

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS**

MARCELA MIRANDA TONACO

**AVALIAÇÃO DE PERFIL E FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS T DE MEMÓRIA EM
INDIVÍDUOS CURADOS DE TUBERCULOSE PULMONAR E COM INFECÇÃO
LATENTE PELO *Mycobacterium tuberculosis***

Belo Horizonte-MG
2015

MARCELA MIRANDA TONACO

**AVALIAÇÃO DE PERFIL E FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS T DE MEMÓRIA EM
INDIVÍDUOS CURADOS DE TUBERCULOSE PULMONAR E COM INFECÇÃO
LATENTE PELO *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação, como requisito parcial para obter o grau de mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

Orientadora Prof^a. Dr^a. Tânia Mara Pinto Dabés
Guimarães - UFMG

Co-orientador Prof. Dr. Vicente de Paulo Coelho
Peixoto de Toledo - UFMG

Belo Horizonte-MG
2015

T663a Tonaco, Marcela Miranda.
Avaliação de perfil e funcionalidade de células T de memória em indivíduos curados de tuberculose pulmonar e com infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* / Marcela Miranda Tonaco. – 2015. 127 f. il.

Orientadora: Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães.
Co-orientador: Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Tuberculose - Teses. 2. Infecção latente - Teses. 3. Linfócitos - Teses. 4. Células de Memória - Teses. 5. Marcadores de superfície - Teses. 6. CD45Ro - Teses. 7. CD27 - Teses. 8. Citocinas - Teses I. Guimarães, Tânia Mara Pinto Dabés. II. Toledo, Vicente de Paulo Coelho Peixoto de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.995



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

UFMG

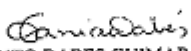
FOLHA DE APROVAÇÃO

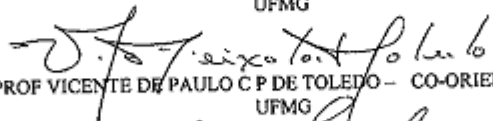
AVALIAÇÃO DE PERFIL E FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS T DE MEMÓRIA EM INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO LATENTE PELO *Mycobacterium tuberculosis*

MARCELA MIRANDA TONACO

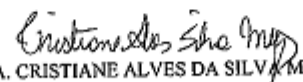
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 24 de setembro de 2015, pela banca constituída pelos membros:


PROFA. TANIA MARA PINTO DABES GUIMARAES - ORIENTADOR
UFMG


PROF VICENTE DE PAULO C P DE TOLEDO - CO-ORIENTADOR
UFMG


Prof. CLÁUDIO JOSÉ AUGUSTO
FUNED


PROFA. CRISTIANE ALVES DA SILVA MENEZES
UFMG

Belo Horizonte, 24 de setembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai de infinita bondade, que é fonte de coragem, sabedoria, inspiração, esperança e superação em minha vida, por todas as bênçãos recebidas e por me proporcionar mais esta grande vitória!

À Professora Tânia Mara P. D. Guimarães, pela confiança, compreensão, ensinamentos e incentivo à pesquisa! Seu exemplo de profissional e de humanismo estará sempre presente em minha vida!

Ao Professor Vicente P. C. de Peixoto Toledo, pelo incentivo e por lutar sempre pelo desenvolvimento da pesquisa e docência, ao contribuir diretamente pela formação da primeira turma do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas – PPGACT/UFMG. Muito obrigada!

À Professora Silvana Spíndola de Miranda, e todo o grupo de pesquisa em Tuberculose, pelos ensinamentos, exemplo e incentivo no desenvolvimento científico!

A meus pais, Isauro e Valéria, verdadeiros exemplos de luta e superação, pelo amor incondicional, por todos os incentivos recebidos e por sempre acreditarem na minha evolução profissional e humana!

Ao Iácones, pela compreensão infinita, por todo apoio durante a jornada e pelo cuidado recebido nos momentos de ansiedade e cansaço!

Ao meu irmão, André Luiz, por estar ao meu lado, propiciando-me momentos de alegria e descontração!

Ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas pelo apoio na realização deste projeto e à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pelo apoio e incentivo à pesquisa em Minas Gerais.

À Fernanda Freire, amiga que o mestrado me presenteou! Sem você, não saberia nem por onde começar! Obrigada por todo auxílio, ensinamentos e pela amizade!

À Maria Luiza Silva, e equipe do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hospital das Clínicas da UFMG, pela disponibilidade em me ajudar nos treinamentos em citometria de fluxo!

À Professora Cristiane Menezes, pelos ensinamentos e toda presteza em ajudar!

Às alunas de iniciação científica, Larissa e Janaína, por toda ajuda prestada no desenvolvimento da pesquisa, sempre com muita alegria!

Aos alunos de iniciação científica, Pedro e Mateus, pela presteza e disponibilidade em ajudar!

À Edilene, que sempre se esmerou em nos ajudar na rotina de trabalho do laboratório, obrigada por todo cuidado e apoio!

Às amigas de mestrado, Darly, Élide e Tatiana, por toda a ajuda recebida e pelos memoráveis momentos de descontração vividos durante esta caminhada!

Ao Jôsimar Dornelas, pela grandiosa ajuda na realização de coletas de amostras e na análise estatística dos resultados.

À Cristina Loures, pelo auxílio na realização e posterior análise das leituras no citômetro de fluxo.

Às colegas de pós-graduação, Tamara, Rita, Letícia e Priscila, pela presteza e disponibilidade em ajudar!

Aos meus familiares pelos momentos de união, incentivo e carinho!

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram e ajudaram na realização deste estudo, o meu “Muito Obrigada”!

“Ele fortalece o cansado e dá grande vigor ao que está sem forças. Até os jovens se cansam e ficam exaustos, e os moços tropeçam e caem; mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam”.

Is 40: 29-31

RESUMO

A tuberculose humana permanece como uma das principais causas de mortalidade por doença infecciosa no mundo. *Mycobacterium tuberculosis* é o principal agente etiológico da doença, cuja transmissão ocorre entre pessoas, pela inalação do bacilo contido em aerossóis eliminados pelo doente ao espirrar, tossir ou falar. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectado pelo *M. tuberculosis*. Apesar de 90% dos infectados serem capazes de permanecer em estado de latência (onde alguns bacilos permanecem viáveis, mas dormentes), eles atuam como reservatórios para a bactéria, pois, ao sofrerem reativação da infecção, tornam-se fonte de contaminação. Embora se saiba que células T CD4+ de memória anti-*M. tuberculosis* podem ser induzidas nos indivíduos com infecção latente e nos curados de tuberculose pulmonar, permanecem lacunas sobre as similaridades e/ou diferenças dessa resposta celular específica entre esses grupos, tanto no nível fenotípico, quanto de funcionalidade da resposta de memória. Com base nesse panorama, o objetivo neste estudo é caracterizar o perfil fenotípico e a funcionalidade de linfócitos T CD4+ e T CD8+ de indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis*, comparativamente aos indivíduos saudáveis não infectados e aos curados de tuberculose pulmonar ativa. As células mononucleares do sangue periférico dos participantes foram incubadas na presença de antígenos do *M. tuberculosis* por 144 horas; pela técnica de citometria de fluxo tiveram a funcionalidade para produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 analisada, foram classificadas fenotipicamente, por análise da expressão dos marcadores de superfície celular CD45Ro e CD27. A análise estatística dos resultados revelou que no grupo de infectados latentes a resposta imune foi caracterizada pelo predomínio de células T CD4+ efetoras, com significativa capacidade de expressão de IFN- γ , e de linfócitos T CD8+ efetores e T_{ME}, os quais foram eficientes em desenvolver uma resposta funcional pela expressão de IFN- γ e TNF- α , respectivamente. Este grupo apresentou maior proporção de linfócitos TCD8+ naïve e de células T CD8+ T_{MC} IFN- γ + que os curados de tuberculose pulmonar, além de maior proporção de linfócitos T CD8+ T_{MC} e T_{ME} que os controles. Nos curados não se observou preponderância de uma subpopulação específica, sendo que entre os linfócitos T IFN- γ + e TNF- α +, houve predominância de fenótipo apenas entre as células T CD4+IFN- γ +, correspondente a linfócitos T efetores. No grupo controle, houve predomínio de resposta efetora, onde a maioria dos linfócitos T CD4+ foram T efetores e aqueles que mais produziram IFN- γ foram linfócitos T_{ME}. Em relação às células T CD4+, esse grupo apresentou maior proporção dos fenótipos T_{ME} e T efetores e de células T_{ME} IFN- γ +, que os outros dois grupos. Os curados e os infectados latentes apresentaram linfócitos T CD4+ efetores e T_{ME} com maior capacidade de produção de IL-2 que os controles. Espera-se que os dados obtidos possam contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatologia e das alterações imunológicas ocorridas na infecção latente pelo *M. tuberculosis*; para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes e de novos métodos de diagnóstico, capazes de prever o risco de reativação da infecção, de diferenciar

indivíduos com infecção latente, pacientes com tuberculose ativa e os curados da doença entre si.

PALAVRAS-CHAVE: Tuberculose; *Mycobacterium tuberculosis*; Infecção latente; Linfócitos; Células de Memória; Marcadores de superfície; CD45Ro; CD27; IFN- γ , TNF- α ; IL-2.

ABSTRACT

Human tuberculosis remains as one of the major causes of mortality by infectious diseases in the world. *Mycobacterium tuberculosis* is the main etiological agent of the disease, whose transmission occurs between people, by the inhalation of the bacillus contained in aerosols spread by the sick, as they sneeze, cough or speak. It is estimated that one third of world population is infected by *M. tuberculosis*. Despite the fact that 90% of these infected are able to remain in a latent state (when some bacillus are viable, but dormant), they act as a reservoir for the bacteria, because, as soon as their infection reactivates, they become a source of contamination. Although it is known that *M. tuberculosis*-specific T CD4⁺ memory cells may be induced in these individuals and in those who got cured from pulmonary tuberculosis, there are gaps about similarities and/or differences on the specific cell response between these groups, both in phenotypic level and in memory response functionality. Based on this panorama, the aim of the present study was to characterize the phenotypic profile and the functionality of T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes in individuals infected by *M. tuberculosis*, compared to healthy individuals and individuals who got cured from active pulmonary tuberculosis. Participants' peripheral blood mononuclear cells were incubated with *M. tuberculosis* antigens for 144 hours; by the technique of flow cytometry, had their functionality for the production of IFN- γ , TNF- α and IL-2 analyzed, and were phenotypically classified regarding the expression of the cell surface markers CD45Ro and CD27. Statistical analyses of the results revealed that, within the group of latent infected individuals, immune response was characterized by predominance of T CD4⁺ effector cells, with significant capacity of expressing IFN- γ ; and T CD8⁺ effector and T_{ME} lymphocytes, which were capable of developing a functional response, by the expression of IFN- γ e TNF- α , respectively. This group showed greater proportion of T CD8⁺ naïve and T_{MC} IFN- γ ⁺ lymphocytes, compared to individuals cured from pulmonary tuberculosis, and also greater proportion of T_{MC} and T_{ME} T CD8⁺ cells, compared to control group. In cured group no preponderance for any specific subpopulation was observed, wherein between T IFN- γ ⁺ and TNF- α ⁺ lymphocytes, predominated the phenotype only for T CD4⁺IFN- γ ⁺, corresponding to effector T cells. In control group, effector response predominated, where most of T CD4⁺ lymphocytes were effector T cells, and the ones who produced more IFN- γ were T_{ME} lymphocytes. With regards to T CD4⁺, this group showed greater proportion of phenotypes T_{ME} and effector T, and T_{ME} IFN- γ ⁺ cells than the other two groups. The cured ones and latent infected ones showed T CD4⁺ effectors and T_{ME} with greater capacity of producing IL-2 than the control group. It is expected that all data can contribute for a better comprehension of the pathophysiology and immunological modifications that occur during latent infection of *M. tuberculosis*, for the development of more effective vaccines and novel diagnostic methods, capable of predicting the risk of reactivation of infection, and to differentiate individuals with latent infection, patients with active tuberculosis disease and cured each other.

KEYWORDS: Tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; Latent infection; Lymphocytes; Memory cells; Surface markers; CD45Ro; CD27; IFN- γ , TNF- α ; IL-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxa de incidência de TB no mundo estimada no ano de 2013.	22
Figura 2 – Coeficiente de incidência de tuberculose por 100 mil habitantes no Brasil no ano de 2012.	23
Figura 3 – Coeficiente de incidência de tuberculose por 100 mil habitantes em Minas Gerais no ano de 2012.	24
Figura 4 – Fotomicrografia do bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por coloração ácido-álcool de Ziehl-Neelsen (ampliado 1000x).	26
Figura 5 – Representação esquemática do envoltório celular do <i>M. tuberculosis</i> : parede e membrana celular.	27
Figura 6 – Progressão natural do curso de acontecimentos e evolução de um indivíduo imunocompetente, após a exposição a gotículas contendo <i>M. tuberculosis</i> , expectoradas por um caso de fonte de TB pulmonar com baciloscopia de escarro positiva.	32
Figura 7 – Bases imunológicas dos testes PT e IGRAs	35
Figura 8 – O ciclo de infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : formação e desenvolvimento do granuloma	40
Figura 9 – Respostas de células T, de acordo com depuração/persistência antigênica e força do estímulo.	48
Figura 10 – Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de linfócitos T CD4+ e CD8+ naïve (CD27+CD45Ro-), de memória central (CD27+CD45Ro+), de memória efetora (CD27-CD45Ro+) e efetores (CD27-CD45Ro-) por citometria de fluxo.	66
Figura 11 – Sequência de procedimentos utilizados para as análises das citocinas intracitoplasmáticas IFN- γ , TNF- α e IL-2 nos linfócitos T CD4+ e CD8+ de memória central (CD27+CD45Ro+), de memória efetora (CD27-CD45Ro+) e efetores (CD27-CD45Ro-) por citometria de fluxo.	68
Figura 12 – Índice CE/CC de células T CD4+, de acordo com os quatro fenótipos de estudo, nos grupos de indivíduos controles, com infecção latente pelo <i>M. tuberculosis</i> e curados de TB pulmonar.	72
Figura 13 – Índice CE/CC de células T CD8+, de acordo com os quatro fenótipos de estudo, nos grupos de indivíduos controles, com infecção latente pelo <i>M. tuberculosis</i> e curados de TB pulmonar.	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 14** – Comparações intragrupo das subpopulações fenotípicas de células T CD4+ estudadas, de acordo com o Índice cultura estimulada/cultura controle, nos indivíduos controles, com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e curados de TB pulmonar. 74
- Figura 15** – Comparações intragrupo das subpopulações fenotípicas de células T CD8+ estudadas, de acordo com o Índice cultura estimulada/cultura controle, nos indivíduos controles, com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e curados de TB pulmonar. 75
- Figura 16** – Índice CE/CC de células T CD4+IFN- γ +, de acordo com os quatro fenótipos de estudo, nos grupos de indivíduos controles, com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e curados de TB pulmonar. 76
- Figura 17** – Índice CE/CC de células T CD8+IFN- γ +, de acordo com os quatro fenótipos de estudo, nos grupos de indivíduos controles, com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e curados de TB pulmonar. 77
- Figura 18** – Índice CE/CC de células T CD4+TNF- α +, de acordo com os quatro fenótipos de estudo, nos grupos de indivíduos controles, com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e curados de TB pulmonar. 79
- Figura 19** – Índice CE/CC de células T CD8+TNF- α +, de acordo com os quatro fenótipos de estudo, nos grupos de indivíduos controles, com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e curados de TB pulmonar. 80
- Figura 20** – Índice CE/CC de células T CD4+IL-2+, de acordo com os quatro fenótipos de estudo, nos grupos de indivíduos controles, com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e curados de TB pulmonar. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, empregados para análise de populações e subpopulações de linfócitos T.	61
Tabela 2 – Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, empregados para análise de expressão intracitoplasmática de citocinas.	61
Tabela 3 – Regiões de análise originadas e populações de células selecionadas.	65
Tabela 4 – Regiões de análise originadas e populações de células selecionadas, de acordo com a ferramenta de análise <i>Boolean gate</i>.	65
Tabela 5 – Distribuição dos participantes do estudo de acordo com sexo	70
Tabela 6 – Distribuição dos participantes do estudo de acordo com idade	71
Tabela 7 – Valores de média e desvio-padrão dos índices CE/CC de cada grupo de estudo, conforme o percentual das subpopulações de linfócitos T CD4+.	82
Tabela 8 – Valores de média e desvio-padrão dos índices CE/CC de cada grupo de estudo, conforme o percentual das subpopulações de linfócitos T CD8+.	82
Tabela 9 – Valores de média e desvio-padrão dos índices CE/CC de cada grupo de estudo, conforme o percentual das subpopulações de linfócitos T CD4+ positivas para as citocinas IFN-γ, TNF-α e IL-2.	83
Tabela 10 – Valores de média e desvio-padrão dos índices CE/CC de cada grupo de estudo, conforme o percentual das subpopulações de linfócitos T CD8+ positivas para as citocinas IFN-γ e TNF-α.	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

abr.	Abril
BSA	Albumina Sérica Bovina
AAR	Álcool-Ácido Resistência
APC	Alofococianina
A.C.	Antes de Cristo
ESAT-6	Antígeno Alvo de Secreção Primária
BGC	Bacilo Calmette Guerin
BD	Becton Dickinson
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
Cy 5.5	Cianina 5.5.
CID	Classificação Internacional de Doenças
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD11a	<i>Cluster of differentiation 11^a</i>
CD27	<i>Cluster of differentiation 27</i>
CD28	<i>Cluster of differentiation 28</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> , molécula expressa em linfócitos T auxiliares
CD45Ra	<i>Cluster of differentiation 45Ra</i> , molécula expressa em linfócitos T
CD45Ro	<i>Cluster of differentiation 45Ro</i> , molécula expressa em linfócitos T
CD62L	<i>Cluster of differentiation 62L</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> , molécula expressa em linfócitos T citotóxicos
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
MHC-II	Complexo Maior de Histocompatibilidade de classe II
CC	Cultura controle
CE	Cultura estimulada
CCR7	<i>Cysteine Chemokine Receptor 7</i>
DNA	Desoxirribonucleotídeo
DP	Desvio Padrão

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

dez.	Dezembro
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EIC	Ensaio imunocromatográfico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
fev.	Fevereiro
PE	Ficoeritrina
PECy7	Ficoeritrina-cianina 7
PHA	Fitohemaglutinina
CO ₂	Gás carbônico
GO	Goiás
G	Grama(s)
SSC	Granulosidade
°C	Grau(s) Celsius
hab.	Habitante(s)
HC	Hospital das Clínicas
IGRAs	<i>Interferon Gamma Release Assays</i>
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-15	Interleucina 15
IL-2	Interleucina 2
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
jan.	Janeiro
jul.	Julho
L	Litro(s)
≥	Maior ou igual a
>	Maior que
®	Marca registrada
mar.	Março

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	Menor que
µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)
µm	Micrômetro(s)
mg	Miligrama (s)
mL	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
MG	Minas Gerais
MS	Ministério da Saúde
mM	Milimolar (es)
n.	Número
OMS	Organização Mundial de Saúde
out.	Outubro
p.	Página(s)
%	Porcentagem
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PerCP	Proteína clorofila peridina
CFP-10	Proteína de Filtrado de Cultura
PT	Prova Tuberculínica
PPD	<i>Purified Protein Derivative</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
EDTA	Sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético
SP	São Paulo
set.	Setembro
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Aguda
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
T _{MC}	T de memória central

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

T _{ME}	T de memória efetora
FSC	Tamanho
PBS	Tampão fosfato salino 0,015M, pH 7,4
PBS-Wash	Tampão fosfato salino 0,015M, pH 7,4, suplementado com BSA 0,5% e azida sódica 0,1%
PBS-Perm	Tampão fosfato salino 0,015M, pH 7,4, suplementado com BSA 0,5%, azida sódica 0,1% e saponina 0,5%
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLRs	<i>Toll Like Receptors</i>
TB	Tuberculose
UV	Ultravioleta
UT	Unidade de tuberculina
UI	Unidades Internacionais
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
v.	Volume

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Preparo de solução estoque de lise de hemácias (10x)	111
APÊNDICE B – Preparo de meio nutriente de cultivo de células, pH 7,2	112
APÊNDICE C – Preparo de solução fixadora MACS FACS FIX (MFF)	113
APÊNDICE D – Preparo de solução PBS pH 7,4	115
APÊNDICE E – Preparo de solução de PBS-Wash	116
APÊNDICE F – Preparo de solução de PBS-Perm	117

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP	118
ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido – Indivíduos saudáveis	119
ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido – Pacientes curados	123
ANEXO D – Ficha Clínica dos Participantes do Projeto	126

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Epidemiologia	21
1.2 Agente etiológico da TB humana	25
1.3 Transmissão do <i>M. tuberculosis</i>	29
1.4 Patogenia da TB	30
1.5 Infecção latente pelo <i>M. tuberculosis</i>	33
1.6 Resposta imune anti <i>M. tuberculosis</i>	36
1.6.1 <u>Formação do granuloma na infecção pelo <i>M. tuberculosis</i></u>	39
1.7 Características de células T de memória	43
1.7.1 <u>Células T de memória na TB</u>	49
2 JUSTIFICATIVA	52
3 OBJETIVOS	55
3.1 Objetivo Geral	55
3.2 Objetivos Específicos	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 Normas éticas	56
4.2 Caracterização da população de estudo	56
4.3 Critérios de inclusão	57
4.4 Critérios de exclusão	58
4.5 Estudos laboratoriais	58
4.5.1 <u>Obtenção das amostras de sangue</u>	58
4.5.2 <u>Análise do fenótipo e funcionalidade de linfócitos T do sangue periférico após cultivo celular <i>in vitro</i></u>	59

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
6 RESULTADOS	70
6.1 População estudada	70
6.2 Análise do fenótipo celular de linfócitos T do sangue periférico após cultivo celular <i>in vitro</i>	71
6.2.1 <u>Análise intergrupos das subpopulações de células T CD4+ e CD8+ naíve, de memória central, de memória efetora e efectoras</u>	71
6.2.2 <u>Análises intragrupo das subpopulações de células T CD4+ e CD8+ naíve, de memória central, de memória efetora e efectoras</u>	73
6.3 Expressão de citocinas nas subpopulações de linfócitos T naíve, T_{MC}, T_{ME} e T efetores após cultivo celular <i>in vitro</i>	76
6.4 Síntese dos resultados	81
7 DISCUSSÃO	86
8 CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS	102
APÊNDICES	111
ANEXOS	118

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) humana é a principal causa de morte por doença infecciosa curável no mundo. Apesar de ser uma doença contemporânea, existem relatos de casos de TB que datam de mais de 5000 anos, conforme estudos realizados em múmias do Antigo Egito. Zimmerman (1979) confirmou, por diagnóstico histológico, um caso fatal de TB em criança, ao analisar múmias do período das dinastias Egípcias. Em outro estudo, desenvolvido por Zink e colaboradores (2001), realizou-se análise molecular de DNA extraído de amostras de tecido esquelético de cadáveres egípcios de 3000 a 500 anos A.C., onde se confirmou a presença de DNA do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente etiológico da TB.

Ainda que seja uma doença evitável e se tenha disponível tratamento capaz de promover a cura de 90% dos casos, a TB é menos impactante apenas que a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), sendo que esta pode ser considerada um dos principais fatores de risco para que infectados pelo *M. tuberculosis* desenvolvam TB. Por essa razão, em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a TB como emergência de saúde pública mundial (WHO, 2013).

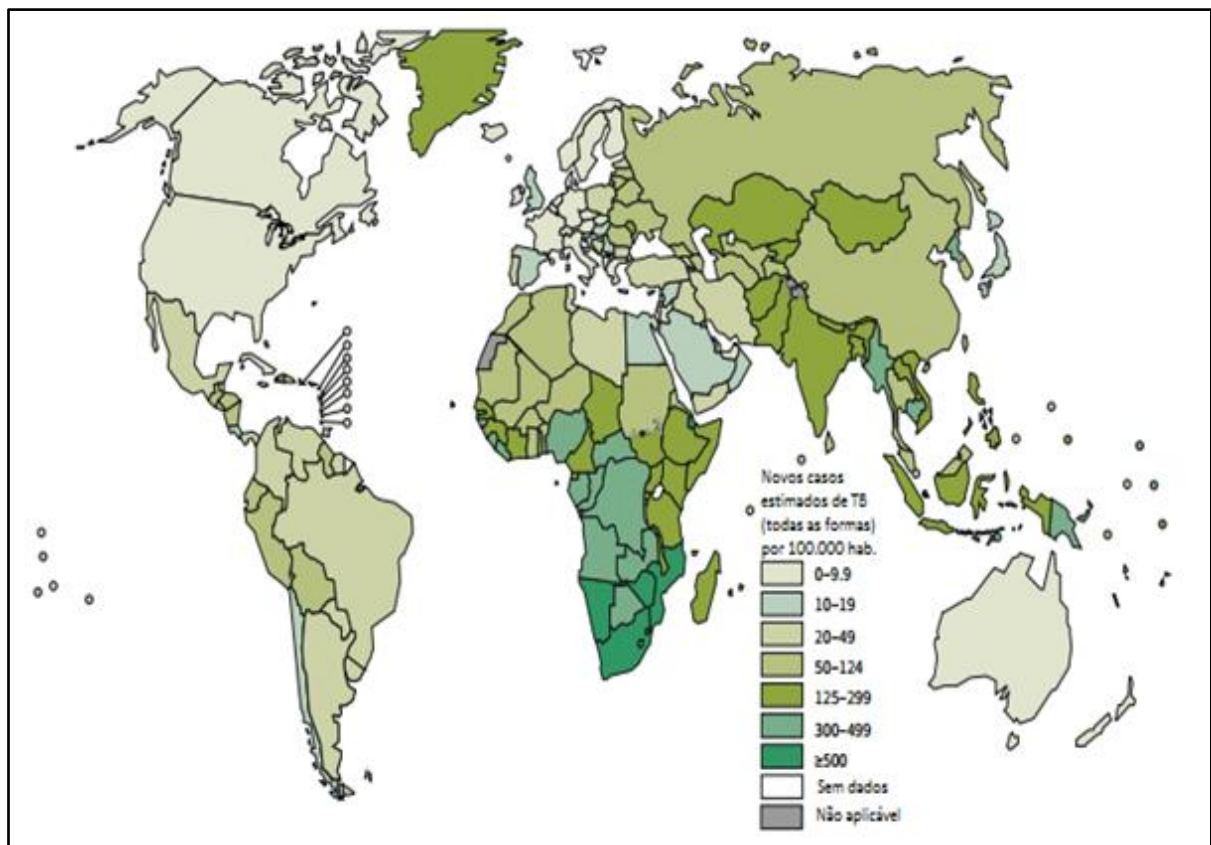
Com o surgimento da infecção pelo HIV, a incidência e a gravidade dos casos de TB foram diretamente afetadas. Esses indivíduos apresentam maior suscetibilidade à infecção pelo bacilo e risco de progressão para a doença (por muitas vezes acometendo outros órgãos, além dos pulmões, ou ainda de forma disseminada), com o estabelecimento do quadro de imunossupressão gerado pelo vírus. O risco de desenvolvimento de TB é 20 a 34 vezes maior entre os soropositivos para HIV e portadores de infecção latente pelo *M. tuberculosis*, quando comparados aos soronegativos para o vírus e à população geral (CHEADE *et al.*, 2009; BRASIL, 2013b).

1.1 Epidemiologia

A TB permanece como um dos grandes problemas de saúde pública no mundo. Estima-se que 9 milhões de pessoas desenvolveram TB em 2013.

Aproximadamente 60% dos casos e mortes da doença acometeram homens. No mesmo ano, estima-se que 550 mil crianças desenvolveram a doença, que foi a causa de morte de 80 mil delas e, do total de casos de TB, 13% (cerca de 1,1 milhão de pessoas) apresentavam soropositividade para o HIV. A maioria dos casos da doença ocorreu nas regiões da Ásia (56%) e África (29%), sendo Índia, China, Nigéria, Paquistão, Indonésia e África do Sul os países com maior número de casos incidentes. Na **Figura 1** pode-se observar a incidência estimada da TB nos diferentes territórios em 2013 (WHO, 2014).

Figura 1 - Taxa de incidência de TB no mundo estimada no ano de 2013.



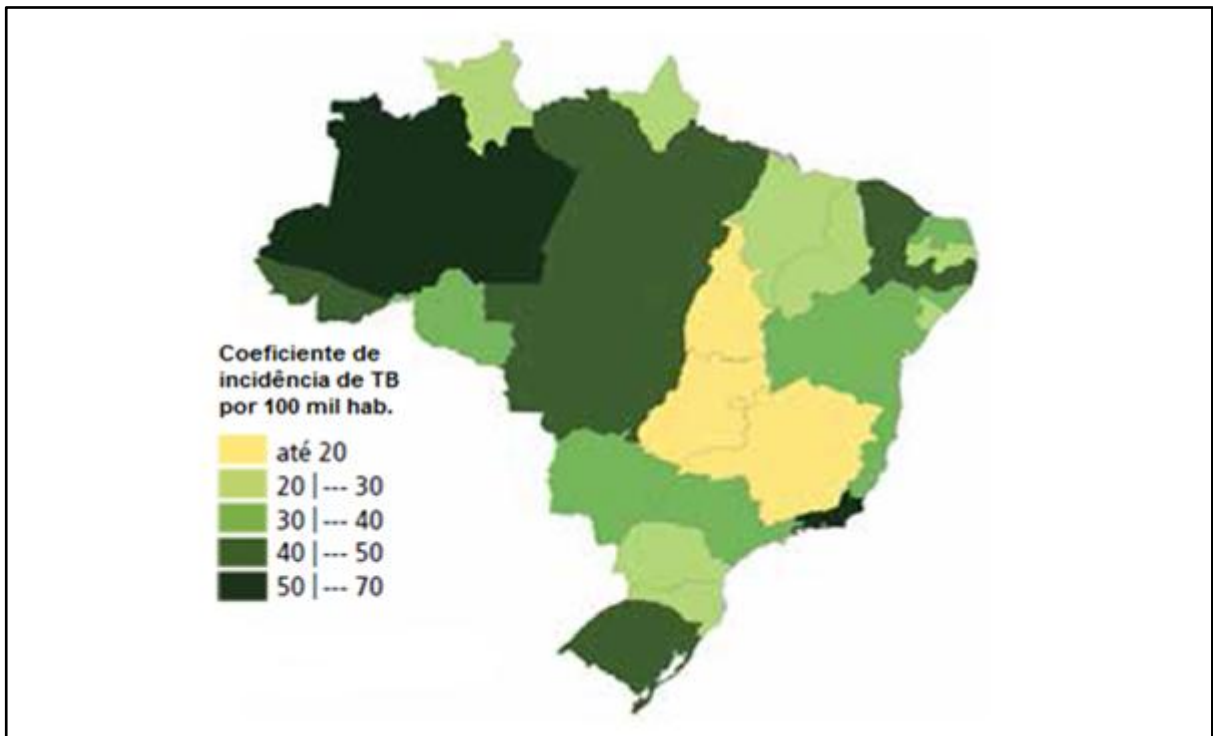
Fonte: adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global Tuberculosis Report 2014*. Geneva: World Health Organization, 2014. 170 p. Disponível em < <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37094/1/9789241564809eng.pdf?ua=1>>. Acesso em 30 jan. 2015.

O Brasil ocupa a 16ª posição entre os 22 países que respondem por 80% do total de casos da doença e, ao ser considerado o coeficiente de incidência, o país ocupa a 22ª posição (BRASIL, 2014a). A condição de co-infecção TB-HIV é a principal causa de mortalidade por AIDS e por TB no país e, dentre os casos novos da doença em

2011, as taxas de co-infecção e letalidade foram, respectivamente, de 9% e 6% (três vezes maior do que se observa na população geral) (BRASIL, 2013b).

