma resposta Th1, a forma aguda por um perfil misto da resposta Th2/Th9, enquanto na forma crônica caracteriza-se pelo perfil Th17/Th22. A ocorrência e gravidade da PCM humana podem também estar associadas a fatores genéticos como os polimorfismos dos genes de citocinas.

Objetivos. 1. Descrever a frequência dos polimorfismos de (SNPs) *IFNG* +874 T/A, *IL12B* 3' UTR +1188 A/C e *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 em pacientes e controles; 2. Investigar a associação entre esses polimorfismos e as diferentes formas clínicas da micose; 3. Verificar se há associação entre esses polimorfismos e a secreção das citocinas IFN- γ , IL-12p40 e IL-12p70. **Materiais**

e Métodos. 143 pacientes com PCM foram incluídos (40 com a forma aguda, 100 com a forma crônica multifocal e 17 unifocal). Critérios de inclusão: ter doença ativa (DA) comprovada por exame micológico ou histopatológico positivo ou presença de anticorpos anti-*Paracoccidioides brasiliensis* ($\geq 1/32$ por contraímunoeletroforese) ou ter doença curada/tratada (CT) quando comprovada anteriormente pelos critérios de DA e atualmente com títulos de anticorpos estáveis e ≤ 4 em dois períodos com intervalo ≥ 6 meses. Analisaram-se os SNPs *IFNG* pela técnica de PCR-ARMS ("Polymerase Chain Reaction - Amplification Refractory Mutational System"), *IL12B* e *IL12RB1* por RFLP ("PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism"). Para a dosagem de citocinas foram utilizadas as técnicas de ELISA (n=29) e CBA ("Cytometric Bead Array"; n= 18), sendo considerados estatisticamente significantes, os valores de $p < 0,05$ para os testes de χ^2 e o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. **Resultados.** O genótipo AA do SNP *IL12RB1* foi mais frequente na forma crônica multifocal e o genótipo AG, na forma unifocal masculina ($p = 0,048$). À análise desta forma clínica entre ambos os sexos, o genótipo AG foi também mais frequente no sexo masculino ($p = 0,009$). Segundo a etnia, foi demonstrada diferença estatisticamente significativa nas frequências dos genótipos e alelos dos SNPs *IFNG* e *IL12RB1* ($p < 0,05$). Em relação às formas clínicas da PCM, houve similaridade nas frequências dos genótipos e alelos dos SNPs estudados. Quanto aos níveis das citocinas, para os SNPs *IFNG*, *IL12B* e *IL12RB1*, maiores níveis de secreção de citocinas, frente a PHA, foram registrados nos grupos CT e CO em relação ao DA, sugerindo relação com a evolução da doença e com a imunossupressão já descrita na doença ativa. **Conclusão.** Não houve associação entre os SNPs *IFNG*, *IL12B* e *IL12RB1* e as diferentes formas da doença quando todos os pacientes foram analisados; no sexo masculino, sugere-se que o genótipo AA esteja associado à doença crônica mais disseminada (*IL12RB1*). Houve diferença significativa entre as etnias nos SNPs *IFNG* e *IL12RB1*, sugerindo-se a ampliação do número de pacientes em determinadas etnias e na forma clínica unifocal para melhor compreensão dessas associações.

Descritores: paracoccidioidomicose; citocinas; polimorfismo de nucleotídeo único; interferon gama; interleucina-12; receptor de interleucina-12.

Study of the association between paracoccidioidomycosis and single nucleotide polymorphisms on genes *IL12B* (3' UTR +1188 A/C), *IL12RB1* (11014 A/G on exon 7) and *IFNG* (+ 874 T/A)

Introduction. Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic chronic mycosis, endemic in Latin America, mainly in Brazil where it is the eighth cause of death among chronic recurrent infectious diseases. PCM infection is characterized by the Th1 immune response, the acute form, by a mixed Th2/Th9 profile, while the chronic form is characterized by Th17/Th22 profile. The occurrence and severity of human PCM can also be associated with genetic factors such as polymorphisms on genes of cytokines. **Objectives.** 1. To describe the frequencies of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) *IFNG* +874 T/A, *IL12B* 3'UTR +1188 A/C and *IL12RB1* 11014 A/G on exon 7, on patients with PCM and non-PCM controls; 2. To investigate the association between those SNPs and the different clinical forms of PCM. 3. To verify the possible association between those SNPs and the secretion of the cytokines IFN- γ , IL-12p40 and IL-12p70. **Materials and Methods.** 143 patients with PCM were included (40 with acute form, 100 with multifocal chronic form and 17 unifocal). Inclusion criteria: active disease (DA) proved by fungal identification on direct microscopy/histopathology or culture, or presence of antibodies anti-*Paracoccidioides brasiliensis* ($\geq 1/32$ by counterimmunoelectrophoresis) or cured/treated disease (CT) when previously proved by criteria of DA and present stable antibodies titles ≤ 4 in two periods with ≥ 6 months in between. The SNP *IFNG* was analyzed by PCR-ARMS (Polymerase Chain Reaction - Amplification Refractory Mutational System) and the SNPs *IL12B* and *IL12RB1* by PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism). The levels of cytokines were detected by ELISA (n= 29) and CBA (Cytometric Bead Array; n= 18) and values of $p < 0.05$ for χ^2 test and Kruskal-Wallis' test, with Dunn's post-test were considered statistically significant. **Results.** The AA genotype of SNP *IL12RB1* was the most frequent in the multifocal chronic form while the AG was more frequent in men with the unifocal chronic form of PCM ($p = 0.048$). On this clinical form in the comparison between genres, the AG genotype was also more frequent in men ($p = 0.009$). On ethnicity, it was demonstrated statistical difference between the frequencies of genotypes and alleles of SNPs *IFNG* and *IL12RB1* ($p < 0.05$). In the comparison between the clinical forms of PCM, the frequencies of genotypes and alleles of the evaluated SNPs were similar. On the levels of cytokines, for SNPs *IFNG*, *IL12B* and *IL12RB1*, increased levels of cytokines were observed with PHA on the CT and CO groups compared with DA, suggesting a connection with the evolution of the disease and the previously described immunosuppression during active disease. **Conclusion.** There was no association between the SNPs *IFNG*, *IL12B* and *IL12RB1* and the different forms of PCM when all patients were analyzed; among men, it is suggested that the AA genotype of *IL12RB1* is associated with a more disseminated chronic disease. There was a significant difference between the ethnicities on SNPs *IFNG* and *IL12RB1*, being the latter also associated with the chronic form in men. The increase in the number of patients in certain ethnic groups and in the unifocal clinical form of PCM might help the better understanding of these associations. Descriptors: paracoccidioidomycosis; cytokines; single nucleotide polymorphism; interferon-gamma; interleukin-12; interleukin-12 receptor.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM), descrita por Adolfo Lutz em 1908, é uma doença granulomatosa sistêmica crônica, endêmica na América do Sul. Ocorre principalmente no Brasil, com aproximadamente 80 % de todos os casos registrados, seguindo-se Colômbia e Venezuela (Brummer et al, 1993; Shikanai-Yasuda et al, 2006).

Fora da região endêmica, já foram diagnosticados cerca de cem casos, principalmente na Europa, que tem recebido um grande número de imigrantes da América Latina. Entre 2010 e 2012, foram 8 casos registrados fora da área endêmica, sendo que todos esses pacientes viveram nessa região até 14 anos antes do aparecimento dos primeiros sintomas (Restrepo et al, 2012).

Não são conhecidos dados confiáveis sobre a incidência no Brasil por não ser doença de notificação compulsória. Estima-se que em zonas endêmicas ocorram cerca de 3-4 novos casos/milhão até 1 a 3 novos casos por 100 mil habitantes ao ano (Shikanai-Yasuda et al, 2006).

A incidência da PCM é heterogênea nas regiões endêmicas do país, ocorre mais frequentemente nos estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Wanke & Londero, 1994). No período de 1955 a 1964 em São Paulo, houve registros de cerca de 139,6 casos por ano, enquanto em Belo Horizonte foram relatados 8,8 casos por ano, no período de 1968 a 1979 (Wanke & Londero, 1994). Em Ribeirão Preto (São Paulo), Belissimo-Rodrigues et al (2012) relataram 1219 casos de PCM tratada no período de 1970 a 2009, sendo 73,6 % dos pacientes com a forma crônica.

Paralelamente, foram registrados 2 163 casos de PCM em Rondônia, de janeiro de 1997 até dezembro 2012, com alta incidência anual principalmente em 14 de 52 municípios. A capital Porto Velho teve baixa incidência comparada aos demais municípios (Vieira et al, 2014). Em contrapartida, os casos de PCM forma aguda tem diminuído nos últimos anos, no Mato Grosso do Sul (Fabris et al, 2014).

Esta micose foi responsável por 6 732 admissões em hospitais do Brasil, entre 1998 a 2005, sendo a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva, entre as doenças infecciosas e parasitárias (Coutinho et al, 2002; Coutinho et al, 2015). Entre as micoses sistêmicas, é a que apresenta maior taxa de mortalidade (Prado et al, 2009).

Kalmar et al (2004), a fim de verificar a prevalência de PCM em uma população pediátrica (entre 7-18 anos, mediana 11,48 anos) do estado de Mato Grosso, estudaram a reatividade cruzada entre os antígenos paracoccidioidina e glicoproteína de 43 kDa (gp43), majoritário no agente etiológico *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), e histoplasmina de *Histoplasma capsulatum* (agente etiológico da histoplasmose). Nas crianças em idade escolar com histoplasmina positiva, foi observada prevalência de 44 % de reatividade positiva para paracoccidioidina, enquanto apenas 6% de positividade para gp43. Esses dados sugerem que o uso da gp43 é mais adequado para estimar a prevalência da infecção por prévia exposição à *P. brasiliensis*.

A PCM tem como agente etiológico os fungos do gênero *Paracoccidioides* sp, que compreende *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), um complexo de três grupos filogenéticos (S1, PS2 e PS3), e uma nova espécie *Paracoccidioides lutzii* (Matute et al, 2006; Teixeira et al, 2009). *P. brasiliensis*

tem como condições favoráveis para seu crescimento, ambientes com temperatura moderada, umidade relativamente alta e presença de uma rica vegetação, porém, seu habitat ainda é desconhecido (Restrepo et al, 1985). Nessas condições, o fungo se apresenta na forma de hifas e conídios (forma infectante), e estes, ao serem inalados, vão para os alvéolos pulmonares, onde dão origem às formas leveduriformes (forma parasitária). Constitui-se então o complexo primário, com consequente disseminação linfohematogênea do fungo para outros locais do organismo (Franco et al, 1987).

O contágio está relacionado às atividades profissionais rurais e agrícolas (terraplanagem, transportes de produtos vegetais, entre outras), e a paracoccidioidomicose também tem sido observada em pacientes sob imunossupressão relacionada à infecção por HIV ou à quimioterapia por neoplasia ou transplante de órgão. A maioria dos indivíduos imunocompetentes expostos a essas atividades provavelmente adquiriu a infecção nas duas primeiras décadas de vida, enquanto que as manifestações clínicas ocorreram entre a terceira e quinta década de vida (Wanke & Londero, 1994; Marques & Shikanai-Yasuda, 1994).

As apresentações clínicas desta micose podem ser classificadas conforme proposto por um grupo de trabalho no *International Colloquium on Paracoccidioidomycosis*, realizado em fevereiro de 1986 em Medellín, Colômbia, que correlaciona os dados clínicos e a história natural da doença: paracoccidioidomicose infecção, e paracoccidioidomicose doença, classificada em formas aguda e crônica, e sequelar (Franco et al, 1987). A forma aguda/subaguda (também chamada juvenil) afeta jovens de ambos os sexos e acomete principalmente o sistema fagocítico mononuclear, por meio da

disseminação linfohematogênica. A forma crônica (também chamada adulta), classificada em unifocal ou multifocal, é mais prevalente em adultos do sexo masculino (razão de 10 a 15 homens para 1 mulher) e após a reativação de lesões quiescentes por muitos anos, acometendo principalmente pulmões, mucosas e pele. A forma crônica unifocal é restrita a somente um órgão, sendo os pulmões os únicos afetados em 25% dos casos, enquanto que a forma crônica multifocal envolve mais de um órgão simultaneamente como pulmões, mucosas e pele (Shikanai-Yasuda et al, 2006).

Os resultados clínicos e a progressão da doença podem estar relacionados ao tipo de resposta imune do indivíduo frente ao fungo. Células “natural killer” (NK), monócitos e macrófagos exercem um papel essencial na defesa do hospedeiro, desencadeando uma reação inflamatória e atividade fungicida mediada por citocinas (Longhi et al, 2012; Nakaira-Takahagi et al, 2011).

Em um modelo experimental, Kashino et al (2000) mostraram que, em camundongos isogênicos resistentes A/Sn e susceptíveis B10.A, a proteção anti-*P. brasiliensis* está diretamente relacionada aos altos níveis de IFN- γ e IL-2 e à produção de anticorpos IgG2a (Th1 - resposta T “helper” 1), enquanto que a susceptibilidade está ligada à produção de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , eosinofilia e secreção preferencial de IgG2b e IgA (Th2 - resposta T “helper” 2). Este estudo foi realizado por resposta proliferativa induzida frente um antígeno de preparo rápido e simples, obtido do sobrenadante de cultura de células leveduriformes de *P. brasiliensis* cepa 339 em meio líquido (Camargo et al, 1991).

Este antígeno solúvel e livre de células (CFA – “Cell-Free Antigen”) contém componentes de 18 a 102 kDa, incluindo a gp43, que foram reconhecidos por

soros de pacientes com anticorpos IgG, IgM, e IgA nas formas aguda e crônica da PCM em reações de Imunodifusão e Immunoblot (Blotta & Camargo, 1993).

Na PCM humana, Benard et al (1996) observaram que a fase ativa da PCM apresenta uma supressão da imunidade celular, que é restaurada após o tratamento. Adicionalmente, tem-se observado na forma crônica em fase ativa, baixa produção de IFN- γ na presença de antígeno bruto de *P. brasiliensis*, quando comparados aos pacientes com cura clínica (Karhawi et al, 2000).

Em relação às formas clínicas, a gp43 induziu baixos níveis de IFN- γ e IL-2 e alta produção de IL-10 por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com as formas aguda e crônica da PCM, enquanto as células de indivíduos sadios infectados com *P. brasiliensis* produziram altos níveis de IFN- γ e IL-2 (Benard et al, 2001).

Oliveira et al (2002) estudaram a linfoproliferação frente aos antígenos de *P. brasiliensis* em pacientes com a forma crônica e aguda, comparativamente aos indivíduos infectados e controles sadio. Registraram na PCM infecção uma polarização para resposta imunológica Th1, com produção de IFN- γ e níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10. Todavia em pacientes da forma aguda o tipo de resposta imunológica foi Th2, com baixa secreção de IFN- γ e altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10. Assim, o perfil de infecção era compatível com alta resistência enquanto o perfil da forma aguda com baixa resistência. A forma crônica foi caracterizada por uma resposta intermediária entre Th1 e Th2.

Em recente trabalho de Castro et al (2013), mostrou-se que novas subpopulações de células T podem estar envolvidas na resposta imune da PCM. Indivíduos infectados apresentam uma resposta Th1 predominante corroborando com os estudos anteriores. A forma aguda é caracterizada por uma resposta

mista Th2/Th9 (semelhante Th2), enquanto a crônica associada por um perfil Th17/Th22 (resposta inflamatória), com participação substancial de células Th1.

A diferenciação para resposta do tipo Th1, que se mostra protetora na paracoccidiodomicose, é resultante da atividade da IL-12, secretada principalmente fagócitos mononucleares e células dendríticas, e recentemente, foi observada esta secreção também por neutrófilos de indivíduos sadios frente ao fungo *P. brasiliensis* (Balderramas et al, 2014). Esta citocina induz a produção de IFN- γ pelas células T e NK (Abbas & Lichtman, 2005).

A IL-12 ativa, chamada IL-12p70, consiste de um heterodímero com duas subunidades ligadas por dissulfeto: 35 kDa (p35) e 40 kDa (p40), sendo esta última também encontrada na IL-23 (Oppmann et al, 2000; Abbas & Lichtman, 2005). Tais subunidades são codificadas por diferentes genes: *IL12A* (p35) e *IL12B* (p40), localizados nos cromossomos 3p12-3q13.2 e 5q31-33, respectivamente (Sieburth et al, 1992).

Um estudo realizado por Sato et al (2011) demonstrou que a IL-12p40 é mais secretada por células dendríticas derivadas de monócitos do sangue periférico de pacientes com PCM após o tratamento ou cura clínica, quando comparadas às com doença ativa e de controles sadios.

Paralelamente, foi visto que em PBMCs de pacientes com a doença ativa secretam significativamente menos IL-12p70 frente a gp43 que indivíduos infectados com *P. brasiliensis* (Romano et al, 2002). Em um estudo com camundongos susceptíveis, foi observado altos níveis da citocina combinada à inflamação exacerbada nos pulmões na fase inicial da infecção por *P. brasiliensis* (Calich & Kashino, 1998).

Segundo Decken et al (1998), camundongos IL12p40^{-/-} infectados com *Cryptococcus neoformans* morrem antes e tem maior carga fúngica que os animais IL-12p35^{-/-}, sugerindo um papel protetor da subunidade IL-12p40 independente do heterodímero de IL-12, enfatizando a contribuição desta citocina para uma resposta Th1 protetora anti-*C. neoformans*. Da mesma forma, em paracoccidioidomicose, camundongos IL-12p40^{-/-} apresentaram uma infecção disseminada e maior número de granulomas, com menor produção de IFN-γ e altos níveis de IL-10, sugerindo que a subunidade p40 de IL-12 medeia a resistência nesta doença pela indução de IFN-γ e uma resposta tipo Th1 (Livonesi et al, 2008).

Em um estudo experimental realizado por Arruda et al (2002), foi observado que o tratamento com IL-12 recombinante, em camundongos susceptíveis à infecção pulmonar, não afeta o crescimento do fungo, porém induz o aumento da inflamação por células mononucleares pulmonares e aumento de IFN-γ na primeira semana de infecção. A administração de IL-12 torna a infecção menos grave, mas há uma resposta inflamatória exacerbada que impede seu uso.

A presença de um polimorfismo com troca de um único nucleotídeo (SNP – “Single Nucleotide Polymorphism”) A → C na região de 3’ UTR A/C do gene *IL12B* parece interferir na secreção de IL-12 (Seegers et al, 2002; Stanilova & Miteva, 2005; Yilmaz et al, 2005).