A prevalência estimada de TB no Brasil em 2011 foi de 62 casos para cada 100 mil habitantes (WHO, 2011), sendo que foram notificados 69.245 casos novos da doença, correspondendo a uma taxa de incidência de 36,0 casos para cada grupo de 100 mil habitantes (BRASIL, 2012a). Em 2012, foram registrados mais de 70.000 novos casos da doença no SINAN (BRASIL, 2012c), sendo que as taxas de incidências foram de 36,7 casos em 100 mil habitantes para todas as formas de TB e de 20,7 casos em 100 mil habitantes para os casos bacilíferos (BRASIL, 2013a, 2014b). Os estados com os mais altos coeficientes de incidência foram Amazonas e Rio de Janeiro (67,3 e 67,0 casos em 100 mil habitantes, respectivamente); enquanto Tocantins e Goiás registraram os menores coeficientes (13,5 e 15,0 casos em 100 mil habitantes, nessa ordem) (**Figura 2**) (BRASIL, 2014b).

Figura 2 – Coeficiente de incidência de tuberculose por 100 mil habitantes no Brasil no ano de 2012.

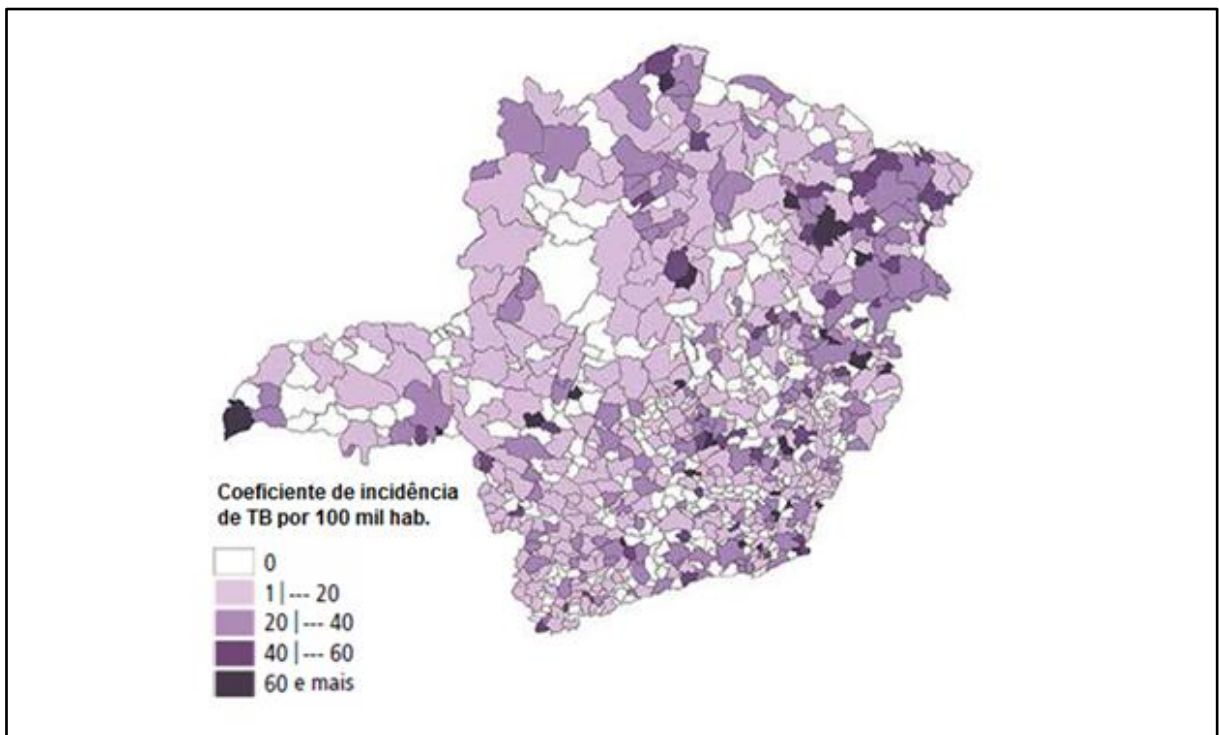


Fonte: adaptado de BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Panorama da tuberculose no Brasil: indicadores epidemiológicos e operacionais. Brasília, 2014b. 92 p.

Já em 2013, foram diagnosticados 71.123 casos novos de TB, correspondendo a um coeficiente de incidência de 35, casos em 100 mil habitantes. Nesse mesmo ano, as regiões Norte, Sudeste e Nordeste apresentaram os maiores coeficientes de incidência (45,2; 37,1 e 34,7 casos em 100 mil habitantes, respectivamente) (BRASIL, 2014a).

No estado de Minas Gerais foram notificados 3.919 casos novos da doença em 2011, o equivalente a uma taxa de incidência de 19,9 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2012a), bem menor que a média nacional. Em 2012, 3.766 casos novos de TB foram registrados no SINAN (**Figura 3**) (BRASIL, 2014b), correspondendo a uma taxa de incidência de 19,0 casos por 100 mil habitantes no estado (BRASIL; 2012b, 2014b).

Figura 3 - Coeficiente de incidência de tuberculose por 100 mil habitantes em Minas Gerais no ano de 2012.



Fonte: adaptado de BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Panorama da tuberculose no Brasil: indicadores epidemiológicos e operacionais. Brasília, 2014b. 92 p.

Pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), o estado de Minas Gerais possui 11 municípios prioritários para a intensificação das ações de controle

da TB: a capital Belo Horizonte e outros dez municípios – Contagem, Coronel Fabriciano, Governador Valadares, Juiz de Fora, Montes Claros, Muriaé, Poços de Caldas, Sabará, Santa Luzia e Teófilo Otoni – com população maior ou igual a 100 mil habitantes, que apresentam:

- ou coeficiente de incidência (todas as formas de TB) superior a 80% do coeficiente nacional (32/100 mil habitantes), de acordo com dados do SINAN, em 2007;
- ou coeficiente de mortalidade por TB superior ao coeficiente nacional (2,5/100 mil habitantes), de acordo com dados do SIM, em 2007 (BRASIL, 2014b).

Em Belo Horizonte, 710 novos casos da doença foram notificados em 2010, correspondendo a uma taxa de incidência de 29,9 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2010b). Em 2012, a incidência da doença na capital mineira se manteve no mesmo nível, quando foram relatados apenas dois casos a mais que em 2010 (712 novos casos, indicando um coeficiente de incidência de 29,7 casos por 100 mil habitantes) (BRASIL, 2014b).

1.2 Agente etiológico da TB humana

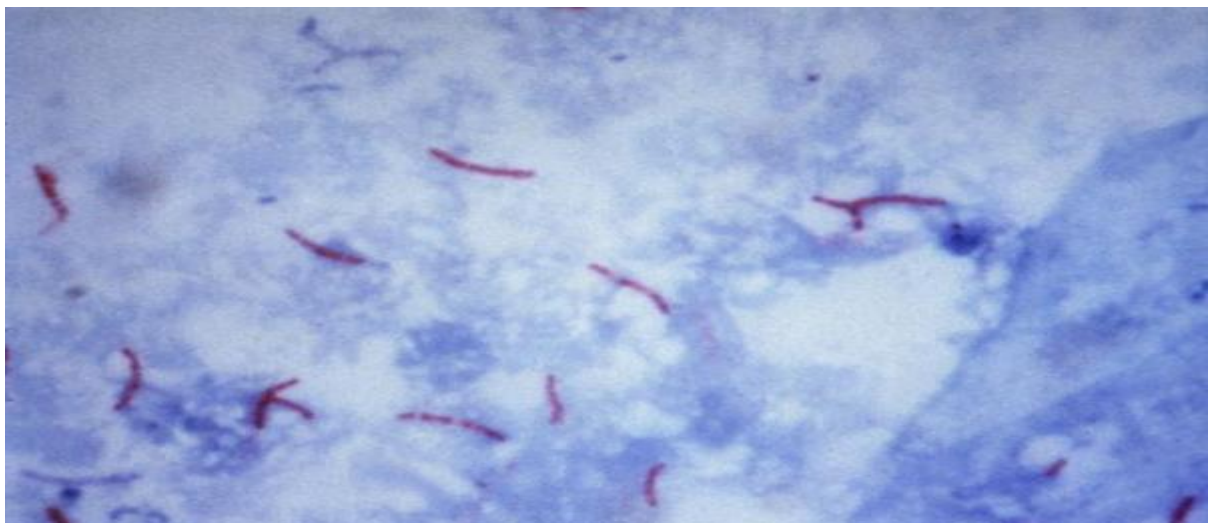
Mycobacterium tuberculosis, principal agente etiológico da TB humana, é uma bactéria pertencente ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, do qual também fazem parte as espécies *M. bovis*, *M. bovis* – BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (BRASIL, 2008).

O microrganismo foi isolado e descrito pela primeira vez em 1882, pelo cientista alemão Heinrich Hermann Robert Koch – que inicialmente o denominou de *Bacterium tuberculosis* – e, por esta razão, ficou conhecido popularmente como bacilo de Koch (KOCH, 1882). Em 1896, os pesquisadores Lehmann e Neumann, estabeleceram o gênero *Mycobacterium*, cuja denominação originou-se do latim *fungus bacterium*, pois a bactéria, quando cultivada em meio líquido, apresenta certas características semelhantes aos fungos (BRASIL, 2008). Dorronsoro & Torroba (2007) enfatizam a relevância dos trabalhos que suscitaram na descoberta

do *M. tuberculosis*, principalmente, quando consideradas todas as peculiaridades do microrganismo: necessidade de técnica especial para coloração; de meios de cultivo especiais e de processo descontaminação prévia das amostras para se garantir o isolamento do microrganismo (por apresentar crescimento lento, pode haver inibição do *M. tuberculosis* pela presença de microrganismos de crescimento rápido).

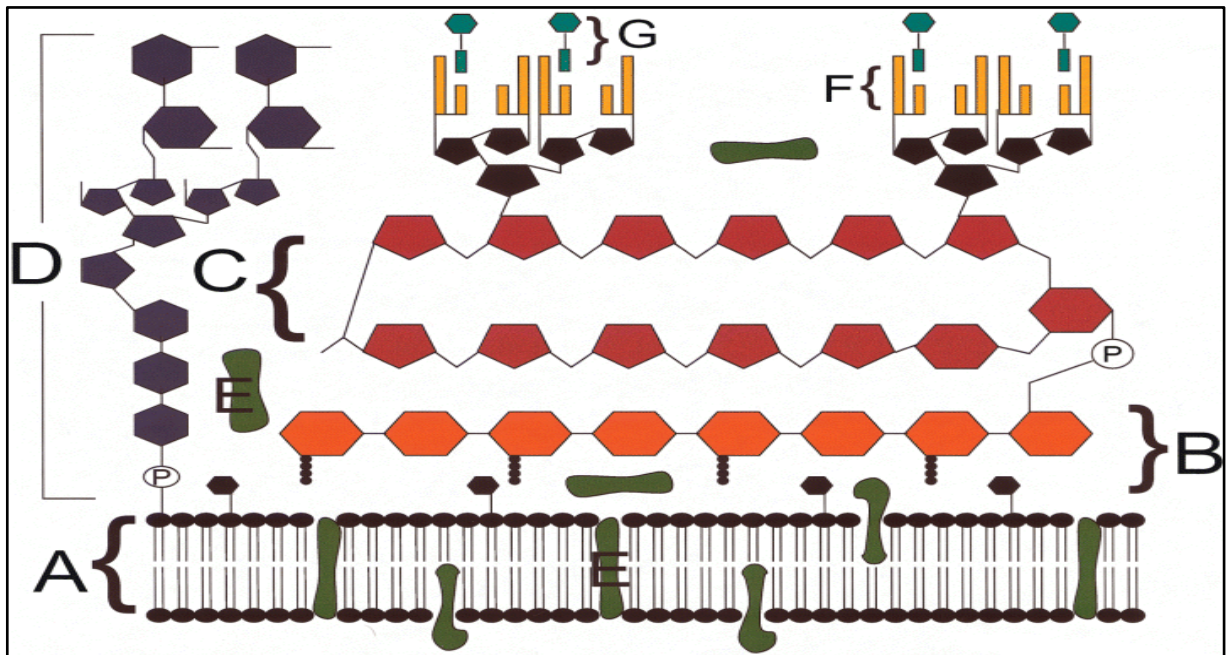
O *M. tuberculosis* e demais bactérias do gênero *Mycobacterium* consistem em bacilos aeróbios estritos, não esporulados, com ausência de mobilidade, crescimento lento (BRASIL, 2001; SILVA, 2010; FERRAZ, 2006; DUCATI *et al.*, 2006) e pouca variação genética, o que levanta a hipótese de que todos derivam de um ancestral comum (ERNST *et al.*, 2007 *apud* SILVA, 2010). Além disso, as bactérias desse complexo possuem capacidade de álcool-ácido resistência (AAR) (BRASIL, 2001; SILVA, 2010; FERRAZ, 2006; DUCATI *et al.*, 2006), apresentando reações tintoriais próprias. Tal característica é amplamente utilizada para a classificação desses microrganismos, pelo emprego da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen (e modificações), através da qual os bacilos coram-se pela fucsina fenicada aquecida e resistem à descoloração por tratamento com uma mistura de ácido e álcool. Utiliza-se ainda solução de azul de metileno como corante de fundo (**Figura 4**) (BRASIL, 2008).

Figura 4 – Fotomicrografia do bacilo *Mycobacterium tuberculosis* por coloração álcool-ácido de Ziehl-Neelsen (ampliado 1000x).



O envoltório celular do *M. tuberculosis* é uma estrutura complexa (**Figura 5**). A parede celular, gerada por um complexo formado entre as moléculas de arabinogalactano, peptídeoglicanocano, lipoarabinomanano e ácidos micólicos (ácidos graxos complexos de 70-80 carbonos), é responsável pela forma característica da bactéria, além de conferir importantes efeitos biológicos, como a indução da formação de granuloma e atuar como barreira efetiva contra agentes antimicrobianos convencionais (GOROCICA *et al.*, 2005; CAMPOS, 2006). Nela estão presentes também moléculas de glicolípides que, em conjunto com certas proteínas, são responsáveis pelas características antigênicas da bactéria; e por ser o componente mais externo da estrutura bacteriana, confere proteção contra diversos fatores externos e agentes imunológicos de defesa do hospedeiro (GOROCICA *et al.*, 2005).

Figura 5 – Representação esquemática do envoltório celular do *M. tuberculosis*: parede e membrana celular.



A) Membrana plasmática. B) Peptídeoglicanos. C) Arabinogalactano. D) Lipoarabinomanano recoberto por manose (LAM) E) Proteínas associadas à membrana plasmática e à parede celular F) Ácidos micólicos G) Glicolípides de superfície associados a ácidos micólicos. Fonte: adaptado de KARAKOUSHIS, P.C., BISHAI, W.R., DORMAN, S.E. Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and the host immune response. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 105–116, 2004. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1462-5822.2003.00351.x/full#b6>>. Acesso em jan. 2015.

A capacidade tintorial de AAR do *M. tuberculosis* deve-se à alta composição lipídica da parede celular (aproximadamente 40-60% de seu peso) conferida pela presença dos ácidos micólicos, que garantem hidrofobicidade – que dificulta a penetração de corantes aquosos – e resistência ao processo de descoloração por álcool-ácido, à ação de agentes químicos e antibióticos (CAMPOS, 2006; KARAKOUSIS, BISHAI e DORMAN, 2004).

Patógeno intracelular facultativo, o *M. tuberculosis* pode se replicar dentro de células, principalmente de macrófagos, onde se multiplica a cada 25-32 horas (CAMPOS, 2006) e apresenta capacidade de sobrevivência por mecanismos de evasão. O mecanismo de inibição ativa da acidificação do fagossoma – estrutura formada durante processo de autofagia celular, no qual os componentes do citoplasma, incluindo organelas e patógenos intracelulares, são sequestrados e posteriormente entregues ao lisossoma para degradação – permite que o *M. tuberculosis* se mantenha replicante e a salvo da resposta imune dentro da célula hospedeira. A capacidade de inibição da maturação do fagossoma garante que o processo de formação do fagolisossoma (estrutura formada pela fusão do fagossoma com lisossoma, rica em hidrolases ácidas com capacidade degradativa e microbicida) seja paralisado e, conseqüentemente, previne a eliminação da bactéria, que se adapta ao ambiente intracelular do macrófago e cria um nicho para a sua sobrevivência (FERRAZ, 2006; O’GARRA *et al.*, 2013; TUFARIELLO, CHAN, FLYNN, 2003). Já pelo processo de inibição de apoptose de macrófagos infectados, o *M. tuberculosis* retarda o desenvolvimento de resposta imune celular: não há formação de vesículas apoptóticas contendo a bactéria, por conseguinte, não se observa a absorção dessas estruturas pelas células dendríticas e posterior apresentação dos antígenos do bacilo a células T naïve, para promover a ativação da resposta imune celular (BEHAR, DIVANGAHI, REMOLD, 2010). Existe ainda o mecanismo de translocação fagossomal, em que a bactéria é capaz de evadir do fagossoma e alcançar o citoplasma da célula hospedeira, dificultando sua eliminação pelo sistema imune (SIMEONE *et al.*, 2012).

1.3 Transmissão do *M. tuberculosis*

A TB é transmitida de pessoa para pessoa, principalmente por via aérea. Indivíduos com TB pulmonar ativa (portadores de lesão pulmonar e bacilíferos) podem expelir pela tosse, espirro ou fala diversas partículas de aerossóis de tamanhos variáveis contendo o bacilo, denominadas gotículas de *Flügge* (BRASIL, 2011; CONDE *et al.*, 2009; CAILLEAUX-CEZAR, 2012). As partículas de maior peso rapidamente se depositam no ambiente, enquanto aquelas mais leves se conservam em suspensão no ar. Após exposição ao sol e ao vento, essas partículas sofrem ressecamento e adquirem um volume ainda menor (com diâmetro de até 5 μ e contendo 1 a 2 bacilos dentro) e são denominadas então de *núcleos de Wells* (CAMPOS, 2006). Somente essas partículas são capazes de atingir os bronquíolos e alvéolos para iniciar a multiplicação bacteriana. As gotículas de diâmetro médio acabam por serem retidas pela mucosa do trato respiratório superior e, em seguida, removidas dos brônquios via mecanismo mucociliar e os bacilos nelas contidos são deglutidos, inativados pelo suco gástrico e eliminados nas fezes. Os bacilos que por ventura se depositem nas roupas, lençóis, copos e outros objetos dificilmente se dispersarão em aerossóis e, por isto, não desempenham papel importante na transmissão (BRASIL, 2002).

Os *núcleos de Wells*, uma vez inalados por um indivíduo saudável, promovem o alcance do *M. tuberculosis* às vias aéreas inferiores do trato respiratório e o estabelecimento da infecção. Mas a probabilidade de inalação do bacilo pode ser reduzida por fatores ambientais como a manutenção de correntes de ar, para promover a dispersão das partículas infectantes no ambiente, e a incidência de luz solar, pois a luz UV, assim como radiação gama, consegue destruir os bacilos. Além disso, a infecção e o desenvolvimento da doença ativa podem ser modulados por outros fatores relacionados à bactéria (virulência e carga bacteriana que atinge os pulmões) e ao hospedeiro (imunidade e predisposição genética). Após o estabelecimento da infecção, a bactéria poderá se multiplicar, e a partir do foco primário nos pulmões, se disseminar para outros órgãos por via linfática ou sanguínea (CAMPOS, 2006; SILVA, 2010).

Estima-se que em uma comunidade, um único caso fonte de infecção (doente pulmonar bacilífero sem receber tratamento adequado) poderá infectar, no prazo de

um ano, de 10 a 15 pessoas que com ela tenham mantido contato (BRASIL, 2002; CAMPOS, 2006; O’GARRA *et al.*, 2013).

1.4 Patogenia da TB

Após primo-infecção pelo *M. tuberculosis*, estima-se que cerca de 90% dos indivíduos acometidos serão capazes de conter a evolução da infecção e apenas 10% irão desenvolver a TB ativa, apresentando as manifestações clínicas por não conseguirem debelar a multiplicação do bacilo; sendo que o risco de adoecimento nessas situações é maior nos dois primeiros anos que sucedem a infecção (BRASIL, 2010a; CAILLEAUX-CEZAR, 2012; LIN e FLYNN, 2010). Nesses pacientes, o equilíbrio imunológico não é alcançado, os bacilos continuam a se multiplicar (por deficiência na imunidade celular, ou pela carga infectante ou pela virulência da cepa) e se instala a doença, classificada como TB primária (FERRAZ *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2006).

Dentre os indivíduos infectados capazes de resistir à doença, apenas 10% conseguirão erradicar o patógeno do organismo. Os demais infectados desenvolverão mecanismos imunológicos competentes em apenas controlar a infecção, gerando uma imunidade protetora parcial: há o controle da replicação do *M. tuberculosis*, mas o organismo não consegue eliminar todos os bacilos. Algumas bactérias escapam dos mecanismos microbicidas, permanecem viáveis, em baixo número e dormentes (não replicantes), estabelecendo o estado de latência da infecção (**Figura 6**) (BRASIL, 2009, 2010a; KURSAR *et al.*, 2007; TAILLEUX *et al.*, 2005; WHITWORTH *et al.*, 2013). Esses indivíduos poderão adoecer tardiamente, em consequência do recrudescimento de algum foco latente no organismo (reativação endógena) (BRASIL, 2010a; LIN e FLYNN, 2010; MOUTINHO, 2011) e desenvolver a TB secundária ou pós-primária (LOPES *et al.*, 2006; O’GARRA *et al.*, 2013). Alguns fatores para essa condição já foram estabelecidos como: desnutrição, idade avançada, alcoolismo, AIDS, diabetes, insuficiência renal crônica, silicose, neoplasias e uso de medicações imunossupressoras (LOPES *et al.*, 2006; O’GARRA *et al.*, 2013). A TB secundária pode ser proveniente ainda de uma reinfecção exógena, com desenvolvimento de uma nova infecção, cuja progressão não pode ser detida pelo sistema imune (LOPES *et al.*, 2006).

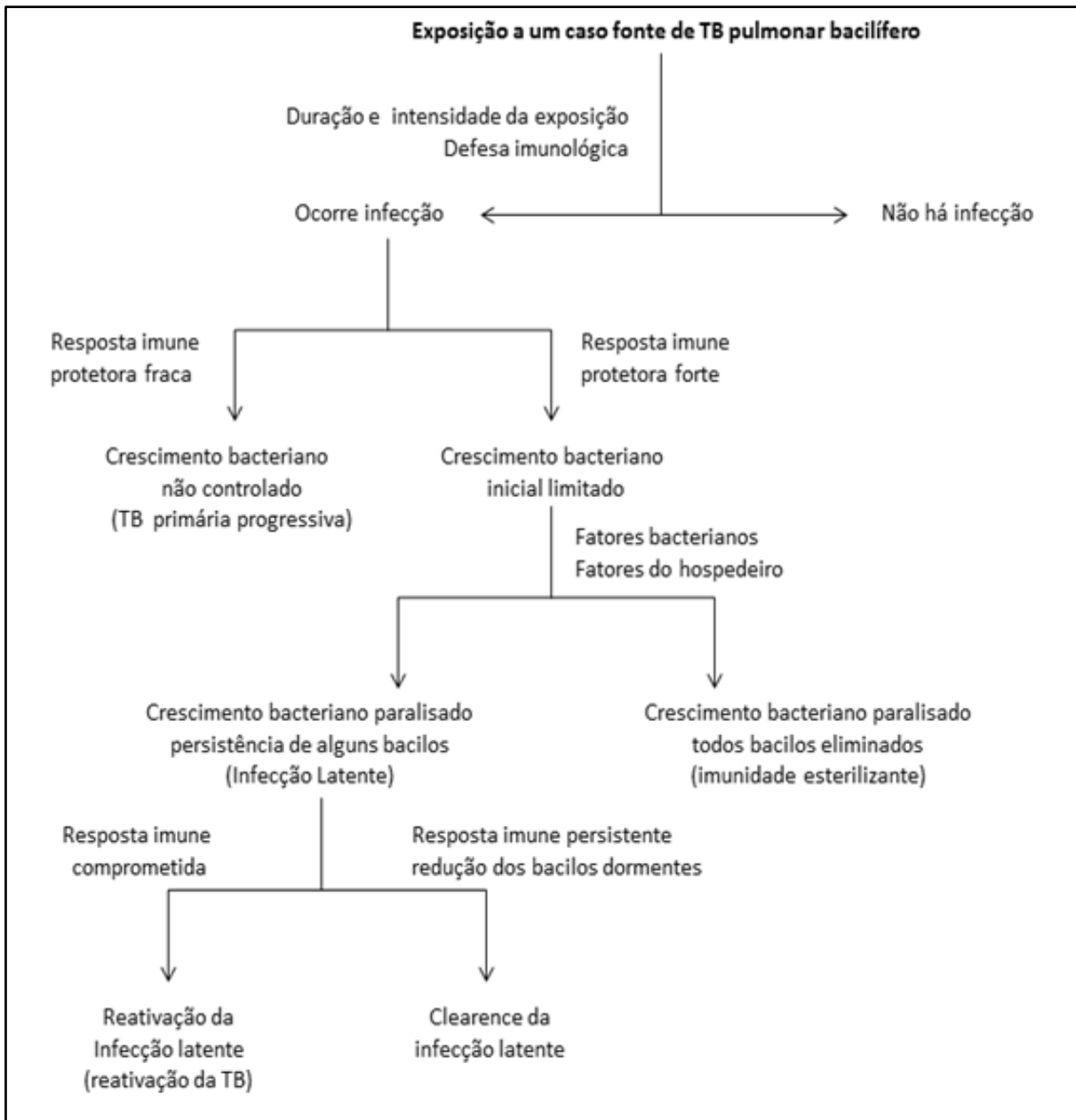
Aproximadamente 90% dos casos de TB se localizarão nos pulmões, por estes proporcionarem ao bacilo as condições ideais de crescimento (meio aeróbio) e por serem os primeiros órgãos atingidos, já que a via respiratória é a principal forma de transmissão da infecção. Após três a quatro semanas da implantação e multiplicação do bacilo no pulmão, pode surgir um foco pulmonar, geralmente único, arredondado e pequeno (1 a 2 mm de diâmetro), denominado de foco de Gohn. A partir do foco de Gohn, há uma disseminação linfática até o gânglio satélite (foco ganglionar), com formação de um complexo, composto de um foco pulmonar, linfangite e um foco ganglionar, denominado *Complexo de Ranke* (CAMPOS, 2006).

No entanto, durante ou mesmo após primo-infecção, por uma redução da capacidade do hospedeiro em conter o bacilo no sítio de infecção, a partir do foco ganglionar, a bactéria pode se disseminar por via hematogênica para todo organismo e causar as formas extrapulmonares da doença, acometendo outros órgãos como pleura, olhos, rins, pele e trato gastrintestinal (BRASIL, 2001, 2009; FERRAZ, 2006).

Lopes *et al.* (2006) relataram o paradigma traçado por William Osler, há mais de 100 anos, entre a infecção pelo *M. tuberculosis* e a Parábola do Semeador, que ilustra a importância da natureza do terreno sobre o qual cai a semente – o bacilo da tuberculose:

“Algumas sementes caem pelo caminho e as aves do céu vêm e as devoram”. Por analogia, estas representam os bacilos espalhados a esmo, fora do organismo, onde a imensa maioria deles morre. “Algumas caem sobre lugares pedregosos”. De modo semelhante, estas são os bacilos que encontram abrigo em alguns de nós, produzindo um pequeno foco, mas nada advém dele; eles mirram “porque não possuem raiz”. “Algumas caem entre espinhos e os espinhos crescem e as sufocam”. Isto representa os casos de tuberculose latente que, por analogia, são as sementes que encontram terreno próprio e se desenvolvem, mas as condições não são favoráveis. “Mas outras caem na terra boa, crescem e frutificam cem vezes mais”. Neste quarto grupo estão os milhares de indivíduos que padeceram da doença; nele, o terreno era favorável e as forças protetoras fracassaram.

Figura 6 – Progressão natural do curso de acontecimentos e evolução de um indivíduo imunocompetente, após a exposição a gotículas contendo *M. tuberculosis*, expectoradas por um caso de fonte de TB pulmonar com baciloscopia de escarro positiva.



Fonte: adaptado de AHMAD, S. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p. 1-18, 2010.

Durante o desenvolvimento da TB, as manifestações clínicas são variáveis e dependentes de fatores relacionados à cepa, ao hospedeiro e à interação entre eles. Inicialmente há o aparecimento de sinais e sintomas sistêmicos e inespecíficos como febre, perda de peso, anorexia, sudorese noturna e mal-estar. Após a instalação efetiva da doença, observam-se consequências locais da infecção, com

desenvolvimento de quadro de tosse, expectoração e hemoptise; anormalidades radiológicas, como linfadenopatia torácica e cavitações pulmonares, indicando a presença de processo inflamatório nos pulmões (BRASIL, 2009; CONDE *et al.*, 2009; FERRAZ *et al.*, 2006; FLYNN & CHAN, 2001; O’GARRA *et al.*, 2013).

1.5 Infecção latente pelo *M. tuberculosis*

A infecção latente pelo *M. tuberculosis* é definida pela presença de uma resposta imunológica contra os antígenos do bacilo e não pela presença confirmada do bacilo, conforme ocorre na TB ativa. Por esta razão, a infecção latente deve ser vista como reflexo de um grupo heterogêneo de indivíduos, dentre os quais estão aqueles que irão progredir para a doença ativa primária; aqueles que mantêm a infecção persistente, ao longo da vida; aqueles que suprimem temporariamente a infecção, mas tardiamente sucumbem e desenvolvem a doença ativa (tidos como casos clássicos da infecção latente), e aqueles que são capazes – quer através de uma resposta imune inata ou adaptativa, ou pela combinação delas – de eliminar eficazmente o agente patogênico (O’GARRA *et al.*, 2013).

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectado pelo *M. tuberculosis* (BRASIL, 2009; KURSAR *et al.*, 2007; WHITWORTH *et al.*, 2013) e, embora o estágio de latência da infecção não apresente manifestações clínicas e não seja transmissível, representa um dos maiores obstáculos à erradicação da TB (CHAN e FLYNN, 2004), visto que os indivíduos com a forma latente atuam como reservatórios para o patógeno, pois, a um dado momento, podem sofrer reativação da infecção, desenvolverem a doença e se tornarem, então, fontes de contaminação do bacilo, contribuindo para uma maior disseminação da doença (WHITWORTH *et al.*, 2013).

Considerando esse quadro, *The Paediatric Tuberculosis Network European Trials Group* recentemente apresentou à OMS a proposta de adição de um código específico para a infecção latente pelo *M. tuberculosis* na Classificação Internacional de Doenças (CID). Essa medida teria como objetivos a definição mais precisa da carga da infecção latente no mundo, a identificação dos casos de infecção latente em bases de dados clínicos existentes e, assim, maior facilidade nos cuidados e

medicamentos fornecidos, como também no planejamento de serviços clínicos, além ajudar no direcionamento de novas pesquisas laboratoriais e epidemiológicas, visando uma melhor compreensão dessa forma de infecção pelo bacilo (TEBRUEGGE *et al.*, 2012).

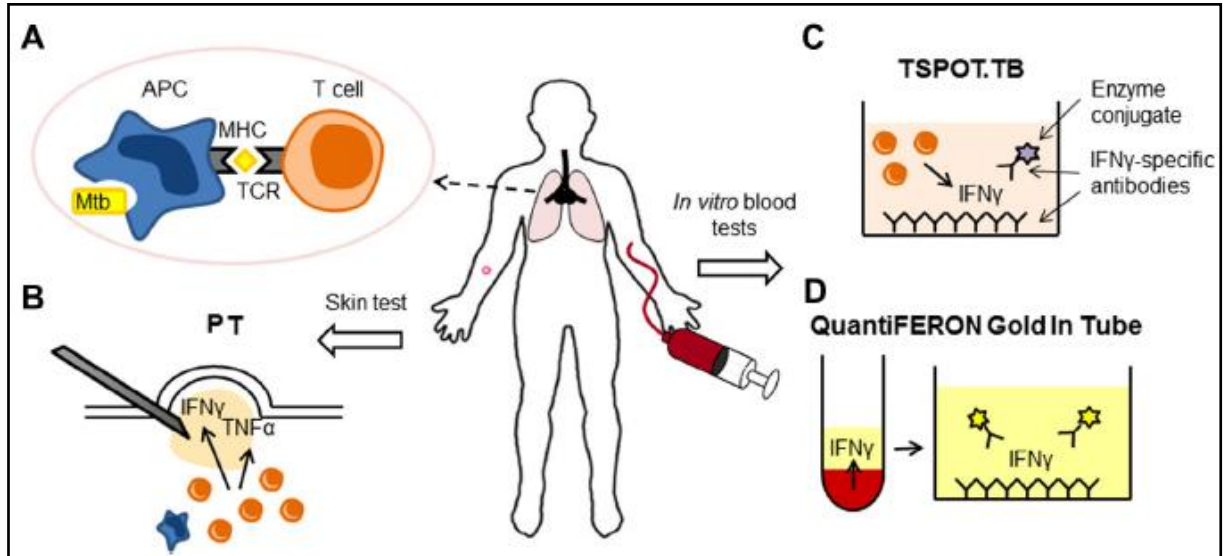
Assim, o diagnóstico dos indivíduos com infecção latente é uma importante estratégia para promover a erradicação da TB no mundo (MUÑOZ & SANTIN, 2013; MORANO *et al.*, 2013). No entanto, ainda não foi desenvolvido um teste que seja considerado padrão ouro para o diagnóstico da infecção latente (GRAN, ABMUS & DYRHOL-RIISE, 2013).

Até a década passada, o único teste disponível para detecção dos indivíduos infectados era a Prova Tuberculínica (PT) (WHITWORTH *et al.*, 2013; ESCOBEDO, MORENO & ESPINO, 2013). Também conhecida como reação de Mantoux, a PT consiste na inoculação de 0,1 mL de derivado proteico purificado (PPD - preparação de proteínas derivadas de precipitados de culturas de *M. tuberculosis* inativadas pelo calor), por via intradérmica, no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo do indivíduo, com posterior leitura da reação de hipersensibilidade tardia local induzida pelo PPD (mediante aferição do tamanho da endureção cutânea desenvolvida após 48-72h da injeção), com o objetivo de medir a resposta imune celular a estes antígenos (**Figura 7B**) (BRASIL, 2001, 2011; CAILLEAUX-CEZAR, 2012; CASTELLO BRANCO & ROCHA, 2012; WHITWORTH *et al.*, 2013).

Atualmente, conta-se também com a metodologia de *Interferon Gamma Release Assays* (IGRAs), que permite a detecção de uma resposta imune celular do hospedeiro contra antígenos do *M. tuberculosis*, a partir de amostra de sangue periférico. As células T CD4⁺ e CD8⁺ sofrem exposição *in vitro* a antígenos do bacilo, e caso estejam presentes células específicas contra o *M. tuberculosis* (primadas para reagirem contra o patógeno em uma segunda exposição), essas se ativarão e, como consequência, irão secretar interferon-gama (IFN- γ), uma citocina pró-inflamatória. Como o IFN- γ será produzido apenas por essas células específicas contra o bacilo, realiza-se sua medição para se averiguar a ocorrência de infecção pelo *M. tuberculosis* (WHITWORTH *et al.*, 2013). Estão disponíveis comercialmente ensaios como o T-SPOT.TB[®] e QuantiFERON[®] TB-Gold In-Tube (**Figura 7C e D**),

para medir a liberação *in vitro* de IFN- γ em resposta a antígenos específicos do *M. tuberculosis*, como o ESAT-6 e o CFP-10 (GRAN, ABMUS & DYRHOL-RIISE, 2013).

Figura 7 – Bases imunológicas dos testes PT e IGRAs



WHITWORTH, H. S. *et al.* IGRAs – The gateway to T cell based TB diagnosis. **Methods**, v. 61, p. 52–62, 2013. (A) Após a infecção, fagocitose do *M. tuberculosis* no pulmão, apresentação de antígenos pelas APCs do linfonodo hilar e ativação de células T antígeno-específicas. (B) PT, tradicionalmente utilizada, detecta uma reação de hipersensibilidade *in vivo* após a injeção intradérmica de antígenos TB. (C, D) IGRAs detecta uma resposta *in vitro* de IFN- γ das células T após a estimulação *overnight* de células mononucleares do sangue periférico ou sangue total com antígenos de *M. tuberculosis*.

As duas técnicas atualmente disponíveis apresentam certas limitações: a PT demonstra dificuldades relacionadas à reprodutibilidade e interpretação dos resultados (ESCOBEDO, MORENO & ESPINO, 2013). A metodologia IGRAs, apesar da maior especificidade (MUÑOZ & SANTIN, 2013), é uma técnica mais complexa, apresenta um custo mais elevado em relação à PT (WHO, 2012) e, além de sofrer influência do contexto epidemiológico, seu desempenho e valor preditivo ainda não foram estabelecidos naqueles indivíduos com suspeita de infecção latente (PAI, ZWERLING & MENZIES, 2008 *apud* BRASIL, 2011).

Tanto PT quanto IGRAs não são capazes de diferenciar infecção latente de TB ativa, como também não podem prever com precisão o risco de indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis* desenvolverem TB ativa, ou diferenciar infecção latente entre persistente e resolvida (O'GARRA *et al.*, 2013; RANGAKA *et al.*, 2012; WALLIS *et al.*, 2013; WHO, 2012).

1.6 Resposta imune anti *M. tuberculosis*

Após inalação do *M. tuberculosis*, a defesa contra a infecção é do tipo inespecífica, composta inicialmente por barreiras físicas presentes no trato respiratório humano – pelos nasais, turbilhonamento do ar inalado, reflexos de tosse, secreção mucoide da árvore respiratória e *clearence mucociliar* – com objetivo de impedir o alcance de patógenos aos alvéolos. Mas, de acordo com a carga bacilífera inalada, alguns bacilos ainda conseguem alcançar o trato respiratório inferior e gerar a infecção (LOPES *et al.*, 2006).

Nos alvéolos, a primeira linha de defesa contra o *M. tuberculosis* é composta por células fagocitárias, como macrófagos residentes, células dendríticas, monócitos e neutrófilos. A invasão pelo bacilo inicia-se pelo reconhecimento de moléculas expressas na sua superfície pelas células fagocíticas do hospedeiro, através de ligação aos receptores associados a patógenos, incluindo os receptores do tipo Toll-like (TLRs). Essa etapa de reconhecimento antigênico propicia a ativação da imunidade inata, com consequente indução de cascatas de sinalização intracelular, que promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-12 (IL-12), proteínas antimicrobianas e o desenvolvimento dos processos de apresentação de antigênica, importantes para o recrutamento e a ativação de células do sistema imunológico (AHMAD, 2010; YUK & JO, 2014).

Os bacilos são fagocitados por macrófagos alveolares e permanecem no citoplasma da célula hospedeira, dentro da estrutura do fagossoma. Os macrófagos infectados desenvolvem diferentes respostas antimicrobianas contra o patógeno intracelular: secreção de mediadores inflamatórios; produção de fatores microbicidas, como intermediários reativos de oxigênio e óxido nítrico; ativação de mecanismo apoptose, para inviabilizar o microambiente de multiplicação da bactéria, isolá-la de outros macrófagos não infectados e, assim, impedir a infecção de novas células, já que na morte por apoptose não ocorre lise da membrana plasmática da célula hospedeira; e ainda formação do fagolisossoma, proveniente da fusão entre o fagossoma e o lisossoma, organela do citoplasma do macrófago que apresenta um pH ácido (4,5-5,0) e grande quantidade de enzimas hidrolíticas, capazes de degradar

macromoléculas, inclusive microrganismos. Porém, o *M. tuberculosis* desenvolveu mecanismos de evasão, que possibilitam sua permanência na forma viável, multiplicando-se dentro do fagossoma dos macrófagos infectados (FLYNN & CHAN, 2001; O’GARRA *et al.*, 2013).

Os macrófagos infectados secretam citocinas que estimulam a quimiotaxia de leucócitos circulantes na corrente sanguínea, sendo os polimorfonucleares os primeiros a chegarem ao sítio de infecção, onde se acumulam e desenvolvem uma reação inflamatória do tipo inespecífica. Os próximos a se deslocarem são os monócitos. (GUZZETTA & KIRSCHNER, 2013; LOPES *et al.*, 2006; O’GARRA *et al.*, 2013).

As células dendríticas também desempenham papel crucial na resposta imune contra o bacilo. Após reconhecimento e internalização dos antígenos, essas células migram para os linfonodos e os apresentam para células T naïve, para promover a ativação da resposta imune adquirida (AMARAL, 2011).

Portanto, a resposta de macrófagos, células dendríticas e demais células fagocíticas é importantes tanto na fase inicial da resposta imune, quanto na etapa de resposta adaptativa. Por meio dos mecanismos de defesa acima descritos e pelo processamento e apresentação dos antígenos do *M. tuberculosis*, essas células são essenciais ao estabelecimento de uma resposta imunológica eficiente contra o patógeno, pois asseguram a ativação de funções efetoras e o recrutamento de linfócitos T auxiliares e citotóxicos ao local da infecção (GUZZETTA & KIRSCHNER, 2013; O’GARRA *et al.*, 2013).

Visto que o *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular e que seus antígenos são preferencialmente apresentados por moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade de classe II (MHC-II), a resposta imune proveniente de células T CD4+ é de extrema importância para proteção do hospedeiro. Prova disso são os indivíduos com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e HIV positivos (com depleção de células T CD4+), que apresentam um risco anual de 8-10% de desenvolverem TB ativa, enquanto aqueles infectados apenas pelo bacilo (HIV negativo) apresentam um risco de 10% ao longo de toda a vida (FLYNN, 2004).

Segundo Ahmad (2010), os linfócitos T CD4+ parecem ter várias funções secundárias e críticas ao controle da infecção pelo *M. tuberculosis*, além da produção inicial de IFN- γ . Dentre essas funções destacam-se a indução de apoptose de macrófagos infectados, através da interação de ligantes Fas/Fas; produção de citocinas pró-inflamatórias; indução de produção de citocinas imunorreguladoras (como interleucinas IL-10, IL-12 e IL-15) por outras células imunes (macrófagos e células dendríticas) e ativação de macrófagos através do contato direto, via ligante CD40. As células T CD4+ também parecem ser críticas para a função citotóxica de células T CD8+, que é mediada pela IL-15.

A resposta imune anti-*M. tuberculosis* está intimamente relacionada à presença de células Th1, que produzem IFN- γ , interleucina-2 (IL-2) e TNF- α , citocinas diretamente relacionadas a uma imunidade mediada por células, eficiente contra patógenos intracelulares (MATUCCI, MAGGI, VULTAGGIO, 2014). O TNF- α , contribui para ativação de mecanismos efetores em monócitos e macrófagos, e para a manutenção da integridade do granuloma – estrutura formada no sítio de infecção, em consequência da resposta imunológica local contra o bacilo – além de induzir diretamente a produção de outras citocinas, como a interleucina-1 e a interleucina-6, e indiretamente a produção de IFN- γ e IL-2. A IL-2 tem papel relevante na manutenção da função efetora e na renovação de células T (atua na diferenciação e sobrevivência de células ativadas), e ainda na manutenção de células de memória. O IFN- γ age na maturação de granulomas funcionais; promove proliferação celular; potencializa a expressão de moléculas de adesão e as atividades microbicidas de macrófagos e células dendríticas; previne a exaustão de células T de memória e aumenta a apresentação de antígenos, promovendo o recrutamento de células T CD4+ e T CD8+ citotóxicas, que participam dos mecanismos de indução de morte bacteriana (AHMAD, 2010; CAVALCANTI *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2006; MARÍN *et al.*, 2012; SILVA, 2010; MATUCCI, MAGGI, VULTAGGIO, 2014).

De acordo com Matucci e colaboradores (2014), também foi confirmado o papel de células T CD8+ anti-*M. tuberculosis*, pela presença dessa população no lúmen das vias aéreas no início da infecção. Suas funções efetoras vão desde habilidade para lisar células infectadas pelo bacilo (como macrófagos e células dendríticas); produção de IFN- γ , embora em menor extensão que as células T CD4+; até a

promoção de morte da bactéria intracelular, através da produção de granzimas e perforinas.

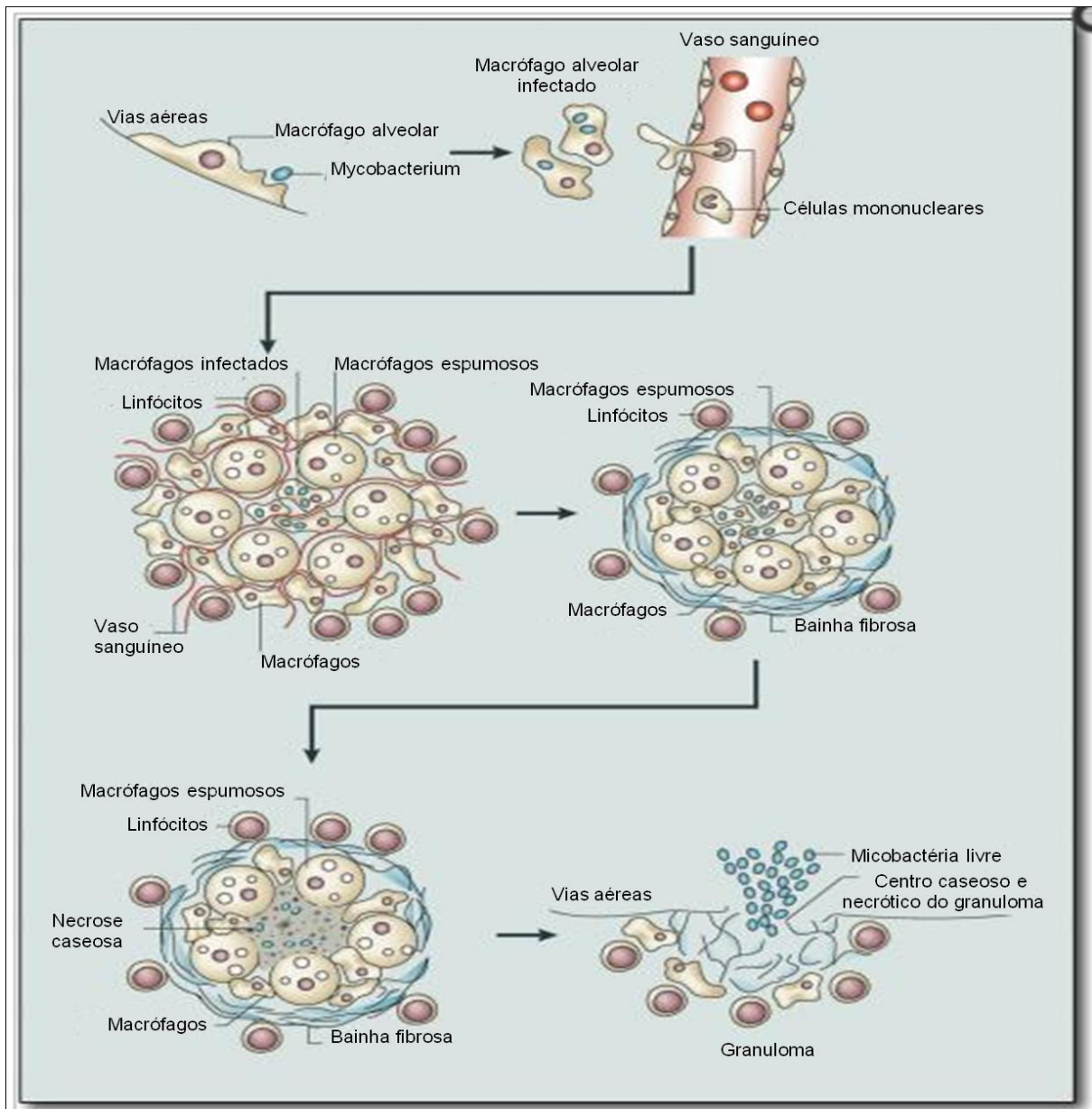
A resposta imune específica promove a ativação e diferenciação de células T que, guiadas por quimiocinas produzidas pelas células infectadas pelo *M. tuberculosis*, migram para o foco da infecção. O acúmulo de macrófagos, linfócitos T e demais células – como células dendríticas, fibroblastos e células endoteliais – leva à formação da estrutura do granuloma no sítio de infecção (AHMAD, 2010).

1.6.1 Formação do granuloma na infecção pelo *M. tuberculosis*

A infecção pelo *M. tuberculosis* desencadeia uma reação inflamatória crônica, que envolve macrófagos e outras células inflamatórias e culmina na formação de uma estrutura complexa no pulmão do hospedeiro acometido, denominada granuloma (**Figura 8**). Existem vários tipos de granulomas na TB humana e mesmo em um indivíduo com TB pulmonar, caracterizados de acordo com o nível de inflamação, necrose, mineralização, fibrose e composição celular (diferentes níveis de macrófagos, linfócitos, neutrófilos, células dendríticas, e fibroblastos) (KIRSCHNER, YOUNG, FLYNN, 2010; YOSHIDA *et al.*, 2010).

Normalmente organizado numa estrutura ligeiramente esférica, o granuloma apresenta um duplo papel na infecção pelo *M. tuberculosis*. Inicialmente, tem a função de proteção e controle da infecção: limita a multiplicação e a disseminação do bacilo pelo organismo ao atuar como um microambiente imunológico, no qual as células interagem entre si, via produção de numerosas citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias. Mas também atua como nicho para a sobrevivência do próprio *M. tuberculosis*, uma vez que sua conformação promove o confinamento do bacilo e age como uma barreira física, que impede que as células de defesa do hospedeiro alcancem e eliminem o patógeno (KIRSCHNER, YOUNG, FLYNN, 2010).

Figura 8 – O ciclo de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*: formação e desenvolvimento do granuloma.



Após inalação do *M. tuberculosis*, presente em gotículas no ar exalado, há fagocitose do bacilo pelos macrófagos alveolares residentes, que agora infectados, invadem a camada epitelial subjacente. A resposta pró-inflamatória resultante promove o recrutamento de monócitos da circulação e neovascularização extensa do local da infecção. Os macrófagos recrutados cercam as células infectadas e se diferenciam em células epitelióides, células gigantes multinucleadas e células espumosas. Esse conjunto de células caracteriza a estrutura inicial do granuloma, que com o tempo torna-se mais estratificado, pela formação de uma bainha fibrosa, formada de material da matriz extracelular, no exterior da camada de macrófagos. Os linfócitos são restritos principalmente a esta área periférica da estrutura granulomatosa. Muitos dos granulomas persistem neste estado de equilíbrio, mas na progressão da doença, há uma perda da vascularização, aumento da necrose e acúmulo de material caseoso no seu centro e, por fim, os bacilos infecciosos são liberados para as vias aéreas, após cavitação e colapso do granuloma nos pulmões. Fonte: adaptado de RUSSELL, D.G; BARRY, C.E , FLYNN, J.L. Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. *Science*, v.328, n. 5980, p. 852–856, 2010. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2872107/>>. Acesso em: mar. 2015.

Assim, um equilíbrio de fatores pró e anti-inflamatórios é necessário para que o papel de proteção do granuloma seja dominante e possibilite, por conseguinte, a redução ou controle da proliferação bacteriana e a modulação da inflamação, a fim de se paralisar a evolução da patologia. Esta estrutura complexa é a chave para o controle da infecção pulmonar e dos danos subsequentes, e compreender a interação de vários tipos de células em granulomas é essencial para elucidar os mecanismos de defesa envolvidos (GUZZETTA & KIRSCHNER, 2013; KIRSCHNER, YOUNG, FLYNN, 2010).

Inicialmente, o granuloma é uma massa amorfa formada pelas células infectadas (em sua maioria macrófagos), por neutrófilos e macrófagos. Com o tempo, há o processamento e apresentação dos antígenos da bactéria pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), com ativação de células T, seguida por ativação de macrófagos e desenvolvimento de células especializadas, incluindo células epitelióides, células gigantes multinucleadas e macrófagos espumosos, que aumentam a complexidade da estrutura e constituem o granuloma maduro (O'GARRA *et al.*, 2013; RUSSELL, BARRY, FLYNN, 2010; YOSHIDA *et al.*, 2010).

Com o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida e a chegada de linfócitos ao local da infecção, o granuloma adquire forma mais organizada, estruturada e estratificada. O centro da estrutura, rico em macrófagos, sofre necrose via atuação do TNF- α secretado pelos macrófagos infectados e torna-se rodeado por um manto de linfócitos (composto largamente por linfócitos T CD4+ e, em menor conjuntura, por linfócitos B e T CD8+), ainda que no granuloma as células T pareçam ter a função de célula apresentadora de antígenos limitada. O granuloma pode ainda ser englobado por uma bainha fibrosa, que delimita a periferia da estrutura, proveniente da ativação de fibroblastos e da produção de colágeno e elastina pelas células epitelióides e células gigantes. A necrose observada no centro do granuloma é do tipo caseosa: homogênea, amarelo-esbranquiçada, rica em proteínas e em gorduras liberadas pelo metabolismo bacilar (LOPES *et al.*, 2006; O'GARRA *et al.*, 2013; RUSSELL, BARRY, FLYNN, 2010).

O aparecimento de linfócitos específicos contra o *M. tuberculosis*, aproximadamente 2 a 3 semanas após a infecção, marca o fim da fase de replicação bacteriana e o

rápido início de um estado de "contenção" (latência). Nesta fase, o granuloma já se apresenta extensivamente vascularizado e há um recrutamento ativo de células para o local da infecção. Naqueles granulomas cuja patologia está associada com a progressão da doença, a bainha fibrosa se torna mais espessa e o número de vasos sanguíneos que penetram na estrutura diminui. Também há um aumento no número de macrófagos espumosos, que podem ser os responsáveis pelo aumento de detritos caseosos no centro do granuloma. Neste estágio avançado, a porção caseosa do granuloma apresenta um estado de hipóxia, condição que pode induzir um estado de persistência não replicativo do *M. tuberculosis*, pela falta de oxigenação tecidual (RUSSELL, BARRY, FLYNN, 2010).

Com a evolução, o foco de necrose caseosa pode sofrer calcificação, situação em que há maior redução da tensão de oxigênio e do pH no tecido, o que corrobora para a redução da carga bacilar no local. Porém, no tecido de granulação adjacente ao centro caseoso, o crescimento bacteriano ainda é intenso, no interior de macrófagos jovens; processo que pode desencadear na evolução da doença, ao promover a extensão da necrose (LOPES *et al.*, 2006). Assim, estudos têm proposto que na infecção latente os bacilos residem na zona central de hipóxia por necrose, em um estado metabolicamente alterado, e na TB ativa podem se multiplicar em áreas periféricas do granuloma, cuja tensão de oxigênio é maior (O'GARRA *et al.*, 2013).

Granulomas ativos, visualizados na doença pulmonar ativa, exibem uma patologia complexa: após meses, o foco caseoso sólido pode se liquefazer – via ação de enzimas proteinases, nucleases e lipases de macrófagos vivos e mortos – com posterior ruptura do granuloma e eliminação do material; seguida de formação de cavidade e do contato dos bacilos com o oxigênio do ar, com significativo aumento da população microbiana. Milhares de bacilos viáveis e infecciosos são liberados para as vias aéreas, resultando no desenvolvimento de uma tosse produtiva, que facilita a propagação de aerossol de bacilos infecciosos (LOPES *et al.*, 2006; RUSSELL, BARRY, FLYNN, 2010).

Histologia de tecidos infectados de pacientes imunocompetentes com tuberculose ativa revelou que há granulomas em todos os estados de desenvolvimento, desde o

estado de contenção até o de progressão para a doença ativa; indicando que o destino de cada granuloma é determinado localmente, não sistemicamente. Observações recentes em pacientes com TB indicam que o influxo de neutrófilos na fase tardia da doença também pode contribuir para o mecanismo de dano tecidual, com posterior disseminação de bactérias infecciosas para as vias aéreas (RUSSELL, BARRY, FLYNN, 2010).

1.7 Características de células T de memória

Durante a resposta imune contra um determinado patógeno, as APCs são as primeiras a entrarem em contato com o microrganismo invasor. Após contato e reconhecimento, essas células, principalmente macrófagos e células dendríticas, migram para os órgãos linfoides secundários, visando interagir com linfócitos T naíve, para promoção de uma rápida expansão clonal de células T efetoras, que por sua vez, adquirem a capacidade de migrar para o local da infecção e combater o patógeno (CORREIA, 2012).

Em seguida, uma vez que o sistema imunológico tenha eliminado o agente patogênico, inicia-se a fase de contração da resposta imune, um mecanismo homeostático em que mais de 90% dessas células efetoras são eliminadas por ativação de mecanismos de apoptose. As células que resistem ao processo de morte, se diferenciam e assumem um fenótipo de memória (AHMED & GRAY, 1996; GUZZETTA & KIRSCHNER, 2013; PREZZEMOLO *et al.*, 2014).

Os linfócitos T de memória compreendem um grupo heterogêneo de células de vida longa, que se desenvolvem na resposta imune antígeno-específica e permanecem no organismo, mesmo na ausência de estimulação antigênica. Apresentam capacidade de se expandirem rapidamente após uma segunda exposição ao antígeno, ainda que este esteja em baixas concentrações, para o qual a resposta é especificamente direcionada, mais rápida e sensível (AHMED & GRAY, 1996; APPAY *et al.*, 2008; SALLUSTO, GEGINAT, LANZAVECCHIA, 2004).

A detecção simultânea de marcadores de superfície celular permite a distinção de uma gama de subpopulações de linfócitos T e, nos últimos anos, diversos estudos

visaram à caracterização fenotípica detalhada destas populações celulares (APPAY *et al.*, 2008; HARARI, VALLELIAN, PANTALEO, 2004).

Uma das primeiras descobertas em relação à fenotipagem de células de memória foi que estas se diferenciam das células T naïve, de acordo com a expressão de CD45, uma proteína transmembrana tirosina fosfatase relacionada com a transmissão de sinais entre células T e B, que tem importante papel na proliferação de linfócitos T antígeno-estimulada, no desenvolvimento do timo e na regulação de uma gama de processos como crescimento celular, diferenciação, ciclo mitótico e transformação oncogênica (CORREIA, 2012; TROWBRIDGE & THOMAS, 1994 *apud* SILVA, 2013). Durante o processo de diferenciação celular, múltiplas isoformas do CD45, como CD45Ra, CD45Rb, CD45Rc e CD45Ro, são expressas na superfície de linfócitos T, como resultado de *splicing* alternativo de três éxons (4, 5 e 6) no gene de CD45, caracterizado pela inclusão diferencial dos segmentos A, B e C. A isoforma CD45Ra é expressa na superfície de linfócitos T naïve, enquanto que a isoforma CD45Ro é típica de linfócitos T de memória (MARÍN *et al.*, 2012; MICHIE *et al.*, 1992 *apud* SILVA, 2013; ZIKHERMAN & WEISS, 2008).

Diversos marcadores de superfície podem ser analisados com o objetivo de subdividir fenotipicamente as populações de células T, além de correlacionar estes marcadores com a capacidade funcional e o estágio de diferenciação celular. Os mais utilizados são aqueles envolvidos nos fenômenos de ativação (CD45Ra e CD45Ro), coestimulação (CD27 e CD28) e migração celular (CCR7). Outros marcadores de superfície, como os receptores de quimiocinas (por exemplo, CX3CR1) e moléculas de adesão (CD62L e CD11a) também parecem seguir padrões específicos de expressão nessas subpopulações celulares (APPAY *et al.*, 2008; HARARI, VALLELIAN, PANTALEO, 2004).

De acordo com Correia (2012), a quantificação e a estimativa da frequência de células T naïve e de memória foram realizadas por muito tempo, utilizando um único marcador de superfície celular como ferramenta, como as isoformas CD45Ra e CD45Ro do antígeno leucocitário comum, CD45. No entanto, com a evolução da metodologia de citometria de fluxo e considerando-se a heterogeneidade fenotípica dessa subpopulação linfocitária, diversos estudos têm ressaltado a necessidade de

se incluir marcadores de superfície adicionais às análises, para melhor caracterização e quantificação dessas células. De Rosa e colaboradores (2001) mostraram em estudo por citometria de fluxo, que o uso de um marcador de superfície isoladamente, como o CD45Ra, seria insuficiente para identificar adequadamente as células T naíve e que a adição de um segundo marcador ao protocolo de marcação aumentou significativamente a especificidade de detecção destas células (97-98% para células T CD4+ e até 93% para células T CD8+).

Hamann e colaboradores (1997) foram pioneiros em mostrar que linfócitos T CD8+ humanos poderiam ser divididos nos subtipos naíve, memória e efetor, de acordo com a expressão de dois marcadores de superfície celular, o CD45Ra e o CD27. O CD27 é uma molécula coestimulatória, membro da família dos receptores ligantes a fatores associados a receptores de TNF (Trafs), expressa em todas as células T naíve e em uma proporção de células T de memória (MARÍN *et al.*, 2012). Tem sido proposto que a perda da expressão de CD27 seria característica de células T com capacidade efetora, sugerindo que aquelas que não expressam este marcador de superfície (CD27-) seriam um subconjunto mais diferenciado, com uma maior capacidade de secreção de citocinas e com uma resposta de memória mais forte que as células que expressam o CD27 (SCHIÖTT *et al.*, 2004).

Sallusto e colaboradores (1999) mostraram que a análise da expressão do marcador de superfície CCR7 – um receptor de quimiocina que controla a migração de linfócitos para os órgãos linfóides secundários – juntamente com CD45Ra, possibilita a divisão das células T de memória humanas em dois subconjuntos funcionalmente distintos. Células de memória, que não expressavam os marcadores CD45Ra e CCR7 exibiram função efetora imediata e foram, então, denominadas células T de memória efetora (T_{ME}). As células de memória com fenótipo CCR7+, que não apresentaram função efetora imediata, foram denominadas células T de memória central (T_{MC}). As subpopulações de memória foram inicialmente definidas de acordo com dois critérios distintos: a) presença ou ausência de função efetora imediata e (b) expressão dos receptores de endereçamento (como o CCR7), que permitem que as células migrem para órgãos linfóides secundários contra os tecidos não-linfóides.

Assim, conforme revisado Guzzetta & Kirschner (2013), os linfócitos T de memória podem ser separados em dois fenótipos tipicamente funcionais. As células T_{ME} , presentes, principalmente, no sangue e tecidos não linfoides, são capazes de montar uma resposta rápida contra antígenos anteriormente apresentados, via produção de moléculas efetoras – citocinas. Já as células T_{MC} residem em órgãos linfóides e, apesar de desenvolverem uma resposta à estimulação antigênica mais lentamente, seriam capazes de se diferenciarem e assumirem um fenótipo de memória efetora (GUZZETTA & KIRSCHNER, 2013; SALLUSTO, GEGINAT, LANZAVECCHIA, 2004). De acordo com a expressão da isoforma de baixo peso molecular do CD45, CD45Ro, e da molécula coestimulatória CD27, as células T CD4+ e CD8+ podem ser subdivididas em quatro fenótipos: T naïve (CD45Ro-CD27+), T_{MC} (CD45Ro+CD27+), T_{ME} (CD45Ro+CD27-) e T efetoras (CD45Ro-CD27-) (APPAY *et al.*, 2008; JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2006; MARÍN *et al.*, 2012; RUEDA *et al.*, 2010; SCHIÖTT *et al.*, 2004; TAPANINEN *et al.*, 2010).