Estudos indicam que um SNP na posição +1188 A/C na região 3’ UTR de *IL12B* (rs3212227) foi significativamente associado à susceptibilidade em várias doenças, tais como anemia grave da malária (Ong’echa et al, 2011); tuberculose (Morris et al, 2011); hanseníase virchowiana (Alvarado-Navarro et al, 2008); cardiopatia chagásica (Zafra et al, 2007); asma (Chen et al, 2011); e com a

desensibilização em transplantados de órgãos sólidos (Lobashevsky et al, 2009), além de estar associado com resistência na hepatite C (Hegazy et al, 2008), infecção crônica pelo vírus da hepatite B (He et al, 2014); hepatite B (Saxena et al, 2014), e resultados clínicos desfavoráveis na infecção por hepatite viral C (Houldsworth et al, 2005).

A atividade biológica da IL-12 é mediada pela ligação de alta afinidade ao receptor desta citocina (IL-12R), expresso em células T e NK ativadas, e constituído de duas subunidades: $\beta 1$ (100 kDa), codificada pelo gene *IL12RB1* no cromossomo 19p13.1, e $\beta 2$ (130 kDa), codificada pelo gene *IL12RB2* no cromossomo 1p31.2 (Presky et al, 1996; Tabone & Morahan, 2003). A subunidade $\beta 1$ também faz parte do complexo do receptor de outra citocina, a IL-23 (Oppmann et al, 2000).

Na PCM humana, Romano et al (2005) relataram que a indução de gp43 em PBMCs leva à diminuição da expressão de IL-12R $\beta 2$ em pacientes com a forma aguda e crônica ativas em comparação aos indivíduos com cura clínica e infectados. Além disso, observou-se que uma alta porcentagem de células T expressavam o IL-12R $\beta 1$, tanto em pacientes com PCM ativa como os indivíduos curados e sensibilizados.

A deficiência do IL-12R $\beta 1$ foi associada a uma forma mais disseminada (aguda) da paracoccidioidomicose, e descrita pela primeira vez por Moraes-Vasconcelos et al (2005), sendo associada também à: doença disseminada por *Mycobacterium tuberculosis*; infecção mais disseminada por BCG; micobacteriose e salmonelose, bem como à coccidioidomicose. (Friesch & Casanova, 2003; Schepers et al, 2013; Senanayake et al, 2015; Vinh et al, 2011). Fica evidente,

portanto, a importância do eixo IL-12/IL-23-IFN- γ e seus receptores no controle das doenças infecciosas, e principalmente, nas micoses sistêmicas.

A presença de um SNP responsável pela troca de arginina por triptofano na posição 701 C>T do gene de *IL12RB1* leva à deficiência deste receptor segundo Sakai et al, 2001. O estudo do polimorfismo do mesmo gene no exon 7 - rs11575934 foi associado à susceptibilidade em tuberculose pulmonar tanto por Akahoshi et al (2003), que observaram a troca de A/G, com substituição de glutamina por arginina, com presença do genótipo GG bem como por Kusuhara et al (2007), com a presença do haplótipo 641G/684T/1094C/1132C. Susceptibilidade à malária causada por *Plasmodium vivax* foi também relatada na população brasileira com o haplótipo -1094A/-641C do mesmo gene (Sortica et al, 2012).

Os polimorfismos de IL-12 e de seu receptor podem interferir na ação desta citocina, e consequentemente, interferir na secreção de IFN- γ , que é uma citocina-chave na imunoregulação das respostas imunes inata e adaptativa.

O IFN- γ pode conferir resistência à infecção por *P. brasiliensis* tanto em camundongos (Kashino et al, 2000; Arruda et al, 2002; Souto et al, 2000) como em humanos (Benard et al, 2001; Karhawi et al, 2000). É secretado por células T CD4⁺, células NK, células B e células apresentadoras de antígeno, tais como monócitos, células dendríticas e macrófagos, mas mais significativamente por células T CD8⁺, e também é um importante indutor de quimiocinas por macrófagos (Mamoni et al, 2006). Recentemente, foi também relatada a secreção por neutrófilos de indivíduos sadios desafiados com *P. brasiliensis* (Rodrigues et al, 2014).

Anjos et al (2002) demonstraram que a fração de polissacarídeo da parede celular de *P. brasiliensis* na forma miceliana (fração F1) induziu monócitos humanos a liberarem relativamente altos níveis de TNF- α que, em combinação com IFN- γ , é responsável pela ativação de monócitos humanos para a efetiva morte do fungo.

O gene de IFN- γ , *IFNG*, situa-se no cromossomo 12q15 (Vandenbroeck & Goris, 2006). Um SNP no intron 1 desse gene, localizado numa região de microsatélite CA₍₁₂₎, foi associado à maior produção dessa citocina (Pravica et al, 1999).

A posição +874 (T/A) do SNP de *IFNG* é o sítio em que começa a tradução de IFN- γ e a troca do nucleotídeo T por A coincide com a possível ligação do NF κ B, um fator de transcrição importante no aumento da produção da citocina (Pravica et al, 2000).

Estudando esta mesma posição, Visentainer et al (2008) observaram que as distribuições genotípica e alélica do gene *IFNG* foram relativamente conservadas entre as populações brasileira (Regiões Sul e Sudeste), italiana, afro-americana e branco-americana.

O alelo T desse SNP tem sido associado à resistência em algumas doenças, tais como doença de Chagas (Torres et al, 2010); tuberculose pulmonar e extrapulmonar (Ding et al, 2008; Amim et al, 2008; Vallinoto et al, 2010); infecção persistente pelo vírus da hepatite B em um estudo de meta-análise (Tang et al, 2014); malária grave em região não endêmica (Kanchan et al, 2015); hanseníase por Cardoso et al (2010), bem como Silva et al (2014) que também observaram associação do alelo T com proteção, num estudo de meta-análise nesta doença. Em contrapartida, em um estudo com tailandeses

baseado em uma análise multivariada, esse alelo e a idade foram fatores independentes relacionados significativamente com cirrose (Dai et al, 2006).

O alelo A tem sido relacionado à susceptibilidade na tuberculose pulmonar, no desenvolvimento de tuberculose pulmonar ativa e extrapulmonar (Shen et al, 2013; Selma et al 2011; Hashemi et al, 2011); tuberculose genital feminina em mulheres inférteis (Bhanothu et al, 2015); infecção cervical por *Chlamydia trachomatis* em mulheres (Eleutério Júnior et al, 2014); bem como ao teste positivo de tuberculina em Xavantes brasileiros (Zembrzuski et al, 2010).

Na PCM, foram estudados poucos SNPs de citocinas. Primeiramente, em 2006, Bozzi et al analisaram os polimorfismos de IL-10 e TNF- α , os quais não foram associados à PCM. Este mesmo grupo, em 2009, observou que o alelo T do SNP no gene de IL-4 (-590 C/T) apresenta relação significativa com esta micose, enquanto que a presença do alelo C nos pacientes, em um ensaio de linfoproliferação frente à antígenos de *P. brasiliensis*, foi relacionada à produção duas vezes maior de IL-4 em comparação ao alelo T do mesmo grupo, e os pacientes independente do alelo secreta mais IL-4 que os indivíduos sadios. Além disso, investigaram o SNP *IFNG* +874 T/A em um número reduzido de pacientes do sexo masculino com paracoccidiodomicose e não observaram associação com essa micose, não sendo estudado as formas clínicas da PCM.

Considerando o papel do IFN- γ na resistência, da deficiência de IL-12p40 na susceptibilidade à paracoccidiodomicose experimental e a relevância do receptor IL-12R β 1 na evolução dessa micose em humanos, o presente trabalho propõe-se a investigar a possível associação entre os polimorfismos nos genes *IL12B*, *IL12RB1* e *IFNG* e a doença.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a possível associação entre as formas clínicas paracoccidioidomicose e os diferentes polimorfismos de um nucleotídeo nos genes de *IL12B*, *IL12RB1* e *IFNG*.

2.2 Objetivos específicos

a) Descrever a frequência do polimorfismo de *IFNG*+874 T/A, *IL12B* 3' UTR +1188 A/C e de *IL12RB1* 11014 A/G em pacientes com paracoccidioidomicose e grupo controle;

b) Investigar a associação entre os polimorfismos de *IL12B* 3' UTR +1188 A/C, *IL12RB1* 11014 A/G e *IFNG* +874 T/A e as diferentes formas clínicas da paracoccidioidomicose;

c) Verificar se há relação entre os polimorfismos dos genes *IL12B*, *IL12RB1* e *IFNG*, e os níveis das citocinas IL-12p40, IL-12p70 e IFN- γ .

CASUÍSTICA, MATERIAIS & MÉTODOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS & MÉTODOS

3.1 Casuística e Critérios de Inclusão

Foram selecionados 125 pacientes com paracoccidioidomicose na Enfermaria Geral e Ambulatório de Micoses Sistêmicas da Divisão de Moléstias Infecciosas, um da Divisão de Clínica Médica do Hospital das Clínicas, quatro pacientes no Ambulatório de Micopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica, um na Enfermaria da Otorrinolaringologia, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e 26 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

O diagnóstico foi realizado no momento da inclusão ou anteriormente por identificação de *P. brasiliensis* em exame micológico direto e/ou cultura e/ou histopatológico e/ou presença de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* por reação de imunodifusão dupla (Ouchterlony) ou reação de contraímunoeletroforese (CIE; títulos ≥ 32), características de doença ativa (DA). Os pacientes foram considerados curados/tratados (CT) se a doença tivesse sido comprovada no passado pelos mesmos critérios do grupo DA, tendo sido incluídos nesse grupo quando os títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* fossem estáveis e CIE ≤ 4 em dois períodos diferentes com intervalo de pelo menos de 6 meses.

As diferentes formas clínicas da paracoccidioidomicose foram classificadas segundo os critérios definidos em Medellín, 1986 (Franco et al, 1987) em: forma aguda ($n= 40$); forma crônica unifocal ($n= 17$); e forma crônica multifocal ($n= 99$).

Os pacientes da forma unifocal incluídos neste trabalho tiveram como característica a localização da doença principalmente no trato respiratório superior (laringe e traqueia), bem como no trato digestório.

Além disso, foi incluído um grupo controle constituído de 121 (cento e vinte e um) indivíduos considerados sadios, sem história prévia da doença e/ou ausência de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* (reação de imunodifusão).

Salienta-se que, de acordo com a resolução nº. 196/96 do Ministério da Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos, foi preenchido o consentimento informado, tanto no grupo de pacientes como no de controles, respeitando-se o sigilo sobre a identidade do indivíduo (CAPPesq 10273/13).

3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com comorbidades tais como tuberculose, neoplasias e outras doenças infecciosas sistêmicas agudas e crônicas (histoplasmose, aspergilose e leishmaniose).

3.3 Características das amostras

Foram incluídos 277 indivíduos (uma amostra por indivíduo), sendo 121 correspondentes aos controles e 156 aos pacientes com paracoccidiodomicose (**Tabela 1**).

No grupo de pacientes a maioria apresentava a forma crônica, e desta destaca-se a forma multifocal (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Distribuição das amostras* de DNA (n=277) segundo os grupos controle (n=121) e pacientes (n=156) e as diferentes formas clínicas da paracoccidioidomicose

Grupos		n	%
Controles		121	43,69
Pacientes		156	56,3
Formas clínicas	Aguda	40	25,64
	Crônica	116	74,36
	Multifocal	99	85,34
	Unifocal	17	14,66
Total		277	100

*1 amostra por paciente

As amostras foram extraídas e armazenadas a -20 °C. No grupo de pacientes, 61 amostras foram extraídas no primeiro período (2002, 2003 e 2006) e 95 no segundo período (2010 – 2015); no grupo controle, 61 amostras foram extraídas no primeiro período e 60 no segundo.

A viabilidade de todas as amostras de DNA foi verificada pela presença da banda de 408 pb do gene do hormônio de crescimento humano na PCR-ARMS para SNP +874T/A do gene *IFNG* (**Figura 1**).

Em relação ao sexo, a população estudada foi predominantemente masculina (n=225; 81,2 %), tanto em controles como em pacientes (**Tabela 2**), e não foi observada diferença estatisticamente significativa (Teste de χ^2 , $p= 0,308$) mostrando homogeneidade entre os grupos quanto a esta variável.

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes com paracoccidioidomicose e controles segundo o sexo

Sexo	Grupos		Total <i>N</i>
	Controles <i>n</i> (%)	Pacientes <i>n</i> (%)	
Masculino	95 (78,5)	130 (83,3)	225
Feminino	26 (21,5)	26 (16,7)	52
Total <i>n</i> (%)	121 (100)	156 (100)	277

No grupo de pacientes com a forma crônica 12 pertenciam ao sexo feminino (sete com a forma multifocal e cinco com a unifocal) e 71 ao sexo masculino (61 com a forma multifocal e 10 com a unifocal). Na forma aguda foram observados sete do sexo feminino e 19 do masculino.

À **Tabela 3**, são apresentadas a média, desvio-padrão e mediana das idades de pacientes e controles.

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes com paracoccidioidomicose (n=156) e controles (n=121) segundo a idade

Idade	Grupos	
	Controles (%)	Pacientes (%)
Média	39,2	49,3
Mediana	37	53,0
Desvio Padrão	16,5	16,2

Esta variável não é relevante para análise dos polimorfismos, mas é para detecção das citocinas. A distribuição em faixas etárias foi homogênea entre os grupos estudados na análise dos ensaios: ELISA (“Enzyme-Linked

ImmunoSorbent Assay” - Teste de χ^2 , $p= 0,499$) e CBA (“Cytometric Bead Array” - Teste Exato de Fisher, $p= 1,0$) (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes com paracoccidioidomicose e controles segundo a faixa etária nos ensaios ELISA e CBA.

Idade	ELISA		CBA	
	Controles <i>n</i> (%)	Pacientes <i>n</i> (%)	Controles <i>n</i> (%)	Pacientes <i>n</i> (%)
Até 35 anos	8 (24,2)	5 (17,2)	2 (25)	4 (22,2)
36-72 anos	25 (75,8)	24 (82,8)	6 (75)	14 (77,8)
Total	33	29	8	18

Quanto à etnia, observa-se homogeneidade na população de estudo (teste de χ^2 , $p= 0,067$), sendo a raça branca predominante em ambos os grupos ($n= 107$), mesmo com a ausência de dados das amostras extraídas anteriormente (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Distribuição dos pacientes com paracoccidioidomicose e controles segundo a etnia

Etnia	Grupos		Total <i>N</i>
	Controles <i>n</i> (%)	Pacientes <i>n</i> (%)	
Amarela	7 (8,1)	3 (3,6)	10
Branca	59 (67,8)	48 (57,1)	107
Negra/Mulata/Parda	21 (24,1)	33 (39,3)	54
Total	87 (100)	84 (100)	171

Seguindo a análise entre as formas clínicas, também não foi possível verificar diferença estatisticamente significativa (teste de χ^2 , $p=0,890$). Observa-se o pequeno número de indivíduos da etnia amarela, com ausência na forma crônica unifocal (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Distribuição dos pacientes com formas clínicas da paracoccidioidomicose segundo a etnia

Etnia	Formas clínicas			Total <i>n</i>
	Crônico Multifocal <i>n</i> (%)	Crônico Unifocal <i>n</i> (%)	Aguda <i>n</i> (%)	
Amarela	2 (3,8)	0	1 (4,3)	3
Branca	30 (57,7)	6 (66,7)	12 (52,2)	48
Negra/Mulata/Parda	20 (38,5)	3 (33,3)	10 (43,5)	33
Total	52 (100)	9 (100)	23 (100)	84

Em relação aos genótipos dos SNPs de *IFNG*, *IL12B* e *IL12RB1*, todos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

3.4 Material Biológico e extração de DNA pelo método de precipitação por sal

Para a obtenção de DNA foram coletados 4 mL de sangue periférico em tubo com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Após a centrifugação por 10 minutos a 214 g obtém-se a camada leucocitária, da qual foi extraído o DNA.

Para a extração foi adicionado DTAB (“Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide”) a 12 % volume a volume com a camada leucocitária, seguido de homogeneização cerca de 30 segundos. Em seguida, os tubos foram incubados

por 10 minutos a 70 °C. Após este período, acrescentou-se clorofórmio volume a volume, homogeneizando imediatamente com vigorosa inversão durante 30 segundos.

Os microtubos foram centrifugados a 10 621 *g* por 2 minutos, e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos contendo 1 mL de CTAB (“Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide”) 5 %. Novamente, homogeneizou-se por inversão até a formação do precipitado DNA-CTAB. O processo de centrifugação foi repetido, e em seguida foram adicionados 300 µL de NaCl 1,2 M e 1 mL de etanol 70 %, ao precipitado. Esta solução foi centrifugada a 17 949 *g* por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. Na etapa de lavagem com etanol 70 %, a solução foi novamente centrifugada a 17 949 *g* por 2 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de água esterilizada.

3.5 SNP na posição +874 T/A do gene *IFNG*

O SNP da posição *IFNG*+874 T/A (rs2430561) foi determinado pelo método PCR-ARMS (“Polymerase Chain Reaction - Amplification Refractory Mutational System”), seguido de análise de eletroforese em gel de agarose (Torres et al, 2010; Pravica et al, 2000).

Para padronizar a reação, foram testadas duas enzimas: a *Platinum Taq* DNA (Invitrogen) e a *GoTaq* DNA Polymerase (Promega).

A amplificação foi realizada utilizando-se três oligonucleotídeos:

5'-TCAACAAAGCTGATACTCCA-3' (consenso)

5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3' (alelo específico A)

5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCAT-3' (alelo específico T)

Além desses, foi aplicado um controle interno: o gene do hormônio de crescimento humano (*HGH*), o qual é comum a todos seres humanos, para verificação da viabilidade do DNA e também como controle de inibição da reação de PCR. Os oligonucleotídeos utilizados foram:

5'-GCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3' (*HGH sense*)

5'-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3' (*HGH antisense*)

As concentrações dos reagentes para realização da PCR-ARMS foram as seguintes: 1 µg DNA genômico; 0,5 pM de cada oligonucleotídeo específico; 0,2 pM do oligonucleotídeo de controle interno (*HGH*); 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM de MgCl₂; 0,625 U/tubo de *Taq*, o volume final foi de 25 µL.