Apesar desse conhecimento, ainda hoje permanecem divergências sobre a origem das subpopulações de memória de linfócitos T. Diversos modelos de diferenciação celular foram propostos. Inicialmente, pensou-se que as células T de memória seriam geradas a partir da diferenciação de células T efetoras, com base na ideia de que o processo de diferenciação celular seria unidirecional, em que células mais diferenciadas não seriam capazes de se reverterem a um estágio de menor diferenciação. Nesse modelo de diferenciação linear, os linfócitos T naïve estimulados dariam origem a células T efetoras, que teriam dois destinos possíveis após *clearance* do estímulo: ou a morte por apoptose, ou a diferenciação em linfócitos T_{ME} , que, por conseguinte, poderiam dar origem a linfócitos T_{MC} . Esse primeiro modelo foi logo questionado pela descrição de que células T_{MC} não apresentavam função efetora completa. Surge assim o modelo de diferenciação divergente, no qual uma célula T poderia originar células filhas com diferentes destinos de diferenciação – T_{MC} , T_{ME} ou T efetora, podendo ignorar o estágio efetor e se diferenciar diretamente em célula T de memória, por mecanismos que conferissem essa heterogeneidade, como o de divisão celular assimétrica. Ainda sugere-se a possibilidade de um terceiro modelo, no qual um linfócito T naïve pode evoluir para uma célula T efetora ou T_{MC} , sendo que esta última teria capacidade de

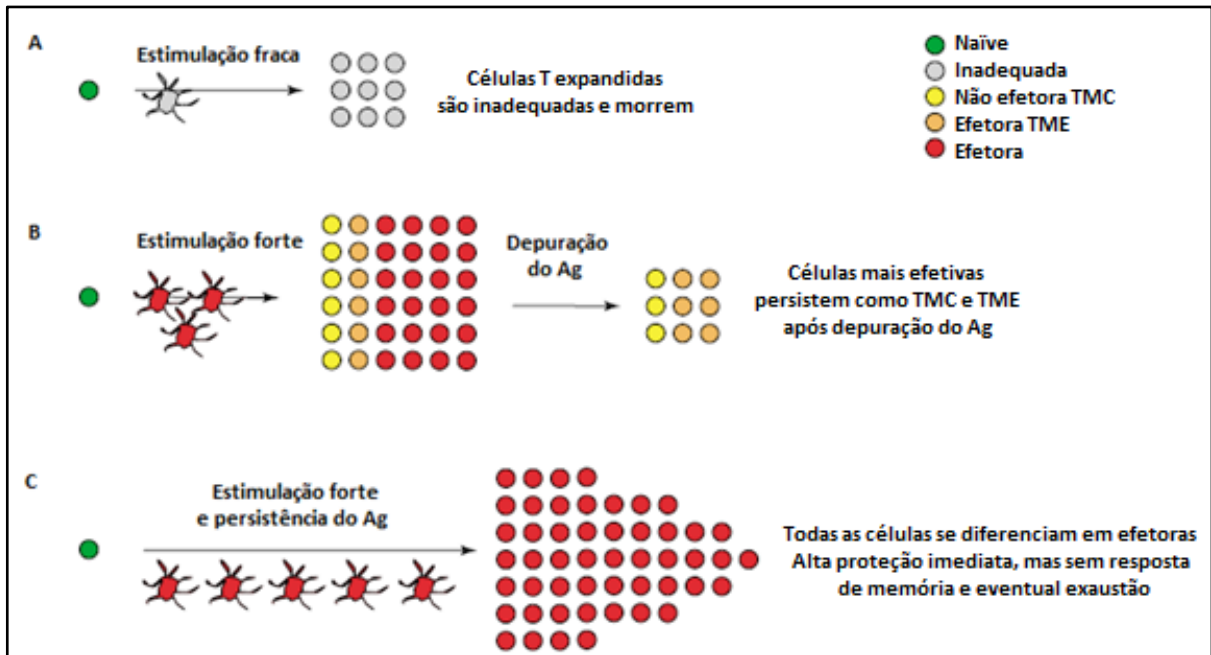
auto-renovação e diferenciação em células T_{ME} (AHMED *et al.*, 2009; KAECH, WHERRY, AHMED, 2002; SEDER, DARRAH, ROEDERER, 2008).

No estudo de Sallusto e colaboradores (1999) foi demonstrado que a estimulação *in vitro* de células T naïve resultou na geração de duas subpopulações de memória – T_{MC} e T_{ME} – e que a estimulação de células T_{MC} promoveu uma eficiente diferenciação deste fenótipo para T_{ME} . Os autores ressaltaram que esta via de diferenciação seria dependente da presença ou ausência de citocinas polarizadoras e da intensidade e duração do estímulo.

Lanzavecchia e Sallusto (2005) ressaltam que este modelo de diferenciação baseia-se na constatação de que, dependendo da força de estimulação recebida dos receptores de células T (TCR) e de citocinas presentes, as células T ativadas adquirem progressivamente receptores de endereçamento tecidual, função efetora e capacidade para responder às citocinas, enquanto perdem os receptores de endereçamento para linfonodos e capacidade proliferativa. Os mesmos autores propuseram também que, no processo de estimulação antigênica das células T naïve, três respostas podem se desenvolver, de acordo com a força e persistência do estímulo antigênico: resposta tolerância, de memória ou crônica. A primeira ocorre quando presente uma estimulação antigênica fraca e insuficiente, onde as células T proliferam e se tornam hipersensíveis ao antígeno, mas permanecem inadequadas para responderem e morrem quando o estímulo cessa. Essa resposta é favorecida se a apresentação antigênica é feita por APCs imaturas e para TCRs de baixa avidéz (**Figura 9A**). A resposta de memória se desenvolverá, caso presente uma estimulação antigênica forte, mas com posterior depuração do antígeno. Nessa situação, as células T se proliferam e atingem vários estágios de diferenciação, de acordo com a força cumulativa dos TCRs e a estimulação de citocinas recebida durante a interação com APCs maduras, sendo que a maioria delas atinge o estado de efetoras com capacidade de migração tecidual (T_{ME}), enquanto algumas atingem estágios intermediários de diferenciação (T_{MC}) (**Figura 9B**). Por fim, caso se processe uma forte estimulação antigênica, com persistência do antígeno, haverá proliferação contínua e diferenciação terminal de todas as células T - um elevado número de células efetoras será mantido por certo tempo, mediando uma proteção eficaz – inviabilizando a geração de células T_{MC} . Nesse

caso, se houver depuração antigênica futura, as células efetoras desaparecerão e as células T de memória não irão se desenvolver, por consequência de uma resposta crônica ao antígeno (**Figura 9C**).

Figura 9 – Respostas de células T, de acordo com depuração/persistência antigênica e força do estímulo.



Resposta de células T a um antígeno: (A) resposta de tolerância; (B) resposta de memória; (C) resposta crônica. Ag - antígeno. Fonte: adaptado de LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, p.326–332. 2005. Disponível em < www.sciencedirect.com >. Acesso em: set. 2014.

Conforme revisto por Correia (2012) e Silva (2013), vários fatores podem estar relacionados a esse contínuo processo de diferenciação celular, como a força do sinal de ativação celular, por interação com TCRs; a concentração antigênica e de moléculas coestimulatórias, como citocinas; a duração da interação entre as células APCs e os linfócitos; e ainda a natureza das APCs. APCs imaturas apresentam baixa capacidade estimulatória e interagem com células T através de um contato fraco, enquanto as maduras são altamente estimuladoras. Estas, quando presentes no início da resposta imune, promovem uma proliferação significativa de células efetoras, que podem sobreviver como T_{ME}. Mas, quando presentes em número significativo somente no fim do curso da resposta imune, podem ter menor capacidade de coestimulação e produção de citocinas, e disponibilizarem menos antígenos, propiciando a expansão de células não efetoras, das quais algumas

sobrevivem como células T_{MC} . Assim, durante a fase de estímulo antigênico, a ocorrência de adequada ativação de linfócitos T naíve promoveria a manutenção de um pool de memória com características efetoras (células T_{ME}). Caso a estimulação se processasse de forma subótima (em baixa concentração antigênica, por curto prazo de interação APC-linfócito T e por fraca ativação via TCRs), mas suficiente, os linfócitos T naíve estariam privados de desenvolverem função efetora e seriam mantidos em um estágio de diferenciação intermediário, caracterizando a subpopulação de linfócitos T_{MC} .

Guzzetta & Kirschner (2013) ressaltam, porém, que a disponibilidade de células T de memória não implica necessariamente em imunidade protetora, ou seja, que um novo desafio pelo mesmo agente patogênico (infecção secundária) não resultará em consequências adversas para o hospedeiro. A imunidade protetora é dependente de uma combinação de fatores relacionados à capacidade do sistema imunológico utilizar eficazmente essas células de memória e a duração dessa imunidade não é uma função linear do número de células T disponíveis.

1.7.1 Células T de memória na TB

Até o momento, a única vacina licenciada com objetivo de prevenir a tuberculose é a Bacilo Calmette-Guérin (BCG), vacina atenuada derivada da estirpe virulenta *Mycobacterium bovis*, uma vacina de quase 100 anos de uso (desde 1921), que protege crianças contra as formas graves da doença, como tuberculose meníngea e miliar. Além de não ser recomendada para lactentes infectados com HIV, devido ao risco de desenvolverem a doença disseminada por *M. bovis*, sua eficácia na prevenção da TB pulmonar em adultos é altamente variável, visto que induz uma imunidade de memória que é perdida com o avançar da idade (GARCÍA & BARRERA, 2004; WHO, 2013).

Diversos estudos têm avaliado novos candidatos a vacinas contra a TB (WHO, 2013). Em muitos deles, a eficácia das novas alternativas de imunização foi analisada de acordo com a memória imunológica desenvolvida, através de análise das subpopulações de células de memória (DUFFY *et al.*, 2009; VOGELZANG, *et al.*, 2014).

As células de memória também têm sido alvo de investigação em estudos comparativos da resposta imune anti-*M. tuberculosis* nos grupos de indivíduos infectados pelo bacilo de Koch, dentre eles, os que desenvolveram TB pulmonar ativa, os que foram curados da doença e aqueles cuja infecção permaneceu apenas no estado de latência. Em um estudo recente, as células T de memória foram caracterizadas de acordo com a expressão dos marcadores de superfície CD45Ro e CD27. Como resultados os autores trazem que pacientes com TB pulmonar ativa apresentaram frequência aumentada de células T CD4+ CD45Ro-CD27+ (T naïve) e, que após estimulação *in vitro* por PPD, desenvolveram gradualmente células CD45Ro+CD27+ (T_{MC}) (MARÍN *et al.*, 2012).

Outro trabalho avaliou a resposta de células de memória de pacientes com TB pulmonar avançada e não avançada, pela análise dos marcadores CD45Ra e CD27, após estímulo com antígenos oriundos da região RD-1 do genoma do *M. tuberculosis*. Observou-se que nos pacientes com a doença avançada a resposta de células T CD4+ com os fenótipos T_{MC} (CD45Ra-CD27+) e T_{ME} (CD45Ra-CD27-) contra os peptídeos selecionados da região RD-1 foi quase ausente; enquanto que a resposta de células T_{MC} e T_{ME} estava presente na maioria dos pacientes com TB não avançada, sendo que o fenótipo T_{ME} foi significativamente maior que o fenótipo T_{MC} nesse grupo (GOLETTI, *et al.*, 2006).

Petruccioli e colaboradores (2013) desenvolveram estudo que incluiu indivíduos com TB ativa, curados de TB e indivíduos com infecção latente pelo *M. tuberculosis*. Após estímulo de curta duração, com antígenos RD-1 (ESAT- 6 e CFP-10), as células do sangue total dos participantes foram avaliadas por citometria de fluxo, utilizando os marcadores CD45Ra e CD27 para analisar as subpopulações de memória. As células T CD4+ com fenótipo T_{ME} estavam significativamente associadas com a doença ativa, em comparação com infecção latente; enquanto que a resposta anti-RD-1 no grupo com infecção latente foi caracterizada por um fenótipo T_{MC}.

Assim, neste estudo buscou-se a geração de novas informações a cerca da presença das subpopulações de células T de memória nos indivíduos com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e naqueles curados de TB pulmonar, tais como a

frequência e funcionalidade; além de serem analisadas as diferenças e similaridades de resposta dos fenótipos avaliados entre os grupos analisados.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos progressos no controle da TB nos últimos anos, a doença permanece como um sério problema de saúde mundial. Com o objetivo de erradicar a epidemia de TB e assim garantir um mundo livre da doença, em 2012, a Organização Mundial da Saúde iniciou o desenvolvimento de uma nova estratégia de combate à doença, denominada *Post-2015 Global TB Strategy*, que sucederá o plano *Stop TB Strategy*, cujos objetivos traçados em 2006 deveriam ser alcançados até 2015. Nesse novo plano de combate à TB, foram estipuladas metas de controle da doença, tendo como referência os dados epidemiológicos do ano de 2015: até o ano de 2025, reduzir os casos de morte por TB em 75% e a taxa de incidência da doença em 50%; até 2035, reduzir os casos de morte por TB e a taxa de incidência da doença em 95% e 90%, respectivamente. Diversas ações devem ser praticadas para que essas novas metas possam ser alcançadas, como o cuidado e prevenção centrados e integrados com o paciente, através do apoio aos doentes; tratamento de todos os casos de TB, inclusive daqueles com cepas resistentes a medicamentos; gestão de comorbidades, com atividades colaborativas entre os projetos de atenção à TB e ao HIV; tratamento preventivo de pessoas com alto risco para TB; realização de vacinação contra TB; diagnóstico precoce da doença, incluindo testes de suscetibilidade aos fármacos e o rastreamento sistemático dos contatos de TB (WHO, 2014).

O rastreamento dos contatos de TB e detecção dos indivíduos com infecção latente pelo *M. tuberculosis*, em particular daqueles que recentemente adquiriram o bacilo, são de grande importância para se conquistar o controle e posterior erradicação da doença no mundo (SILVA, 2010). A notificação de TB se restringe, com raras exceções, apenas aos casos ativos da doença, o que corrobora para o desconhecimento da verdadeira prevalência da infecção latente pelo *M. tuberculosis* (TEBRUEGGE *et al.*, 2012). Novamente, ressalta-se o papel desses indivíduos na manutenção dos casos de TB: por atuarem como reservatórios para o patógeno, caso sofram algum comprometimento da resposta imunológica, poderão desenvolver a doença e, conseqüentemente, estabelecer uma nova cadeia de transmissão do bacilo (WHITWORTH *et al.*, 2013). Assim, a aquisição de novos conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos na resposta imune contra o *M. tuberculosis* na

infecção latente é crucial para a geração de estratégias mais eficazes no combate à TB, como o desenvolvimento de vacinas mais efetivas.

Para que a defesa imunológica do hospedeiro contra o *M. tuberculosis* seja eficiente, necessita-se de uma coordenação efetiva dos mecanismos de resposta imune inata e adaptativa. A resposta imune do tipo adaptativa, ou mediada por células, caracteriza-se pela expansão e diferenciação de várias subpopulações de células efetoras – como células Th1, Th17, Th2 e T reguladoras – além da geração de células T de memória, que apresentam uma maior capacidade de resposta mediante a uma nova exposição ao bacilo e são um marco da resposta imune adaptativa (MARÍN *et al.*, 2012; SALLUSTO, GEGINAT, LANZAVECCHIA, 2004).

O conhecimento sobre as células T de memória no contexto de infecções foi obtido em maior extensão a partir de estudos de infecções virais agudas e crônicas, sendo que infecções bacterianas crônicas, como a TB, foram minimamente estudadas. Além disso, explicações sobre a resposta de memória proveniente de células T CD8+ encontram-se em estágio mais avançado que aquela proveniente de células T CD4+ (HENAO-TAMAYO, ORDWAY, ORME, 2014). Diversos modelos de diferenciação celular foram propostos no intuito de se elucidar a origem de células de memória, porém, dúvidas persistem sobre qual seria mais condizente com os processos ocorridos *in vivo*. (AHMED *et al.*, 2009; KAECH, WHERRY, AHMED, 2002; SEDER, DARRAH, ROEDERER, 2008). Certas condições podem estar relacionadas à dificuldade de comprovar a via de diferenciação de linfócitos T, como a realização de ensaios *in vitro* em curto prazo, ou de estudos *in vivo* que utilizam intervalos curtos de tempo antes do segundo estímulo antigênico (HENAO-TAMAYO, ORDWAY, ORME, 2014).

A metodologia de citometria de fluxo possibilita análises de células em suspensão, de forma rápida e objetiva, a partir da marcação com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos. As células em estudo podem ser quantificadas e identificadas de acordo com os parâmetros de tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência (SILVA, 2013). Essa tecnologia tem permitido muitos progressos nos estudos que envolvem a análise de diferentes populações celulares em processos infecciosos e inflamatórios humanos. A detecção de marcadores de

superfície celular por meio da citometria de fluxo possibilitou avanços na caracterização de novas subpopulações celulares, inclusive das células T de memória. A distinção e classificação desta subpopulação de linfócitos podem ser realizadas pela análise da expressão de diferentes marcadores fenotípicos na superfície celular, como CD45Ro e CD27.

A importância da subpopulação de linfócitos T de memória na infecção pelo *M. tuberculosis* tem sido demonstrada em estudos desenvolvidos com animais (HENAO-TAMAYO *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2012; VOGELZANG *et al.*, 2014). Embora seja sabido que nos indivíduos infectados pelo bacilo e nos curados de TB pulmonar, células T CD4⁺ de memória *M. tuberculosis*-específicas podem ser induzidas (ADEKAMBI *et al.*, 2012), permanecem lacunas sobre as semelhanças e/ou diferenças dessa resposta celular específica entre esses grupos de indivíduos, tanto no nível fenotípico quanto de funcionalidade da resposta de memória. O papel dessas células no ser humano ainda é pouco compreendido: a única vacina disponível contra TB não é capaz de gerar uma resposta de memória efetiva, uma vez que promove proteção variável na população humana e parece ser efetiva em proteger a população apenas contra as formas graves da doença. Além disso, o fato de que indivíduos curados de TB poderem se reinfectar e, novamente, desenvolverem a doença, levanta a questão de quão protetoras são as células T de memória, específicas ao *M. tuberculosis* (MARÍN *et al.*, 2012).

Assim, através do estudo de avaliação da resposta imune das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, mediante investigação do fenótipo e das citocinas produzidas por estas células, em resposta a antígenos de parede celular da cepa H37Rv do *M. tuberculosis*, buscar-se-á fornecer uma melhor compreensão da biologia, da patogênese e das alterações imunológicas ocorridas na infecção latente por esse bacilo, comparativamente aos curados de TB pulmonar e indivíduos saudáveis não infectados. Esse estudo poderá contribuir, ainda, para a geração de subsídios intelectuais para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes e de novos métodos de diagnóstico, que sejam capazes de prever o risco de reativação da infecção pelo *M. tuberculosis*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar por citometria de fluxo o perfil fenotípico e caracterizar a funcionalidade de linfócitos T CD4+ e T CD8+, entre as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos com infecção latente pelo *M. tuberculosis*, comparativamente aos indivíduos saudáveis não infectados e aos curados de TB pulmonar.

3.2 Objetivos Específicos

1- Caracterizar fenotipicamente as subpopulações T naïve, T efetora, T_{MC} e T_{ME} de linfócitos T CD4+ e TCD8+ dos participantes do estudo, por análise da expressão de moléculas de superfície CD45Ro e CD27, após ensaio *in vitro* de 144 horas.

2- Caracterizar a resposta imune específica ao *M. tuberculosis* das subpopulações T_{MC}, T_{ME} e T efetora de linfócitos T CD4+ e T CD8+ dos participantes do estudo, avaliando-os quanto à produção de citocinas pró-inflamatórias, após ensaio *in vitro* de 144 horas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Normas éticas

Todos os protocolos experimentais empregados na realização do estudo foram elaborados de acordo com normas éticas de pesquisa médica, por adoção dos princípios da “Declaração de Helsinque” (adotada pela 18ª Assembleia Mundial de Médicos em Tóquio, Japão, 1975), os quais estão contidos no “Código de Ética Médica” do Conselho Federal de Medicina do Brasil.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP, de acordo com o processo n. 28/13, registro n. 13864313.3.0000.5149 (**Anexo A**).

4.2 Caracterização da população de estudo

Os participantes deste estudo foram recrutados no Ambulatório de Referência de Tuberculose do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG) e na Faculdade de Farmácia da UFMG. Todos os indivíduos receberam esclarecimentos sobre a natureza e objetivos do estudo. Aqueles que aceitaram participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**anexos B e C**) e foram entrevistados por profissionais de saúde, que preencheram a ficha clínica (**Anexo D**), que contém um questionário validado pela Rede-TB de pesquisa e atualmente em uso no Ambulatório de Referência de TB (HC/UFMG).

Assim, neste estudo foram avaliados os seguintes grupos de indivíduos:

- Grupo de voluntários assintomáticos com prova tuberculínica (PT) positiva (portadores de infecção latente pelo *M. tuberculosis*);
- Grupo de voluntários saudáveis com PT negativa (não infectados pelo *M. tuberculosis*);
- Grupo de voluntários curados de TB pulmonar.

Os participantes que não tinham histórico de TB foram submetidos à PT, para possibilitar a classificação em indivíduos com PT positiva ou negativa e, assim, compor dois dos três grupos de estudo. A PT foi realizada pela administração de PPD (RT 23 do *M. tuberculosis*, 2 UT – Compenhague-Dinamarca) na dose de 100 µL, pela técnica de Mantoux (injeção intradérmica) no antebraço esquerdo (PT1). A leitura do resultado foi realizada 72 horas após a aplicação do PPD, utilizando régua milimetrada transparente para medição do maior diâmetro transverso da área do endurecido palpável gerado. Foi realizada uma segunda PT (PT2 – no antebraço direito), decorrida uma semana da aplicação da PT1, naqueles participantes que apresentaram um resultado menor que (<) 10 mm na PT1, com objetivo de se avaliar o efeito *booster* (incremento de 6 mm na leitura da PT1 e com resultado maior ou igual a 10 mm). Os participantes com leituras menores que 10 mm e efeito *booster* negativo foram classificados como PT negativa e aqueles que tiveram endurecido maior ou igual (≥) a 10 mm na PT1 ou efeito *booster* positivo na PT2 foram classificados como PT positiva (com infecção latente pelo *M. tuberculosis*).

O grupo de curados de TB pulmonar foi composto de indivíduos que anteriormente receberam diagnóstico clínico-laboratorial de TB, realizaram tratamento adequado, preconizado pelo Ministério da Saúde (MS) e que possibilitou a cura da doença, mas permaneceram com alguma sequela pulmonar.

4.3 Critérios de inclusão

- Indivíduos entre 18 e 60 anos;
- Indivíduos HIV negativo;
- Indivíduos saudáveis com PT negativa;
- Indivíduos assintomáticos com PT positiva (portadores de infecção latente pelo *M. tuberculosis*);
- Indivíduos curados de tuberculose pulmonar ativa, com confirmação clínico-laboratorial;
- Concordância com a participação no estudo e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.4 Critérios de exclusão

- Indivíduos HIV positivo;
- Gestantes;
- Pacientes com outros quadros patológicos associados tais como: diabetes, silicose, sarcoidose, linfoma, hepatopatias, imunodeficiência congênita, insuficiência renal crônica, autoimunidade e desnutrição;
- Indivíduos em uso de imunossupressores e corticosteroides;
- Indivíduo ou paciente que se recusar em assinar o TCLE.

4.5 Estudos laboratoriais

Após padronização de todas as condições e etapas metodológicas abaixo descritas (purificação de células mononucleares do sangue periférico, cultivo celular, marcação de superfície celular e intracitoplasmática), foi iniciada a coleta de amostras dos participantes do estudo.

4.5.1 Obtenção das amostras de sangue

Foram coletados 20 mL de sangue periférico de cada participante elegível para o estudo, sendo 16 mL coletados em anticoagulante heparina (para realização dos ensaios *in vitro*) e 4 mL coletados em anticoagulante EDTA (para pesquisa de infecção pelo vírus HIV), diretamente em tubos do sistema *Vacutainer* (Becton-Dickinson), devidamente identificados. Todo material utilizado na coleta era estéril e descartável.

Os participantes do estudo tiveram suas amostras de sangue total (colhido em EDTA) submetidas à pesquisa sorológica para infecção pelo vírus HIV, utilizando teste imunocromatográfico rápido (HIV-EIC, Gold Analisa). Todos os participantes incluídos apresentaram resultado não reagente para o teste, indicando ausência de infecção pelo vírus.

4.5.2 Análise do fenótipo e funcionalidade de linfócitos T do sangue periférico após cultivo celular *in vitro*

4.5.2.1 Purificação de células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico dos participantes do estudo foram isoladas por metodologia de centrifugação em gradiente de Ficoll Hypaque (Sigma Chemical Co., densidade 1,077g/mL). Sobre um volume de Ficoll Hypaque depositou-se o dobro de sangue heparinizado de cada paciente (mantendo a proporção de 1:2 Ficoll Hypaque – sangue) em tubos estéreis de poliestireno de 50 mL (Falcon – Corning). O conteúdo dos tubos foi centrifugado a 550g, durante 45 minutos a 18°C, e com auxílio de pipeta Pasteur estéril, coletou-se o anel de CMSP, formado na interface entre o Ficoll Hypaque e o plasma. As CMSP foram transferidas para novo tubo estéril de poliestireno e, em seguida, lavadas por três vezes com meio RPMI-1640, submetidas à centrifugação a 370g durante 7 minutos a 4°C e posterior descarte do sobrenadante. O sedimento celular obtido foi ressuscitado em 1,0 mL de meio RPMI-1640 e procedeu-se a contagem das células em câmara hematómica de Neubauer, com simultânea avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão por coloração com Azul de Tripán, em que as células eram consideradas não viáveis quando, ao serem analisadas por microscopia óptica, estavam incluídas com o Azul de Tripán ou apresentavam degeneração em forma de balão (MELO *et al.*, 2003). Ajustou-se a concentração celular para $1,5 \times 10^6$ células viáveis/mL, com meio RPMI-1640 completo (suplementado com 5% de soro AB humano [Sigma-Aldrich], 50UI penicilina/ 0,05 mg estreptomicina/mL [Sigma-Aldrich] e 2mM de L-glutamina [Sigma-Aldrich]).

4.5.2.2 Preparo de antígeno de parede celular da cepa H37Rv da bactéria

M. tuberculosis

A cepa de referência H37Rv de *M. tuberculosis* (ATCC 27294) foi recuperada do Laboratório de Micobactérias do HC/UFMG. Esta cepa foi repicada em tubos com meio Lowenstein-Jensen, incubados a 37°C até evidência de crescimento bacteriano (desenvolvimento de colônias de *M. tuberculosis*). Após crescimento, as colônias foram coletadas, ressuscitadas em solução salina estéril e neutralizadas a

80°C por 1 hora. Em seguida, o material foi sonificado em 2 ciclos de 20 segundos a 40 hertz (ou em amplitude de 36%), em banho de gelo e a suspensão obtida foi esterilizada por radiação gama (dose de 5000 Gray por 2 horas e 15 minutos). Por fim, a concentração de proteínas foi dosada pelo método de LOWRY *et al.* (1950).

4.5.2.3 Cultivo de CMSP

As CMSP foram incubadas em placas de cultivo de 24 orifícios (*Corning Costar Corporation, Cambridge, MA*), após o ajuste da concentração celular. Em cada poço de cultivo foram adicionadas $1,5 \times 10^6$ células em 1,0 mL de meio de cultura completo.

As células de cada participante foram cultivadas na presença de antígeno da cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, na concentração final de 10 µg/mL (cultura estimulada) e na ausência de antígeno (apenas com meio de cultura completo – cultura controle). Como controle positivo da cultura, foi feito cultivo celular na presença de mitógeno fitohemaglutinina (Phytohemagglutinin – PHA – Sigma-Aldrich) na concentração final de 3 µg/mL. Procedeu-se a incubação das culturas de células em estufa, com atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂, na temperatura de 37°C, por 144 horas.

4.5.2.4 Anticorpos monoclonais

Para a análise imunofenotípica de linfócitos T de cada participante, foram utilizados anticorpos monoclonais específicos contra glicoproteínas expressas na superfície de leucócitos, conhecidas como marcadores celulares de membrana e denominadas internacionalmente como *Cluster of Differentiation* (CD). Esses anticorpos reagem especificamente com CDs distintos, possibilitando assim, a detecção e posterior avaliação da percentagem dos diferentes tipos de células leucocitárias de interesse, no caso, linfócitos T naïve, efetores, de memória central e de memória efetora. Para tal, foram utilizados anticorpos monoclonais fabricados pelas empresas BD Biosciences® e eBiosciences® (**Tabela 1**).

Para análise de funcionalidade celular, após cultivo com estímulo antigênico específico, foram empregados anticorpos mononucleares específicos para as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-2. Por meio de protocolo de marcação intracitoplasmática, esses anticorpos marcados com fluorocromos permitiram avaliar quais das CMSP foram capazes de produzir essas citocinas. Foram utilizados anticorpos monoclonais fabricados pela empresa BD Biosciences[®] (**Tabela 2**).

Tabela 1 – Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, empregados para análise de populações e subpopulações de linfócitos T.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Código	Fabricante
Mouse Anti- Human CD4	FITC	RPA-T4	555346	BD Biosciences
Mouse Anti- Human CD8	APC	RPA-T8	555636	BD Biosciences
Mouse Anti- Human CD45Ro	PerCP-Cy5.5	UCHL1	560607	BD Biosciences
Mouse Anti- Human CD27	efluor [®] 450	O323	48-0279	eBiosciences

FITC- isotiocianato de fluoresceína, APC – alofocianina, PerCP – proteína clorofila peridina, Cy 5.5– cianina 5.5.

Tabela 2 – Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, empregados para análise de expressão intracitoplasmática de citocinas.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Código	Fabricante
Mouse Anti- Human IFN- γ	V500	B27	561980	BD Biosciences
Mouse Anti- Human TNF- α	PE	MAb11	559321	BD Biosciences
Rat Anti- Human IL-2	PECy7	Mq1-17H12	560707	BD Biosciences

PE- ficoeritrina, PECy7 – ficoeritrina-cianina 7.

Antes de serem realizadas as análises imunofenotípicas das amostras dos participantes do estudo, por citometria de fluxo, todos os anticorpos utilizados foram previamente titulados, a fim de se determinar a concentração ideal de uso de cada um. CMSP provenientes de doadores saudáveis da Faculdade de Farmácia da UFMG foram empregadas nesta etapa, após serem obtidas pela realização dos protocolos de purificação e cultivo celular, padronizados para o estudo.

4.5.2.5 Imunofenotipagem de linfócitos T e análise de citocinas intracitoplasmáticas

Decorridas 140 horas de incubação, adicionou-se, conforme recomendação do fabricante, 1,0µL de brefeldina A (BD *Golgi Plug*TM, BD Biosciences) às culturas de células que seriam submetidas à marcação intracitoplasmática de citocinas. A brefeldina A tem a capacidade de reter as citocinas no interior do complexo de Golgi e, conseqüentemente, dentro das células. Procedeu-se incubação das culturas por mais 4 horas, para assegurar as 144 horas de incubação.

Finalizado o período de incubação, as placas de cultivo celular foram centrifugadas a 400g, por 10 minutos a 4°C. As células das culturas foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL, por procedimento de homogeneização com 500 µL de PBS (tampão fosfato salino, 0,015M, pH 7,4) gelado por três vezes.

A cada tubo, adicionou-se 1 mL de solução de lavagem, PBS-Wash (tampão fosfato salino [PBS] 0,015M pH 7,4, suplementado com 0,5% de albumina sérica bovina [BSA, Sigma Chemical Co.] e 0,1% de azida sódica [VETEC]) e homogeneizou-se o conteúdo em vortex. As amostras foram centrifugadas (400g, por 7 minutos a 4°C) e descartou-se o sobrenadante gerado.

Posteriormente, foram adicionados às células 8µL da diluição de anticorpos monoclonais, específicos para os marcadores de superfície celular em estudo, marcados com fluorocromos, utilizando as seguintes diluições anti CD4-FITC 1:10, anti CD8-APC 1:20, anti-CD45Ro-PerCp Cy5.5 1:5 e anti-CD27-efluor 450 1:5. Os tubos tiveram seu conteúdo homogeneizado em vortex e foram incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Na sequência, as células foram incubadas com 2 mL de solução de lise (solução aquosa pH 7,85 contendo citrato de sódio diidratado 2,5% p/v, formaldeído PA 54% v/v, dietilenoglicol PA 30% v/v e heparina comercial 40UI/mL; previamente diluída 10 vezes em água destilada), por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz; para promover a lise dos eritrócitos e a fixação dos leucócitos. As células foram

centrifugadas (400g, por 7 minutos a 4°C), após a adição de 1 mL de PBS-Wash e descartou-se o sobrenadante gerado.

Ao sedimento celular foram adicionados 500 µL de PBS-Wash e 3 mL de solução de permeabilização, PBS-Perm (tampão fosfato salino 0,015M, pH 7,4, suplementado com 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina). A permeabilização das células foi feita por homogeneização suave dos tubos (por no mínimo 10 movimentos de inversão), seguida de incubação a 4°C por 10 minutos e ao abrigo da luz. A suspensão obtida foi centrifugada (400g, por 7 minutos a 4°C) e novamente lavada com 2 mL de PBS-Wash.

Posteriormente, foram adicionados 12µL da diluição dos anticorpos monoclonais específicos para as citocinas de interesse, marcados com fluorocromos, com diferentes espectros de emissão entre si. Foram empregados os anticorpos anti IFN-γ-V500, anti IL-2-PECy7 e anti TNF-α-PE, todos na diluição 0,4. Os tubos tiveram o conteúdo homogeneizado em vortex e foram incubados por 30 minutos a 4°C e ao abrigo da luz.

Ao final da etapa de incubação, as células foram lavadas utilizando processo de centrifugação (400g, por 7 minutos a 4°C) com 2mL de PBS-Perm e, em seguida, com 2mL de PBS-Wash. Foram adicionados 200µL de solução fixadora - MFF (10g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2) às amostras, que foram mantidas a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento da leitura, que não foi superior às 24h.

Foi feita a aquisição de 100.000 eventos por tubo em citômetro de fluxo LSR Fortessa™ (BD Biosciences). A análise dos parâmetros fenotípicos e de funcionalidade das células foi determinada utilizando o programa FlowJo (versão 9.5.1 TreeStar), empregando diferentes estratégias de análise, conforme descrito no item **4.5.2.6**.

4.5.2.6 Estratégia de aquisição dos dados

Os dados obtidos por meio da imunofenotipagem das CMSP após cultura celular foram analisados utilizando diferentes estratégias, com objetivo de avaliar a funcionalidade e percentual de linfócitos T efetores, naíve, de memória central, de memória efetora. Assim, pelo emprego de múltiplos recursos do programa FlowJo (versão 9.5.1 TreeStar), foram adotadas as estratégias de análise fenotípica e de citocinas intracitoplasmáticas, descritas a seguir.

4.5.2.6.1 Análise de linfócitos T efetores, naíve, de memória central e de memória efetora

Iniciou-se a análise de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, de acordo com o perfil fenotípico (naíve, memória central, memória efetora e efetora), pela seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, avaliados através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (**Figura 10A**). Em seguida, foram construídos gráficos de FSC *versus* CD45Ro-PerCP Cy5.5 e FSC *versus* CD27-V450 (**Figura 10, B e C**), onde as regiões (R2), (R2'), (R3) e (R3') foram delimitadas, selecionando-se as populações CD27⁺, CD27⁻, CD45Ro⁺ e CD45Ro⁻, respectivamente. Utilizaram-se então gráficos de FSC *versus* CD4-FITC e FSC *versus* CD8-APC, para quantificar o percentual das subpopulações celulares CD4⁺ e CD8⁺ dentro das quatro populações anteriormente selecionadas, delimitando-se as regiões (R4), (R5), (R6), (R7), (R8), (R9), (R10) e (R11) (**Figura 10, D a K**), de acordo com a **Tabela 3**.

Por conseguinte, as oito regiões geradas foram combinadas entre si, duas a duas, através da ferramenta *boolean gate* do programa FlowJo, utilizando-se o termo *and* para designar a interseção dos eventos presentes simultaneamente nas regiões (R4) e (R8); (R4) e (R10); (R5) e (R9); (R5) e (R11); (R6) e (R8); (R6) e (R10); (R7) e (R9); (R7) e (R11) (**Figura 10, L-S**) para assim se caracterizar oito populações fenotípicas de linfócitos T (G1-G8), conforme **Tabela 4**.

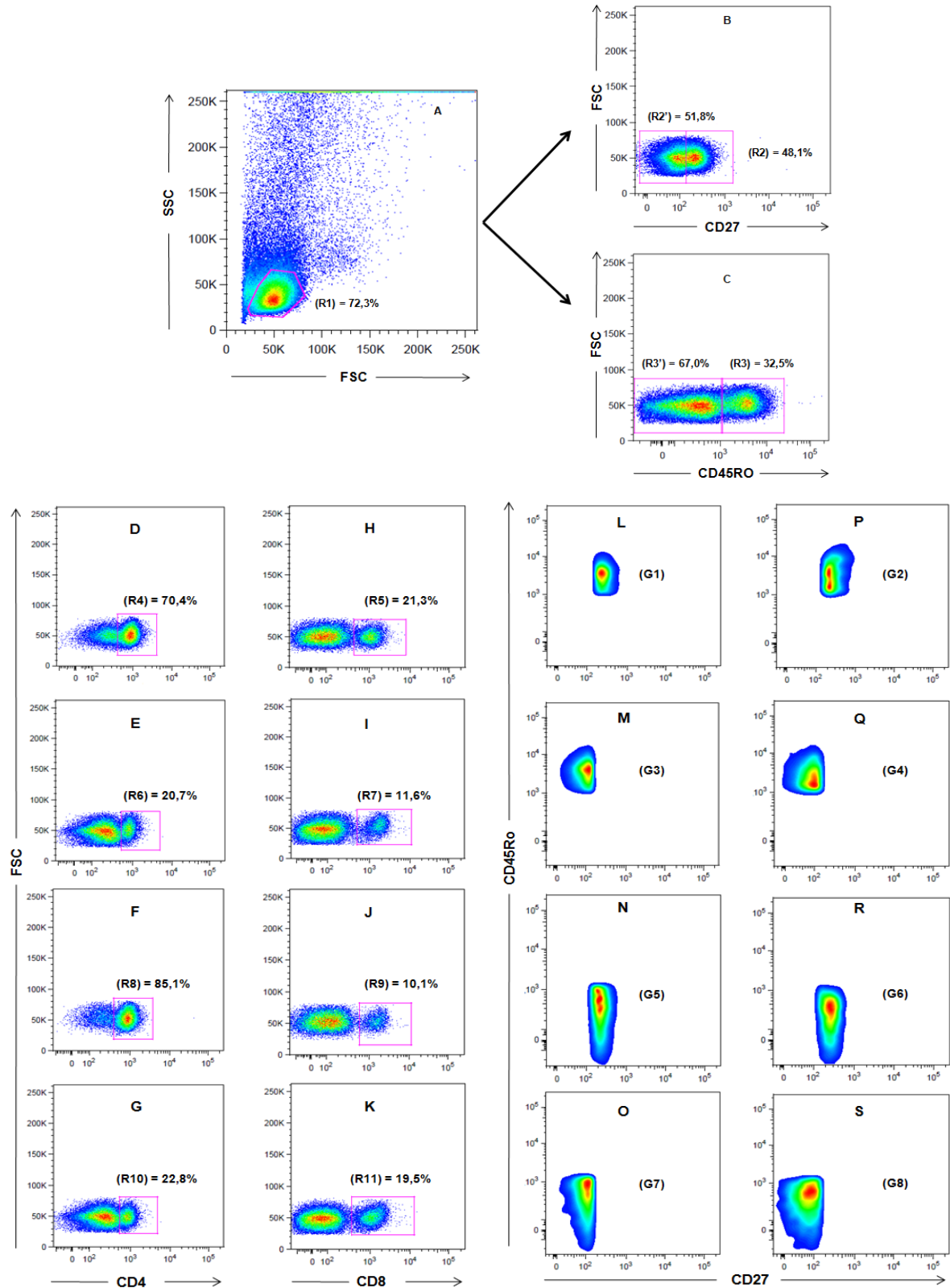
Tabela 3 – Regiões de análise originadas e populações de células selecionadas

Região	População celular selecionada
(R1)	Linfócitos
(R2)	CD27+
(R2')	CD27-
(R3)	CD45Ro+
(R3')	CD45Ro-
(R4)	CD27+ CD4+
(R5)	CD27+ CD8+
(R6)	CD27- CD4+
(R7)	CD27- CD8+
(R8)	CD45Ro+ CD4+
(R9)	CD45Ro+ CD8+
(R10)	CD45Ro- CD4+
(R11)	CD45Ro- CD8+

Tabela 4 – Regiões de análise originadas e populações de células selecionadas, de acordo com a ferramenta de análise *Boolean gate*.

Fórmula do <i>Boolean Gate</i>	População celular selecionada	Fenótipo celular
G1 =R4 and R8	CD27+CD45Ro+CD4+	CD4+ de memória central
G2 =R5 and R9	CD27+CD45Ro+CD8+	CD8+ de memória central
G3 =R6 and R8	CD27-CD45Ro+ CD4+	CD4+ de memória efetora
G4 =R7' and R9	CD27-CD45Ro+CD8+	CD8+ de memória efetora
G5 =R4 and R10	CD27+CD45Ro- CD4+	CD4+ naïve
G6 =R5 and R11	CD27+CD45Ro- CD8+	CD8+ naïve
G7 =R6 and R10	CD27-CD45Ro- CD4+	CD4+ efetora
G8 =R7 and R11	CD27-CD45Ro- CD8+	CD8+ efetora

Figura 10 – Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de linfócitos T CD4+ e CD8+ naíve (CD27+CD45Ro-), de memória central (CD27+CD45Ro+), de memória efetora (CD27-CD45Ro+) e efetores (CD27-CD45Ro-) por citometria de fluxo.



(A) Gráfico de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC), utilizado para a

seleção da população de interesse, os linfócitos (R1). (B) Gráfico de distribuição pontual FSC *versus* CD27-V450, utilizado para selecionar as populações celulares CD27+ (R2) e CD27- (R2'). (C) Gráfico de distribuição pontual FSC *versus* CD45Ro-PerCP Cy5.5 utilizado para selecionar as populações celulares CD45Ro+ (R3) e CD45Ro- (R3'). (D-G) Gráfico de distribuição pontual FSC *versus* CD4-FITC, utilizado para selecionar a população celular CD4+ dentro das células presentes nas regiões (R2), (R2'), (R3) e (R3'), respectivamente. (H-K) Gráfico de distribuição pontual FSC *versus* CD8-APC, utilizado para selecionar a população celular CD8+ dentro das células presentes nas regiões (R2), (R2'), (R3) e (R3'), respectivamente. Foram feitas combinações das regiões geradas (R4-R11), através da ferramenta de *boolean gate*, conforme **Tabela 4**, para quantificar o percentual das subpopulações de memória central, de memória efetora, naïve e efetora em linfócitos T CD4+ (L-O) e T CD8+ (P-S), respectivamente.

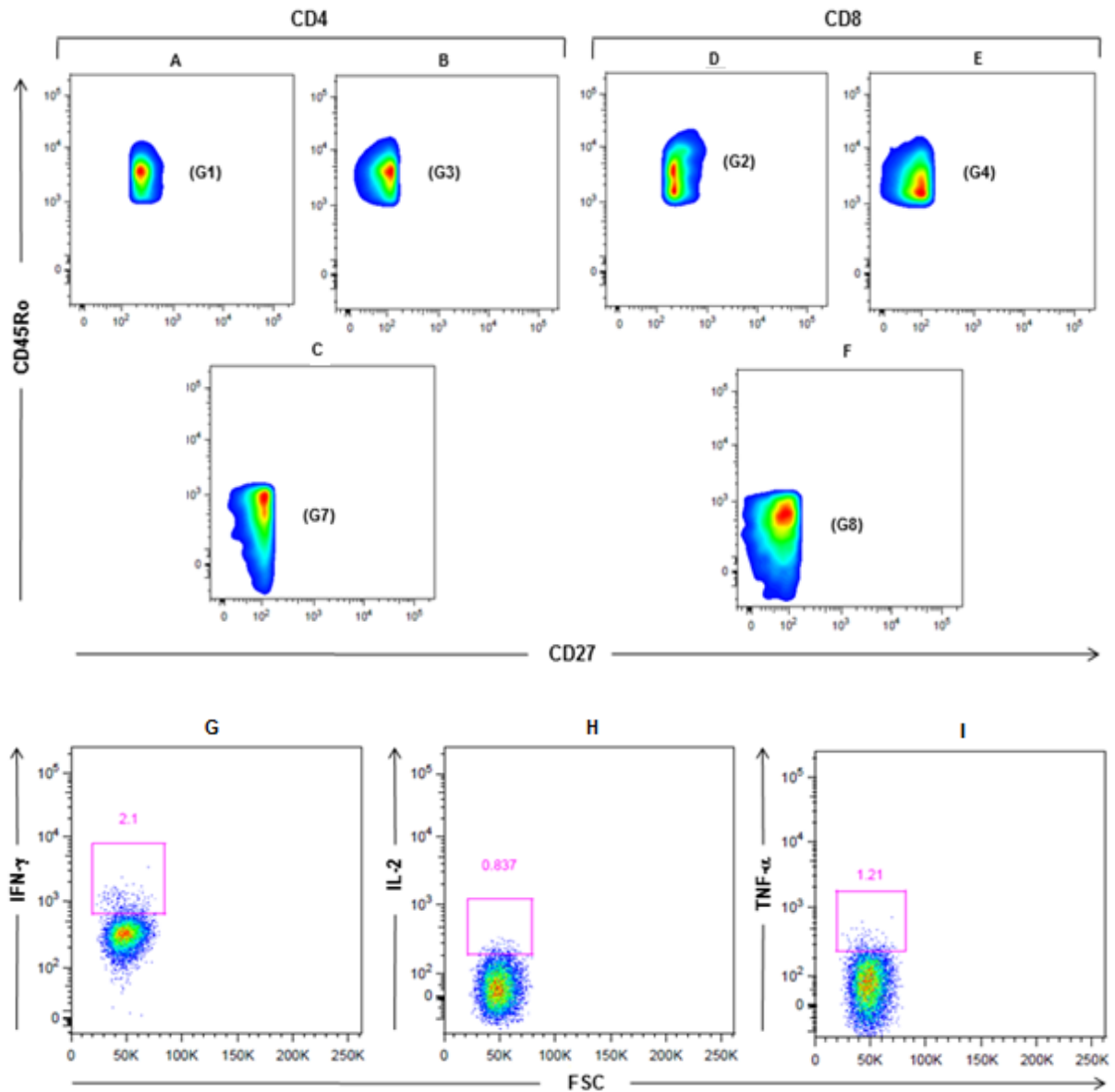
4.5.2.6.2 Análise de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos T efetores, de memória central e de memória efetora

A **Figura 11** ilustra a sequência de passos para a análise do perfil de citocinas intracitoplasmáticas produzidas pelas subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+, anteriormente quantificadas e selecionadas, de acordo com a expressão dos marcadores de superfície CD45Ro e CD27 (**Figura 10**).

Após seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, obtidos através de gráficos de distribuição pontual de FSC *versus* SSC (**Figura 10A**), foram construídos gráficos de FSC *versus* CD45Ro-PerCP Cy5.5 e FSC *versus* CD27-V450 (**Figura 10, B e C**), onde as regiões (R2), (R2'), (R3) e (R3') foram delimitadas selecionando-se as populações CD27+, CD27-, CD45Ro+ e CD45Ro-, respectivamente. Em seguida, gráficos de FSC *versus* CD4-FITC e FSC *versus* CD8-APC foram gerados para quantificação do percentual de células T CD4+ e CD8+ contido nas regiões (R2), (R2'), (R3) e (R3'), delimitando-se oito regiões de marcação – (R4) a (R11) (**Figura 10, D-K**), de acordo com a **Tabela 3**, que foram combinadas entre si utilizando a ferramenta *boolean gate* do programa FlowJo, empregando-se o termo *and* para designar a interseção dos eventos presentes simultaneamente nas regiões, conforme a **Tabela 4**.

Finalmente, as células presentes nas interseções (G1), (G2), (G3), (G4), (G7) e (G8), geradas após análise de *boolean gate* (**Figura 11, A-F**), foram analisadas por gráficos de FSC *versus* IFN- γ -V500, TNF- α -PE e IL-2-PeCy7 (**Figura 11, G-I**), para quantificar o percentual de células T CD4+ efetoras, T_{MC} e T_{ME} produtoras de IFN- γ , TNF- α e IL-2 e o percentual de linfócitos T CD8+ efetores, T_{MC} e T_{ME} produtores de IFN- γ e TNF- α .

Figura 11 – Sequência de procedimentos utilizados para as análises das citocinas intracitoplasmáticas IFN- γ , TNF- α e IL-2 nos linfócitos T CD4+ e CD8+ de memória central (CD27+CD45Ro+), de memória efetora (CD27-CD45Ro+) e efetores (CD27-CD45Ro-) por citometria de fluxo.



(A-F) Após realização da sequência de procedimentos descritos no item 5.5.2.6.1, com determinação das regiões celulares G1 a G8, através da ferramenta de *boolean gate*, (G-I) gráficos de FSC versus FL2/IFN- γ ou TNF- α ou IL-2 foram confeccionados para analisar as células confinadas nas regiões G1, G2, G3, G4, G7 e G8 e, assim, quantificar o percentual de células T de memória central, de memória efetora e efetora positivas para IFN- γ , TNF- α e IL-2.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises fenotípicas e de citocinas intracitoplasmáticas de linfócitos T, entre as CMSP após cultura celular, inicialmente originaram a percentagem celular de cada subpopulação fenotípica avaliada (T naïve, T_{MC}, T_{ME} e T efetora) e a percentagem de células produtoras de cada citocina analisada nas subpopulações linfocitárias T_{MC}, T_{ME} e T efetora. Os resultados foram expressos em índices fenotípicos e de citocinas, obtidos a partir do cálculo da razão entre a percentagem de cada subconjunto de células observado na cultura estimulada e a percentagem detectada na respectiva cultura controle (sem estímulo). Os dados tiveram a natureza paramétrica analisada e confirmada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e, em seguida, foram analisados pelo teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, empregando-se o software GraphPad Prism 5.0. Para todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 População estudada

A população estudada foi composta de 26 participantes: 10 indivíduos controles (saudáveis e com ausência de infecção pelo *M. tuberculosis*, confirmada por resultado da primeira prova tuberculínica < 10 mm e efeito *booster* negativo); 12 indivíduos assintomáticos com infecção latente (confirmada por resultado da prova tuberculínica ≥ 10 mm) e 4 pacientes curados de TB pulmonar (que finalizaram o tratamento e apresentaram alterações radiológicas congruentes com sequela de TB pulmonar). Os participantes foram oriundos do Ambulatório de Tuberculose do HC-UFMG e da Faculdade de Farmácia da UFMG.

No grupo de curados de TB foram incluídos participantes que, mesmo após realizarem tratamento adequado e alcançarem a cura da doença, permaneceram com alguma sequela pulmonar em decorrência da TB, como fibratelectasia (fibrose do parênquima pulmonar) e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) leve. Estes indivíduos são acompanhados periodicamente, pela equipe de Pneumologia do Ambulatório Bias Fortes, para serem avaliados quanto ao quadro de sequela de TB.

Todos os participantes incluídos no estudo eram HIV negativos, de ambos os sexos. No grupo controle 20% eram homens e 80% mulheres; com média de idade 28,3 anos. No grupo de indivíduos com infecção latente a média de idade foi de 42,6 anos, sendo que 91,7% eram mulheres. No grupo de curados, 75,0% dos participantes eram mulheres, com média de idade 49,2 anos (**tabelas 5 e 6**).

Tabela 5 – Distribuição dos participantes do estudo de acordo com sexo

Grupos	(n)	Sexo masculino (%)	Sexo Feminino (%)
Controle	10	20,0	80,0
Infecção latente	12	8,3	91,7
Curados de TB	4	25,0	75,0

(n) – número de participantes do grupo

Tabela 6 – Distribuição dos participantes do estudo de acordo com idade

Idade	Grupos			
	Faixa etária (anos)	Controle (n)	Infecção latente (n)	Curados de TB (n)
18-25		1	1	0
25-45		9	5	1
45-60		0	6	3

(n) – número de participantes do grupo

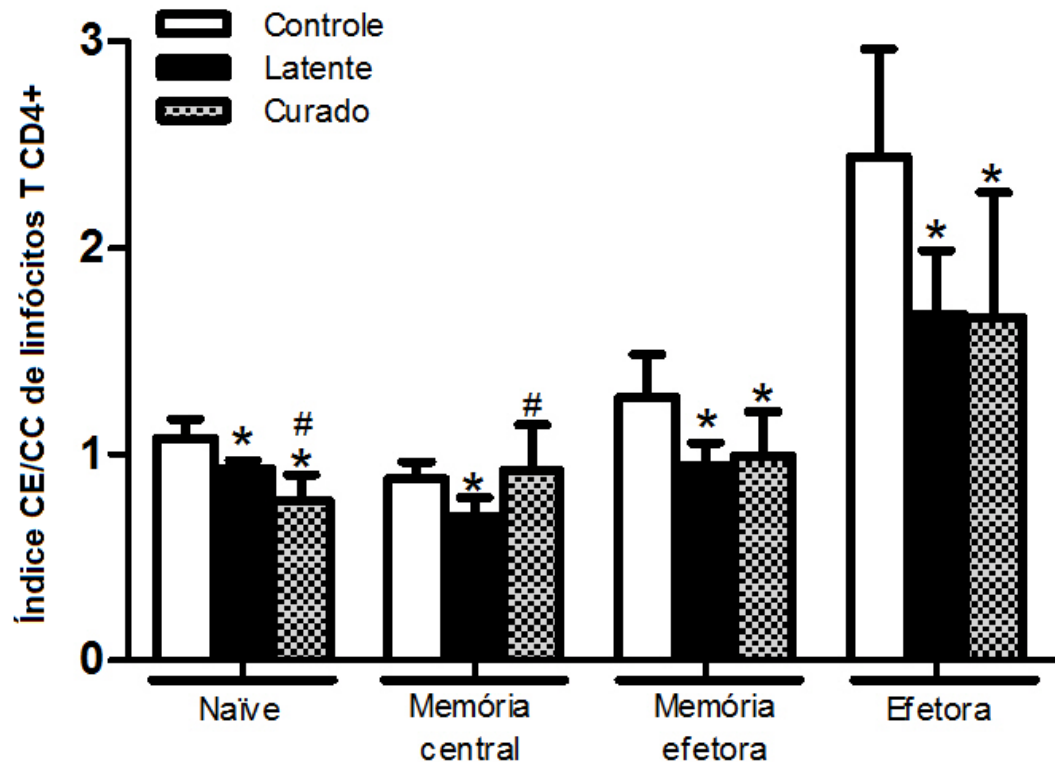
6.2 Análise do fenótipo celular de linfócitos T do sangue periférico após cultivo celular *in vitro*

Foram estudadas as subpopulações celulares naïve, de memória central, de memória efetora e efetora de linfócitos T CD4+ e T CD8+, por análise da expressão dos marcadores de superfície celular CD45Ro e CD27, após incubação de longo prazo (144h) das CMSP na ausência/presença de estímulo específico com o *M. tuberculosis*, conforme descrito no item 4.

6.2.1 Análise intergrupos das subpopulações de células T CD4+ e CD8+ naïve, de memória central, de memória efetora e efectoras

A composição fenotípica de linfócitos T CD4+ dos três grupos de estudo, expressa pela média do índice cultura estimulada/cultura controle (CE/CC) de cada participante, conforme descrito no item 5, está apresentada na **Figura 12**. Compararam-se as médias dos índices entre os grupos de estudo para cada subpopulação celular estudada. Observou-se que: o grupo latente apresentou menor proporção de células T CD4+ naïve que o grupo controle; o grupo dos curados apresentou menor proporção de células T CD4+ naïve que os outros dois grupos ($p < 0,05$); o grupo latente apresentou proporção de células T CD4+ T_{MC} significativamente menor, quando comparado com os outros grupos ($p < 0,05$); comparativamente ao grupo controle, o grupo de curados e o grupo de indivíduos com infecção latente apresentaram menor proporção de células T CD4+ T_{ME} e T efectoras ($p < 0,05$).

Figura 12 – Índice CE/CC de células T CD4+, de acordo com os quatro fenótipos de estudo, nos grupos de indivíduos controles, com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e curados de TB pulmonar.

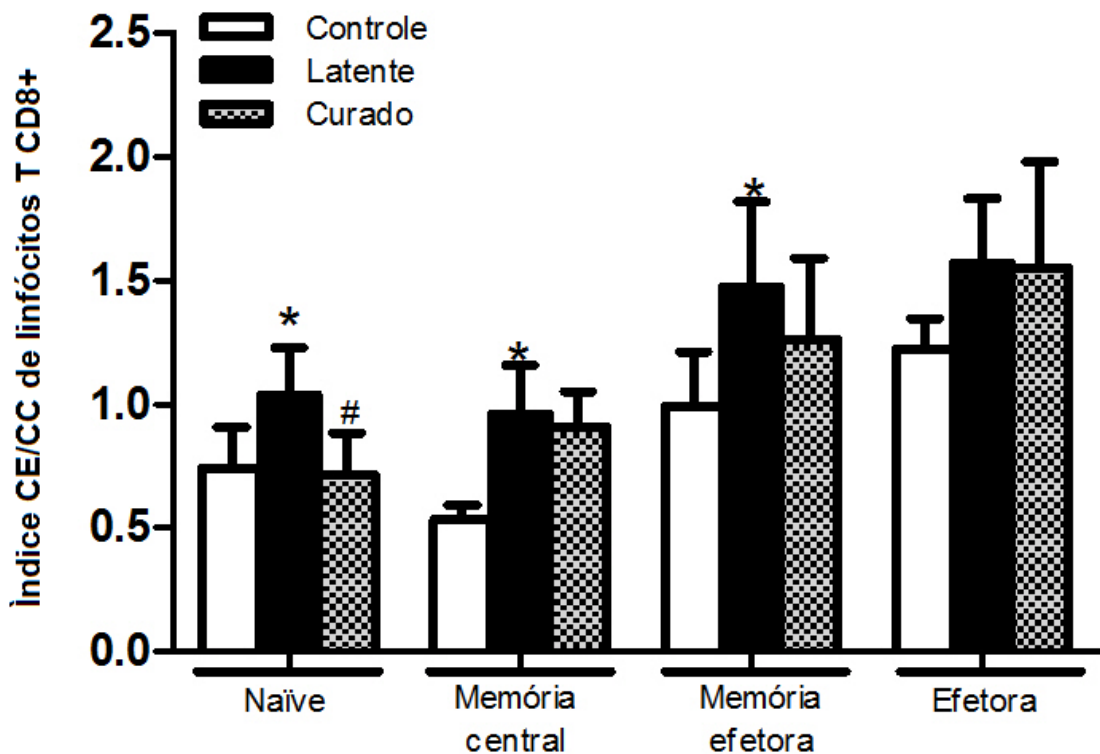


Índice CE/CC, calculado pela razão do percentual de cada subpopulação de linfócitos T CD4+ (naïve, memória central, memória efetora e efetora) na cultura estimulada pelo percentual na cultura controle, nos três grupos de estudo. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por "*" em comparação com o grupo controle e por "#" em comparação com o grupo de infectados latentes. As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão.

Na **Figura 13** está apresentada a composição fenotípica de linfócitos T CD8+ dos três grupos de estudo, expressa pela média do índice CE/CC, conforme descrito no item 5. Foram feitas comparações das médias dos índices entre os grupos de estudo para cada subpopulação celular estudada. Observou-se que o grupo latente apresentou proporções de células T CD8+ naïve, T_{MC} e T_{ME} significativamente maiores ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo controle. Houve diferença estatística na proporção da subpopulação de células T CD8+ naïve entre o grupo de curados e os indivíduos com infecção latente, a qual foi menor no primeiro grupo ($p < 0,05$). As demais subpopulações não apresentaram diferença significativa de expressão entre o grupo de curados e de indivíduos com infecção latente ($p > 0,05$).

Não houve diferença significativa nos quatro fenótipos celulares de linfócitos T CD8+ avaliados entre os indivíduos curados e os controles.

Figura 13 – Índice CE/CC de células T CD8+, de acordo com os quatro fenótipos de estudo, nos grupos de indivíduos controles, com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e curados de TB pulmonar.



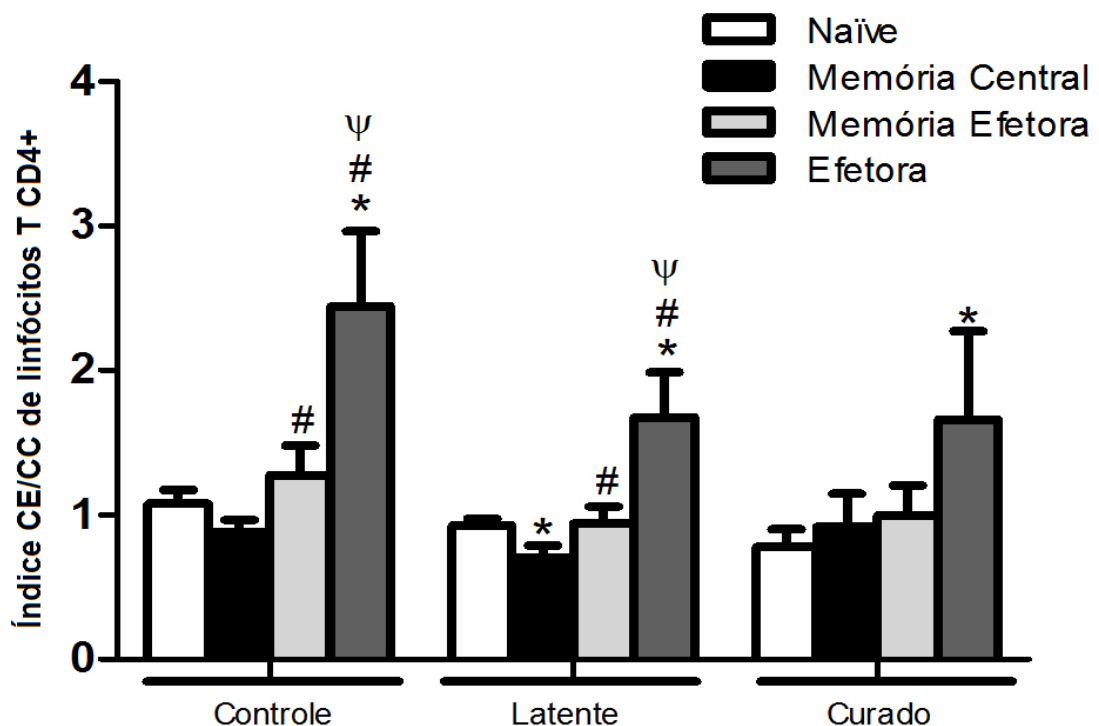
Índice CE/CC, calculado pela razão do percentual de cada subpopulação de linfócitos T CD8+ (naïve, memória central, memória efetora e efetora) na cultura estimulada pelo percentual na cultura controle, nos três grupos de estudo. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por "*" em comparação com o grupo controle e por "#" em comparação com o grupo de infectados latentes. As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão.

6.2.2 Análises intragrupo das subpopulações de células T CD4+ e CD8+ naïve, de memória central, de memória efetora e efetoras

Por análise comparativa das subpopulações celulares dentro de um mesmo grupo de estudo, observou-se que no grupo controle a subpopulação de linfócitos T CD4+ preponderante foi a de fenótipo T efetor e que a subpopulação T_{ME} sobressaiu ao fenótipo T_{MC} ($p < 0,05$). No grupo latente o predomínio do fenótipo T efetor sobre as

demais subpopulações e do fenótipo T_{ME} sobre o T_{MC} foram significativos ($p < 0,05$), mas, neste grupo constatou-se ainda diferença significativa na proporção de células T CD4+ entre as subpopulações T_{MC} e T naíve, em que houve predomínio desta sobre aquela. No grupo de indivíduos curados observou-se maior homogeneidade na proporção das subpopulações de linfócitos entre si, sendo notada diferença estatística ($p < 0,05$) apenas entre os fenótipos T CD4+ naíve e T efetor, com preponderância deste último (**Figura 14**).

Figura 14 – Comparações intragrupo das subpopulações fenotípicas de células T CD4+ estudadas, de acordo com o Índice cultura estimulada/cultura controle, nos indivíduos controles, com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e curados de TB pulmonar.