Na PCR, procedeu-se à etapa de denaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, seguidos de 10 ciclos de incubação de 95°C por 15 segundos, 62 °C por 50 segundos e 72 °C por 40 segundos, seguidos por 20 ciclos de incubação de 95 °C por 20 segundos, 56 °C por 50 segundos e 72 °C por 50 segundos, com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. O produto amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 2 % contendo brometo de etídio utilizando como referência um padrão molecular (PM) "Ladder Mix" (Fermentas Life Sciences) de 500 pb.

Seguiu-se o estudo do SNP de 3'UTR de *IL12B*+1188 (A/C) e de *IL12RB1* (A/G) posição 11016 (rs11575834), após resultado positivo para PCR-ARMS de *IFNG* +874 (T/A).

3.6 SNP na posição +1188 A/C da região 3'UTR do gene *IL12B*

Para genotipagem do SNP A/C, localizado na posição +1188 de 3' UTR (rs3212227) do gene de *IL12B*, foi realizada PCR-RFLP ("PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism"; PCR - Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição) segundo Zafra et al (2007). Para amplificação do fragmento de 233 pb de *IL12B*, foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos:

5'-TTCTATCTGATTTGCTTTA-3' (sense)

5'-TGAAACATTCCATACATCC-3' (antisense)

O DNA (1 µg) foi amplificado por meio de uma denaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido de 29 ciclos de incubação de 95 °C por 30 segundos, 43 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto com uma extensão final por 7 minutos a 72 °C.

A presença do polimorfismo A/C de 3' UTR foi determinada pela digestão a 65 °C por 5 minutos dos produtos amplificados pela enzima de restrição *FastDigest TaqI* (Fermentas Life Sciences), gerando os genótipos: AA (233 pb), AC (233+165+69 pb) e CC (165+69 pb). A separação dos fragmentos foi visualizada por meio da eletroforese em gel de agarose 3 % contendo brometo de etídio, sendo utilizado como referência um padrão molecular (PM) "Ladder Mix" (Fermentas Life Sciences) de 500 pb.

3.7 Identificação do polimorfismo no gene *IL12RB1*

Para identificação do SNP A/G, localizado no éxon 7, posição 11016 (rs11575834) do gene *IL12RB1*, foi feita PCR-RFLP segundo Tabone & Morahan

(2003). Para amplificação do fragmento de 375 pb, foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos:

5'-AGCCAGGACTTGAAGTGG-3' (*forward*)

3'-TTTCCTAATGCTTGCCCCTGT-5' (*reverse*)

O DNA (100 ng) foi amplificado por meio de uma denaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de incubação de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, com uma extensão final por 9 minutos a 72 °C.

O polimorfismo A/G na posição 11016 do éxon 7 foi determinada pela digestão a 37 °C por 5 minutos dos produtos amplificados pela enzima de restrição *FastDigest PvuII* (Fermentas Life Sciences), gerando os padrões de banda AA (271+104 pb), AG (375+271+104 pb) e GG (375 pb). A separação dos fragmentos foi visualizada por meio da eletroforese em gel de agarose 3 % contendo brometo de etídio, utilizando como referência um padrão molecular (PM) *Ladder Mix* (Fermentas Life Sciences) de 500 pb.

3.8 Preparo do CFA (“Cell-Free Antigen”) de *P. brasiliensis*

Foi utilizado como antígeno o CFA conforme descrito por Camargo et al (1991). As células de culturas de *P. brasiliensis* cepa B339, em 3 dias em meio ágar Fava Netto a 35 °C foram transferidas com auxílio de alça de platina para microtubos com capacidade para 1,5 mL, contendo 1 mL de meio RPMI 1640 (Gibco). Os tubos foram agitados em agitador de tubos por 2 minutos e, logo em seguida, centrifugados a 10.621 g por 10 minutos. A partir do sobrenadante obtido realizou-se a técnica de SDS-PAGE (“Sodium Dodecyl Sulfate -

Polyacrylamide Gel Electrophoresis”), e os resultados foram semelhantes aos do trabalho de Blotta & Camargo (1993). Este antígeno foi denominado de “Cell-Free Antigen” e armazenado a -80°C para posterior utilização.

3.9 Cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)

Esta técnica consiste na separação de células mononucleares do sangue venoso periférico colhido em tubos heparinizados, utilizando-se um gradiente de concentração chamado Ficoll-Hypaque (Pharmacia).

Após a coleta das amostras de sangue de pacientes com PCM e de indivíduos saudáveis, o sangue total foi diluído volume a volume (1:2) em meio RPMI 1640 (Gibco). Em tubos cônicos, colocou-se um volume de 4 mL de Ficoll-Hypaque (Pharmacia) e, com uma pipeta Pasteur, foi adicionado lentamente dois volumes do sangue diluído em RPMI 1640 (Gibco).

Estes tubos foram centrifugados a 1.258 g por 20 minutos a 10°C , para a obtenção da camada leucocitária, estas células foram lavadas com meio RPMI 1640 (Gibco) por centrifugação a 652 g por 10 minutos a 10°C . A etapa de lavagem foi repetida três vezes para se certificar que o Ficoll-Hypaque (Pharmacia) foi todo retirado. Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o pellet de células ressuspendido em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Gibco) e 1 % de L-glutamina (Gibco).

As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer com corante azul de Trypan (Sigma), acertando-se a concentração para 2×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado.

Após esta etapa, para determinação da cinética de produção das citocinas IFN- γ , IL-12p40 e IL-12p70 por ELISA, as culturas foram mantidas por 24, 48, 72 e 144 horas, sendo preparadas quatro placas de 24 poços (Costar) idênticas, estimuladas com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA - Gibco) a 5 $\mu\text{g/mL}$ ou com antígeno CFA a 5 $\mu\text{g/mL}$ ou deixadas sem estímulo. Todas as culturas foram mantidas nos períodos determinados em incubadora a 37 °C com 5 % de CO₂.

Os sobrenadantes das culturas foram colhidos em microtubos separadamente segundo período e condições de cultura, identificados e mantidos a -80 °C até a dosagem das citocinas por ELISA.

3.10 ELISA (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”) para detecção de IL-12p40 em sobrenadantes de cultura

Para detecção das citocinas IL-12p40 em sobrenadantes de cultura, de pacientes e controles, foram utilizados kits comerciais de ensaios de ELISA, seguindo-se os protocolos do fabricante (BD Biosciences). Primeiramente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura anti-IL-12p40 diluídos 1:250 em tampão carbonato de sódio 0,1 M (BD Biosciences) e aplicados 50 $\mu\text{L/poço}$. As placas foram seladas e incubadas *overnight* a 4 °C. Após este período de incubação, as placas foram lavadas três vezes com 150 $\mu\text{L/poço}$ de Tampão de lavagem (“Wash Buffer”; BD Biosciences) e após a última lavagem, o resíduo foi retirado batendo-se as placas delicadamente sobre um papel filtro.

Foi realizado o bloqueio com 150 µL/poço de Reagente Diluente (RD; BD Biosciences) e incubados a temperatura ambiente durante 1 hora, em seguida, repetiu-se o procedimento de lavagem descrito acima.

As curvas-padrão foram feitas com sete pontos de diluições seriadas a partir da concentração máxima de 2000 pg/mL. Para cada diluição, foram aplicados 50 µL/poço em duplicata, bem como o RD em duplicata como “branco” da reação. As amostras foram diluídas 1:2 em RD e aplicadas, em duplicata, 50 µL/poço. As placas foram incubadas 2 horas a temperatura ambiente.

Após este período, foi repetido o procedimento de lavagem por cinco vezes. Os anticorpos de detecção específicos para IL-12p40 foram diluídos 1:250 em RD, assim como a estreptoavidina (1:250) nesta mesma solução, e foram aplicados 50 µL/poço. As placas foram seladas e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora.

Passada 1 hora, o procedimento de lavagem foi repetido sete vezes, sendo o tampão deixado nos poços por 1 minuto entre as lavagens. O substrato, que é a junção da solução A e B (BD Biosciences), foi aplicado 50 µL/poço, e as placas incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro. Para parar a reação, foram utilizados 25 µL/poço da solução de parada (“Stop Solution”; BD Biosciences). A leitura da placa foi feita na leitora Versamax na absorbância de 450 nm, subtraída de 570 nm.

3.11 Detecção de IFN- γ e IL-12p70 pelo ensaio CBA (“Cytometric Bead Array”)

As dosagens de IFN- γ e IL-12p70 nos sobrenadantes das culturas de PBMCs de controles e pacientes foram realizadas pelo método CBA, utilizando-se o “Flex Set”: hIFN- γ (catálogo 558269) e hIL-12p70 (catálogo 558283). Este método permite no mesmo ensaio, com uma pequena quantidade de amostra, avaliar simultaneamente várias citocinas.

Seguiu-se o protocolo do fabricante (BD Biosciences) com algumas modificações, que emprega micropérolas (“beads”), de intensidade de fluorescência distinta e discreta, ligadas a anticorpos específicos para captura de cada citocina humana.

Para a curva-padrão de IFN- γ e IL-12p70 foi realizada uma diluição seriada em Reagente Diluente (RD) a partir do tubo mais concentrado 2500 pg/mL até 9,77 pg/mL, para ambas, além de um controle negativo (CN), que continha somente RD.

Alíquotas de 100 μ L de cada micropérola conjugada com anticorpo de captura foi diluída em 5550 μ L de Diluente de Captura de micropérola, 25 μ L desta solução foi aplicado em 25 μ L da curva padrão, CN e das amostras de sobrenadante de cultura de PBMC, seguindo-se de homogeneização e incubação por 1 hora.

Após esta incubação, a detecção das citocinas foi realizada com o emprego de um segundo grupo de anticorpos também específicos, ligados a uma substância que emite fluorescência ao ser excitada pelo laser do citômetro de fluxo, a ficoeritrina (PE). Assim, foi diluído 100 μ L de cada anticorpo em 5550 μ L

de Diluente de Detecção. Desta solução foi aplicado 100 μ L em cada amostra, no CN e na curva-padrão, e em seguida homogeneizou-se e incubou-se no escuro em temperatura ambiente por 2 horas.

Em seguida, foram aplicados 500 μ L de Tampão de lavagem em cada tubo e centrifugou-se a 200 *g* por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante, sendo aplicados mais 200 μ L de tampão de lavagem para ressuspender as micropérolas. Logo após, todas as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo Fortessa (BD Biosciences).

As concentrações foram determinadas a partir da comparação entre os valores de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) das amostras e de uma curva-padrão.

3.12 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no “software” *SPSS Statistics* versão 17.0, comparando as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes de IFN- γ , IL-12R β 1 e de IL-12p40, entre o grupo de pacientes com paracoccidioidomicose (forma crônica unifocal, multifocal e aguda) e o grupo de indivíduos sadios. Para tal análise, foi utilizado o teste de χ^2 de Pearson e Exato de Fisher e quando nas tabelas 3x2 e 3x3 havia uma proporção superior a 20% de frequências esperadas >5 , utilizou-se o teste de χ^2 , Razão de Verossimilhança (LR - “Likelihood Ratio”). A distribuição dos genótipos na população de estudo foi testada por equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para a escolha do maior período de secreção de cada citocina foi utilizado o teste de Friedman, com pós teste de Dunn, no “software” *GraphPad Prism 5*.

Após esta etapa, a comparação entre os níveis de IFN- γ , IL-12p40 e IL-12p70 e a expressão de tais genes nos diferentes grupos estudados foi realizada no “software” *GraphPad Prism 5*, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. Serão considerados significantes, valores de $p < 0,05$. Para valores não detectáveis nas análises de citocinas, foi utilizado o valor imediato abaixo do detectável.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Estudo do SNP na posição +874 T/A do gene *IFNG*

4.1.1 PCR-ARMS

Para o estudo do SNP +874 T/A do gene *IFNG*, foi realizada a PCR-ARMS que revelou uma banda de 263 pb correspondente a cada alelo específico (T e A), e o controle interno (*HGH*), uma banda de 408 pb nos 277 indivíduos incluídos neste trabalho (**Figura 1**).

A **Figura 1** mostra a padronização para a PCR-ARMS +874 T/A de *IFNG*, em gel de agarose 2 %, utilizando como referência um padrão de tamanho molecular de 500 pares de base, após o emprego da enzima *GoTaq DNA Polymerase* e *Platinum Taq DNA*, observando-se resultados similares tanto na revelação da banda do controle interno como a do alelo específico. Ressalta-se que a mesma amostra foi aplicada tanto na porção superior do gel correspondente à reação específica para o alelo T, como na porção inferior para o alelo A. De cinco amostras, três eram heterozigotos e dois eram homozigotos para o alelo T.

Figura 1. Padronização da PCR *IFNG* +874 T/A, gel de agarose 2 %. **Parte Superior:** Alelo T; **Parte Inferior:** Alelo A. **Amostras 1-8:** *Taq DNA Platinum* (Invitrogen). **Amostras 9-16:** teste *GoTaq DNA Polymerase* (Promega). **Amostras 1 e 9:** Padrão de tamanho molecular; **Amostras 2 e 10:** Controle negativo da sala de mistura reativa; **Amostras 3 e 11:** Controle negativo da sala de aplicação de DNA; **Amostras 4-6 e 12-14:** heterozigotos (TA). **Amostras 7-8 e 15-16:** homozigotos (TT).

A **Figura 2** é um exemplo dos resultados obtidos com a enzima *GoTaqDNA Polymerase*, verificando-se os três genótipos: TT, TA e AA, sendo que a mesma amostra foi aplicada tanto na porção superior (alelo T) como na porção inferior (alelo A).

Figura 2. Genótipos resultantes da PCR *IFNG* +874 T/A com a enzima *GoTaqDNA Polymerase*, gel de agarose 2 %. **Parte Superior PCR para o alelo T e Parte Inferior PCR para o alelo A, segundo Materiais e Métodos.** **Amostra 1:** Padrão de tamanho molecular; **Amostra 2:** Controle negativo da sala de mistura reativa; **Amostra 3:** Controle negativo da sala de aplicação de DNA; **Amostras 4, 7, 8, 9, 10, 11 e 14:** indivíduos positivos para os alelos A (homozigotos). **Amostras 5, 6 e 12:** indivíduos positivos para o alelo T e A (heterozigotos); **Amostra 13:** indivíduo positivo para o alelo T (homozigoto).

4.1.2 Frequência genotípica do SNP na posição +874 T/A do gene *IFNG*

Observando os genótipos de *IFNG* +874 T/A, a distribuição das frequências, em 277 indivíduos, foi de 41,1 % para o genótipo AA e 45,5 % para TA, ambos mais frequentes que o genótipo TT (13,4 %), podendo assim, exemplificar a distribuição genotípica da população brasileira (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IFNG* +874 T/A em indivíduos controles e pacientes com paracoccidiodomicose

Genótipos <i>IFNG</i> +874 T/A	Grupos	
	Controles <i>n</i> (%)	Pacientes <i>n</i> (%)
AA	48 (39,7)	66 (42,3)
TA	57 (47,1)	69 (44,2)
TT	16 (13,2)	21 (13,5)
Total	121	156

Em relação à forma clínica, não houve diferença estatística significativa nas frequências dos genótipos do SNP *IFNG* +874 T/A entre os pacientes (teste de χ^2 , $p= 0,651$) (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IFNG* +874 T/A entre pacientes com a forma crônica e aguda da paracoccidiodomicose

Genótipos <i>IFNG</i> +874 T/A	Formas clínicas	
	Crônica <i>n</i> (%)	Aguda <i>n</i> (%)
AA	47 (40,5)	19 (47,5)
TA	52 (44,8)	17 (42,5)
TT	17 (14,7)	4 (10)
Total	116	40

Entre as formas crônicas da PCM, observou-se uma maior frequência dos genótipos AA e TA na forma crônica multifocal, e na unifocal o genótipo TA foi o mais frequente, todavia tais frequências foram similares à análise estatística (Teste χ^2 ; $p=0,090$). Verifica-se ainda uma ausência de portador TT em pacientes com a forma crônica unifocal (**Tabela 9**).

Tabela 9 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IFNG* +874 T/A em pacientes com a forma multifocal e a unifocal da paracoccidioidomicose crônica

Genótipos <i>IFNG</i> +874 T/A	Forma crônica	
	Multifocal <i>n</i> (%)	Unifocal <i>n</i> (%)
AA	41 (41,4)	6 (35,3)
TA	41 (41,4)	11 (64,7)
TT	17 (17,2)	0
Total	99	17

4.1.3 Frequência alélica do SNP na posição +874 T/A do gene *IFNG*

Considerando o total de alelos dos indivíduos estudados em ambos os grupos ($N= 554$), os resultados demonstraram uma predominância do alelo A (63,9 %) em relação ao alelo T (36,1 %). Tal predominância foi também observada nos grupos controle e de pacientes com paracoccidiodomicose (Tabela 10).

Tabela 10 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IFNG* +874 T/A em indivíduos controles ($n= 121$) e pacientes com paracoccidiodomicose ($n= 156$)

Alelos <i>IFNG</i> +874 T/A	Grupos	
	Controles <i>N</i> (%)	Pacientes <i>N</i> (%)
A	153 (63,2)	201 (64,4)
T	89 (36,8)	111 (35,6)
Total	242	312

**N* = número de alelos

Comparando-se as formas clínicas da paracoccidioidomicose, foi observada predominância do alelo A tanto nos pacientes com a forma crônica quanto naqueles com a forma aguda (Teste χ^2 , $p= 0,349$) (**Tabela 11**).

Tabela 11 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IFNG* +874 T/A em pacientes com a forma crônica (n= 116) e aguda (n= 40) da paracoccidioidomicose

Alelos <i>IFNG</i> +874 T/A	Formas clínicas	
	Crônica N* (%)	Aguda N* (%)
A	146 (62,9)	55 (68,8)
T	86 (37,1)	25 (31,2)
Total	232	80

*N- número de alelos

Nos resultados comparativos das formas multifocal e unifocal da paracoccidioidomicose crônica, a distribuição dos alelos mostrou maior frequência do alelo A nas duas formas (Teste χ^2 , $p= 0,538$) (**Tabela 12**).