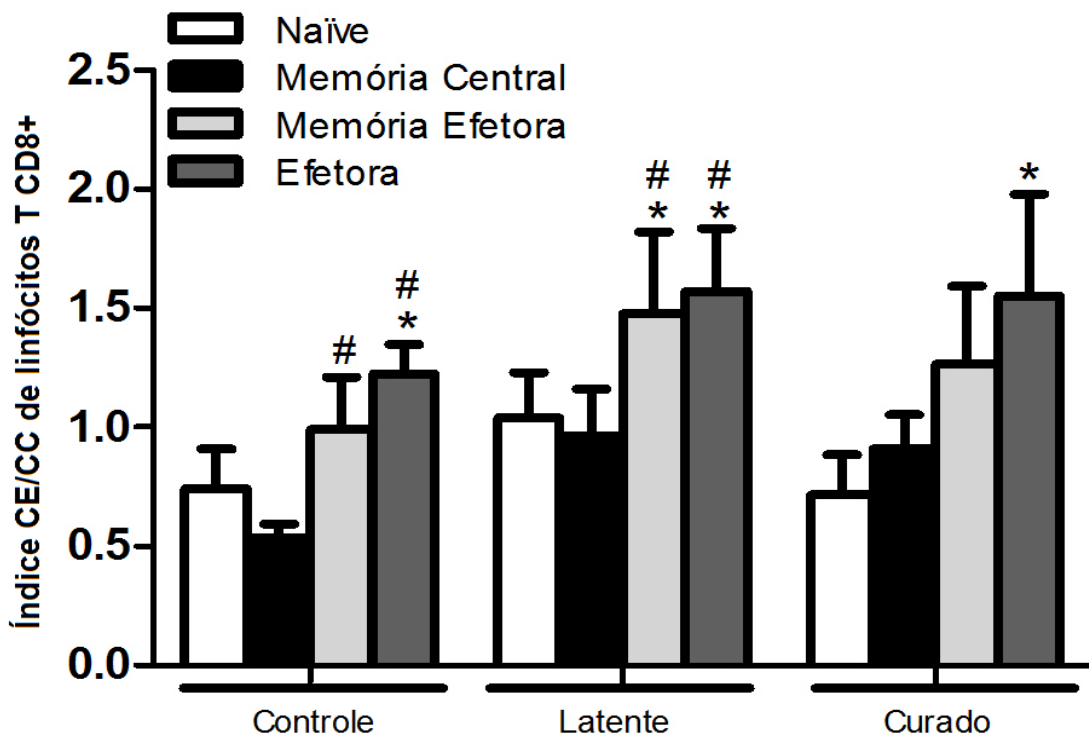


Índice cultura estimulada/cultura controle calculado pela razão do percentual de cada subpopulação de linfócitos T CD4+ (naíve, memória central, memória efetora e efetora) na cultura estimulada pelo percentual na cultura controle, nos três grupos de estudo. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por “*” em comparação com o fenótipo naíve, por “#” em comparação com o fenótipo de memória central, por “Ψ” em comparação com o fenótipo de memória efetora. As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão.

Quando a análise comparativa foi feita entre as subpopulações de linfócitos T CD8+ de um mesmo grupo de estudo, constatou-se que no grupo controle as subpopulações de linfócitos T efetores e T_{ME} foram preponderantes ao fenótipo T_{MC}

($p < 0,05$), mas não diferiram entre si ($p > 0,05$). Além disso, as células T efetoras estavam presentes em proporção significativamente maior que os linfócitos T naïve ($p < 0,05$), mas não houve diferença significativa entre as células T_{MC} e T naïve. No grupo de indivíduos com infecção latente as subpopulações de linfócitos T efetores e T_{ME} estavam presentes em proporção significativamente maior que as células T_{MC} e T naïve ($p < 0,05$), porém não diferiram entre si ($p > 0,05$). Também não foi constatada diferença entre os grupos de células T_{MC} e T naïve. No grupo de curados, assim como na população de células T CD4+, houve maior homogeneidade entre as quatro subpopulações de linfócitos T CD8+ estudadas, sendo observada diferença estatística ($p < 0,05$) apenas entre os fenótipos T naïve e T efetor, com predomínio desta subpopulação (**Figura 15**).

Figura 15 – Comparações intragrupo das subpopulações fenotípicas de células T CD8+ estudadas, de acordo com o Índice cultura estimulada/cultura controle, nos indivíduos controles, com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e curados de TB pulmonar.



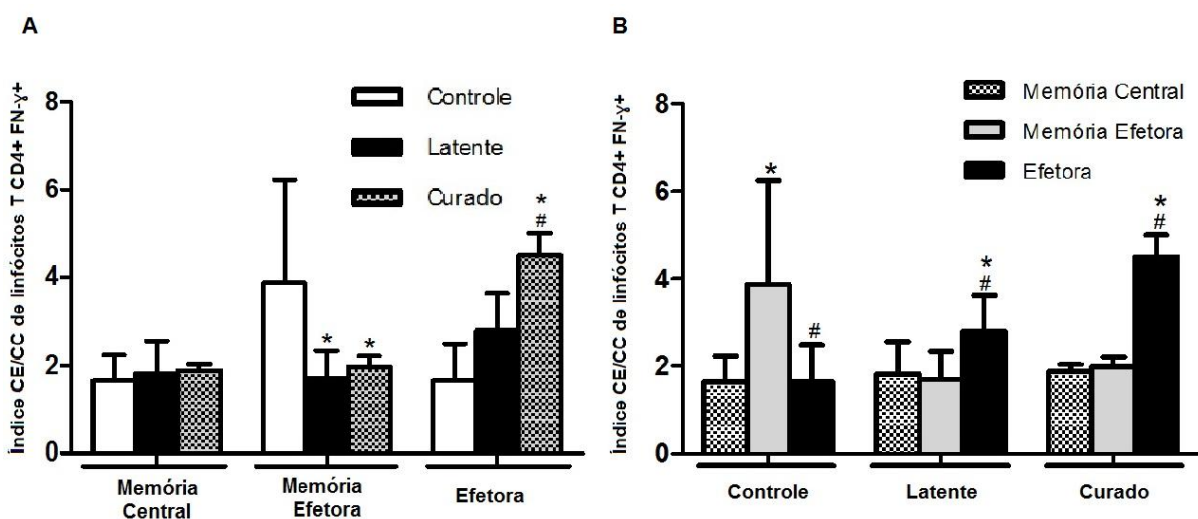
Índice cultura estimulada/cultura controle calculado pela razão do percentual de cada subpopulação de linfócitos T CD8+ (naïve, memória central, memória efetora e efetora) na cultura estimulada pelo percentual na cultura controle, nos três grupos de estudo. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por "*" em comparação com o fenótipo naïve, por "#" em comparação com o fenótipo de memória central, por "Ψ" em comparação com o fenótipo de memória efetora. As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão.

6.3 Expressão de citocinas nas subpopulações de linfócitos T_{MC}, T_{ME} e T efetores após cultivo celular *in vitro*

A análise da expressão de IFN- γ pelas células T CD4+ revelou que os linfócitos com fenótipo T_{MC} não apresentaram diferença significativa nos níveis de expressão da citocina entre os três grupos avaliados ($p > 0,05$). Já em relação ao fenótipo T_{ME}, esta subpopulação celular apresentou expressão significativamente maior de IFN- γ nos controles, quando comparado com indivíduos com infecção latente e curados de TB pulmonar ($p < 0,05$). Quanto às células de fenótipo T efetor, foi possível observar que essa subpopulação linfocitária apresentou expressão de IFN- γ significativamente aumentada no grupo de curados, quando comparado com os outros dois grupos ($p < 0,05$) (**Figura 16A**).

Quando os dados foram analisados para constatar se havia predomínio de alguma subpopulação de linfócitos T CD4+produtora de IFN- γ em cada um dos três grupos, observou-se que no grupo controle prevaleceram as células T_{ME}. Já no grupo dos infectados latentes e nos curados de TB a maior proporção de células produtoras de IFN- γ era do fenótipo T efetor (**Figura 16B**).

Figura 16 – Índice CE/CC de células T CD4+IFN- γ + nos grupos de estudo, de acordo com os fenótipos T_{MC}, T_{ME} e T efetor

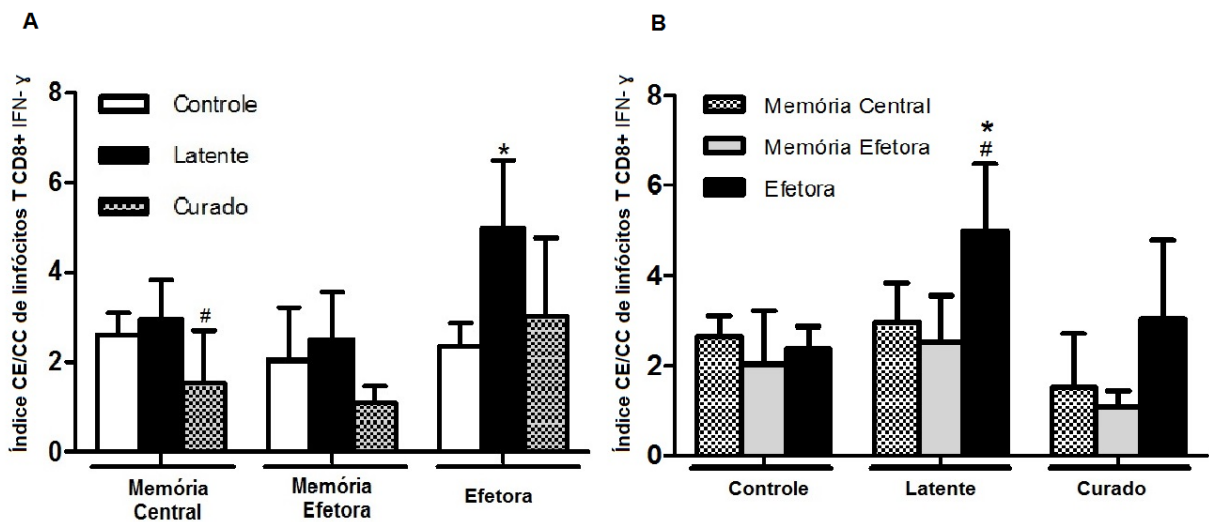


Índice CE/CC calculado pela razão do percentual de cada subpopulação de linfócitos T CD4+IFN- γ + (memória central, memória efetora e efetora) na cultura estimulada pelo percentual na cultura controle, nos três grupos de estudo. A) Comparações intergrupos: as diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por “*” em comparação com o grupo controle e por “#” em comparação

com o grupo de infectados latentes. As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. B) Comparações intragrupo: as diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por “*” em comparação com a subpopulação T_{MC} e por “#” em comparação com a subpopulação T_{ME} . As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão.

Na análise de expressão de IFN- γ pelas células T CD8+, observou-se que os indivíduos com infecção latente apresentaram níveis de células T_{MC} IFN- γ + significativamente maiores que o grupo de curados ($p < 0,05$). Ainda considerando o fenótipo T_{MC} , não se constatou diferença na proporção de células IFN- γ + entre o grupo controle e o grupo latente, nem entre os indivíduos curados e os controles. No grupo com infecção latente, o nível de linfócitos T efetores produtores de IFN- γ foi significativamente maior que o grupo controle ($p < 0,05$), mas não houve diferença quando comparado com o grupo de curados, que também não diferiu do grupo controle. Não se observou diferença na expressão de IFN- γ pela subpopulação de linfócitos T_{ME} , entre os três grupos avaliados. (Figura 17A).

Figura 17 – Índice CE/CC de células T CD8+IFN- γ + nos grupos de estudo, de acordo com os fenótipos T_{MC} , T_{ME} e T efetor



Índice CE/CC calculado pela razão do percentual de cada subpopulação de linfócitos T CD8+IFN- γ + (memória central, memória efetora e efetora) na cultura estimulada pelo percentual na cultura controle, nos três grupos de estudo. A) Comparações intergrupos: as diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por “*” em comparação com o grupo controle e por “#” em comparação com o grupo de infectados latentes. As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. B) Comparações intragrupo: as diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por “*” em comparação com a subpopulação T_{MC} e por “#” em comparação com a subpopulação T_{ME} . As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão.

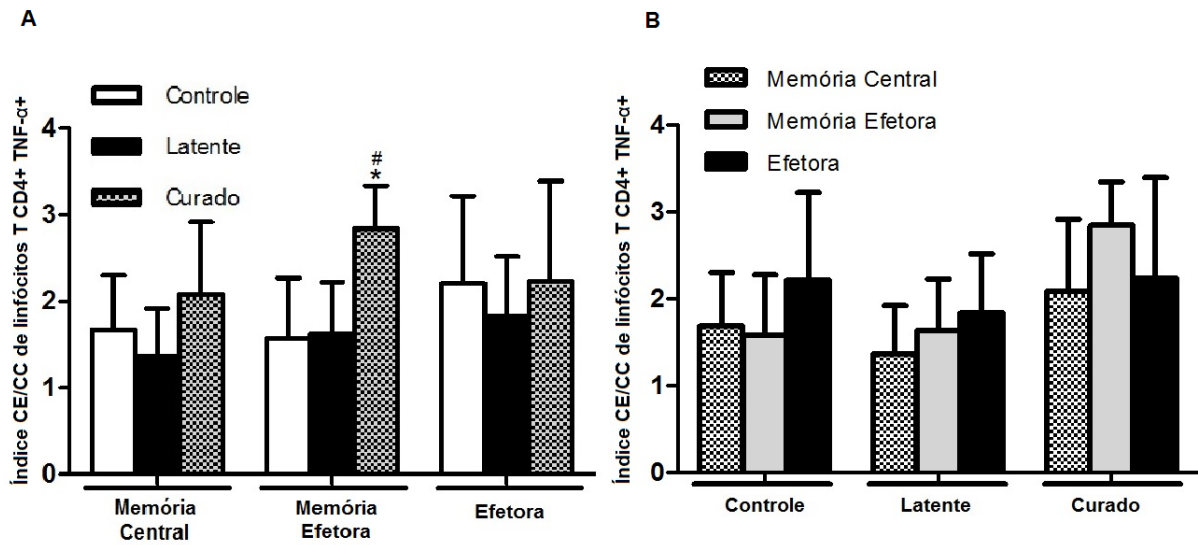
No grupo controle e no grupo de curados de TB não se constatou diferença significativa entre as subpopulações T_{MC} , T_{ME} e T efetora de linfócitos T CD8+ IFN- γ (p>0,05), portanto, a resposta de células T CD8+ via produção de IFN- γ não foi predominante em uma subpopulação específica. Já no grupo dos infectados latentes a maior proporção de células T CD8+ IFN- γ era do fenótipo T efetor (p<0,05) (**Figura 17B**).

Na análise de expressão de TNF- α pelas células T CD4+, não se observou diferença significativa nos níveis de produção da citocina pela subpopulação de células T_{MC} em nenhum dos três grupos de estudo (p>0,05). Tal fato também foi visualizado para a subpopulação de linfócitos T CD4+ efetores. Houve diferença significativa (p<0,05) entre os grupos de estudo apenas na subpopulação T_{ME} , cuja expressão de TNF- α foi mais pronunciada no grupo de curados, comparativamente com os indivíduos com infecção latente e o grupo controle, sendo que não houve diferença entre esses dois grupos (p>0,05). (**Figura 18A**).

Quando a análise de linfócitos T CD4+ TNF- α foi realizada em um mesmo grupo, não se observou diferença estatisticamente significante entre as subpopulações T_{MC} , T_{ME} e T efetora em nenhum dos três grupos de estudo. Assim, não houve predomínio de um fenótipo celular produtor da citocina nos grupos de indivíduos controles, infectados pelo *M. tuberculosis* e curados de TB (**Figura 18B**).

Ao ser analisada a produção de TNF- α pelos linfócitos T CD8+, constatou-se que a expressão da citocina pelas células T_{MC} foi aumentada no grupo controle, quando comparado com os indivíduos com infecção latente e com os curados de TB pulmonar (p<0,05), mas não houve diferença nos níveis de TNF- α entre estes dois grupos. Já na avaliação dos linfócitos T CD8+ T_{ME} , constatou-se maior expressão da citocina pelas células dos indivíduos com infecção latente, comparativamente aos controles e aos curados de TB pulmonar (p<0,05). Nas células com fenótipo T efetor, a expressão de TNF- α foi significativamente maior no grupo de curados, em comparação com os outros dois grupos e significativamente menor no grupo latente, quando comparado com o grupo controle (p<0,05) (**Figura 19A**).

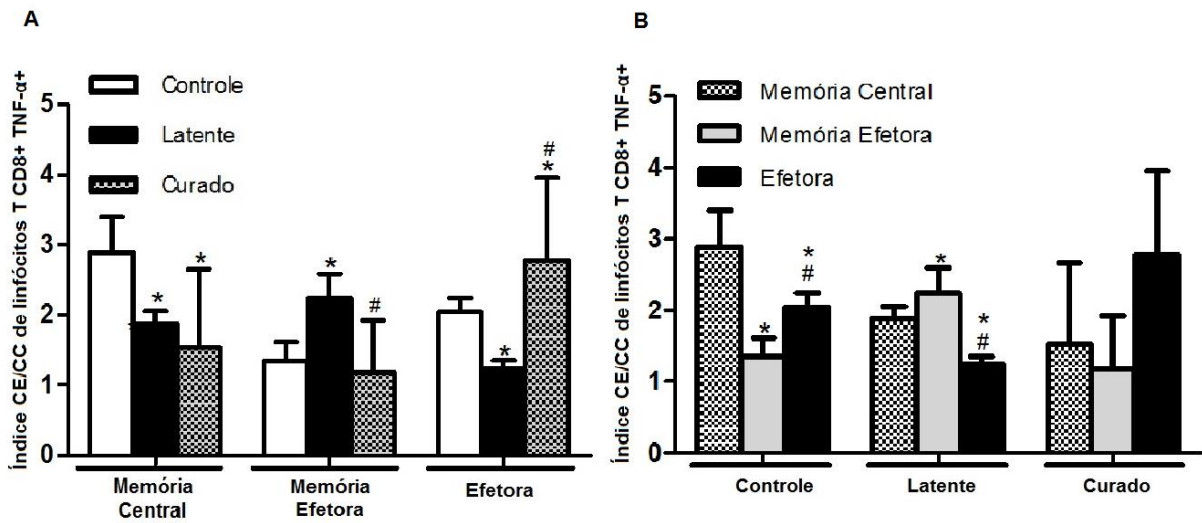
Figura 18 – Índice CE/CC de células T CD4+TNF- α + nos grupos de estudo, de acordo com os fenótipos T_{MC}, T_{ME} e T efetor



Índice CE/CC, calculado pela razão do percentual de cada subpopulação de linfócitos T CD4+TNF- α + (memória central, memória efetora e efetora) na cultura estimulada pelo percentual na cultura controle, nos três grupos de estudo. A) Comparações intergrupos: as diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por “*” em comparação com o grupo controle e por “#” em comparação com o grupo de infectados latentes. As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. B) Comparações intragrupo: as diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por “*” em comparação com a subpopulação T_{MC} e por “#” em comparação com a subpopulação T_{ME}. As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão.

Além disso, no grupo controle observou-se que dentre as células T CD8+ TNF- α +, a subpopulação com fenótipo T_{MC} predominou sobre as demais, sendo que, em comparação às células T_{ME}, uma maior proporção de células T efetoras era TNF- α + ($p < 0,05$). No grupo de infectados latentes, o fenótipo T efetor de linfócitos T CD8+ foi o que apresentou menor proporção de células TNF- α +, seguido do fenótipo T_{MC}, indicando predomínio da subpopulação T_{ME} ($p < 0,05$). Já no grupo dos curados de TB pulmonar não houve diferença de expressão da citocina entre os três fenótipos analisados ($p > 0,05$) (**Figura 19B**).

Figura 19 – Índice CE/CC de células T CD8+TNF- α + nos grupos de estudo, de acordo com os fenótipos T_{MC}, T_{ME} e T efetor

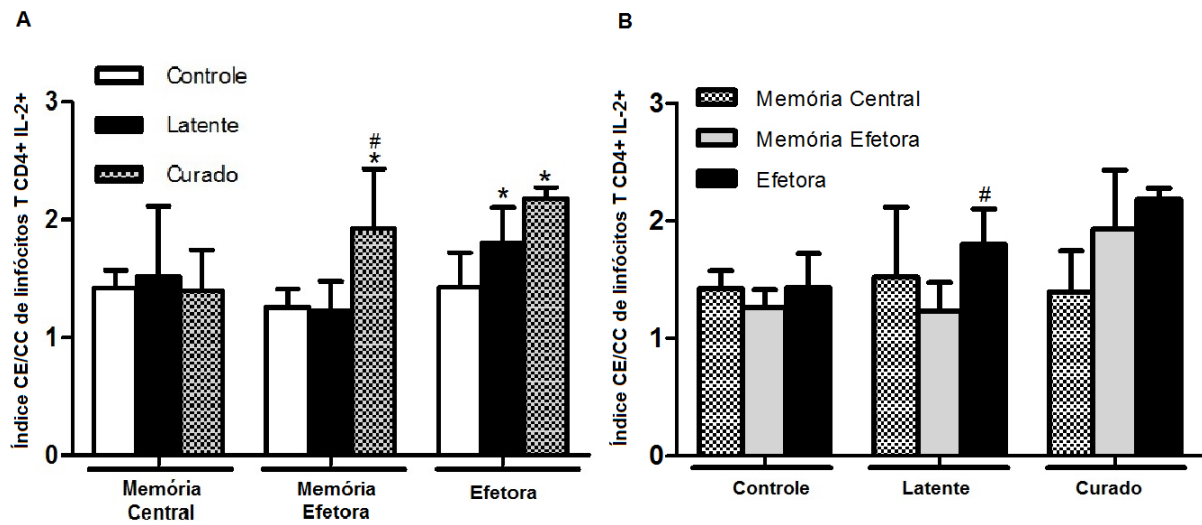


Índice CE/CC, calculado pela razão do percentual de cada subpopulação de linfócitos T CD8+TNF- α + (memória central, memória efetora e efetora) na cultura estimulada pelo percentual na cultura controle, nos três grupos de estudo. A) Comparações intergrupos: as diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por “*” em comparação com o grupo controle e por “#” em comparação com o grupo de infectados latentes. As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. B) Comparações intragrupo: as diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por “*” em comparação com a subpopulação T_{MC} e por “#” em comparação com a subpopulação T_{ME}. As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão.

A expressão de IL-2 pela subpopulação T_{MC} de linfócitos T CD4+ foi estatisticamente semelhante entre os três grupos de estudo. Os linfócitos T_{ME} do grupo de curados de TB expressaram níveis significativamente aumentados da citocina, em comparação com os outros dois grupos ($p < 0,05$), que não diferiram entre si nesta análise. Já na análise de células T CD4+ com fenótipo efetor, a expressão de IL-2 foi significativamente menor no grupo controle, quando comparado aos indivíduos com infecção latente e aos curados de TB pulmonar ($p < 0,05$), que, por conseguinte, não diferiram entre si estatisticamente (**Figura 20A**).

Constatou-se diferença estatística entre as subpopulações de linfócitos T CD4+ IL-2+ analisadas somente no grupo de infectados latentes, em que a proporção de células T efetoras IL-2+ foi preponderante à subpopulação T_{ME} IL-2+ ($p < 0,05$). Os outros dois grupos de estudo não apresentaram discrepâncias entre as subpopulações produtoras da citocina (**Figura 20B**).

Figura 20 – Índice CE/CC de células T CD4+IL-2+ nos grupos de estudo, de acordo com os fenótipos T_{MC}, T_{ME} e T efetor



Índice CE/CC, calculado pela razão do percentual de cada subpopulação de linfócitos T CD4+ IL-2+ (memória central, memória efetora e efetora) na cultura estimulada pelo percentual na cultura controle, nos três grupos de estudo. A) Comparações intergrupos: as diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por “*” em comparação com o grupo controle e por “#” em comparação com o grupo de infectados latentes. As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão. B) Comparações intragrupo: as diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas por “*” em comparação com a subpopulação T_{MC} e por “#” em comparação com a subpopulação T_{ME}. As barras verticais representam a média aritmética em cada grupo e a linha horizontal o desvio padrão.

6.4 Síntese dos resultados

As **Tabelas 7, 8, 9 e 10** expõem os resultados obtidos no estudo após o cultivo *in vitro* de CMSP de participantes dos três grupos de estudo na presença/ausência de estímulo antigênico específico pelo *M. tuberculosis*. Os valores são expressos em médias dos índices CE/CC para cada subpopulação celular avaliada, como também para cada citocina expressa por essas subpopulações.

Tabela 7 – Valores de média e desvio-padrão dos índices CE/CC de cada grupo de estudo, conforme o percentual das subpopulações de linfócitos T CD4+.

Grupo Linfócitos T CD4+	Controles		Infecção latente		Curados	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T naíve	1,079982	0,092117	0,926892	0,043187	0,773574	0,127768
T_{MC}	0,881424	0,082257	0,696950	0,090710	0,918642	0,225944
T_{ME}	1,277390	0,205562	0,941209	0,115513	0,994658	0,208252
T efetora	2,444099	0,520867	1,676033	0,313909	1,663022	0,609072

Média e desvio padrão (DP) dos índices CE/CC das subpopulações de linfócitos T CD4+ de cada grupo de estudo (controles, infecção latente e curados). O índice CE/CC por participante foi calculado para cada subpopulação de linfócitos T CD4+ avaliada (naíve, memória central, memória efetora e efetora), como sendo a razão do percentual de células da CE pelo percentual da CC.

Tabela 8 – Valores de média e desvio-padrão dos índices CE/CC de cada grupo de estudo, conforme o percentual das subpopulações de linfócitos T CD8+.

Grupo Linfócitos T CD8+	Controles		Infecção latente		Curados	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T naíve	0,742534	0,165353	1,040684	0,188598	0,716341	0,168444
T_{MC}	0,535024	0,057048	0,964447	0,194267	0,912183	0,140879
T_{ME}	0,990402	0,220895	1,478440	0,342565	1,265110	0,328106
T efetora	1,226929	0,119707	1,571934	0,261670	1,551046	0,428335

Média e desvio padrão (DP) dos índices CE/CC das subpopulações de linfócitos T CD8+ de cada grupo de estudo (controles, infecção latente e curados). O índice CE/CC por participante foi calculado para cada subpopulação de linfócitos T CD8+ avaliada (naíve, memória central, memória efetora e efetora), como sendo a razão do percentual de células da CE pelo percentual da CC.

Dentre todos os resultados, aqueles que apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos do estudo são:

- dos três grupos analisados, o grupo controle foi o que apresentou maior proporção de células T CD4+ naíve;
- no caso das células T CD4+ T_{MC}, os controles e os curados de TB apresentaram maior proporção células que o grupo de infectados latentes;
- os controles apresentaram maior proporção de células T CD4+ efetoras e T_{ME} que os outros dois grupos;
- o grupo latente apresentou maiores proporções de células T CD8+ naíve, T_{MC} e T_{ME} que o grupo controle; e maior proporção de células T CD8+ naíve que os curados.

Quando as análises compararam as médias dos índices CE/CC de cada subpopulação linfocitária de um mesmo grupo populacional entre si, os resultados com diferença significativa ($p < 0,05$) foram:

- nos grupos controle e latente, os linfócitos T CD4+ efetores prevaleceram sobre as outras três subpopulações e os linfócitos T_{ME} foram mais preponderantes que os T_{MC};
- no grupo latente observou-se ainda que os linfócitos T naíve preponderaram sobre os T_{MC};
- no grupo de curados de TB pulmonar as células T CD4+ efetoras estavam presentes em maior proporção que os linfócitos T naíve;
- no grupo controle os linfócitos T CD8+ efetores predominaram sobre aqueles com fenótipo T_{MC} e T naíve e as células T_{ME} estavam presentes em maior proporção que as células T_{MC};
- no grupo latente as subpopulações de células T CD8+ com fenótipo T efector e T_{ME} predominaram sobre as células T_{MC} e T naíve;
- no grupo de curados de TB pulmonar houve predomínio dos linfócitos T efetores sobre os T naíve.

Tabela 9 – Valores de média e desvio-padrão dos índices CE/CC de cada grupo de estudo, conforme o percentual das subpopulações de linfócitos T CD4+ positivas para as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-2.

Grupo		Controles		Infecção latente		Curados	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP
Linfócitos T CD4+	T _{MC}	1,635552	0,597379	1,822042	0,741618	1,880830	0,154274
	T _{ME}						
	T efetora						
IFN- γ +	T _{MC}	3,869745	2,371011	1,691504	0,642273	1,982361	0,230504
	T _{ME}						
	T efetora						
TNF- α +	T _{MC}	1,633448	0,856154	2,789403	0,833001	4,496375	0,508113
	T _{ME}						
	T efetora						
IL-2+	T _{MC}	1,681512	0,618701	1,361735	0,557598	2,086936	0,826473
	T _{ME}						
	T efetora						
IL-2+	T _{MC}	1,573591	0,700047	1,629136	0,599317	2,844917	0,499710
	T _{ME}						
	T efetora						
IL-2+	T _{MC}	2,213102	1,008850	1,833893	0,684496	2,238366	1,153849
	T _{ME}						
	T efetora						
IL-2+	T _{MC}	1,422159	0,151569	1,520633	0,597709	1,392626	0,352898
	T _{ME}						
	T efetora						
IL-2+	T _{MC}	1,261941	0,152336	1,234611	0,242300	1,929431	0,505552
	T _{ME}						
	T efetora						
IL-2+	T _{MC}	1,428385	0,291642	1,798418	0,304952	2,181451	0,097753
	T _{ME}						
	T efetora						

Média e desvio padrão (DP) dos índices CE/CC das subpopulações de linfócitos T CD4+ positivas para IFN- γ , TNF- α e IL-2 de cada grupo de estudo (controles, infecção latente e curados). O índice CE/CC por participante foi calculado para cada subpopulação de linfócitos T CD4+ (memória central, memória efetora e efetora), como sendo a razão do percentual de células positivas para cada citocina na CE pelo percentual obtido na CC.

Tabela 10 – Valores de média e desvio-padrão dos índices CE/CC de cada grupo de estudo, conforme o percentual das subpopulações de linfócitos T CD8+ positivas para as citocinas IFN- γ e TNF- α .

Grupo		Controles		Infecção latente		Curados	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP
Linfócitos T CD8+	T _{MC}	2,633847	0,469626	2,957969	0,879965	1,517630	1,195985
	T _{ME}	2,037336	1,189020	2,525725	1,023912	1,089114	0,351748
	T efetora	2,372773	0,495951	4,990734	1,500119	3,020111	1,769251
Linfócitos T CD8+	T _{MC}	2,886707	0,506320	1,883115	0,171528	1,529498	1,127809
	T _{ME}	1,349924	0,265799	2,233649	0,357075	1,173356	0,747944
	T efetora	2,038958	0,206667	1,240778	0,114081	2,778381	1,177657

Média e desvio padrão (DP) dos índices CE/CC das subpopulações de linfócitos T CD8+ positivas para IFN- γ e TNF- α de cada grupo de estudo (controles, infecção latente e curados). O índice CE/CC por participante foi calculado para cada subpopulação de linfócitos T CD8+ (memória central, memória efetora e efetora), como sendo a razão do percentual de células positivas para cada citocina na CE pelo percentual obtido na CC.

Na análise de expressão de citocinas pelas subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ estudadas nos três grupos, os resultados com diferença significativa ($p < 0,05$) foram:

- o grupo controle apresentou maior proporção de linfócitos T CD4+ com fenótipo T_{ME} IFN- γ + que os indivíduos com infecção latente e os curados de TB pulmonar;
- o grupo de curados de TB pulmonar foi aquele que apresentou maior população de linfócitos T CD4+ efetores produtores de IFN- γ , dentre os três grupos populacionais avaliados;
- os indivíduos com infecção latente apresentaram maior proporção de linfócitos T CD8+ T_{MC} IFN- γ + que o grupo de curados de TB pulmonar;
- os indivíduos com infecção latente apresentaram maior proporção de linfócitos T CD8+ efetores IFN- γ + que o grupo controle;
- a expressão de TNF- α por linfócitos T CD4+ com fenótipo T_{ME} foi mais pronunciada no grupo de curados, do que nos outros dois grupos;
- o grupo controle apresentou maior proporção de linfócitos T CD8+ com fenótipo T_{MC} produtores de TNF- α que os indivíduos com infecção latente e os curados de TB pulmonar;
- o grupo latente apresentou maior proporção de células T CD8+ T_{ME} TNF- α + que os controles e os curados de TB pulmonar;

- as células T CD8+ efectoras TNF- α + foram prevalentes no grupo de curados e estavam em menor proporção no grupo latente;
- os curados de TB pulmonar demonstraram maiores níveis de linfócitos T CD4+ com fenótipo T_{ME} IL-2+, que os outros dois grupos;
- os curados e infectados latentes apresentaram maior proporção de células T CD4+ efectoras IL-2+ que os controles;
- entre as células T CD4+ IFN- γ +, houve predomínio da subpopulação T_{ME} no grupo controle e da subpopulação T efectora nos grupos de infectados latentes e de curados de TB pulmonar;
- entre os linfócitos T CD8+ IFN- γ +, o fenótipo efector prevaleceu sobre os demais no grupo de infectados latentes, porém, nos outros dois grupos não se constatou diferença na proporção de células que expressaram a citocina, entre as subpopulações avaliadas;
- em relação às células T CD8+ TNF- α +, no grupo controle houve predomínio da subpopulação de linfócitos T_{MC}, seguida pelas células T efectoras, e no grupo de infectados latentes predominaram os linfócitos T_{ME};
- por análise de linfócitos T CD4+ IL-2+, constatou-se que no grupo de infectados latentes houve predomínio da subpopulação de células T efectoras sobre o fenótipo T_{ME}.

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, a caracterização fenotípica de linfócitos T CD4+ e CD8+, bem como análise do perfil de citocinas produzidas por essas células, após estímulo antigênico específico *in vitro*, teve como objetivo elucidar aspectos da resposta imune celular na infecção latente pelo *M. tuberculosis*, principalmente no que diz respeito às células T de memória. Foram feitas comparações de subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ entre os controles, os infectados latentes e os curados de TB pulmonar, de acordo com análise da expressão de marcadores de superfície. O uso combinado de anticorpos anti-CD45Ro e anti-CD27 definiram quatro subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+: (CD45Ro-CD27+), (CD45Ro+CD27+), (CD45Ro+CD27-) e (CD45Ro-CD27-), que de acordo com estudos anteriores, correspondem a células T naïve, T_{MC}, T_{ME} e T efetoras, respectivamente (APPAY *et al.*, 2008; JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2006; MARÍN *et al.*, 2012; RUEDA *et al.*, 2010; SCHIÖTT *et al.*, 2004; TAPANINEN *et al.*, 2010).

Os indivíduos controles e infectados latentes foram submetidos à PT, posteriormente à assinatura do TCLE e coleta de amostras de sangue para os experimentos, com objetivo principal de se eliminar uma possível interferência do próprio teste nos resultados obtidos para os grupos. Além disso, foi analisado nos participantes submetidos à PT o *efeito booster*, fenômeno no qual há reativação da resposta imunológica específica a um estímulo previamente sofrido, por meio de novas exposições a esse estímulo. O objetivo dessa análise foi eliminar o risco de resultados falsos negativos para a infecção pelo *M. tuberculosis*. Para essa avaliação, procedeu-se a uma segunda PT, com nova aplicação de tuberculina (reforço do estímulo) após uma a três semanas da primeira PT. Considera-se o *efeito booster* positivo quando a segunda PT apresentar resultado \geq a 10 mm e com incremento de pelo menos 6 mm em relação à primeira PT (BRASIL, 2014c). Todos os participantes do grupo controle apresentaram a primeira PT negativa (ausência de nódulo) e *efeito booster* negativo. Dos dez indivíduos incluídos nesse grupo, somente em dois houve desenvolvimento de endurecido na segunda PT, mas em ambos desenvolveu-se um nódulo de apenas 2 mm, que configura um *efeito booster* negativo.

Inicialmente, na obtenção resultados, analisou-se uma mesma subpopulação de linfócitos T – naïve, T_{MC}, T_{ME} e T efetora – nos três grupos de estudo (**figuras 12 e 13**), para avaliar se existe alguma diferença na resposta imunológica anti-*M. tuberculosis*, principalmente no que diz respeito à expressão de células de memória. Em seguida, dentro de um mesmo grupo de estudo, foram comparadas as quatro subpopulações fenotípicas de linfócitos T CD4+ e T CD8+ entre si, com objetivo de analisar se existe algum fenótipo preponderante em cada grupo (**figuras 14 e 15**).

Nas análises das quatro subpopulações estudadas em um mesmo grupo, observou-se uma prevalência de linfócitos T CD4+ efetores no grupo controle (**Figura 14**). Tal resultado era esperado, pois os linfócitos T naïve dessa população não haviam sido previamente primados pelos antígenos do *M. tuberculosis*. Na fase de primeiro contato com o antígeno específico, há uma proliferação maciça e expansão clonal, culminando em uma alta frequência de células T efetoras antígeno-específicas, cujo objetivo principal é debelar a infecção pelo patógeno (SEDER & AHMED, 2003; PREZZEMOLO *et al.* 2014). Em seguida, predominaram células T_{ME} sobre as T_{MC}, o que também se justifica, uma vez que linfócitos T_{ME} possuem capacidade de desenvolverem resposta efetora, com produção de mediadores efetivos contra o agente agressor (LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2005; SALLUSTO, GEGINAT, LANZAVECCHIA, 2004). Quando foram avaliadas as subpopulações de linfócitos T CD8+, constatou-se novamente o predomínio de uma resposta efetora, onde os linfócitos T efetores e T_{ME} sobressaíram (**Figura 15**). Ressalta-se mais uma vez o fato do primeiro contato das células imunes desses indivíduos com os antígenos do bacilo. A resposta celular do tipo T CD8+ durante o processo infeccioso é de extrema importância, pois tem por objetivo desenvolver uma resposta citotóxica efetiva, principalmente neste caso em que o bacilo é um patógeno intracelular. As células T CD8+ efetoras promovem a eliminação da bactéria através da indução de mecanismos, como apoptose celular, e da produção de citocinas e moléculas citolíticas (perforinas e granzimas), capazes de promover a morte da célula hospedeira e do patógeno intracelular (SEDER & AHMED, 2003; MATUCCI, MAGGI, VULTAGGIO, 2014; PREZZEMOLO *et al.* 2014).

No grupo de infectados latentes, houve predomínio de células T CD4+ efetoras sobre as outras três subpopulações celulares, sendo que as células T_{ME}

sobressaíram às células T_{MC} (**Figura 14**). Este resultado contrasta com aqueles obtidos nos estudos desenvolvidos por Petruccioli e colaboradores (2013) e por Pollock e colaboradores (2013), em que se observou predomínio do fenótipo T_{MC} entre os linfócitos T CD4+ dos infectados latentes, após cultivo na presença de ESAT-6 e CFP-10. A variável metodológica com maior probabilidade de ser a causa para esta diferença é o prazo de cultivo celular, pois, enquanto neste estudo o contato antigênico foi de longo prazo (144 horas), nos dois estudos referenciados as células foram estimuladas por apenas 16 horas. O maior período de incubação pode ter permitido a diferenciação das células T_{MC} , presentes no início da incubação, em outros fenótipos celulares com maior capacidade efetora, com objetivo de responder a esta segunda estimulação antigênica.

Ainda nos infectados latentes, entre os linfócitos T CD8+ predominaram as subpopulações T_{ME} e T efetora sobre as células T naïve e T_{MC} (**Figura 15**). Esses resultados podem ser consequência do estímulo durante os períodos de contato antigênico (durante a infecção e cultivo *in vitro*). Quando há estimulação antigênica com persistência do antígeno (tanto na infecção latente em si, quanto no microambiente proporcionado às células em cultura pela incubação com antígeno por 144h), espera-se que ocorra proliferação celular contínua e diferenciação dos linfócitos T, tendo como consequência a manutenção de um elevado número de células com fenótipo efetor, com intuito de gerar uma resposta de proteção adequada (LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2005; PREZZEMOLO *et al*, 2014). As células T_{ME} foram preponderantes às T_{MC} , pois neste estado de estimulação, linfócitos T_{MC} são capazes de se diferenciarem em T_{ME} , cujo fenótipo é eficiente em promover uma resposta efetora imediata contra antígenos anteriormente apresentados. Essa questão é discutida por Lanzavecchia e Sallusto (2005), que relatam ainda que linfócitos T_{ME} , uma vez gerados em resposta a um estímulo específico, podem ser detectados por vários anos após a etapa de primagem, sugerindo que estas células são intrinsecamente estáveis ou continuamente reabastecidas, através de diferenciação de linfócitos T_{MC} .

Já no grupo dos curados, observou-se um predomínio das células T CD4+ e CD8+ efetoras sobre as T naïve, mas sem diferença sobre as subpopulações de memória (**figuras 14 e 15**). Esta população de estudo sofreu infecção pelo *M. tuberculosis*,

porém a resposta imunológica gerada não foi capaz de conter a multiplicação do bacilo, o que culminou no desenvolvimento da TB pulmonar, com estimulação antigênica forte (por multiplicação dos bacilos e instalação da doença ativa). Em seguida, os participantes realizaram tratamento medicamentoso contra o patógeno e conseguiram alcançar o estado de cura da doença, com a inativação do agente patogênico. Tais eventos, de estimulação antigênica forte com posterior neutralização do antígeno, contribuíram para a geração de uma resposta de memória, conforme relatado por Lanzavecchia e Sallusto (2005). Os linfócitos com esse fenótipo, após nova estimulação (cultivo *in vitro*), tenderam a se autorreplicar, para assegurar a manutenção de um pool de células efetoras específicas contra o bacilo (LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2002; PETRUCCIOLI *et al.*, 2013).

Na avaliação de uma mesma subpopulação de linfócitos T CD4+ entre os três grupos de estudo, tanto o grupo de curados quanto o de indivíduos com infecção latente apresentaram uma percentagem menor de células T naïve na cultura estimulada, quando comparada com a cultura não estimulada (índices CE/CC <1,0). Este dado sugere que, por este segundo desafio antigênico, os linfócitos T naïve dos dois grupos tenham se diferenciado em outras subpopulações linfocitárias, com objetivo de gerar uma resposta imune de defesa específica, e que a proliferação de células T naïve não ocorreu na mesma magnitude que no grupo controle, cujo índice CE/CC foi > 1,0. Esse resultado correlaciona-se com o fato de que, no primeiro contato das células dos controles com o *M. tuberculosis*, a tendência é ocorrer proliferação clonal dos linfócitos T naïve, para assegurar a manutenção de células T efetoras antígeno-específicas (SEDER & AHMED, 2003; PREZZEMOLO *et al.*, 2014). Além disso, os curados e infectados pelo *M. tuberculosis* desenvolveram uma resposta imune específica anterior ao estímulo *in vitro* – confirmada pelo desenvolvimento de seqüela no tecido pulmonar dos curados e pela responsividade dos infectados latentes à PT – e, portanto, a resposta gerada no segundo contato poderia ser proveniente de proliferação ou diferenciação de outros fenótipos celulares, que não o T naïve. Ressalta-se aqui o papel que as células T de memória, previamente desenvolvidas por ocasião da infecção pelo *M. tuberculosis*, teriam para o estabelecimento de uma resposta efetora após estímulo *in vitro*, pois são capazes de se diferenciarem em células T efetoras de forma menos dependente de

coestimulação e de estímulo antigênico de longa duração, quando comparadas com as células T naïve (BERARD, TOUGH, 2002).

O grupo controle também apresentou maior proporção de células T_{ME} e T efetoras de linfócitos T CD4+, que os outros dois grupos (**Figura 12**). Neste primeiro contato com o antígeno do *M. tuberculosis*, espera-se que a diferenciação celular nos indivíduos não infectados se dê no sentido de gerar linfócitos com fenótipos capazes de desenvolver resposta efetora imediata, como as subpopulações T efetora e T_{ME} (SALLUSTO, GEGINAT, LANZAVECCHIA, 2004; PREZZEMOLO *et al.*, 2014). Essa explanação é confirmada pelo resultado de que houve predomínio desses dois fenótipos (T efetor e T_{ME}) entre os linfócitos T CD4+ do grupo controle (**Figura 14**). A geração de uma resposta imunológica efetora tem por objetivo principal prover mecanismos capazes de debelar o agente patogênico invasor, de forma rápida e eficiente, como produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de outras subpopulações de células de defesa, como linfócitos T CD8+ e macrófagos (AHMAD, 2010; MATUCCI, MAGGI, VULTAGGIO, 2014). Vale ressaltar que os curados e infectados latentes já deveriam ter células T_{ME} *M. tuberculosis*-específicas circulantes, que podem ter contribuído para aumentar a diferença obtida entre os grupos. Apesar desse resultado, pode-se sugerir que os curados e infectados latentes foram capazes de desenvolver uma resposta T CD4+ efetora contra o estímulo, visto que os índices CE/CC desses dois grupos também foram >1,0 para esta subpopulação. Esse resultado correlaciona-se com o achado de que, dentre os linfócitos T CD4+ dos curados e dos infectados latentes, houve predomínio de células com fenótipo efetor (**Figura 14**).

Quando foram avaliadas as subpopulações de linfócitos T CD8+, o grupo de infectados latentes apresentou maior proporção de células T naïve que os controles, indicando que, na presença do estímulo antigênico, a diferenciação de células T CD8+ naïve foi mais significativa nos controles. Este dado correlaciona-se com o importante papel dos linfócitos T CD8+ na geração de uma resposta imune efetiva, ao primeiro contato com o patógeno, para assegurar a geração de diversos mecanismos anti-*M. tuberculosis* (MATUCCI, MAGGI, VULTAGGIO, 2014). Além disso, nos indivíduos em estado de latência da infecção, a diferenciação e proliferação de células T CD8+, consequentes da resposta ao estímulo *in vitro*,

podem ter ocorrido de forma mais significativa a partir de outras subpopulações linfocitárias que não os linfócitos T naíve. Linfócitos T CD8+ de memória, específicos contra o bacilo e gerados em resposta à instalação da infecção, têm capacidade de se diferenciar em fenótipos efetores, quando da ocorrência de uma nova exposição antigênica (BERARD, TOUGH, 2002; SALLUSTO, GEGINAT, LANZAVECCHIA, 2004).

Os curados de TB pulmonar apresentaram menor proporção de células T CD8+ naíve que os infectados latentes. Este resultado sugere que nos curados houve maior diferenciação desta subpopulação após estímulo *in vitro*, gerando redução na proporção de linfócitos T CD8+ com esse fenótipo e, conseqüentemente, um índice CE/CC < 1,0 (**Figura 13**). Esse achado correlaciona-se com o resultado de que no grupo dos curados houve predomínio de células T CD8+ efectoras sobre aquelas com fenótipo T naíve, indicando a diferenciação para uma subpopulação com características efectoras, no intuito de responder a esse segundo estímulo (**Figura 15**).

Na análise de linfócitos T CD8+ T_{MC} e T_{ME}, constatou-se que o grupo de infectados latentes apresentou maior proporção de células que o grupo controle. Nesse caso, como os infectados latentes já haviam sido expostos aos antígenos do bacilo, nessa segunda estimulação, as células de memória existentes poderiam ter respondido com autorreplicação, a fim de manterem um pool de células efectoras, uma vez que são capazes de se diferenciarem em linfócitos T_{ME} e efetores (HENAO-TAMAYO, ORDWAY, ORME, 2014). Além do mais, Seder e Ahmed (2003) ressaltam que a atividade de células T CD4+ é de extrema importância para a geração de células T CD8+ com capacidade proliferativa e função efectora, em um segundo desafio antigênico. Portanto, sugere-se que a melhor resposta de células T CD8+ de memória observada no grupo de infectados latentes esteja diretamente relacionada com a presença de células T CD4+ *M.tuberculosis*-específicas, cuja geração antecedeu o estímulo antigênico *in vitro*. Enquanto isso, conforme discutido anteriormente, o grupo controle respondeu ao primeiro contato com o antígeno por diferenciação dos linfócitos T naíve para um fenótipo T efector, em sua maioria, sendo que os linfócitos T CD4+ antígeno-específicos apareceriam somente com o cultivo *in vitro*. Este resultado reforça outro encontrado no grupo controle, em que se

observou um predomínio da subpopulação efetora entre os linfócitos T CD8+ (**Tabela 8**).

Ao se analisar a funcionalidade das subpopulações de linfócitos T nos grupos de estudo, constatou-se uma maior proporção de células T_{ME} CD4+ IFN- γ + no grupo controle do que nos indivíduos com infecção latente e nos curados de TB pulmonar (**Figura 14, Tabela 9**). Ao contrário do que foi observado neste estudo, Mueller e colaboradores (2008) realizaram cultivo de células do sangue total de crianças não infectadas pelo *M. tuberculosis*, por 18h na presença de ESAT-6 e CFP-10 ou lisado do *M. tuberculosis*, e relataram que não foram detectadas células T produtoras de IFN- γ nesse grupo. A principal característica metodológica que explicaria a diferença observada é o tempo de cultivo celular na presença estímulo antigênico: um curto prazo de estímulo da cultura pode não ter sido suficiente para promover a ativação de células T ao ponto de produzirem citocinas pró-inflamatórias, uma vez que esses indivíduos não teriam células T específicas para o *M. tuberculosis*, capazes de responderem rapidamente à exposição antigênica, pela produção de citocinas.

Como exposto anteriormente, os indivíduos curados de TB pulmonar e os infectados latentes sofreram exposição ao bacilo que antecedeu o estímulo antigênico *in vitro*, portanto, já deveriam ter uma proporção de células T_{ME} capazes de responderem ao segundo estímulo pela produção de IFN- γ . No entanto, no grupo controle esse fenótipo celular foi gerado somente após o estímulo antigênico *in vitro* de longa duração (primagem celular), o que propiciou um índice CE/CC maior que dos demais grupos. Este achado é compatível com o resultado encontrado de que o grupo controle apresentou maior proporção de células T CD4+ T_{ME}, quando comparado aos outros dois grupos (**Figura 12, Tabela 7**), e é reforçado pelo resultado de que, entre as células T CD4+IFN- γ + do grupo controle, houve predomínio da subpopulação T_{ME} IFN- γ + (**Figura 16B**). Assim, as células T_{ME} CD4+ geradas neste grupo foram importantes para propiciar uma resposta efetora contra o agente patogênico, através da produção de IFN- γ – citocina pró-inflamatória responsável pela ativação de diversos mecanismos de combate ao *M. tuberculosis* (AHMAD, 2010; SILVA, 2010; MATUCCI, MAGGI, VULTAGGIO, 2014). Ressalta-se também que, ainda que em menor proporção, os outros dois grupos apresentaram um aumento de linfócitos T_{ME} CD4+ capazes de produzir IFN- γ em resposta ao estímulo

antigênico *in vitro*, uma vez que o índice CE/CC de células T_{ME} CD4⁺ IFN- γ ⁺ desses grupos também foi > 1,0 (**Figura 14, Tabela 9**). Esses dados estão condizentes com o fato de que a subpopulação T_{ME} apresenta atividade efetora e alta capacidade de produção de IFN- γ ⁺, conforme relatado por Sallusto e colaboradores, em 1999.

Os curados de TB pulmonar apresentaram maior proporção de células T CD4⁺ efetoras IFN- γ ⁺ que os outros dois grupos de estudo, após estímulo antigênico específico (**Figura 16A**). Este resultado é compatível com a constatação de que entre as células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ deste grupo, houve predomínio da subpopulação T efetora (**Figura 16B**). Uma vez que esses participantes sofreram forte estimulação antigênica, com o desenvolvimento da doença ativa, esta subpopulação de linfócitos T, gerada por ocasião do segundo contato antigênico, pode ser mais competente para produção de IFN- γ que nos outros dois grupos. Sugere-se ainda que este resultado esteja intimamente relacionado com a presença de células T de memória antígeno-específicas, desenvolvidas por ocasião da doença, em resposta ao patógeno. Após uma segunda exposição antigênica, tais células teriam gerado linfócitos T efetores com maior capacidade funcional pró-inflamatória, que aqueles provenientes da diferenciação de células T naïve no grupo controle. Apesar disto, as células T CD4⁺ efetoras dos controles e dos infectados latentes também desenvolveram uma resposta imune pró-inflamatória pela produção de IFN- γ ⁺, já que o índice CE/CC desses linfócitos T IFN- γ ⁺ também foi > 1,0 nesses grupos. Além do mais, a subpopulação efetora predominou entre as células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ do grupo de infectados latentes (**Figura 16B**) e, apesar de não significativa ($p > 0,05$), observou-se tendência de maior resposta neste grupo que no grupo controle, indicando mais uma vez o papel das células de memória para geração de resposta pró-inflamatória na infecção pelo *M. tuberculosis*.

Os infectados latentes apresentaram maior proporção de linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ com fenótipo T_{MC}, quando comparados com os curados de TB pulmonar. Petruccioli e colaboradores (2013) ao avaliarem a resposta de células T CD4⁺ aos antígenos recombinantes ESAT-6 e CFP-10, demonstraram associação do fenótipo T_{MC} com os indivíduos com infecção latente pelo *M. tuberculosis*. Sugere-se, então, que a correlação desse fenótipo possa estar presente também no caso dos linfócitos T

CD8+, indicando uma função de controle da infecção nesses indivíduos, o que pode ter colaborado para impedir a evolução da infecção para TB ativa.

No grupo com infecção latente, o nível de linfócitos T CD8+ IFN- γ + com fenótipo T efetor foi significativamente maior que o grupo controle (**Figura 17A**). Este resultado sugere que, nesses indivíduos, esta subpopulação de linfócitos T CD8+ é de grande relevância ao combate do patógeno. Quando comparados aos controles, os infectados latentes diferem no fato de que seu sistema imunológico ter sido previamente exposto e estimulado pelo bacilo. Desta forma, maior a probabilidade de se constatar a capacidade funcional de células T CD8+ efetoras nesse grupo, visto que esses indivíduos teriam desenvolvido linfócitos T anti-*M. tuberculosis* específicos antes da estimulação *in vitro*, principalmente linfócitos T CD4+, os quais se já se mostraram estritamente necessários para uma ótima produção de IFN- γ + por linfócitos T CD8+ efetores (BOLD & ERNST, 2012; SEDER & AHMED, 2003). Tal dado é reforçado pelo resultado de predomínio do fenótipo T efetor entre os linfócitos T CD8+ IFN- γ + do grupo de infectados latentes (**Figura 17B**), o qual também foi observado por Pollock e colaboradores (2013).

Quando se analisou a produção de TNF- α pelas subpopulações de linfócitos T CD4+, observou-se que o grupo dos curados apresentou maior proporção de células T_{ME} com capacidade de produzir a citocina, quando comparado com os outros dois grupos de estudo (**Figura 18**). O TNF- α tem capacidade de induzir a produção de outras citocinas, como o IFN- γ , por células T ativas (MATUCCI, MAGGI, VULTAGGIO, 2014). Tal característica reforça o resultado encontrado de que o grupo dos curados de TB pulmonar apresentou maior proporção de linfócitos T CD4+ efetores IFN- γ + que os demais grupos analisados (**Figura 16A**). Deve-se ressaltar também que, ainda que em menor magnitude, os linfócitos T_{ME} dos controles e dos infectados latentes desenvolveram uma resposta imunológica anti-*M. tuberculosis* através da produção de TNF- α , uma vez que o índice CE/CC foi > 1,0 para os dois grupos (**Figura 18**).

Em relação à produção de TNF- α por linfócitos T CD8+, o grupo controle apresentou maior proporção células T_{MC} TNF- α + que os outros grupos (**Figura 19A**), resultado reforçado pelo achado de que essa foi a subpopulação predominante entre os

linfócitos T CD8+ TNF- α + no grupo controle (**Figura 19B**). Novamente, ressalta-se a importância do TNF- α + na produção de citocinas pró-inflamatórias: apesar de essas células estarem em menor proporção que as subpopulações com atividade efetora (T_{ME} e T efetora) no grupo dos controles (**Figura 15**), a capacidade de produzirem TNF- α pode ter contribuído para a maior produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4+ de fenótipo T_{ME} nesse grupo, tendo em vista a capacidade do TNF- α de estimular indiretamente a produção de IFN- γ (MATUCCI, MAGGI, VULTAGGIO, 2014).

Nos infectados latentes se constatou predomínio de linfócitos T_{ME} entre as células T CD8+ TNF- α + (**Figura 19B**). Este resultado faz correlação com outro, em que os infectados latentes foram os participantes que apresentaram maior proporção da subpopulação T_{ME} de linfócitos T CD8+ TNF- α +, entre os três grupos analisados (**Figura 19A**). Sugere-se que esta subpopulação de linfócitos T, funcional para expressão de TNF- α , possa estar intimamente relacionada com a capacidade do sistema imunológico dos infectados latentes conterem o desenvolvimento da infecção para doença ativa, já que o papel de proteção do TNF- α contra o bacilo foi confirmado, após várias evidências de que a terapia anti-TNF- α aumenta o risco de reativação da infecção latente pelo *M. tuberculosis* (DIXON *et al.*, 2010; FALLAHI-SICHANI *et al.*, 2012; MILLER & ERNST, 2009; TUBACH *et al.*, 2009).

Ainda com relação aos linfócitos T CD8+ TNF- α +, o grupo dos curados de TB pulmonar foi o que apresentou maior proporção de células T efectoras TNF- α + (**Figura 19A**) e, apesar de não ter sido um resultado estatisticamente significativo ($p > 0,05$), observou-se tendência de predomínio deste fenótipo entre os linfócitos T CD8+ produtores da citocina nesses indivíduos (**Figura 19B**). Sugere-se que a resposta de células T CD8+ efectoras desenvolvida nesses indivíduos, após uma nova exposição ao *M. tuberculosis*, possa ocorrer pela produção significativa de outras citocinas, além do IFN- γ . Assim, foi possível constatar que na segunda exposição antigênica, houve geração de resposta pró-inflamatória pelos linfócitos T dos curados, sendo que a maior produção de IFN- γ e TNF- α foi proveniente de células T CD4+ e T CD8+ com fenótipo efector, respectivamente.

A análise da expressão de IL-2 demonstrou que sua produção por linfócitos T CD4+ com fenótipo T_{ME} foi maior no grupo dos curados de TB pulmonar, mas nos outros

dois grupos essa subpopulação celular também foi capaz de produzir IL-2 em resposta à presença do bacilo, visto que em ambos o índice CE/CC desses linfócitos T CD4+ IL-2+ também foi > 1,0 (**Figura 20A**). Os infectados latentes e os curados de TB pulmonar apresentaram maior proporção de células T CD4+ efectoras IL-2+ (**Figura 20A**), sugerindo que nesses indivíduos, o segundo contato com o *M. tuberculosis* promoveria a geração de linfócitos T destinados a assegurar a manutenção do pool de células T de memória e de células antígeno-específicas com função efetora (MARÍN *et al.*, 2012).

Em síntese, são relatadas as principais diferenças observadas na resposta imune entre três grupos de estudo, após cultivo de longo prazo das CMSP com antígenos do *M. tuberculosis*. No grupo com infecção latente constatou-se preponderância do fenótipo T naíve sobre T_{MC} nos linfócitos T CD4+, e do fenótipo T_{ME} sobre T naíve nos linfócitos T CD8+, resultados que não foram encontrados no grupo controle. Os infectados latentes apresentaram maior proporção de linfócitos T CD4+ e T CD8+ naíve que os curados; além de terem o fenótipo T efetor predominante sobre os demais fenótipos de linfócitos T CD4+, não apenas sobre o T naíve, conforme encontrado no grupo de curados. As principais diferenças da resposta imune entre os controles e curados de TB pulmonar residem no fato de que nos controles houve predomínio de linfócitos T CD4+ efetores sobre os outros três fenótipos, não apenas sobre os T naíve, como nos curados; além de predomínio de linfócitos T CD8+ efetores e T_{ME} sobre T_{CM}, o que não foi observado nos curados.

Em relação aos resultados de funcionalidade das subpopulações linfocitárias T CD4+ e T CD8+ nos três grupos de estudo, foram relatadas as seguintes diferenças significantes. Nos indivíduos com infecção latente, a resposta de células T CD8+ ao estímulo do *M. tuberculosis* pela produção de IFN- γ e TNF- α , foi dominada por linfócitos T efetores e T_{ME}, respectivamente, enquanto no grupo dos curados não se observou predomínio de um fenótipo específico produtor dessas citocinas. Em relação à resposta de células T CD4+ IFN- γ +, o grupo controle apresentou predomínio de linfócitos T_{ME} e os curados apresentaram predomínio do fenótipo T efetor; enquanto na análise de linfócitos T CD8+ TNF- α +, houve predomínio de células T_{MC} nos controles e no grupo dos curados não houve um fenótipo que sobressaísse aos demais. Por comparação dos resultados dos controles e dos

indivíduos com infecção latente, observou-se que entre os linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺, no primeiro grupo houve predomínio do fenótipo T_{ME} e no segundo grupo predominaram células T efetoras; em relação aos linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺, enquanto no grupo controle não houve predomínio de uma subpopulação sobre as demais, os infectados latentes tinham maior proporção de células T efetoras; e na resposta de células T CD8⁺ pela produção de TNF- α ⁺, predominaram os linfócitos T_{MC} nos controles e os T_{ME} nos infectados latentes.

Além das diferenças acima discutidas, foram constatadas algumas semelhanças na resposta imune entre os três grupos de indivíduos analisados. O grupo controle e os indivíduos com infecção latente apresentaram uma resposta de células T CD4⁺ com predomínio de células T efetoras sobre os demais fenótipos, além de maior proporção de linfócitos T naíve que o grupo de curados de TB pulmonar. Ainda nesses dois grupos, a resposta de células T CD8⁺ teve predomínio do fenótipo T efetor sobre T_{MC} e T naíve e não houve predominância de uma subpopulação específica entre as células T CD4⁺ TNF- α ⁺ e T CD4⁺ IL-2⁺. Nos indivíduos com infecção latente e nos curados de TB pulmonar observou-se uma resposta de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ com preponderância do fenótipo T efetor sobre o T naíve; além de ter predominado o fenótipo T efetor, dentre as células T CD4⁺ IFN- γ ⁺, e de não ter havido predomínio de uma subpopulação específica entre os linfócitos T CD4⁺ TNF- α ⁺ nos dois grupos. Já entre os controles e os curados de TB pulmonar houve semelhança na resposta de células T CD4⁺ e T CD8⁺, em que linfócitos T efetores predominaram sobre aqueles com fenótipo T naíve. Além do mais, esses dois grupos apresentaram maior proporção de linfócitos T CD4⁺ T_{MC} e de linfócitos TCD8⁺TNF- α ⁺ efetores que os infectados latentes, mas não apresentaram uma subpopulação específica dominante dentre os linfócitos T CD4⁺TNF- α ⁺, T CD4⁺ IL-2⁺ e T CD8⁺IFN- γ ⁺.

Houve dificuldade em se correlacionar os resultados obtidos neste estudo com aqueles relatados por outros estudos de células T de memória na infecção pelo *M. tuberculosis*. As considerações mais relevantes foram observadas nas diferentes metodologias padronizadas e nas formas de exposição dos resultados por esses estudos.

Foi possível observar que em alguns estudos o cultivo celular foi realizado por curto período de tempo (16-24 horas) (ADEKAMBI *et al.*, 2012; MUELLER *et al.*, 2008; PETRUCCIOLI *et al.*, 2013; POLLOCK *et al.*, 2013). Em outros, foram realizadas culturas de longo prazo (5-9 dias) (GOLETTI *et al.*, 2006; MARÍN *et al.*, 2012; RUEDA *et al.*, 2010). Ensaio de longo período de estimulação asseguram maior tempo para expansão de células, o que corrobora para uma maior sensibilidade dos resultados (aumento da capacidade de medir uma resposta que não seria mensurável pelo uso de outros sistemas); permitem a avaliação de células T antígeno-específicas, quanto à presença e à capacidade de produção de marcadores funcionais, como citocinas; são altamente recomendados para estudos que visam avaliar subpopulações de linfócitos que exigem maiores períodos de apresentação antigênica para se ativarem e se expandirem (como no caso da avaliação de células de memória central, em que foi proposta uma melhor medição em ensaios de longo prazo). Neste tipo de ensaio, os resultados são menos afetados pela manipulação das células durante o isolamento ou criopreservação e o tempo de incubação das CMSP, após a coleta do sangue, é menos importante que nos ensaios de curto prazo (HANEKOM *et al.*, 2008).