Tabela 12 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IFNG* +874 T/A em pacientes com a forma multifocal (n= 99) e a forma unifocal (n= 17) da paracoccidioidomicose crônica

Alelos <i>IFNG</i> +874 T/A	Forma crônica	
	Multifocal N* (%)	Unifocal N* (%)
A	123 (62,1)	23 (67,6)
T	75 (37,9)	11 (32,4)
Total	198	34

*N- número de alelos

4.2 Estudo do SNP na posição +1188 A/C na região 3'UTR do gene *IL12B*

4.2.1 PCR-RFLP

A PCR-RFLP para SNP 3'UTR do gene de *IL12B* +1188 A/C foi aplicada nas 277 amostras de DNA de pacientes com paracoccidioidomicose e indivíduos saudáveis (selecionadas previamente na PCR positivas para *IFNG* +874 T/A), utilizando como referência um padrão de tamanho molecular de 500 pb.

Na **Figura 3**, são demonstrados os resultados de 9 amostras: 5 de pacientes (amostras 3, 4, 7, 8 e 10), e 4 de controles (amostras 5, 6, 9 e 11). A positividade foi verificada em gel de agarose 2 %.

Figura 3. PCR 3'UTR *IL12B* +1188 A/C, gel de agarose 2 %. **Amostras 1 e 12:** Padrão de tamanho molecular; **Amostra 2:** Controle negativo da sala de mistura reativa; **Amostra 3, 4, 7, 8 e 10:** pacientes positivo para *IL12B*; **Amostras 5, 6, 9 e 11:** controles positivos para *IL12B*.

Os produtos da PCR 3'UTR *IL12B* +1188 A/C positivos, após digestão com a enzima de restrição *FastDigest TaqI* (Fermentas Life Sciences) resultaram em 3 tamanhos de bandas: homozigoto para o alelo A (233 pb), heterozigoto (233+165+69 pb) ou homozigoto para o alelo C (165+69 pb) (**Figura 4**).

Na **Figura 4**, observa-se o resultado dos padrões de bandas gerados pela digestão da enzima de restrição *TaqI* (Fermentas Life Sciences) em gel de agarose 3 %. A amostra 2 corresponde a um paciente homozigoto para o alelo C; as amostras 3, 4, 9 e 5, 7 correspondem respectivamente a controles sadios e pacientes heterozigotos; as amostras 6 e 8 correspondem a pacientes homozigotos para o alelo A.

Figura 4. Reação de enzima *TaqI* (Fermentas Life Sciences) do produto da PCR 3'UTR *IL12B* +1188 A/C, gel de agarose 3 %. **Amostra 1:** Padrão de tamanho Molecular “Ladder Mix” (Fermentas Life Sciences); **Amostra 2:** paciente positivo para o alelo C (homozigoto C); **Amostras 3, 4 e 9:** controles positivos para o alelo A e C (heterozigotos); **Amostras 5 e 7:** pacientes positivos para o alelo A e C (heterozigotos); **Amostras 6 e 8:** pacientes positivos para o alelo A (homozigotos A).

4.2.2 Frequência genotípica do SNP na posição +1188 A/C da região 3'UTR do gene *IL12B*

Considerando os grupos estudados, a proporção dos genótipos seguiu a tendência AA>AC>CC (**Tabela 13**), expressando a distribuição dos genótipos do SNP *IL12B* +1188 A/C na região 3'UTR na população brasileira.

Tabela 13 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12B* +1188 A/C na região 3'UTR entre indivíduos controles e pacientes com paracoccidiodomicose

Genótipos <i>IL12B</i> 3'UTR	Grupos	
	Controles <i>n</i> (%)	Pacientes <i>n</i> (%)
AA	55 (45,4)	82 (52,6)
AC	52 (43)	59 (37,8)
CC	14 (11,6)	15 (9,6)
Total	121	156

Analisando as formas clínicas, não foi observada diferença significativa entre as frequências dos genótipos (Teste χ^2 , $p=0,931$) (**Tabela 14**).

Tabela 14 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12B* +1188 A/C na região 3'UTR segundo as formas clínicas crônica e aguda da paracoccidiodomicose

Genótipos <i>IL12B</i> 3'UTR	Formas clínicas	
	Crônica <i>n</i> (%)	Aguda <i>n</i> (%)
AA	62 (53,4)	20 (50)
AC	43 (37,1)	16 (40)
CC	11 (9,5)	4 (10)
Total	116	40

Os resultados apresentados à **Tabela 15** mostram similaridade nas frequências dos genótipos (Teste χ^2 , $p= 0,308$), com maior frequência do genótipo AA nas formas multifocal e unifocal, seguidos de AC e CC.

Tabela 15 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12B* +1188 A/C na região 3'UTR em pacientes com a forma multifocal e unifocal da paracoccidiodomicose crônica

Genótipos <i>IL12B</i> 3'UTR	Forma Crônica	
	Multifocal <i>n</i> (%)	Unifocal <i>n</i> (%)
AA	50 (50,5)	12 (70,6)
AC	39 (39,4)	4 (23,5)
CC	10 (10,1)	1 (5,9)
Total	99	17

4.2.3 Frequência alélica do SNP na posição +1188 A/C da região 3'UTR do gene *IL12B*

Verificando a distribuição dos alelos do SNP *IL12B* na população estudada, observa-se que o alelo A foi o mais frequente (**Tabela 16**).

Tabela 16 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IL12B* +1188 A/C na região 3'UTR em indivíduos controles ($n= 121$) e pacientes com paracoccidiodomicose ($n= 156$)

Alelos <i>IL12B</i> 3'UTR	Grupos	
	Controles <i>N</i> * (%)	Pacientes <i>N</i> * (%)
A	162 (66,9)	223 (71,5)
C	80 (33,1)	89 (28,5)
Total	242	312

**N*- número de alelos

Comparando-se os pacientes com as formas crônica e aguda da paracoccidiodomicose, não se observou diferença estatística entre os dois grupos nas distribuições dos alelos A e C (Teste χ^2 , $p=0,735$) (**Tabela 17**).

Tabela 17 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IL12B* +1188 A/C na região 3'UTR em pacientes com paracoccidiodomicose, segundo as formas clínicas crônica (n= 116) e aguda (n= 40)

Alelos <i>IL12B</i> 3'UTR	Formas clínicas	
	Crônica N* (%)	Aguda N* (%)
A	167 (72)	56 (70)
C	65 (28)	24 (30)
Total	232	80

*N = número de alelos

Em relação às formas multifocal e unifocal da paracoccidiodomicose crônica, observou-se que as frequências alélicas foram semelhantes (Teste χ^2 , $p=0,145$), com um predomínio do alelo A em ambas (**Tabela 18**).

Tabela 18 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IL12B* +1188 A/C na região 3'UTR em pacientes com a forma multifocal (n= 99) e unifocal (n= 17) da paracoccidiodomicose crônica

Alelos <i>IL12B</i> 3'UTR	Forma crônica	
	Multifocal N* (%)	Unifocal N* (%)
A	139 (70,2)	28 (82,4)
C	59 (29,8)	6 (17,6)
Total	198	34

*N = número de alelos

4.3 Estudo do SNP na posição 11014 A/G no éxon 7 do gene *IL12RB1*

4.3.1 PCR-RFLP

O estudo do SNP na posição 11014 A/G no éxon 7 do gene *IL12RB1* utilizou a técnica de PCR-RFLP, aplicada em 277 amostras de DNA de pacientes com paracoccidioidomicose e indivíduos saudáveis, selecionadas na etapa anterior de acordo com a positividade do controle interno (*HGH*) na PCR-ARMS para *IFNG* +874 T/A.

A amplificação de um produto com 375 pb resultante da PCR *IL12RB1*, utilizando-se como referência um padrão de tamanho molecular de 500 pb, foi verificada em gel de agarose 2 % e ilustrada na **Figura 5**, em que há 8 amostras, sendo 2 de pacientes (amostras 3 e 9) e 6 de controles (amostras 4, 5, 6, 7, 8 e 10).

Figura 5. PCR *IL12RB1* posição 11014 A/G no éxon 7, gel de agarose 2 %. **Amostra 1:** Padrão de tamanho molecular; **Amostra 2:** Controle negativo da sala de mistura reativa; **Amostra 3 e 9:** pacientes positivo para *IL12RB1*; **Amostras 4 a 8 e 10:** controles positivos para *IL12RB1*.

As amostras positivas para PCR *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 seguiram para digestão com a enzima de restrição *FastDigest PvuII* (Fermentas Life Sciences), resultando em 3 padrões de bandas: homozigoto para o alelo A (271+104 pb), heterozigoto (375+271+104 pb) ou homozigoto para o alelo G (375 pb) (**Figura 6**).

Figura 6. Reação de enzima *PvuII* (Fermentas Life Sciences) do produto PCR *IL12RB1* posição 11014 A/G no éxon 7, gel de agarose 3 %. **Amostra 1:** Padrão de tamanho molecular; **Amostra 2 e 8:** pacientes positivos para o alelo A (homozigoto A); **Amostra 3:** controle positivo para o alelo A e C (heterozigotos); **Amostras 4, 5 e 9:** controles positivos para o alelo G (homozigoto G); **Amostras 6 e 7:** controles positivos para o alelo A (homozigotos A).

A **Figura 6** é um exemplo do resultado dos padrões de bandas gerado pela digestão da enzima de restrição *PvuII* (Fermentas Life Sciences) em gel de agarose 3%. As amostras 2 e 8, 6 e 7 correspondem, respectivamente, a pacientes e controles sadios homozigotos para o alelo A; a amostra 3 corresponde a um controle heterozigoto (AG); as amostras 4, 5 e 9 correspondem a controles homozigotos para o alelo G.

4.3.2 Frequência genotípica do SNP na posição 11014 A/G no éxon 7 do gene *IL12RB1*

Considerando todos indivíduos estudados, nota-se um predomínio do genótipo AA, seguidos pelos genótipos AG e GG (**Tabela 19**).

Tabela 19 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL 12RB1* 11014 A/G no éxon 7 em indivíduos controles e pacientes com paracoccidiodomicose

Genótipos <i>IL 12RB1</i>	Grupos	
	Controles <i>n</i> (%)	Pacientes <i>n</i> (%)
AA	75 (62)	95 (60,9)
AG	35 (28,9)	53 (34)
GG	11 (9,1)	8 (5,1)
Total	121	156

Na **Tabela 20**, as frequências dos genótipos entre as formas clínicas da paracoccidiodomicose não mostraram diferença significativa (Teste χ^2 , $p=0,971$).

Tabela 20 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL 12RB1* 11014 A/G no éxon 7 segundo as formas clínicas da paracoccidiodomicose (crônica e aguda)

Genótipos <i>IL 12RB1</i>	Formas clínicas	
	Crônica <i>n</i> (%)	Aguda <i>n</i> (%)
AA	70 (60,3)	25 (62,5)
AG	40 (34,5)	13 (32,5)
GG	6 (5,2)	2 (5)
Total	116	40

Na paracoccidiodomicose crônica, nota-se que a forma unifocal apresentou a mesma frequência para os genótipos AA e AG, em comparação com a forma multifocal em que o homozigoto A foi o mais frequente, contudo tal comparação não apresentou diferença estatisticamente significativa (Teste χ^2 , $p=0,469$) (**Tabela 21**).

Tabela 21 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 segundo a forma crônica da paracoccidiodomicose (multifocal e unifocal)

Genótipos <i>IL12RB1</i>	Forma Crônica	
	Multifocal <i>n</i> (%)	Unifocal <i>n</i> (%)
AA	62 (62,6)	8 (47,1)
AG	32 (32,3)	8 (47,1)
GG	5 (5,1)	1 (5,8)
Total	99	17

4.3.3 Frequência alélica do SNP na posição 11014 A/G no éxon 7 do gene *IL12RB1*

Na análise dos grupos de estudo observa-se distribuição similar entre os dois grupos com maior frequência do alelo A do que o T em controles e pacientes com paracoccidiodomicose (**Tabela 22**).

Tabela 22 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 em indivíduos controles (n= 121) e pacientes com paracoccidiodomicose (n= 156)

Alelos <i>IL12RB1</i>	Grupos	
	Controles N* (%)	Pacientes N* (%)
A	185 (76,4)	243 (77,9)
G	57 (23,6)	69 (22,1%)
Total	242	312

*N = número de alelos

Comparando-se as formas clínicas crônica e aguda, observou-se similaridade nas frequências dos alelos (Teste χ^2 , $p= 0,735$) (**Tabela 23**).

Tabela 23 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 em pacientes das formas clínicas crônica (n= 116) e aguda (n= 40) da paracoccidiodomicose

Alelos <i>IL12RB1</i>	Formas clínicas	
	Crônica N* (%)	Aguda N* (%)
A	180 (77,6)	63 (78,7)
G	52 (22,4)	17 (21,3)
Total	232	80

*N = número de alelos

Em relação às formas multifocal e unifocal da paracoccidioidomicose crônica, também foi observado predomínio do alelo A em ambas, sem diferença estatística (Teste χ^2 , $p= 0,290$) (**Tabela 24**).

Tabela 24 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 em pacientes com a forma multifocal (n= 99) e unifocal (n= 17) da paracoccidioidomicose crônica

Alelos <i>IL12RB1</i>	Forma crônica	
	Multifocal <i>N</i> * (%)	Unifocal <i>N</i> * (%)
A	156 (78,8)	24 (70,6)
G	42 (21,2)	10 (29,4)
Total	198	34

**N* = número de alelos

4.4 Frequências dos genótipos e alelos dos SNPs dos genes *IFNG*, *IL12B* e *IL12RB1* segundo sexo

Na população estudada, o genótipo TA do SNP +874T/A do gene *IFNG* foi o mais frequente em ambos os sexos (Teste χ^2 , $p=0,892$) (**Tabela 25**).

Tabela 25 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IFNG* +874 T/A segundo o sexo

Genótipos <i>IFNG</i> +874 T/A	Sexo	
	Feminino <i>n</i> (%)	Masculino <i>n</i> (%)
AA	21 (40,4)	93 (41,3)
TA	23 (44,2)	103 (45,8)
TT	8 (15,4)	29 (12,9)
Total	52	225

Nos polimorfismos dos genes *IL12B* e *IL12RB1*, a distribuição dos genótipos foi semelhante entre os sexos (Teste χ^2 , $p= 0,708$ e $0,541$ respectivamente) (**Tabela 26 e 27**), do mesmo modo na análise com os alelos (dados não mostrados).

Tabela 26 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12B* +1188 A/C na região 3'UTR segundo o sexo

Genótipos <i>IL12B</i> 3' UTR	Sexo	
	Feminino <i>n</i> (%)	Masculino <i>n</i> (%)
AA	24 (46,1)	113 (50,2)
AC	21 (40,4)	90 (40)
CC	7 (13,5)	22 (9,8)
Total	52	225

Tabela 27 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12RB* 11014 A/G no éxon 7 segundo o sexo

Genótipos <i>IL12B</i> 3' UTR	Sexo	
	Feminino <i>n</i> (%)	Masculino <i>n</i> (%)
AA	33 (63,5)	137 (60,9)
AG	14 (26,9)	74 (32,9)
GG	5 (9,6)	14 (6,2)
Total	52	225

Estudando-se o sexo masculino e as formas crônicas da paracoccidiodomicose, nota-se uma diferença significativa nas frequências dos genótipos do SNP *IL12RB1* (Teste χ^2 LR, $p= 0,048$), sendo o genótipo AA mais frequente entre os homens com a forma crônica multifocal, e na unifocal os

heterozigotos (**Tabela 28**). Não foi observada diferença entre as mulheres (Teste χ^2 LR, $p= 0,074$) (dados não mostrados).

Tabela 28 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL 12RB* 11014 A/G no éxon 7 em pacientes do sexo masculino com a forma crônica multifocal e unifocal

Genótipos <i>IL 12RB</i> 1		Forma crônica PCM	
		Multifocal <i>n</i> (%)	Unifocal <i>n</i> (%)
Sexo masculino	AA	58 (63,1)	4 (33,3)
	AG	29 (31,5)	8 (66,7)
	GG	5 (5,4)	0
Total		92	12

Considerando os pacientes com a forma crônica unifocal e o mesmo SNP, observa-se diferença significativa na frequência dos genótipos segundo o sexo masculino e feminino (Teste χ^2 LR, $p= 0,009$), sendo os heterozigotos mais frequentes nos homens (66,7 %) e ausência destes portadores no sexo feminino (**Tabela 29**). No entanto, também deve-se notar que há um pequeno número neste grupo de pacientes com PCM crônica unifocal.

Tabela 29 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL 12RB* 11014 A/G no éxon 7 em pacientes com paracoccidioidomicose crônica unifocal segundo o sexo

Genótipos <i>IL 12RB</i>		Sexo	
		Masculino <i>n</i> (%)	Feminino <i>n</i> (%)
PCM Crônica Unifocal	AA	4 (33,3)	4 (80)
	AG	8 (66,7)	0
	GG	0	1 (20)
Total		12	5

Seguindo-se a análise de alelo do mesmo SNP e a forma crônica unifocal entre o sexo masculino e feminino, bem como forma crônica multifocal e unifocal segundo sexo masculino, esta diferença desaparece (dados não mostrados).

4.5 Frequências dos genótipos e alelos dos SNPs dos genes *IFNG*, *IL12B* e *IL12RB1* segundo etnia

Em relação à etnia, foi observada diferença significativa na distribuição dos genótipos do SNP *IFNG* +874 T/A (Teste χ^2 LR, $p=0,02$), sendo o genótipo AA mais frequente no grupo étnico amarelo; os heterozigotos nos demais e o genótipo TT foi mais frequente na etnia branca (**Tabela 30**).

Tabela 30 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IFNG* +874 T/A segundo etnia (n= 171): amarela, branca e negra/mulata

Genótipos <i>IFNG</i> +874 T/A	Etnia		
	Amarela n (%)	Branca n (%)	Negra/Mulata/Parda n (%)
AA	9 (90)	39 (36,4)	22 (40,7)
AT	1 (10)	46 (43)	28 (51,9)
TT	0	22 (20,6)	4 (7,4)
Total	10	107	54

Na análise com os alelos, tal diferença permaneceu (Teste χ^2 , $p= 0,03$), notando-se uma menor frequência do alelo T no grupo amarelo em comparação aos demais grupos, além disso há poucos indivíduos dessa etnia (**Tabela 31**).

Tabela 31 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IFNG* +874 T/A segundo etnia (N= 342): amarela, branca e negra/mulata/parda

Alelos <i>IFNG</i> +874 T/A	Etnia		
	Amarela N* (%)	Branca N* (%)	Negra/Mulata/Parda N* (%)
A	19 (95)	124 (57,9)	72 (66,7)
T	1 (5)	90 (42,1)	36 (33,3)
Total	20	214	108

*N = número de alelos

Seguindo-se o estudo com o mesmo SNP, ainda observar-se diferença significativa na distribuição das frequências entre as etnias de pacientes (Teste χ^2 LR, $p= 0,039$) sendo o homozigoto A mais frequente no grupo amarelo, com frequências similares de AA e TA em brancos, enquanto o genótipo TT foi mais frequente em na etnia branca (**Tabela 32**). Esta diferença não foi observada no grupo controle (Teste χ^2 LR, $p= 0,069$) dados não mostrados.

Tabela 32 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IFNG* +874 T/A dos pacientes segundo etnia (n= 84): amarela, branca e negra/mulata/parda no grupo de pacientes com paracoccidioidomicose

Genótipos <i>IFNG</i> +874 T/A		Etnia		
		Amarela n (%)	Branca n (%)	Negra/Mulata/Parda n (%)
Pacientes	AA	3 (100)	19 (39,6)	14 (42,4)
	AT	0	18 (37,5)	17 (51,5)
	TT	0	11 (22,9)	2 (6,1)
Total		3	48	33

Quando seguimos com a análise entre os alelos ainda observamos esta diferença. (Teste χ^2 LR, $p= 0,028$) (**Tabela 33**).

Tabela 33 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IFNG* +874 T/A segundo etnia (N= 168): amarela (n= 3), branca (n= 48) e negra/mulata/parda (n= 33) em pacientes com paracoccidioidomicose

Alelos <i>IFNG</i> +874 T/A		Etnia		
		Amarela N* (%)	Branca N* (%)	Negra/Mulata/Parda N* (%)
Pacientes	A	6 (100)	56 (58,3)	45 (68,2)
	T	0	40 (41,7)	21 (31,8)
Total		6	96	66

*N = número de alelos

Na análise comparativa do SNP no gene *IL12B* entre as etnias foi observada uma similaridade na distribuição dos genótipos (Teste χ^2 LR, $p=0,091$) (**Tabela 34**), o mesmo é visto em relação aos alelos (dados não mostrados).

Tabela 34 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12B* +1188 A/C na região 3'UTR segundo etnia (n= 171): amarela, branca e negra/mulata/parda.

Genótipos <i>IL12B</i>	Etnia		
	Amarela n (%)	Branca n (%)	Negra/Mulata/Parda n (%)
AA	2 (20)	57 (53,3)	28 (51,9)
AC	6 (60)	41 (38,3)	16 (29,6)
CC	2 (20)	9 (8,4)	10 (18,5)
Total	10	107	54

O estudo com o SNP no gene *IL12RB1* revelou diferença estatística nas frequências genotípicas e alélicas segundo etnia, conforme se vê às **Tabelas 35 e 36** (Teste χ^2 LR, $p=0,01$ e $0,001$ respectivamente).

Tabela 35 - Distribuição genotípica das frequências do SNP *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 segundo etnia (n= 171): amarela, branca e negra/mulata/parda

Genótipos <i>IL12RB1</i>	Etnia		
	Amarela n (%)	Branca n (%)	Negra/Mulata/Parda n (%)
AA	3 (30)	57 (53,3)	41 (75,9)
AG	5 (50)	43 (40,2)	12 (22,2)
GG	2 (20)	7 (6,5)	1 (1,9)
Total	10	107	54

Tabela 36 - Distribuição alélica das frequências do SNP *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 segundo etnia ($N= 342$): amarela, branca e negra/mulata/parda

Alelos <i>IL12RB1</i>	Etnia		
	Amarela N^* (%)	Branca N^* (%)	Negra/Mulata/Parda N^* (%)
A	11 (55)	157 (73,4)	94 (87)
G	9 (45)	57 (26,6)	14 (13)
Total	20	214	108

* N = número de alelos

Quanto à distribuição das frequências genotípica SNP *IL12RB1* em os pacientes, também foi observada diferença significativa segundo as etnias (Teste χ^2 LR, $p= 0,023$) (**Tabela 37**). Seguindo-se com as análises com alelos essa significância desaparece.

Tabela 37 - Distribuição alélica das frequências SNP *IL12RB1* 11014 A/G no éxon 7 segundo etnia ($n= 84$): amarela, branca e negra/mulata/parda em pacientes com paracoccidioidomicose

Genótipos <i>IL12RB1</i>		Etnia		
		Amarela n (%)	Branca n (%)	Negra/Mulata/Parda n (%)
Pacientes	AA	1 (33,3)	24 (50)	26 (78,8)
	AG	2 (66,7)	24 (50)	6 (18,2)
	GG	0	0	1 (3)
Total		3	48	33

Em relação a todas as análises que envolveram os grupos étnicos, deve-se levar em consideração o número de indivíduos incluídos no grupo étnico amarelo ($n= 10$), sendo 7 controles e 3 pacientes, conforme **Tabela 5**.

4.6 Estudo da cinética de IFN- γ , IL-12p40 e IL-12p70 em sobrenadantes de cultura de PBMCs

A **Figura 7** representa a cinética de IFN- γ em sobrenadantes de cultura de pacientes DA e CT, bem como em controles, frente aos estímulos PHA e CFA. A escolha do período de 144h como pico de secreção de IFN- γ foi feita de forma descritiva, contemplando os melhores valores após estímulos com PHA, com ou sem CFA, já que não houve diferença estatística entre os períodos estudados nos grupos.

Da mesma forma procedeu-se com as demais citocinas IL-12p40 e IL-12p70 com um pico de 144h e 24h, respectivamente (**Figuras 8 e 9**).

Em relação as formas clínicas dos pacientes com PCM, os resultados de cinética de secreção de citocinas foram similares aos observados anteriormente nas fases clínicas (DA e CT) da PCM, e também não foi visto diferença significativa (dados não mostrados).

Figura 7. Cinética de IFN- γ , realizada pela técnica de CBA, em sobrenadantes de PBMCs de indivíduos dos grupos controle (CO; $n=5$) e de pacientes (DA= 8 e CT= 6) sem estímulo e com estímulo (PHA e CFA) nos períodos de 24, 48, 72 e 144h.

Figura 8. Cinética dos níveis de IL-12p40, analisada por ELISA, em sobrenadantes de cultura de PBMCs de indivíduos dos grupos controle (CO; $n=18$) e de pacientes (DA= 11 e CT= 9), sem estímulo e com estímulo (PHA e CFA) nos períodos de 24, 48, 72 e 144h.

Figura 9. Cinética dos níveis de IL-12p70, analisada por técnica de CBA, em sobrenadantes de cultura de PBMCs de indivíduos dos grupos controle (CO; $n=5$) e de pacientes (DA= 8 e CT= 6), sem estímulo e com estímulo (PHA e CFA) nos períodos de 24, 48, 72 e 144h.

4.7 Relação dos SNPs *IFNG*, *IL12B* e *IL12RB1* e a secreção das citocinas de IFN- γ , IL-12p40 e IL-12p70 em sobrenadantes de cultura de PBMCs

4.7.1 SNPs *IFNG*, *IL12B* e *IL12RB1* a secreção das citocinas de IFN- γ , IL-12p40 e IL-12p70: relação com as formas clínicas

Selecionado o período de 144 horas para dosagem da secreção de IFN- γ , procedeu-se às análises a fim de verificar a relação entre genótipo e alelos, nas diferentes formas clínicas da PCM, e a secreção das suas respectivas citocinas.

Em relação às formas clínicas, observou-se para o SNP *IFNG* diferença significativa nos níveis secretados de IFN- γ frente ao CFA, entre as formas clínicas Aguda (AG) e Crônica (CR), mas não em relação aos alelos (Alelo A: Forma AGCT > CRCT – $p < 0,05$ e Alelo A – Forma AGCT > CRDA: $p < 0,05$). Para o SNP *IL12B*, encontrou-se também para o alelo A diferença estatisticamente significativa entre os níveis de IL-12p40 secretados frente à PHA para o Alelo A: grupo CO > CRDA ($p < 0,05$). Já para o SNP *IL12RB1* frente à PHA, houve diferença significativa entre a secreção de IL-12p40 entre alelo A: CO > alelo G: CRDA ($p < 0,05$). Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa entre A e G no mesmo grupo ou forma clínica, pôde-se verificar que o alelo G foi relacionado à secreção de níveis consideráveis de IL-12p40 (dados não mostrados, com análise variável de número de alelos de 4-15 em pacientes e de 41-50 em controles).

Como as formas clínicas apresentaram padrão similar entre as fases da PCM ativa e curada-tratada, e também para se aumentar o número de portadores em cada genótipo, os pacientes foram agrupados conforme a fase da doença.

4.7.2 SNPs *IFNG*, *IL12B* e *IL12RB1* a secreção das citocinas de IFN- γ , IL-12p40 e IL-12p70: relação com as fases da doença curada-tratada e ativa

4.7.2.1 SNP *IFNG* e secreção de citocina

Como as formas clínicas apresentaram padrão similar entre as fases da PCM ativa e curada-tratada, e também para se aumentar o número de portadores em cada genótipo, os pacientes foram agrupados conforme a fase da doença.

De maneira interessante, embora em pequeno número, o genótipo TT parece apresentar comportamento diferente em CO e DA (níveis baixos), e em CT apresenta níveis mais elevados. No entanto, esses achados não tiveram diferença significativa (**Tabela 38**).

Tabela 38 - Secreção de IFN- γ de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os genótipos do SNP *IFNG* +874 T/A, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT

Grupos	Genótipos do SNP <i>IFNG</i>	IFN- γ (pg/mL)		
		<i>n</i>	Mediana	Intervalo Interquartil
CT	AA	3	2031	1724 - 2166
	TA	2	2052	1496 - 2607
	TT	2	6147	1326 - 10968
DA	AA	4	485,5	117,1 - 2328
	TA	5	410,7	39,93 - 3355
	TT	2	198,1	107,8 - 288,4
CO	AA	1	2500	-
	TA	5	5352	1728 - 12943
	TT	2	316,6	315,5 - 317,8

Observou-se que a secreção de IFN- γ foi similar entre os alelos dos grupos, no entanto, nota-se que os indivíduos na fase CT e o grupo CO secretam mais níveis elevados desta citocina do que em DA, mas com significância ($p < 0,05$) só observada com o alelo A do grupo CO em relação ao alelo T do grupo DA (Tabela 39).

Tabela 39 - Secreção de IFN- γ de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os alelos do SNP *IFNG*+874 T/A, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT

Grupos	Alelos do SNP <i>IFNG</i>	IFN- γ (pg/mL)		
		<i>n</i>	Mediana	Intervalo Interquartil
CT	A	8	2031	1724 - 2166
	T	6	2052	1326 - 10968
DA	A	13	410,7	32,59 - 1948
	T ^a	5	288,4	77,51 - 705,5
CO	A ^a	7	2500	1995 - 12061
	T	9	1728	316,6 - 8717

^aalelo A grupo CO vs alelo T grupo DA

Em relação aos níveis de IL-12p40 e p70 frente ao estímulo de PHA e o SNP *IFNG*+874T/A, diferenças significantes não foram registradas para os mesmos alelos anteriormente descritos para a secreção de IFN- γ (**Tabela 39**), sendo que os alelos A e T no grupo DA apresentam valores similares para cada citocina, IL-12p40 e p70 (**Tabela 40**).

Independentemente do alelo, os grupos CT e CO secretam maiores níveis de IL-12p40 e 70 do que o grupo DA. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação: alelo T grupo CT vs alelo A grupo DA, na análise dos níveis de IL-12p40; alelo A entre os grupos CT e DA e alelo A dos grupos CO e DA na análise dos níveis de IL-12p70. Tais resultados também foram observados na análise da secreção de IFN- γ , porém sem diferença estatística (**Tabela 40**).

Tabela 40 - Secreção de IL-12p40 e p70 de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os alelos do SNP *IFNG* +874 T/A, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT

Grupos	Alelos do SNP <i>IFNG</i>	n	IL-12p40 (pg/mL)		IL-12p70 (pg/mL)	
			Mediana	Intervalo Interquartil	Mediana	Intervalo Interquartil
CT	A ^b	8	1492	1130 - 1492	73,21	25,36 - 190,7
	T ^a	6	3366	2644 - 3950	47,24	11,98 - 104,4
DA	A ^{a,b,c}	13	668,3	198,3 - 2364	6,970	1,1 - 17,54
	T	5	689,3	478,2 - 2481	6,970	ND - 11,06
CO	A ^c	7	1262	925 - 6170	214,7	12,88 - 444,9
	T	9	1717	1286 - 4848	20,73	ND - 188,9

ND= não detectável

^aIL-12p40: alelo T grupo CT vs alelo A grupo DA

^bIL-12p70: alelo A grupo CT vs alelo A grupo DA

^cIL-12p70: alelo A grupo CO vs alelo A grupo DA

Na análise da secreção de IFN- γ dos alelos do SNP +874 T/A em sobrenadantes frente ao CFA, os valores foram similares entre os grupos (Tabela 41).

Tabela 41 - Secreção de IFN- γ de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo CFA de acordo com os alelos do SNP *IFNG*+874 T/A, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT

Grupos	Alelos do SNP <i>IFNG</i>	<i>n</i>	IFN- γ (pg/mL)	
			Mediana	Intervalo Interquartil
CT	A	8	90,25	ND - 260,1
	T	6	4,82	2,74 - 241,3
DA	A	13	4,3	ND - 36,0
	T	5	6,51	2,0 - 51,7
CO	A	7	16,51	2,22 - 21,2
	T	9	17,03	11,19 - 22,75

ND= não detectável

Com estímulo de CFA não foi observada diferenças significantes entre o SNP +874 T/A de *IFNG* e os níveis de IL-12p40 e p70, apresentado níveis baixos para ambas citocinas (dados não apresentados).

4.7.2.2 SNP *IL12B* e secreção de citocina

À **Tabela 42**, observa-se que no grupo CT, embora sem significância estatística, o genótipo AC secreta níveis maiores que 2000 pg/mL de IL-12p40 diferentemente dos outros genótipos e do grupo DA e CO, havendo poucos portadores de alguns genótipos entre as fases da doença.

Tabela 42 - Secreção de IL-12p40 de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os genótipos do SNP *IL12B* +1188 A/C, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT

Grupos	Genótipos do SNP <i>IL12B</i>	IL-12p40 (pg/mL)		
		<i>n</i>	Mediana	Intervalo Interquartil
CT	AA	8	1782	1342 - 3461
	AC	3	2965	2945 - 3788
	CC	1	1377	-
DA	AA	7	633,8	226,8 - 2364
	AC	8	1086	312 - 2151
	CC	2	934,1	478,1 - 1390
CO	AA	15	1715	1265 - 3165
	AC	11	1590	925 - 2484
	CC	6	1463	1006 - 3828

Os resultados demonstram que o alelo A do grupo CO teve significativamente maior secreção de IL-12p40 em relação ao mesmo alelo do grupo DA, bem como o alelo A do grupo CT em relação aos alelos A e C do grupo DA (**Tabela 43**). Esta tendência de maior secreção desta citocina do grupo CT em relação ao DA fora observada entre os genótipos, porém sem significância estatística.

Tabela 43 - Secreção de IL-12p40 de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os alelos do SNP *IL12B*+1188 A/C, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT

Grupos	Alelos do SNP <i>IL12B</i>	<i>n</i>	IL-12p40 (pg/mL)	
			Mediana	Intervalo Interquartil
CT	A ^{a,b}	19	1824	1639 - 3774
	C	5	2945	1377 - 3376
DA	A ^{a,c}	22	651	226,8 - 2324
	C ^b	12	1029	478,2 - 1633
CO	A ^c	1	1669	1263 - 3097
	C	23	1590	1075 - 2373

ND= não detectável

^aAlelo A do grupo CT vs Alelo A do grupo DA

^bAlelo A do grupo CT vs Alelo C do grupo DA

^cAlelo A do grupo CO vs Alelo A do grupo DA

Dosando-se as citocinas IFN- γ e IL-12p70 em sobrenadantes de PBMCs estimuladas com PHA, foi observado que o alelo A do grupo CO secreta significativamente maiores níveis de IFN- γ em relação ao mesmo alelo do grupo DA, e para IL-12p70 foi observada significância entre o alelo A do grupo CT em relação ao mesmo alelo do DA (**Tabela 44**). Esses resultados também foram observados na análise dos níveis de IL-12p40 (**Tabela 43**).

Tabela 44 - Secreção de IFN- γ e IL-12p70 de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os alelos do SNP *IL12B*, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT

Grupos	Alelos do SNP <i>IL12B</i>	<i>n</i>	IFN- γ (pg/mL)		IL-12p70 (pg/mL)	
			Mediana	Intervalo Interquartil	Mediana	Intervalo Interquartil
CT	A ^a	12	2031	1553 - 2497	65,42	22,77 - 190,7
	C	2	6147	1326 - 10968	29,61	11,98 - 47,24
DA	A ^{a,b}	16	37,3	47,26 - 907	6,97	1,9 - 14,3
	C	6	198,1	91,18 - 3599	4,6	ND - 17,04
CO	A ^b	14	2247	317,8 - 12061	20,73	ND - 224,4
	C	2	2114	1728 - 2500	329,8	214,7 - 444,9

ND= não detectável

^aAlelo A do grupo CT vs Alelo A do grupo DA para IL-12p70

^bAlelo A do grupo CO vs Alelo A do grupo DA para IFN- γ

Em relação ao estímulo com o antígeno CFA, a maioria dos pacientes apresentaram níveis indetectáveis de IL-12p40 para o SNP *IL12B*, e considerando a maior secreção observada 62,1 pg/mL, proporcionalmente os portadores do alelo A na fase ativa da PCM secretariam menos IL-12p40 (12,5 %), em relação ao alelo C do mesmo grupo (33,3 %) e o grupo CT (alelo A: 26,3 % e alelo C: 20 %) (dados não mostrados).

Seguindo com o mesmo estímulo, a dosagem de IL-12p70 foi indetectável em grande parte da população estudada. Acrescido a isso, os níveis de IFN- γ e IL-12p70 não apresentaram significância nas análises dentro e entre os grupos estudados (dados não mostrados).

Ressalta-se que não houve portador do genótipo CC no grupo de pacientes CT para ambos os estímulos, o que pode influenciar as análises.

4.7.2.3 SNP *IL12RB* e secreção de citocina

No estudo do SNP no receptor de IL-12p40, não houve nenhum portador do genótipo GG, que seria responsável pela troca de aminoácido e poderia causar alguma deficiência no receptor, nos grupos de paciente na dosagem de IL-12p70 e IFN- γ , só havendo um representante (DA) para IL-12p40. Devido esta dificuldade, partiu-se direto para análise dos alelos (**Tabela 45**).

Não foi observada diferença na secreção das citocinas IFN- γ , IL-12p40 e p70 entre os alelos A e G nos grupos de estudo, indicando que esta troca não causaria prejuízo ao receptor. O alelo A do grupo DA secreta menores níveis dessas citocinas em relação ao mesmo alelo dos grupos CO e CT, com significância na comparação entre o alelo A do grupo CT vs alelo A grupo DA

para as citocinas IL-12p40 e p70, e para IFN- γ e IL-12p40 ainda com esse mesmo alelo e os grupos DA e CO.

Tabela 45 - Secreção de IFN- γ , IL-12p70 e p40 de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA de acordo com os alelos do SNP *IL12RB1*, nos grupos: controle (CO) e pacientes DA e CT

Grupos	Alelos SNP <i>IL12RB1</i>	<i>n</i> IFN- γ e IL- 12p70/p40	IFN- γ (pg/mL)	IL-12p70 (pg/mL)	IL-12p40 (pg/mL)
Mediana (Intervalo Interquartil)					
CT	A ^a	11/20	2031 (1496 - 2607)	57,62 (14,61 - 190,7)	1824 (1377 - 3374)
	G	3/4	2166 (1326 - 2607)	57,62 (47,24 - 73,21)	2734 (1937 - 2960)
DA	A ^{a,b}	20/28	344 (62,38 - 1000)	6,97 (0,70 - 15,38)	651 (443,8 - 2151)
	G	2/6	334,3 (41,46 - 627,1)	5,68 (ND - 11,06)	1390 (213,5 - 1720)
CO	A ^b	14/50	2247 (1375 - 7029)	91,94 (ND - 253,3)	1532 (1239 - 2484)
	G	2/14	6188 (315,5 - 12061)	91,94 (20,73 - 163,2)	1817 (1075 - 3682)

ND= não detectável

^aAlelo A grupo CT vs Alelo A grupo DA nas análises para IL-12p40 e p70

^bAlelo A grupo CO vs Alelo A grupo DA nas análises para IFN- γ e IL-12p40

Com o estímulo do CFA, a secreção das citocinas foi similar entre os alelos dos grupos, não havendo diferença estatisticamente significativa. Apesar de um número pequeno de indivíduos, os portadores do alelo G do grupo CT e DA têm uma tendência de secretar maiores níveis de IL-12p40 em comparação aos alelos dos outros grupos, e em relação à secreção de IFN- γ somente o alelo G do grupo DA mostra a mesma tendência em relação aos demais alelos dos grupos (dados não mostrados).

Tabela 46 - Sumário dos resultados estatisticamente significantes dos SNPs *IFNG*, *IL12B* e *IL12RB1* nos grupos estudados

SNP (Tabela)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Valor de <i>p</i>
Genótipo do SNP <i>IL12RB1</i> 11014 A/G no éxon 7 (Tabela 28)	Crônico multifocal sexo masculino	Crônico unifocal sexo masculino	-	0,048
Genótipo do SNP <i>IL12RB1</i> 11014 A/G no éxon 7 (Tabela 29)	Crônico unifocal sexo masculino	Crônico unifocal sexo feminino	-	0,009
Genótipo do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A (Tabela 30)	Etnia Amarela	Etnia Branca	Etnia Negra/mulata/parda	0,02
Alelo do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A (Tabela 31)	Etnia Amarela	Etnia Branca	Etnia Negra/mulata/parda	0,03
Genótipo do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A (Tabela 32)	Pacientes de etnia Amarela	Pacientes de etnia Branca	Pacientes de etnia Negra/mulata/parda	0,039
Alelo do SNP <i>IFNG</i> +874 T/A (Tabela 33)	Pacientes de etnia Amarela	Pacientes de etnia Branca	Pacientes de etnia Negra/mulata/parda	0,033
Genótipo do SNP <i>IL12RB1</i> 11014 A/G no éxon 7 (Tabela 35)	Etnia Amarela	Etnia Branca	Etnia Negra/mulata/parda	0,01
Alelo do SNP <i>IL12RB1</i> 11014 A/G no éxon 7 (Tabela 36)	Etnia Amarela	Etnia Branca	Etnia Negra/mulata/parda	0,001
Alelo do SNP <i>IL12RB1</i> 11014 A/G no éxon 7 (Tabela 37)	Pacientes de etnia Amarela	Pacientes de etnia Branca	Pacientes de etnia Negra/mulata/parda	0,023

Tabela 47 - Sumário dos resultados estatisticamente significantes relativos às diferenças entre os alelos dos diferentes SNPs nos grupos controle (CO) e de pacientes CT e DA, segundo a secreção das citocinas IFN- γ , IL-12p70 e p40 de sobrenadantes de PBMCs frente ao estímulo PHA

SNP	Citocina	Grupo 1	Grupo 2	Valor de <i>p</i>
<i>IFNG</i>	IFN- γ	Alelo A grupo CO	Alelo T grupo DA	<0,05
		Alelo T grupo CT	Alelo A grupo DA	<0,05
	IL-12p70	Alelo A grupo CT	Alelo A grupo DA	<0,05
		Alelo A grupo CO	Alelo A grupo DA	<0,05
<i>IL12B</i>	IFN- γ	Alelo A grupo CO	Alelo A grupo DA	<0,05
		Alelo A grupo CT	Alelo A grupo DA	<0,05
		Alelo A grupo CT	Alelo C grupo DA	<0,05
		Alelo A grupo CO	Alelo A grupo DA	<0,05
	IL-12p70	Alelo A grupo CT	Alelo A grupo DA	<0,05
<i>IL12RB1</i>	IFN- γ	Alelo A grupo CO	Alelo A grupo DA	<0,05
		Alelo A grupo CT	Alelo A grupo DA	<0,05
		Alelo A grupo CO	Alelo A grupo DA	<0,05
	IL12-p70	Alelo A grupo CT	Alelo A grupo DA	<0,05

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os mecanismos genéticos que determinam a susceptibilidade do hospedeiro vêm sendo cada vez mais explorados (Moraes-Vasconcelos et al, 2005; Bozzi et al, 2006; 2009; Mezger et al, 2008), auxiliando no conhecimento dos fatores relacionados à evolução das micoses sistêmicas. Desse modo, o presente estudo procurou identificar polimorfismos de citocinas possivelmente associados à paracoccidioidomicose e suas formas clínicas, com foco nas citocinas envolvidas na resistência em modelo experimental e em dados conhecidos do perfil na doença humana (Moraes-Vasconcelos et al, 2005; Oliveira et al, 2002, Castro et al, 2013).

O grupo de pacientes com paracoccidioidomicose no presente trabalho, assim como relatado por Blotta et al (1999) e Belissimo-Rodrigues et al (2011 e 2013), teve uma maior proporção de indivíduos do sexo masculino, porém esta predominância é característica dessa micose (Shikanai-Yasuda et al, 2006). A distribuição das amostras de DNA, segundo as formas clínicas da micose foi semelhante aos achados de Blotta et al (1999) numa amostragem com 584 pacientes, que relataram 20 % dos casos com a forma aguda e 80 % com a forma crônica, destacando-se 52 % com a forma multifocal.

Com relação à etnia, um estudo do IBGE de 2008 e 2010 demonstrou que na população de São Paulo há uma maior proporção de indivíduos da raça branca, assim como os resultados aqui apresentados. Além disso, Belissimo-Rodrigues et al (2011 e 2013) relataram uma maior proporção de pacientes com

paracoccidioidomicose de etnia branca em relação à negra/mulata, corroborando nossos achados.

A maior produção das citocinas IFN- γ e IL-12 tem sido diretamente relacionada à resposta imune protetora em pacientes com paracoccidioidomicose (Benard et al, 2001; Oliveira et al, 2002; Romano et al, 2005; Castro et al, 2013). Segundo relatos, trocas de um único nucleotídeo (SNP) nos genes *IFNG* e *IL12B* parecem interferir na secreção dessas citocinas (Pravica et al, 1999; Seegers et al, 2002; Stanilova & Miteva, 2005) em indivíduos saudáveis.

O presente trabalho estudou três SNPs, um no gene de IFN- γ (*IFNG* +874 T/A), um no gene de IL-12p40 (*IL-12B* 3'UTR +1188 A/C) e um no gene do receptor IL-12R β 1 (*IL12RB1* 11014 A/G éxon 7).

Na análise comparativa entre as frequências dos genótipos e alelos dos SNPs *IFNG* +874 T/A e *IL12RB1*, foi observada uma diferença estatisticamente significativa na distribuição entre as etnias.

Visentainer et al (2008) verificaram que a distribuição do SNP *IFNG* na população brasileira não difere de outras etnias, e ainda relataram uma proporção do alelo TT na etnia branca (italianos e americanos) semelhante aos nossos achados e na população brasileira, a proporção foi um pouco abaixo da que foi encontrada neste estudo. Contudo, esses autores não estudaram a etnia amarela, com predomínio do genótipo AA neste estudo, similarmente aos dados de Ito et al (2006) e Migita et al (2005) em população japonesa. Segundo Sun et al (2015), este polimorfismo, em um estudo de meta-análise, foi associado às doenças relacionadas ao vírus da hepatite, especialmente em população asiática.

Além disso, o genótipo AA do SNP *IFNG* foi previamente associado a menores níveis de IFN- γ na leishmaniose cutânea (Matos et al, 2007) e malária (Medina et al, 2011).

Na comparação relativa aos genótipos e secreção de IFN- γ em sobrenadantes de cultura, verificou-se no grupo CT com genótipo AA uma menor secreção de IFN- γ em sobrenadantes de cultura em relação aos outros genótipos (**Tabela 38**) frente ao estímulo com PHA, porém o número de pacientes analisados foi pequeno em todos os grupos e não houve significância estatística, sendo heterogênea a secreção nos outros grupos (DA e CO).

Tais observações poderiam estar associadas à gravidade da doença vista em imigrantes asiáticos (Lacaz, 1956), porém são necessários mais estudos, devido ao pequeno número de indivíduos aqui incluídos.

Considerando o SNP *IL12RB1*, houve um predomínio do genótipo AG na etnia de descendentes japoneses (amarela) e o GG ocorreu em 20 %, similarmente Kusuha et al (2007) observaram que nos japoneses houve predomínio do genótipo AG e uma proporção do GG de 15 % em controles e 26 % em pacientes com tuberculose.

Akahoshi et al (2003) relataram maior secreção IFN- γ em resposta à indução com IL-12 em indivíduos sadios com haplótipo contendo o mesmo alelo A analisado no presente estudo - *IL12RB1* (rs11575934) e outros SNPs de *IL12RB1* (684C, 1094T e 1132G), quando comparado ao outro haplótipo que continha o alelo G. Esses autores relacionaram a secreção desta citocina à presença de haplótipos, não sendo possível, portanto, saber como é a secreção associada somente ao SNP *IL12RB1* A/G do éxon 7 (rs11575934).

Na comparação relativa ao SNP *IL12RB1* e a secreção das citocinas IFN- γ , IL-12p40 e p70 não foi observada diferença entre os alelos A e G (**Tabela 45**), porém com um pequeno número de indivíduos analisados, sendo necessários mais estudos para melhor compreensão do papel deste receptor.

No SNP *IL12B* +1188 A/C, apesar de não significante, o genótipo AC foi o mais frequente na etnia amarela similarmente aos achados de Tsunemi et al (2002), e a frequência deste genótipo varia entre as etnias: raça caucasiana (23,3 - 33,6 %) (Hall et al, 2000; Stanilova & Miteva, 2005; Calvo et al, 2002; McCormack et al, 2002), negros de Camarões (51,5 %) (Hall et al, 2000), porém difere de afro-americanos (24,8 %) (Ma et al, 2003).

Visto que as frequências dos genótipos dos SNPs variam entre as etnias, considerando a miscigenação da população brasileira, este estudo demonstra a necessidade de mais estudos genotípicos nesta população.

Quanto à distribuição dos genótipos e dos alelos no estudo do SNP *IFNG* +874 T/A, no presente trabalho, houve predomínio do alelo A e menor frequência do genótipo TT nos grupos de pacientes e controles, de acordo com outros estudos na população brasileira (Visentainer et al, 2008; Albuquerque et al, 2009; Matos et al, 2007; Cardoso et al, 2010; Medina et al, 2011; Bozzi et al, 2009; Neves et al, 2012; Pereira et al, 2015).

O polimorfismo no gene de IFN- γ (rs2430561) não foi associado às diferentes formas clínicas da PCM como observado na tuberculose (Cooke et al, 2006; Onay et al, 2010; Abhimanyu et al, 2011; Leandro et al, 2013; Mabunda et al, 2015); na hanseníase (Wang et al, 2012); nas hepatites B e C (Falleti et al, 2007; Cheong et al, 2006; Bahgat et al, 2015); na malária (Pereira et al, 2015);

na toxoplasmose (Neves et al, 2012); e na leishmaniose tegumentar americana (Matos et al, 2007).

A maior produção de IFN- γ está intimamente relacionada ao estímulo conjunto de IL-12 e IL-18 em macrófagos (Munder et al, 1998; Schindler et al, 2001), sendo a IL-12 importante no direcionamento das células para a resposta imune do tipo Th1.

Nosso trabalho pela primeira vez, segundo nosso conhecimento, estudou o SNP no gene da subunidade IL-12p40 (*IL12B*) na região 3' UTR +1188 A/C na paracoccidiodomicose, mostrando maior frequência do genótipo AA tanto em pacientes como em controles, similarmente aos achados de Frachim et al (2011) na população brasileira, e diferentemente do grupo controle de Carvalho et al (2012). Esta discrepância pode ser devido ao pequeno número de indivíduos incluídos no último estudo, bem como a variação dos grupos étnicos nas diferentes regiões.

O presente trabalho não encontrou associação entre o SNP *IL12B1* (rs11575934) e as formas clínicas dessa doença, similarmente aos relatos em outras doenças, como tuberculose pulmonar (Selvaraj et al, 2008), lupus eritematoso sistêmico (Miteva et al, 2010), carcinoma hepatocelular na infecção por vírus da hepatite B (Liu et al, 2011); hepatite C (Mueller et al, 2004; Youssef et al, 2013); resposta ao tratamento, gravidade da fibrose e da atividade necroinflamatória em pacientes com hepatite C (Youssef et al, 2013).

A IL-12 secretada por macrófagos e monócitos induz à diferenciação da resposta tipo Th1 e produção de IFN- γ pela ligação de alta afinidade com o complexo (subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$) do receptor de IL-12 (IL-12R) nas células T (Abbas & Lichtman, 2005). Desta forma, qualquer deficiência pode interferir na

resposta frente a *Paracoccidioides* sp, tendo já sido registrada a deficiência completa do receptor IL-12R β 1 em vários pacientes com outras infecções, como segue.

Em revisão incluindo 73 pacientes, Frieschi & Casanova (2003) registraram maior ocorrência da deficiência completa do receptor IL-12R β 1 em relação à deficiência de IL-12p40. A deficiência do receptor IL-12R β 1 ocorreu principalmente em pacientes que apresentaram doença disseminada após inoculação de BCG em salmonelose não-tifóidica, tuberculose e outras micobacterioses. Mais raramente, a associação da deficiência do receptor e de IL-12p40 foi registrada em pacientes infectados por ambas comorbidades, salmonelose e micobacteriose. Do mesmo modo, Schepers et al (2013) relataram que a deficiência de tal receptor levou a uma doença disseminada causada por *Mycobacterium tilburgii*. Uma infecção disseminada causada por BCG foi também associada à deficiência desse receptor de IL-12 (Senanayake et al, 2015).

Na paracoccidioidomicose, um caso disseminado associado à deficiência no receptor de IL-12/IL-23 foi registrado e relacionado a um defeito no eixo IL-12/IL-23-IFN- γ por Moraes-Vasconcelos et al (2005).

O presente trabalho estudou o SNP *IL12RB1* A/G éxon 7 (rs11575934) neste importante receptor, pela primeira vez na paracoccidioidomicose, segundo nosso conhecimento. Nossos resultados apresentaram diferença estatisticamente significativa (Teste χ^2 LR, $p= 0,048$) em pacientes do sexo masculino com a forma crônica multifocal em relação à forma unifocal, com predomínio de AA na forma multifocal e AG na unifocal (**Tabela 28**), sugerindo a relação entre este genótipo e a forma mais disseminada da doença crônica.

De maneira interessante, a relação entre secreção de citocinas e alelos do SNP *IL12RB1* frente a PHA (**Tabela 47**), sugere que os menores níveis de IL12p40 relacionados ao alelo A em todos os grupos ligar-se-iam ao receptor IL-12R β 1, e poderiam estar associados à menor secreção de IFN- γ (observada no grupo CO). Esses dados corroboram a predominância de AA no sexo masculino na forma multifocal e também do AG na unifocal, que como portadores de apenas um alelo A apresentaria um perfil intermediário evoluindo com doença menos disseminada.

Adicionalmente, estudando-se a forma crônica unifocal (**Tabela 29**) mostrou-se uma maior proporção de heterozigotos no sexo masculino e homozigotos do alelo A no feminino. Essas informações corroboram os dados discutidos no parágrafo anterior, com presença de genótipo AG em cerca de 67 % em homens e ausência em mulheres e em contraste, a predominância de AA em mulheres, que deveriam estar protegidas pela presença de hormônio feminino. No entanto, apesar da diferença entre sexos ter sido estatisticamente significativa ($p= 0,009$), esta evidência necessita ser confirmada com número adicional de mulheres estudadas com a forma crônica unifocal.

A presença do genótipo GG, responsável pela troca de aminoácido glutamina por arginina, não foi associada à deficiência no receptor de IL-12 ou à susceptibilidade nas infecções por agentes do complexo *Mycobacterium avium* em 19 indivíduos japoneses e quatro de etnia branca, respectivamente (Sakai et al, 2001). Por outro lado, Altare et al (1998) relataram, em um indivíduo, a associação deste polimorfismo com deficiência do receptor e infecção por *M. avium*. Esta discrepância pode ser devido ao número de indivíduos incluídos em

cada estudo, além disso, outros polimorfismos não analisados por Altare et al (1998) podem influenciar a expressão do receptor.

Esses dados mostram a importância de mais estudos nesse SNP para melhor compreensão do fenótipo do receptor. Não tendo sido encontrada associação entre o SNP e suas formas clínicas, é fundamental a análise de maior número de pacientes da forma unifocal como definida no presente estudo com comprometimento restrito e limitado à laringe, traqueia ou retrofaringe, sem disseminação para outros órgãos ou tecidos.

Com efeito, conforme observado por Mello et al (2002), em sobrenadantes de PBMCs de pacientes da forma unifocal frente a antígeno de *P. brasiliensis* houve uma tendência à maior secreção de IFN- γ (que pode ser induzida por IL-12), em contraste com a presença de maiores níveis de IL-4 e IL-5 na forma multifocal. Neste contexto, Sadahiro et al (2007), associaram a forma crônica unifocal ao alelo DRB1*11 do complexo de histocompatibilidade (HLA) num estudo que envolveu 80 pacientes com paracoccidioidomicose.

Considerando a distribuição das frequências dos genótipos, observou-se similaridade entre os grupos controle e de pacientes, sendo mais frequente o genótipo AA e o alelo A em ambos. O alelo A foi também predominante na tuberculose (Lee et al, 2005) e na doença pulmonar micobacteriana não-tuberculosa (Park et al, 2008). Neste último trabalho, porém, observou-se maior predominância do genótipo AG em pacientes e controles, diferindo dos nossos achados, possivelmente por ter sido realizado na população coreana.

A frequência do alelo G no grupo controle e de pacientes foi semelhante à observada por Sortica et al (2012) na população brasileira e de etnia africana (10 – 24 %), sendo menor quando comparada às etnias europeia (30 – 38 %) e

asiática (34 – 49 %), e maior quando comparada à população nativa brasileira (1 %) (Zembrzuski et al, 2010).

Em relação ao estudo da cinética de IFN- γ , IL-12p40 e p70, foram observados maiores níveis destas citocinas nos períodos de 144h para IFN- γ e IL-12p40, e 24h para IL-12p70. A maior secreção de IFN- γ em 144h, também foi vista por Sadahiro et al (2007) em pacientes com PCM curada/tratada (CT) frente aos antígenos *P. brasiliensis* (AgPb) e o purificado (gp43), este último presente no antígeno de CFA. Estes resultados diferem de outros autores que estudaram as citocinas na PCM humana, e utilizaram períodos de 48-120 horas para análise de IFN- γ (Oliveira et al, 2002; Benard et al, 2001; Karhawi et al, 2000). Tal diferença pode ser devida às diferentes técnicas utilizadas para obtenção e purificação dos antígenos, além disso os pacientes são de fase clínica diferente, e ainda há outros componentes além da gp43 no antígeno de CFA, o que reforça a utilidade da cinética realizada.

Paralelamente, estudos com cinética da expressão RNA mensageiro (RNAm) de IFN- γ , etapa que antecede a secreção da mesma, registraram a expressão de RNAm em culturas estimuladas com PHA a partir de 3h entre os indivíduos infectados e com a forma crônica ativa. A forma aguda (juvenil) ativa expressa menos RNAm em comparação aos demais grupos (Mamoni & Blotta, 2005; Castro et al, 2013).

Em relação à dosagem de IL-12p40 e p70, os resultados diferem dos encontrados na literatura em que a maior secreção é de 18 horas para IL-12p70 e 48 horas para ambas (Romano et al, 2005; Oliveira et al, 2002) frente ao antígeno bruto AgPb e purificado gp43, respectivamente. O CFA tem como um

dos componentes a gp43, mas os demais componentes que o constituem podem interagir com as células T, resultando em um período de secreção heterogêneo.

Outro estudo detectou IL-12 intracelular em monócitos com estímulo de LPS por 24 horas, observando uma frequência elevada nas células dos pacientes com a forma crônica, sugerindo que a secreção desta citocina ocorra após 18h dependendo do estímulo, com expressão e secreção em 24 horas, como encontrado em nosso estudo para IL-12p70.

Desta forma, escolhido o melhor período de secreção das citocinas, foi analisada relação dos genótipos e alelo, segundo a forma e fase clínica da PCM. Não foi possível estabelecer a associação entre os genótipos dos SNPs de *IFNG*, *IL12B* e *IL12RB1* e a secreção das suas respectivas citocinas, diferentemente de outros estudos (Pravica et al, 1999; Seegers et al, 2002; Stanilova & Miteva, 2005; Selveraj et al, 2008; Matos et al, 2007; Medina et al, 2011; Cardoso et, 2010; Akahoshi et al, 2003). Esta discrepância pode ser devido diferença na etnia, doença e desenho do estudo (número de pacientes, estímulo dado a PBMCs, material biológico analisado e estudo de haplótipos).

Os resultados significantes da secreção de citocinas em relação aos alelos dos SNPs *IFNG*, *IL12B* e *IL12RB1* (**Tabela 46**), sugerem que a secreção das citocinas IFN- γ , IL-12p40 e p70 seja independente do polimorfismo, e parece estar relacionada à evolução da PCM, visto que os pacientes do grupo DA secretam menores níveis destas citocinas do que os do grupo CT e CO, frente a PHA (**Tabelas 39, 40, 42-45**).

Tais resultados relativos à melhor resposta segundo a evolução clínica foram registrados anteriormente por Karhawi et al (2000), frente a PHA e antígeno AgPb. Paralelamente, Benard et al (1996) observaram que a PCM ativa

apresenta um papel de imunossupressão celular transitória aos antígenos de *P. brasiliensis*, enquanto em pacientes tratados a resposta é restaurada. Em 2007, um estudo realizado por Bozzi et al mostrou, em pacientes não tratados e durante o tratamento, presença de proliferação de células T CD4⁺ e produção de IFN- γ , frente a antígenos do fungo. Em contraste, as células dos pacientes que reativaram a doença, após a aparente cura clínica, apresentaram maior produção de IL-4, com ativação de células de memória B.

Adicionalmente, Romano et al (2005) observaram que a expressão do receptor $\beta 1$ de IL-12 foi alta no grupo com PCM ativa (crônico e agudo), com aproximadamente em 50 % das células T, similarmente ao encontrado nos dois grupos de indivíduos curado e infectado, corroborando os nossos achados em que não houve diferença na secreção de citocina IFN- γ em relação ao SNP *IL12RB1* entre as fases da PCM. Paralelamente, a similaridade nos níveis de IL-12p40 e p70 observados nos diferentes genótipos e alelos sugere que a expressão deste receptor não seja alterada.

O presente estudo analisou as frequências genótípicas e alélicas dos SNPs dos genes de *IFNG*, *IL12B* e *IL12RB1* entre os indivíduos do grupo controle e de pacientes com paracoccidioidomicose, bem como suas formas clínicas, não sendo observada qualquer associação, similarmente aos dados já relatados para SNPs isolados em uma grande variedade de infecções (toxoplasmose, hepatite B e hepatite C) e outras doenças (lupus eritematosos disseminado, carcinoma hepatocelular por vírus da hepatite B) (Neves et al, 2012; Matos et al, 2007; Miteva et al, 2010; Liu et al, 2011; Mueller et al, 2004; Youssef et al, 2013).

Essas observações diferem dos resultados relatados em colombianos com doença de Chagas (Zafra et al, 2007; Torres et al, 2010), em quenianos com

anemia grave da malária (Ong'echa et al, 2011), e chineses com tuberculose (Ding et al, 2008). Estas diferentes observações poderiam ser explicadas pela heterogeneidade das frequências genotípicas em cada população (Bagheri et al, 2006), bem como o número de indivíduos em cada estudo.

Além de SNPs, outras deficiências podem ocorrer no eixo IL-12/IFN- γ . A deficiência do receptor de IFN- γ , por exemplo, foi descrita na forma mais disseminada de histoplasmose, coccidioidomicose e micobacteriose (Zerbe et al, 2005; Vinh et al, 2009; Marazzi et al, 2010).

Por outro lado, estudando citocinas imunoregulatórias, Bozzi et al (2006 e 2009) observaram associação da doença paracoccidioidomicose com SNP na posição -1082 da região promotora do gene de IL-10, bem como com SNP na posição -590C/T no gene de IL-4, sugerindo que outras vias possam estar relacionadas a esta doença.

Um fator limitante neste trabalho foi o número de culturas realizadas que, após estratificação por SNPs resultou em pequeno número, devido à menor demanda de pacientes mesmo em vários centros. Segundo Coutinho et al (2015), o número de admissões em hospitais na Região Sudeste tem diminuído e segundo Fabris et al (2014), há nítido decréscimo da incidência da forma aguda na região centro-oeste do país. Outro fator é a miscigenação da população brasileira, que cria uma diversidade de grupos étnicos, diminuindo o número de indivíduos conforme a estratificação nas etnias pelos SNPs.

Desta forma, este estudo salienta que a secreção de citocinas foi dependente da evolução da doença e não dos polimorfismos nos SNPs, sendo maior em pacientes tratados/curados do que na fase de doença ativa, confirmando vários estudos já registrados. Paralelamente, sugere que pacientes

de diferentes etnias particularmente amarela e da forma crônica unifocal devam ser inseridos em estudos mais amplos para SNP *IL12RB1* A/G e SNP *IFNG*+874T/A, abrindo também perspectivas para ampliar pesquisas em polimorfismos em genes de outras citocinas, e de receptores de IFN- γ , além da associação com os níveis de citocinas secretados, a fim de esclarecer a participação de fatores genéticos na resposta imune à paracoccidiodomicose.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A análise comparativa da frequência do genótipo do SNP *IFNG* +874T/A não demonstrou diferença estatisticamente significativa na comparação entre as formas clínicas da paracoccidiodomicose, da mesma forma que a frequência alélica deste mesmo polimorfismo.
2. Similarmente, as frequências genotípica e alélica do polimorfismo *IL12B* +1188 A/C demonstraram similaridade entre as diferentes formas clínicas da paracoccidiodomicose.
3. Não se observaram diferenças entre as formas clínicas no estudo do polimorfismo do gene *IL12RB1* A/G decorrente da troca de A por G, que em homozigose poderia levar à expressão deficiente do receptor.
4. Na comparação entre a forma crônica multifocal e unifocal no sexo masculino, observou-se predomínio do genótipo AA na forma multifocal e AG na unifocal do SNP *IL12RB1* 11014 A/G, sugerindo sua relação com a forma crônica mais disseminada nesta população. A presença de menores níveis de IL-12p40 frente a PHA em portadores do alelo A dos grupos CR e DA, embora sem significância estatística, estaria de acordo com tal associação entre a forma crônica mais disseminada em homozigose (AA), e mais localizada em heterozigose (AG).

5. No grupo de pacientes, observou-se diferença estatisticamente significativa à análise comparativa entre as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *IFNG* +874 T/A, *IL12RB1* A/G, segundo as etnias.

6. Não se observou associação entre os genótipos/alelos dos SNPs *IFNG* +874 T/A, *IL12B* +1188 A/C e *IL12RB1* A/G e os níveis de citocinas secretadas, que estariam relacionados à forma clínica e fase da PCM, curada-tratada ou ativa, e não aos polimorfismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- Abhimanyu, Mangangcha IR, Jha P, Arora K, Mukerji M et al. Differential serum cytokine levels are associated with cytokine gene polymorphism in the north Indians with active pulmonar tuberculosis. *Infect Genet Evol*. 2011, 11:1015-1022.
- Albuquerque MC, Aleixo ALQC, Benchimol EI, Leandro ACCS, Neves LB, Vicente RT et al. The IFN- γ +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009, 104(3):451-455.
- Amim LHLV, Pacheco AG, Fonseca-Costa J, Loredó CS, Rabahi MF, Melo MH et al. Role of the IFN- γ +874T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol Biol Rep*. 2008. 35:563-566.
- Altare F, Durandy A, Lammas D, Emile J, Lamhamed S, Le Deist F. Impairment of mycobacterial immunity in human Interleukin-12 receptor deficiency. *Science*. 1998. 280:1432-1435.
- Alvarado-Navarro A, Montoya-Buelna M, Muñoz-Valle JF, López-Roa RI, Guillén-Vargas C, Fafutis-Morris M. The 3' UTR 1188 A/C polymorphism in the interleukin-12p40 gene (IL-12B) is associated with lepromatous leprosy in the west of Mexico. *Immunol Lett*. 2008. 118:148-151.
- Akahoshi M, Nakashima H, Miyake K et al. Influence of interleukin-12 receptor β 1 polymorphisms on tuberculosis. *Hum Genet*. 2003. 112:237-243.
- Anjos AR, Calvi SA, Ferracini R, Peraçoli CL, Silva CL, Soares AMVC. Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing β -glucan in tumor necrosis factor- α production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. *Med Mycol*. 2002. 40:377-382.
- Arruda C, Franco MF, Kashino SS, Nascimento FRF, Fazioli RA, Vaz CAC et al. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary infection. *Clin Immunol*. 2002. 103(2):185-195.
- Bagheri M, Abdi-Rad I, Omrani D, Khalkhali HR. Heterogeneity of cytokine single-nucleotide polymorphisms among the Iranian and the others East-South Asian populations. *Transfusion Med*. 2006. 16:192-199.
- Bahgat NA, Kamal MM, Abdelaziz AO, Mohye MA, Shoush HI, Ahmed MM et al. Interferon- γ and interleukin-10 gene polymorphisms are not predictors of chronic hepatitis C (genotype-4) disease progression. *Asian Pac J Prev*, 2015. 16:5025-5030.

- Balderramas BA, Penitenti M, Rodrigues DR, Bachiega TF, Fernandes RK, Ikoma MRV et al. Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. *Cytokine*. 2014. 67:36-43.
- Belissimo-Rodrigues F, Machado AA, Martinez R. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of 1000-cases series from a hyperendemic area on the Southeast of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011. 85(3):546-550.
- Belissimo-Rodrigues F, Bollela VR, Fonseca BAL, Martinez R. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. *Med Mycol*. 2013. 51(3):313-318.
- Benard G, Hong MA, Del Negro GMB, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJS. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1996. 54(1):7-12.
- Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Gianninni MJS, Duarte AJS. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2001. 13:248-52.
- Bhanothu V, Lakshmi V, Theophillus JP, Rozati R, Badhini P, Vijayalaxmi B. Investigation of Toll-like receptor-2 (2258G/A) and Interferon-gamma (+874T/A) gene polymorphisms among infertile women with female genital tuberculosis. *Plos One*. 2015. 26:1-28.
- Blotta MHSL, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér AS, Papaiordanou PMO et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg*. 1999. 61(3):390-394.
- Blotta MHSL, Camargo ZP. Immunological response to Cell-Free Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 1993. 31:671-676.
- Bozzi A, Pereira PPN, Reis BS, Goulart MI, Pereira MCN, Pereira EP et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor- α single nucleotide gene polymorphism frequency in paracoccidioidomycosis. *Hum Immunol*. 2006. 67:931-939.
- Bozzi A, Reis BS, Goulart M, Pereira MCN, Pedroso EP, Goes AM. Analysis of memory T cells in the human paracoccidioidomycosis before and during chemotherapy treatment. *Immunol Lett*. 2007. 114:23-30.
- Bozzi A, Reis BS, Pereira PP, Pedroso EP, Góes AM. Interferon- gamma and interleukin-4 single nucleotide gene polymorphisms in paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2009. 48:212-217.
- Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa das características étnico-raciais da população [Internet]. 2008 [about 95p]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/caracteristicas_raciais/PCERP2008.pdf
- Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). CENSO demográfico: Características gerais da população, religião e pessoas com deficiência. 2010.

- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993. 6(2):89-117.
- Calich VLG, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998. 31:615-623.
- Calvo J, Martínez N, Etxagibel A, Calleja S, Sáez-Torres C et al. Allelic frequencies of polymorphic variants of cytokine genes (IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IL10, IL12p40 and IFNG) in a Spanish population. *Immunología.* 2002. 21:76-86.
- Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J Med Vet. Mycol.* 1991. 29:31-38.
- Castro LF, Ferreira MC, Silva RM, Blotta MHSL, Longhi LN, Mamoni RL. Characterization of immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect.* 2013. 67:470-485.
- Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, Venturini J et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum Genet.* 2010. 128:481-490.
- Carvalho VCV, Macêdo JL, Lima CAD, Lima MCG, Heráclio SA, Amorim M et al. IFN-gamma and IL-12B polymorphisms in women with cervical intraepithelial neoplasia caused by human papillomavirus. *Mol Biol Rep.* 2012. 39:7627-7634.
- Chen T, Liang W, Gao L, Wang Y, Liu Y et al. Association of single nucleotide polymorphism in interleukin 12 (IL-12A e -B) with asthma in Chinese population. *Human Immun.* 2011. 72:603-606.
- Cheong JY, Cho SW, Chung SG, Lee JA, Yeo M et al. Genetic polymorphism on interferon- γ , interferon- γ receptor, and interferon regulatory factor-1 genes in patients with hepatitis B virus infection. *Biochem Genet.* 2006. 44(5/6):246-255.
- Cooke GS, Campbell SJ, Silah J, Gustafson P, Bah B, Sirugo G et al. Polymorphism within the interferon- γ /receptor complex is associated with pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006. 174:339-343.
- Coutinho ZF, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM, Saboroza PC, Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública.* 2002. 18(5):1441-1454.
- Coutinho ZF, Wanke B, Travassos C, Oliveira RM, Xavier DR, Coimbra Júnior CEA. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). *Trop Med Int Health.* 2015. 20(5):673-678.
- Dai C, Chuang W, Hsieh M, Lee L, Hou N, et al. Polymorphism of interferon-gamma +874 and clinical characteristics of chronic hepatitis C. *Transl Res.* 2006. 148(3):128-133.
- Decken K, Kohler G, Palmer-Lehmann K, Wunderlin A, Mattner F, Magram J et al. Interleukin-12 is essential for protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 1998. 66(10):4994-5000.

- Ding S, Li L, Zhu X. Polymorphism of interferon- γ gene and risk of tuberculosis in the southeastern Chinese population. *Hum Immunol*. 2008. 69:129-133.
- Eleutério Júnior J, Teles RA, Linhares IM, Normand N, Witkin SS. Interferon-gamma gene polymorphism influences the frequency of *Chlamydia trachomatis* cervical infection in young women. *Int J STD AIDS*. 2014. 1-5.
- Fabris LR, Andrade UV, Ferreira dos Santos A, Marques APC, Oliveira SMVL et al. Decreasing prevalence of the acute/subacute clinical form of paracoccidioidomycosis in Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Rev Inst Med Trop*. 2014. 56(2):121-125.
- Falletti E, Fabris C, Toniutti P, Fontanini E, Cussigh A, et al. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and liver fibrosis progression due to recurrent hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res*. 2007. 27:239-246.
- Franco M, Montenegro MR, Marques RS, Dillon L. Host-parasite relationship in Paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*. 1987. 25:5-9.
- Frachim CS, Sass N, Mattar R, Pendeloski KPT, Lin LH, Torlono MR et al. Inflammatory mediators gene polymorphisms in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2011. 30:338-341.
- Frieschi C, Casanova J. The role of interleukin-12 in human infectious diseases: only a faint signature. *Eur J Immunol*. 2003. 33:1461-1464.
- Hall MA, McGlinn E, Coakley G, Fisher SA, Boki K et al. Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease. *Genes Immun*. 2000. 1:219-224.
- Hashemi M, Sharifi-Mood B, Nezamdoost M, Moazeni-Rood A, Naderi M et al. Functional polymorphism is associated with pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. *Prague Med Rep*. 2011. 112:38-43.
- He D, Tao S, Guo S, Li M, Wu J, Huang H et al. Interaction of TLR-IFN and HLA polymorphisms on susceptibility of chronic HBV infection in Southwest Han Chinese. *Liver Int*. 2014. 35(8):1941-1949.
- Hegazy D, Thurairajah P, Metzner M, Houldsworth A, Shaw S, Kaminski E et al. Interleukin 12B gene polymorphism and apparent resistance to hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol*. 2008. 152:538-541.
- Houldsworth A, Metzner M, Rossol S, Shaw S, Kaminski E et al. Polymorphism in the IL-12B gene outcome of the HCV infection. *J. Interferon Cytokine Res*. 2005. 25:271-276.
- Ito C, Watanabe M, Okuda N, Watanabe C, Iwatani Y. Association between the severity of Hashimoto's Disease and the functional +874T/A polymorphism in the interferon- γ gene. *Endocr J*. 2006. 4:473-478.
- Kalmar EMN, Alencar FEC, Alves FP, Pang LW, Del Negro GMB et al. Paracoccidioidomycosis: an epidemiologic survey in a pediatric population from the Brazilian Amazon using testing skin tests. *Am J Trop Med Hyg*. 2004. 71:82-86.

- Kanchan K, Jha P, Pati SS, Mohanty S, Mishra SK, Sharma SK et al. Interferon- γ (IFNG) microsatellite repeat and single nucleotide polymorphism haplotypes of IFN- α receptor (IFNAR1) associated with enhanced malaria susceptibility in Indian populations. *Infect Genet Evol.* 2015. 29:6-14.
- Karhawi AS, Colombo AL, Salomão R. Production of IFN- γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. *Med Mycol.* 2000. 38:225-229.
- Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CAC, Burger E et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- γ production. *J Interferon and Cytokine Res.* 2000. 20:89-97.
- Kusuhara K, Yamamoto K, Okada K, Mizuno Y, Hara T. Association of IL12RB1 polymorphisms with susceptibility to and severity of tuberculosis in Japanese: a gene-based association analysis of 21 candidate genes. *Int J Immunogenet.* 2007. 34:35-44.
- Lacaz CS. South American Blastomycosis. *An Fac Med.* 1956. 29:7-120.
- Leandro ACCS, Rocha MA, Lamoglia-Souza A, Vandeberg JL, Rolla VC, Bonecini-Almeida MG. No association of IFNG +871T/A SNP and NOS2A -654G/C SNP variants with nitric oxide radial serum levels or susceptibility to tuberculosis in Brazilian population subset. *Biomed Res Int.* 2013. 1-7.
- Lee HW, Lee HS, Kim DK, Ko DS, Han SK. Lack of an association between interleukin-12 receptor β 1 polymorphism and tuberculosis in Koreans. *Respiration.* 2005. 72:365-368.
- Liu L, Xu Y, Liu Z, Chen J, Zhang Y, Zhu J et al.. IL12 polymorphisms, HBV infection and risk of hepatocellular carcinoma in a high-risk Chinese population. *Int J. Cancer.* 2011. 128:1692-1696.
- Livonesi MC, Souto JT, Campanelli AP, Maffei CML, Martinez R, Rossis MA, Silva JS. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. *Med Mycol.* 2008. 46:637-646.
- Lobashevsky AL, Manwaring JE, Travis MM, Nord BL, Higgins NG, Serov YA et al. Effect of desensitization in solid organ transplant recipients depends on some cytokines genes polymorphism. *Transpl Immunol.* 2009. 21:169-178.
- Longhi LNA, Silva RM, Fornazim MC, Spago MC, Oliveira RTD et al. Phenotypic and functional characterization of NK cells in human immune response against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Immunol.* 2012. 189:935-945.
- Ma X, Reich RA, Gonzales O, Pan X, Fothergill AK et al. No evidence for association between the polymorphism in the 3' untranslated region of interleukin-12B and human susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis.* 2003. 118:1116-1118.
- Mabunda N, Alvarado-Arnez LE, Vubil A, Mariamo A, Pacheco AG, Jani IVJ, Moraes MO. Gene polymorphisms in patients with tuberculosis from Mozambique. *Mol Biol Rep.* 2015. 425:71-76.

- Mamoni RL, Blotta MHS. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine*. 2005. 32:20-29.
- Mamoni R L, Blotta MHS. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2006. 35:207-216.
- Marazzi MG, Chapgier A, Defilippi A, Pistioia V, Mangini S et al. Disseminated *Mycobacterium scrofulaceum* infection in a child with interferon- γ receptor 1 deficiency. *Int J Infect Dis*. 2010. 14:167-170.
- Marques AS, Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycosis associated with immunosuppression, *AIDS and cancer*. In: Franco M, Lacaz LC, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. (eds) Paracoccidioidomycosis, Boca Raton, Florida: CRC Press. 1994. 393-405.
- Matos GI, Covas CJF, Bittar RC, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC et al. IFNG +874 T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN- γ production. *BMC Infect Dis*. 2007. 7(33):1741-2334.
- Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol*. 2006. 23:65-73.
- Medina TS, Costa SPT, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF et al. Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malar J*. 2011. 10(264):1-10.
- McComarck RM, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Middleton D, Savage DA. The IL-12B 3' untranslated region DNA polymorphism is not associated with early-onset type 1 diabetes. *Genes Immun*. 2002. 3:433-435.
- Mello LM, Silva-Vergara M, Rodrigues VJ. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high Interleukin-4 and Interleukin-5 production. *Hum Immunol*. 2002. 6(2):149-154.
- Mezger M, Steffens M, Beyer M, Manger C, Eberle J, Toliat M et al. Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2008. 111(2):534-536.
- Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T et al. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection-association between TGF- β 1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2005. 42:505-510.
- Miteva LD, Manolova IM, Ivanova MG, Rashkov RK, Stoilov RM et al. Functional genetic polymorphism in the interleukin-12 gene is associated with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2010. 32:53-59.

- Morris GA, Edwards DRV, Hill PC, Wejse C, Bisseye C, Olesen R et al. Interleukin 12B (IL12B) genetic variation and pulmonary tuberculosis: a study of cohorts from the Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina. *Plos One*. 2011. 6(2):1-10.
- Moraes-Vasconcelos D, Grumach AS, Yamaguti A, Andrade MEB, Fieschi C, Beaucoudrey L, Casanova J, Duarte JS. *Paracoccidioides brasiliensis* disseminates disease in a patient with inherited deficiency in the β 1 subunit of the Interleukin (IL)-12/ IL-23 receptor. *Clin Infect Dis*. 2005. 41:31-37.
- Mueller T, Mas-Marques A, Sarrazin C, Wiese M, Halangk J, Witt H et al. Influence of interleukin 12B (IL12B) polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2004. 41:652-658.
- Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete Interferon- γ upon combined stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med*. 1998. 187(12):2103-2108.
- Nakaira-Takahagi E, Golim MA, Bannwart CF, Puccia R, Peraçoli MTS. Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. *Med Mycol*. 2011. 49:694-703.
- Neves ESN, Curi ALL, Albuquerque MC, Palhano-Silva CS, Silva LB, Bueno WF et al. Genetic polymorphism for IFN- γ +874 T/A in patients with acute toxoplasmosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012 45(6):751-760.
- Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PMO, Blotta MHSL. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect*. 2002. 4:139-144.
- Onay H, Ekmekci AY, Durmaz B, Sayin E, Cosar E et al. Interferon- γ gene and interferon- γ receptor-1 gene polymorphisms in children with tuberculosis from Turkey. *Scand J Infect Dis*. 2010. 42:39-42.
- Ong'echa JM, Raballah EO, Kempaiah PM, Anyona S B, Were T, Davenport G C et al. Polymorphic variability in the 3' untranslated region (UTR) of IL12B is associated with susceptibility to severe anaemia in Kenyan children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *BMC Genet*. 2011. 12(69):1-9.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct form from IL-12. *Immunity*. 2000. 13:715-725.
- Park HY, Kwon YS, Ki C, Suh G, Chung MP et al. Interleukin-12 receptor β 1 polymorphism and nontuberculous mycobacterial lung disease. *Lung*. 2008. 186:241-245.
- Pereira VA, Sánchez-Arcila JC, Teva A, Perce-da-Silva DS, Vasconcelos MPA, Lima CAM et al. IL10A genotypic association with decreased IL-10 circulating levels in malaria infected individuals from endemic area of the Brazilian Amazon. *Malar J*. 2015. 14(30):1-12.

- Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009. 104(3):513-521.
- Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human gene. *Eur J Immunogenet*. 1999. 26:1-3.
- Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee J, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. *H Immunol*. 2000. 61:863-866.
- Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu C et. al. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two β -type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci*. 1996. 93:14002-14007.
- Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia: J Med Vet Mycol*. 1985. 23:323-334.
- Restrepo A, Gómez BL, Tobón A. Paracoccidioidomycosis: Latin American's own fungal disorder. *Curr Fungal Infect Rep*. 2012. 6:303-311.
- Rodrigues DR, Fernandes RK, Balderramas HÁ, Penitenti M, Bachiega TF, Calvi SA et al. Interferon-gamma production by human neutrophils upon stimulation by IL-12, IL-15 and IL-18 and challenge with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Cytokine*. 2014. 69:102-109.
- Romano CC, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. *Cytokine*. 2002. 18(3):149-157.
- Romano CC, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. The role of interleukin-10 in the differential expression. Of interleukin-12p70 and its β 2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. *Clin Immunol*. 2005. 114:86-94.
- Sadahiro A, Roque ACM, Shikanai-Yasuda MA. Generic human leukocyte antigen class (DRBI and DQBI) alleles in patients with paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2007. 45:35-40.
- Sadahiro A, Diogo CL, Oshiro TM, Shikanai-Yasuda MA. Kinetics of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43 peptides, in patients cured paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007. 40(2):156-162.
- Sakai T, Matsuoka M, Aoki M, Nosaka K, Mitsuya H. Missense mutation of the interleukin-12 receptor β 1 chain-encoding gene is associated with impaired immunity against *Mycobacterium avium* complex infection. *Blood*. 2001. 97:2688-2694.
- Sato PK, Oshiro TM, Diogo CL, Passos EC, Shikanai-Yasuda MA. Characterization of monocyte-derived dendritic cells from patients with active and treated paracoccidioidomycosis. *Scand J Immunol*. 2011. 74:608-618.

- Saxena R, Chawla YK, Verma I, Kaur J. Effect of IL-12B, IL-2, TGF- β 1 and IL-4 polymorphism and expression on hepatitis B progression. *J Interferon Cytokine Res*. 2014. 34(2):117-128.
- Schepers K, Schandené L, Bustamante J, Van Vooresz J, de Suremain M et al. IL-12R β 1 deficiency and disseminated *Mycobacterium tuberculosis* disease. *J Clin Immunol*. 2013. 33:1285-1288.
- Schindler H, Lutz MB, Rollinghoff M, Bodgan C. The production of IFN- γ by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol*. 2001. 166:3075-3082.
- Seegers D, Zwiars A, Strober W, Peña AS, Bouma GA. TaqI polymorphism in the 3' UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. *Genes Immun*. 2002. 3:419-423.
- Senanayake MP, Kumararatne DS, Doffinger R, Barcenas-Morales G. Disseminated BCG in an infant with interleukin-12 receptor B1 (IL12RB1) deficiency. *Paediatric Int Child Health*. 2015. 35(1):69-71.
- Sun Y, Lu Y, Li T, Xie L, Deng Y, Li S, Qin X. Interferon Gamma +874T/A polymorphism increases the risk of hepatitis virus-related diseases: evidence from meta-analysis. *Plos One*. 2015. 1-15.
- Tang S, Yue M, Wang J, Zhang Y, Yu R, Su J et al. Associations of IFN- γ rs2430561 T/A, IL28B rs12979860 C/T and ER α rs2077647 T/C polymorphisms with outcomes of hepatitis B virus infection: a meta-analysis. *J Biomed Res*. 2014. 28(6):484-493.
- Selma WB, Harizi H, Bougmiza I, Hannachi N, Kahla IB et al. Interferon Gamma +874 T/A polymorphism is associated with susceptibility to active pulmonary tuberculosis development in Tunisian patients. *DNA and Cell Biol*. 2011. 6:379-387.
- Selvaraj P, Alagarasu K, Harishankar M, Vidyarani M, Nisha Rajeswari D, Narayanan PR. Cytokine gene polymorphism and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Cytokine*. 2008. 43:26-33.
- Senanayake MP, Kumararatne DS, Barcenas-Morales G. Disseminated BCG in infant with interleukin-12 receptor B1 (IL12RB1) deficiency. *Paediatr Inf Child Health*. 2014. Disponível em: <http://www.maneyonline.com/doi/full/10.1179/2046905514Y.0000000129>.
- Shen C, Jiao W, Feng W, Wu Z, Xiao J et al. IFNG polymorphisms are associated with tuberculosis in Han Chinese pediatric female population. *Mol Biol Rep*. 2013. 40:5477-5482.
- Shikanai-Yasuda MA, Filho FQT, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML, Kono A. S et al. Guidelines in Paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 39(3):297-310.
- Sieburth D, Jabs EW, Warrington JA, Li X, Lasota J, LaForgia S et al. Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics*. 1992. 14:59-62.

- Silva GAV, Naveca FG, Ramasawmy R, Boechat AL. Association between the IFNG +874 A/T gene polymorphism and leprosy resistance: a meta-analysis. *Cytokine*. 2014. 65:130-135.
- Souto J, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol*. 2000. 156(5):1811-1820.
- Sortica VA, Cunha MG, Ohnishi DO, Souza JM, Ribeiro-dos-Santos AKC et al. IL1B, IL4R, IL12RB1 and TNF gene polymorphisms are associated with *Plasmodium vivax* malaria in Brazil. *Malar J*. 2012. 11(409):1-7.
- Stanilova S, Miteva L. Taq-I polymorphism in 3' UTR of the IL-12B and association with IL-12p40 production from human PBMC. *Genes Immun*. 2005. 6:364-366.
- Tabone T & Morahan G. Definition of polymorphisms in the gene encoding the interleukin-12 receptor B1 subunit: testing linkage disequilibrium with type I diabetes susceptibility. *Genes Immun*. 2003. 4:222-227.
- Texeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*. 2009. 52:273-283.
- Torres OA, Galzada JE, Beraún Y, Morillo CA, González A, González CI, Martín J. Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infect Genet Evol*. 2010. 10:682-685.
- Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K et al. Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'- untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci*, 2002. 30:161-166.
- Vallinoto ACR, Graça ES, Araújo MS, Azevedo VN, Cayres-Vallinoto I et al. IFNG +874 T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection and clinical manifestation of tuberculosis. *Hum Immunol*. 2010. 71:692-696.
- Vandenbroeck K, Goris A. The IFNG-IL23-IL22 cytokine gene cluster, 2006. In: Vandenbroeck, K (ed) Cytokine gene polymorphisms in multifactorial conditions, Vol 1. CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, 157-174.
- Vieira GD, Alves TC, Lima SMD, Camargo LMA, Sousa CM. Paracoccidioidomycosis in western Brazilian Amazon state: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014. 47(1):63-68.
- Vinh DC, Masannat F, Dzioba RB, Galgiani JN, Holland SM. Refractory disseminated coccidioidomycosis & mycobacteriosis in Interferon- γ Receptor Deficiency. *Clin Infect Dis*. 2009. 49:62-65.
- Vinh DC, Schwartz B, Hsu AP et al. Interleukin-12 receptor β 1 deficiency predisposing to disseminated coccidioidomycosis. *Clin Infect Dis*. 2011. 52:e99-e102.
- Visentainer JEL, Sell AM, Silva GC, Cavichioli ADG, Franceschi DSA et al. TNF, IFNG, IL6, IL10 e TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. *Int J Immunogenet*. 2008. 35:287-293.

- Wang D, Feng J, Li Y, Zhang D, Li X et al. Genetic variants of MRC1 gene and the IFNG gene are associated with leprosy in Han Chinese from the Southwest China. *Hum Genet.* 2012. 131:1251-1260.
- Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. (eds). Paracoccidioidomycosis, CRC Press, Boca Raton. 1994. 109-120.
- Yilma, V, Yentür SP, Saruhan-Direskeneli G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine.* 2005. 30:188-194.
- Youssef SS, El-Aal AMA, Nasr AS, Zanaty T, Seif SM. Interleukin-12B gene polymorphism frequencies in Egyptians and sex-related susceptibility to hepatitis C infection. *J Interferon Cytokine Res.* 2013. 33(8):415-419.
- Youssef SS, El-Aal AMA, Saad A, Omran MH, Zanathy TE, Seif SM. Impact of IL12B gene rs 3212227 polymorphism on fibrosis, liver inflammation, and response to treatment in genotype 4 egyptian hepatitis C patients. *Dis Markers.* 2013. 35(5):431-435.
- Zafra G, Morillo C, Martín J, González A, González CI. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes Infect.* 2007. 9:1049-1052.
- Zembrzuski VM, Basta PC, Callegari-Jacques SM, Santos RV, Coimbra CEA et al. Cytokines genes are associated with tuberculin skin test response in a native Brazilian population. *Tuberculosis.* 2010. 90:44-49.
- Zerbe CS, Holland SM. Disseminated histoplasmosis in persons with interferon- γ receptor 1 deficiency. *Clin Infect Dis.* 2005. 41:38-41.