Diversos foram os estímulos antigênicos empregados em estudos que avaliaram a resposta de células T de memória na infecção pelo *M. tuberculosis*, como PPD, coquetel com peptídeos ESAT-6 e CFP-10, BCG e lisado do *M. tuberculosis*. Além disso, não foi raro encontrar estudos que utilizaram diferentes estímulos antigênicos e que expuseram como resultados as comparações da resposta imune de memória desenvolvida de acordo com cada antígeno. As concentrações padronizadas para o uso de um antígeno de interesse também foram discrepantes entre alguns estudos.

Outra variação encontrada entre as metodologias dos estudos com linfócitos T de memória foi o tipo de células utilizadas. Alguns autores realizaram o cultivo de células do sangue total (MUELLER *et al.*, 2008; PETRUCCIOLI *et al.*, 2013), enquanto a maioria utilizou apenas as CMSP, após isolamento a partir do sangue periférico (ADEKAMBI *et al.*, 2012; GOLETTI *et al.*, 2006; MARÍN *et al.*, 2012; POLLOCK *et al.*, 2013; RUEDA *et al.*, 2010). A resposta imunológica desenvolvida na presença de outras subpopulações celulares e outros componentes plasmáticos pode se diferenciar daquela observada quando realizado cultivo *in vitro* apenas com

células mononucleares. Apesar das técnicas de isolamento de CMSP requererem mais recursos e exigirem maiores volumes de sangue (por perda celular durante o processo), por comparação com a estimulação de células do sangue total, os ensaios que utilizam CMSP possibilitam uma descrição da resposta de células T sem que ocorra interferência de outros componentes do sangue total, como neutrófilos e o plasma (HANEKOM *et al.*, 2008).

Assim, as principais dificuldades de se interpretar e correlacionar os resultados obtidos com aqueles provenientes de diferentes estudos, que avaliaram a resposta imunológica gerada pelas diferentes subpopulações linfocitárias contra o *M. tuberculosis*, estão diretamente relacionadas com a falta de harmonização e padronização dos protocolos experimentais empregados (HANEKOM *et al.*, 2008; PETRUCCIOLI *et al.*, 2013; PREZZEMOLO *et al.*, 2014). A Organização Mundial da Saúde desenvolveu um painel de recomendações, que trouxe informações importantes sobre as vantagens e desvantagens de cada tipo de metodologia de cultivo celular (cultura de curto e longo prazo; uso de CMSP frescas, CMSP criopreservadas ou sangue total, etc.) e sobre as condições de cultivo celular que devem empregadas, de acordo o objetivo proposto em cada estudo, principalmente no que se refere à avaliação de novas vacinas anti-TB (HANEKOM *et al.*, 2008).

A mais importante limitação encontrada na execução deste estudo foi o tamanho amostral analisado, principalmente por indisponibilidade de PPD para realização da PT, durante uma parte do período de recrutamento de participantes. O Ministério da Saúde oficializou a falta do insumo, que afetou tanto na rede pública quanto na rede privada de laboratórios e impossibilitou a análise de uma população de estudo maior. Em relação aos curados de TB pulmonar, houve dificuldade de se conseguir um grupo maior, pois se constatou que no serviço de saúde em que foi realizado o recrutamento desses participantes, boa parte dos indivíduos atendidos apresentavam co-morbidades, que eram critérios de exclusão para este estudo, como diabetes ou uso de corticosteroides (muitas vezes relacionado ao tratamento das sequelas da doença). Além disso, não foi rara a exclusão desses indivíduos por uma questão metodológica: em alguns deles, o número de CMSP obtidas era insuficiente para realização de todos os cultivos celulares padronizados. Outra dificuldade enfrentada foi em relação à eficiência de marcação de um dos anticorpos

monoclonais que seriam empregados no painel de marcação celular: foi preciso demonstrar ao fabricante, por ensaios experimentais, que o reagente adquirido não apresentou as especificações necessárias que assegurassem seu desempenho durante os ensaios, para que assim fosse possível a troca do produto. A partir desta situação, o protocolo de marcação celular precisou sofrer modificações, um novo reagente precisou ser importado e novas padronizações foram realizadas, o que contribuiu para redução do período de coleta de amostras clínicas.

Por fim, muitos estudos publicados, que analisaram a resposta imunológica de indivíduos com infecção latente pelo *M. tuberculosis* e/ou curados de TB pulmonar, não realizaram comparações dos dados obtidos entre esses dois grupos, pois os resultados foram expostos em relação àqueles encontrados para o grupo com doença ativa. As comparações de resultados relacionados à resposta imunológica contra o *M. tuberculosis* entre os dois grupos de indivíduos são de extrema relevância, pois, a partir dessas análises, torna-se possível uma melhor compreensão das diferenças e das semelhanças da resposta imune nesses indivíduos.

8 CONCLUSÃO

Através da avaliação de parâmetros imunofenotípicos e da produção de citocinas intracitoplasmáticas pelas subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+, após estímulo antigênico *in vitro* de longa duração, foram observadas diferenças significantes na resposta de linfócitos T entre os grupos do estudo, principalmente em relação aos linfócitos T CD8+, pela produção de TNF α +. As diferenças na resposta específica contra o *M tuberculosis* entre esses indivíduos podem estar relacionadas com maior propensão ou não ao desenvolvimento da tuberculose. Espera-se que os dados obtidos possam contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatologia e das alterações imunológicas ocorridas na infecção latente pelo *M. tuberculosis*; para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes e de novos métodos de diagnóstico, capazes de prever o risco de reativação da infecção, de distinguir indivíduos com infecção latente, pacientes com TB ativa e curados de TB entre si, uma vez que as metodologias atuais não possibilitam essa diferenciação.

REFERÊNCIAS

- ADEKAMBI, T. *et al.* Distinct Effector Memory CD4⁺ T Cell Signatures in Latent Mycobacterium tuberculosis Infection, BCG Vaccination and Clinically Resolved Tuberculosis. **PLoS ONE**, v.7, n. 4, p. 1-11, abr. 2012.
- AHMAD, S. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p. 1-18, 2010.
- AHMED, R., GRAY, D. Immunological Memory and Protective Immunity: Understanding Their Relation. **SCIENCE**, v. 272, p. 54-60, 1996.
- AHMED, R. *et al.* The precursors of memory: models and controversies. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 662-668, 2009.
- AMARAL, E. P. **Avaliação da virulência micobacteriana e modulação da resposta imune durante a infecção por isolados clínicos de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis***. 2011. 38 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil.
- APPAY, V. *et al.* Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues. **Cytometry Part A**, v. 73A, p. 975-983, 2008.
- BEHAR. S.M.; DIVANGAHI, M.; REMOLD, H. G. Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy? **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p. 668-674, 2010. Disponível em <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n9/full/nrmicro2387.html>>. Acesso em: abr. 2015.
- BERARD, M.; TOUGH, D.F. Qualitative differences between naïve and memory T cells. **Immunology**, v. 106, n. 2, p. 127-138, 2002.
- BOLD, T. D.; ERNST, J. D. CD4⁺ T Cell-Dependent IFN- γ Production by CD8⁺ Effector T Cells in Mycobacterium tuberculosis Infection. **J Immunol**, v. 189, p. 2530-2536, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: O controle da Tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. **MS/SVS**, v. 44, n.2, 2014a. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/10/Boletim-Tuberculose-2014.pdf>>. Acesso em: dez. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Panorama da tuberculose no Brasil: indicadores epidemiológicos e operacionais. Brasília, 2014b. 92 p. Disponível em <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/panorama%20tuberculose%20brasil_2014.pdf>. Acesso em: fev. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Técnicas de aplicação e leitura da prova tuberculínica. Brasília, 2014c. 56 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Tuberculose: alinhada com o social, afinada com a tecnologia. MS/SVS, v. 44, n. 2, 2013a. Disponível em: < http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Abr/10/boletim2_2013_tb_web.pdf>. Acesso em: out. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria-Executiva. Recomendações para o manejo da coinfeção TB-HIV em serviços de atenção especializada a pessoas vivendo com HIV/AIDS. Brasília, 2013b. 28 p. Disponível em < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/recomendacoes_manejo_coinfeccao_tb_hiv.pdf>. Acesso em: mar. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Especial Tuberculose. MS/SVS, v. 43, p. 1-12, 2012a. Disponível em <<http://www.saude.rs.gov.br/upload/1337634001Tuberculose-Boletim%20Epidemiologico.pdf>>. Acesso em: out. 2013.

BRASIL. PORTAL DA SAÚDE: Profissional e Gestor. Tuberculose. 2012b. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/PORTAL/SAUDE/PROFISSIONAL/AREA_CFM?ID_AREA=1527>. Acesso em: out 2013.

BRASIL. SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. 2012c. Disponível em <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def>>. Acesso em: out. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília, 2011. 284p. Disponível em < http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/TB/mat_tec/manuais/MS11_Manual_Recom.pdf>. Acesso em: out. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília, 2010a. 186 p. Disponível em < http://www.itarget.com.br/newclients/sppt.org.br/2010/extra/download/manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf> Acesso em: out. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS: Informações de saúde. Indicadores e dados básicos. 2010b. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ibd2011/matriz.htm>>. Acesso em: set. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. Brasília, 2009. 816 p. Disponível em: < <http://infosaudepb.saude.pb.gov.br/mosaico/static/arquivos/guia.pdf>>. Acesso em: abr. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília, 2008. 436 p. Disponível em < http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf>.

Acesso em: jul. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5. ed. Rio de Janeiro, 2002. 236 p. Disponível em <www.saude.mt.gov.br/arquivo/2934>. Acesso em: abr. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Tuberculose - Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia* (Série TELELAB). Brasília: Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids, 2001. 72 p.

CAILLEAUX-CEZAR, M. Diagnosis and Treatment of Latent Tuberculosis. **Pulmão RJ**, v. 21, n.1, p.41-45, 2012. Disponível em < http://www.sopterj.com.br/revista/2012_21_1/full.pdf>. Acesso em: abr. 2014.

CAMPOS, H.S. Tuberculosis: etiopathogenesis and clinical presentations. **Pulmão RJ**, v.15, n.1, p.29-35, 2006. Disponível em <http://sopterj.com.br/profissionais/educacao_continuada/curso_tuberculose_2.pdf>. Acesso em: fev. 2015.

CASTELLO BRANCO, B; ROCHA, R. M. Current Clinical Interpretation of PPD Test: An Approach Elucidating. **R Bras Ci Saúde**, v. 16, n.2, p. 249-252, 2012. Disponível em <<http://periodicos.ufpb.br/ojs/index.php/rbcs/article/viewFile/10803/7320>>. Acesso em: out. 2013.

CAVALCANTI, Y. V. L. *et al.* Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. **Pulmonary Medicine**, v. 2012, p. 1-10. 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. Disponível em <<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>>. Acesso em: abr. 2015.

CHAN. J.; FLYNN. J. The immunological aspects of latency in tuberculosis. **Clinical Immunology**, v. 110, p. 2-12, 2004.

CHEADE, M.F.M *et al.* Characterization of tuberculosis among HIV/AIDS patients at a referral center in Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p.119-125, 2009.

CONDE, M. B. *et al.* III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **J Bras Pneumol.**, v. 35, n.10, p. 1018-1048, 2009. Disponível em < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132009001000011&script=sci_abstract&lng=pt>. Acesso em: out. 2013.

CORREIA, R.P. **Estudo da distribuição de células T naïve e subtipos de células T de memória em neoplasias hematológicas.** 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil.

De ROSA, S. C. *et al.* 11-color, 13-parameter flow cytometry: Identification of human naïve T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. **Nature Medicine**, v. 7, p. 245-248, 2001.

DIXON, W. G. *et al.* Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). **Ann Rheum Dis**, v. 69, p. 522-528, 2010.

DORRONSORO, I.; TORROBA, L. Microbiology of tuberculosis. **An. Sist. Sanit. Navar.**, v.30, n. 2, p. 67-84, 2007.

DUCATI, R. G. *et al.* The resumption of consumption. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.

DUFFY, D. *et al.* Immunological Memory Transferred with CD4 T Cells Specific for Tuberculosis Antigens Ag85B-TB10.4: Persisting Antigen Enhances Protection. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. 1-8, 2009.

ESCOBEDO, C. J. S.; MORENO, J. A. E.; ESPINO, J. M. Performance of Tuberculin Skin Test Compared to QFT-IT to Detect Latent TB Among High-risk Contacts in Mexico. **Archives of Medical Research**, v. 44, p. 242-248, 2013.

FALLAHI-SICHANI, M. *et al.* Differential risk of tuberculosis reactivation among anti-TNF therapies is due to drug binding kinetics and permeability. **J Immunol.**, v. 188, n. 7, p. 3169–3178, 2012.

FERRAZ, J.C. *et al.* Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. **Braz J Med Biol Res**, v.39, n.11, p. 1387-1397, 2006.

FLYNN, J.L. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. **Tuberculosis**, n.84, p.93-101, 2004.

FLYNN J L, CHAN J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review Immunology**, v. 19: 93-129, 2001.

GARCÍA, L. F.; BARRERA, L. F. Perspectivas para nuevas vacunas antituberculosas en la era posgenómica. **Biomédica**, v. 24, p. 228-238, 2004.

GOLETTI, D. *et al.* Region of Difference 1 Antigen–Specific CD4+Memory T Cells Correlate with a Favorable Outcome of Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, p.984–992, 2006.

GOROCICA *et al.* Structural components of the envelope of Mycobacterium tuberculosis that intervene in the pathogenesis of tuberculosis. **Rev. Inst. Nat. Enf. Resp. Mex.** v.18, n. 2, 2005. Disponível em < http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018775852005000200010>. Acesso em: mar.2015.

GRAN, G.; ABMUS, J.; DYRHOL-RIISE, A. M. Screening for latent tuberculosis in Norwegian health care workers: high frequency of discordant tuberculin skin test positive and interferon-gamma release assay negative results. **BMC Public Health**, v.13, n. 353, p. 1-8, 2013.

GUZZETTA, G., KIRSCHNER, D. The Roles of Immune Memory and Aging in Protective Immunity and Endogenous Reactivation of Tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-14, 2013.

HAMANN, D. *et al.* Phenotypic and Functional Separation of Memory and Effector Human CD8+ T Cells. **J. Exp. Med.**, v. 186, n.9, p.1407-1418, 1997.

HARARI, A.; VALLELIAN, F.; PANTALEO, G. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p. 3525–3533, 2004.

HENAO-TAMAYO, M. *et al.* Phenotypic Definition of Effector and Memory T-Lymphocyte Subsets in Mice Chronically Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 4, p. 618–625, 2010.

HENAO-TAMAYO, M.; ORDWAY, D. J.; ORME, I. M. Memory T cell subsets in tuberculosis: What should we be targeting? **Tuberculosis**, v. 94, n.5, p. 455-461, 2014.

JANGPATARAPONGSA, K. Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection. **Microbes and Infection**, v. 8, p.680-686, 2006.

KAECH, S. M.; WHERRY, J.; AHMED, R. Effector and Memory T-Cell Differentiation: Implications for Vaccine Development. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 662-668, 2002.

KARAKOUSIS, P.C., BISHAI, W.R., DORMAN, S.E. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 105–116, 2004. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1462-5822.2003.00351.x/full#b6>>. Acesso em: jan. 2015.

KIRSCHNER, D.E.; YOUNG, D.; FLYNN, J.L. Tuberculosis: Global Approaches to a Global Disease. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 21, n. 4, p. 524–531, 2010. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2943033/>>. Acesso em: abr. 2015.

KOCH, R. Die Aetiologie der Tuberculose. **Berliner Klinischen Wochenschrift**, n.15, p. 221-230, abr. 1882. In *Milestones in Microbiology: 1556 to 1940*, traduzido e editado por Thomas D. Brock, ASM Press, p. 109-115,1998. Disponível em <<https://www.asm.org/images/Membership/archives/SignificantEvents/1882%20sig%20events%20pdf%20%20koch%20tb%20etiologia.pdf>>. Acesso em: abr. 2014.

KURSAR, M. *et al.* Cutting Edge: Regulatory T Cells Prevent Efficient Clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 2661-2665, 2007.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, p.326–332. 2005. Disponível em < www.sciencedirect.com>. Acesso em: set. 2014.

LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. **J Immunol.**, v.185; p. 15-22, 2010.

LIN, C-W. *et al.* Recombinant BCG coexpressing Ag85B, CFP10, and interleukin-12 induces multifunctional Th1 and memory T cells in mice. **APMIS**, v. 120; p. 72-82, 2012

LOPES, A. J. *et al.* Patogenia e Imunologia. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**, ano 5, p. 27-34, 2006. Disponível em < http://revista.hupe.uerj.br/audiencia_pdf.asp?aid2=230&nomeArquivo=v5n2a04.pdf >. Acesso em: out. 2013.

LOWRY, O.H., *et al.* Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p. 265-275,1951.

MARÍN, N. D. *et al.* Reduced Frequency of Memory T Cells and Increased Th17 Responses in Patients with Active Tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 10, p. 1667–1676, 2012.

MATUCCI, A.; MAGGI, E; VULTAGGIO A. Cellular and Humoral Immune Responses During Tuberculosis Infection: Useful Knowledge in the Era of Biological Agents. **J Rheumatol.**, v. 91, p.17-23, 2014. Disponível em < <http://www.jrheum.org/content/91/17>>. Acesso em: jul. 2014.

MELO, D. F. *et al.* Viabilidade das células mononucleares de sangue periférico humano em diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 25, n. 1, p. 69-74, 2003.

Miller, E. A.; Ernst, J. D. Anti-TNF immunotherapy and tuberculosis reactivation: another mechanism revealed. **J Clin Invest.**, v. 119, n. 5, p. 1079–1082, 2009.

MORANO, J.P. *et al.* Latent Tuberculosis Infection: Screening and Treatment in an Urban Setting. **J Community Health**, v. 38, p.941–950, 2013.

MOUTINHO, I. L. D. Tuberculosis: immunological aspects in the infection and in the disease. **Rev Med Minas Gerais**, v. 21, n.1, p. 42-48, 2011.

MUÑOZ, L.; SANTIN, M. Interferon-g release assays *versus* tuberculin skin test for targeting people for tuberculosis preventive treatment: An evidence-based review. **Journal of Infection**, v. 66, p. 381-387, 2013.

O’GARRA, A. *et al.* The Immune Response in Tuberculosis. **Annu. Rev. Immunol.**, v.31, p. 475–527, 2013.

- PETRUCCIOLI, E. *et al.* IFN γ /TNF α specific-cells and effector memory phenotype associate with active tuberculosis. **Journal of Infection**, v. 66, p. 475-486, 2013.
- POLLOCK, K. M. *et al.* T-Cell Immunophenotyping Distinguishes Active From Latent Tuberculosis **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, p. 952–968, 2013.
- PREZZEMOLO, T. *et al.* Functional signatures of human CD4 and CD8T cell responses to Mycobacterium tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 180, p. 1-13, 2014.
- RANGAKA, M. X. *et al.* Predictive value of interferon- γ release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v.12, p. 45-55, 2012.
- RUEDA, C. M. *et al.* Characterization of CD4 and CD8 T cells producing IFN- γ in human latent and active tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 90, p. 346-353, 2010.
- RUSSELL, D.G; BARRY, C. E , FLYNN, J.L. Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. **Science**, v.328, n. 5980, p. 852–856, 2010. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2872107/>>. Acesso em: mar. 2015.
- SALLUSTO, F. *et al.* Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, p. 708–712, 1999.
- SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. CENTRAL MEMORY AND EFFECTOR MEMORY T CELL SUBSETS: Function, Generation, and Maintenance. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p.745–763, 2004.
- SCHIÖTT, A. *et al.* CD27– CD4+ memory T cells define a differentiated memory population at both the functional and transcriptional levels. **Immunology**, v. 113, p. 363–370, 2004.
- SEDER, R. A., AHMED, R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. **Nature Immunology**, v. 4, n. 9, p. 835-842, 2003.
- SEDER, R. A.; DARRAH, P.A.; ROEDERER, M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 247-258, 2008.
- SILVA, B. D. S. **Participação das células Th1, Th17 e T reguladoras no desenvolvimento da tuberculose ativa**. 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil.
- SILVA, A. L. T. **Caracterização Fenotípica de Linfócitos T de Memória na Infecção por Plasmodium vivax**. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brasil.
- SIMEONE, R. *et al.* Phagosomal Rupture by Mycobacterium tuberculosis Results in Toxicity and Host Cell Death. **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 2, p.1-13, 2012.

TAILLEUX, L. *et al.* DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for Mycobacteria in patients with Tuberculosis. **Plos Medicine**. v. 2, p. 1269-1279. 2005.

TAPANINEN, P. *et al.* Effector memory T-cells dominate immune responses in tuberculosis treatment: antigen or bacteria persistence? **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 14, p.347-355, 2010.

TEBRUEGGE, M. *et al.* Inclusion of latent tuberculosis infection as a separate entity into the international classification of diseases. **Thorax**, v. 68, n. 6, p. 588, 2013.

TUBACH, F. *et al.* Risk of tuberculosis is higher with anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody therapy than with soluble tumor necrosis factor receptor therapy: The three-year prospective French Research Axed on Tolerance of Biotherapies registry. **Arthritis Rheum.**, v.60, n. 7, p. 1884-1894, 2009.

TUFARIELLO, J.M; CHAN, J.; FLYNN, J.L. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, n. 9, p. 578–590, 2003.

VOGELZANG, A. *et al.* Central memory CD4+ T cells are responsible for the recombinant Bacillus Calmette-Guérin Δ ureC::hly vaccine's superior protection against tuberculosis. **J Infect Dis.**, v. 210, n. 12, p.1928-1937, 2014.

WALLIS, R. S. *et al.* Tuberculosis biomarkers discovery: developments, needs, and challenges. **Lancet Infect Dis.**, v.13, p.362–72, 2013.

WHITWORTH, H. S. *et al.* IGRAs – The gateway to T cell based TB diagnosis. **Methods**, v. 61, p. 52–62, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global Tuberculosis Report 2013*. Geneva: World Health Organization, 2013. 306 p. Disponível em < http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf>. Acesso em: abr. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global Tuberculosis Report 2012*. Geneva: World Health Organization, 2012. 100 p. Disponível em < http://who.int/tb/publications/global_report/gtbr12_main.pdf>. Acesso em: out. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Health Observatory Data Repository. World Health Organization, Geneva. 2011. Disponível em < <http://apps.who.int/gho/data/node.main.1317?lang=en>>. Acesso em: out. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global Plan to Stop TB 2011–2015. Stop TB Partnership*. Geneva: World Health Organization, 2010. 101 p. Disponível em < <http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/TBGlobalPlanToStopTB2011-2015.pdf>> Acesso em: out. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global Tuberculosis Report 2014*. Geneva: World Health Organization, 2014. 170 p. Disponível em < <http://apps.who>

int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: jan. 2015.

YOSHIDA, Y. O. *et al.* Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung. **The Journal of Immunology**, v. 184, p. 4414–4422, 2010.

YUK, J. M.; JO, E. K. Host immune responses to mycobacterial antigens and their implications for the development of a vaccine to control tuberculosis. **Clin Exp Vaccine Res.**, v.3, p. 155-167, 2014.

ZIKHERMAN, J.; WEISS, A. Alternative Splicing of CD45: The Tip of the Iceberg. **Immunity**, v. 29, n. 6, p. 839-841, 2008.

ZIMMERMAN, M. R. Pulmonary And Osseous Tuberculosis in an Egyptian Mummy. **Bull. N.Y. Acad. Med.**, v. 55, n. 6, p. 604-608, 1979.

ZINK, A. *et al.* Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 355-366, 2001.

APÊNDICE A – Preparo de solução estoque de lise de hemácias (10x)

Reagentes

a. citrato de sódio diidratado	2,5 g
b. formaldeído PA	54 mL
c. dietilenoglicol PA	30 mL
d. heparina comercial (5000 UI/mL)	800 µL
e. Água destilada	qsp
	100 mL

Procedimentos

1. Em um béquer de 100 mL, dissolver 2,5g de citrato de sódio diidratado em 7 mL de água destilada, utilizando agitador magnético;
2. Adicionar 54 mL de formaldeído PA por gotejamento e sob agitação;
3. Adicionar 30 mL de dietilenoglicol por gotejamento e sob agitação;
4. Ajustar o pH em 7,85
5. Completar o volume com água destilada para 100 mL
6. Filtrar em 0,45 µm e armazenar em frasco plástico leitoso à temperatura ambiente

Preparo de solução de lise de trabalho

Diluir a solução estoque de lise (10x) na proporção 1:10 com água destilada, imediatamente antes de seu uso.

APÊNDICE B – Preparo de meio nutriente de cultivo de células, pH 7,2**Reagentes – para preparo de 1L de solução**

RPMI 1640	10,38g
NaHCO ₃	2,0g
HEPES	2,4g
Penicilina/Estreptomicina	5 mL (estoque 10 mil UI e 10 mg/mL)
Água deionizada estéril	qsp 1000 mL

Procedimento:

1. Dissolver os reagentes sólidos em 900 mL de água deionizada estéril;
2. Adicionar o volume de antibiótico indicado;
3. Ajustar o pH da solução para 7,2;
4. Completar o volume da solução para 1,0L com água deionizada estéril em proveta;
5. Esterilizar o meio nutriente por filtração, utilizando bomba de vácuo;
6. Fracionar a solução filtrada em frascos estéreis com tampa de vedação, com capacidade de 500 mL, dentro da capela de fluxo laminar;
7. Fracionar o conteúdo de cada frasco em eppendorfs de 15 mL, para realização de prova de esterilidade (incubação dos eppendorfs em estufa com 5% de CO₂, por 24h, avaliação da esterilidade do meio de cultivo pela confirmação de ausência de crescimento microbiano);
8. Armazenar os frascos a 2-8°C.

APÊNDICE C – Preparo de solução fixadora MACS FACS FIX (MFF)**Reagentes**

Paraformaldeído P.A	40g
Hidróxido de sódio P.A.	0,106g
Cacodilato de sódio PA	40,04g
Cloreto de sódio	26,6g
Água destilada	qsp
	400 mL

Procedimentos

1. Preparo de solução de Paraformaldeído (20x): realizar etapas na capela de exaustão
 - a. Pesar 40g de paraformaldeído PA para estoque
 - b. Aquecer 150mL de água destilada em béquer com agitador
 - c. Acrescentar 0,106g de hidróxido de sódio PA
 - d. Esperar dissolver e continuar aquecendo até no máximo 70°C
 - e. Acrescentar o paraformaldeído PA aos poucos para não precipitar
 - f. Homogeneizar até a solução ficar completamente transparente
 - g. Completar o volume da solução para 200 mL com água destilada
 - h. Fazer alíquotas de 2,5 mL da solução e estocar a -20°C por até 6 meses.

2. Preparo de solução de Cacodilato de Sódio (20X) para estoque
 - a. Pesar 40,04g de cacodilato de sódio PA
 - b. Pesar 26,6g de cloreto de sódio PA
 - c. Em um béquer, adicionar 150mL de água destilada e o cloreto de sódio, homogeneizando com um bastão de vidro ou barra magnética até completa dissolução
 - d. Acrescentar o cacodilato de sódio PA pesado aos poucos e homogeneizar utilizando um bastão de vidro ou barra magnética até completa dissolução
 - e. Completar o volume para 200mL com água destilada e
 - f. Fazer alíquotas de 2,5 mL e estocar a -20°C por até 6 meses

/continua.

APÊNDICE C (conclusão)

3. Preparo de solução fixadora de trabalho
 - a. Aquecer a solução de paraformaldeído 20x em banho-maria a 56°C até completa solubilização (ficar transparente).
 - b. Descongelar a solução de cacodilato de sódio 20x à temperatura ambiente.
 - c. Misturar as soluções de paraformaldeído 20x e cacodilato 20x, usando alíquotas de mesmo volume e completar para 10 vezes o volume final obtido com água destilada.
 - d. Acertar o pH para 7,2 -7,4.
 - e. Filtrar e armazenar em frasco âmbar em geladeira (2°C-8°C) por até 7 dias.

APÊNDICE D – Preparo de solução PBS pH 7,4**Reagentes** para 1 litro de PBS (10 X)

NaCl		84,15 g
Na ₂ HPO ₄ . H ₂ O		5,37g
KH ₂ PO ₄		14,69g
Água destilada	qsp	1000mL

Procedimentos

1. Preparo de solução estoque de PBS (10x):
 - a. Adicionar 500 mL de água destilada em um béquer e acrescentar os sais lentamente,
 - b. Homogeneizar com auxílio de agitador magnético até completa solubilização.
 - c. Acertar o pH em 7,4
 - d. Transferir o volume total para uma proveta de 1000 mL e completar o volume com água destilada.

2. Preparo de solução de trabalho de PBS (1x)
 - a. Diluir a solução de PBS (10 X) na proporção 1:10 com água destilada, de acordo com o volume desejado.
 - b. Filtrar e estocar em temperatura de 2 a 8°C

APÊNDICE E – Preparo de solução de PBS-Wash

O PBS-Wash é o PBS suplementado com 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica.

Reagentes

BSA		0,5g
Azida sódica		0,1 g
PBS 1x filtrado	qsp	100 mL

Procedimentos

1. Adicionar BSA e azida sódica a 75 mL de PBS 1x, lentamente e sob agitação constante, cuidando para haver formação de espuma
2. Acertar o pH para 7,4;
3. Acertar o volume para 100 mL com PBS 1x em proveta;
4. Filtrar em membrana de 0,45 µm;
5. Acondicionar a solução em frasco plástico transparente;
6. Conservar em temperatura de 2-8°C (geladeira).

APÊNDICE F – Preparo de solução de PBS-Perm

O PBS-Perm é o PBS-Wash suplementado com 0,5% de saponina.

Reagentes

Saponina		0,5g
PBS-Wash	qsp	100 mL

Procedimentos

1. Em um béquer, adicionar a saponina a 75 mL de PBS-Wash, lentamente, sob agitação constante, cuidando para não haver formação de espuma;
2. Acertar o pH para 7,4;
3. Acertar o volume da solução para 100 mL com PBS-Wash em proveta;
4. Filtrar a solução em membrana de 0,45 µm;
5. Acondicionar a solução em frasco plástico transparente;
6. Conservar em temperatura de 2-8°C (geladeira).

ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 13864313.3.0000.5149

Interessado(a): Profa. Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães
Departamento de Análises Clínicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 27 de agosto de 2013, o projeto de pesquisa intitulado **"Tuberculose humana: avaliação de novos biomarcadores com potencial uso em diagnóstico e prognóstico da doença"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido – Indivíduos saudáveis**TCLE: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Indivíduos saudáveis)**

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA O ESTUDO “Tuberculose humana: Validação de novos biomarcadores com potencial uso em diagnóstico e prognóstico da doença”.

Nome do Participante: _____

Número no Projeto: _____

Investigador Principal: Professora TÂNIA MARA PINTO DABÉS GUIMARÃES, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Faculdade de Farmácia/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, Telefone 0xx-31-3409-6875.

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP – Av. Antônio Carlos 6627 – Cidade Administrativa II – 2º andar – Sala 2005 – Campus da Pampulha – Belo Horizonte, MG, Brasil - telefone: 0xx-31-3409-4592.

DESCRIÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Convite e objetivo: Você está sendo convidado a participar de um estudo que tem como objetivo analisar e comparar a resposta imune utilizando células mononucleares do sangue periférico de pacientes com TB ativa (alterações em células do seu sangue) e indivíduos reatores ou não ao teste tuberculínico (esse teste que será feito no seu antebraço) para identificação de biomarcadores (substâncias) que possam diferenciar se uma pessoa pode estar com ou sem a tuberculose.

Após ser-lhe explicado o que contém neste questionário, você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado a assinar este termo de consentimento. Aproximadamente 30 pessoas participarão deste estudo.

Participação voluntária: Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar

/continua.

ANEXO B (continuação)

ou desistir de participar do estudo, não afetará de modo algum, qualquer cuidado ou tratamento que você pode estar recebendo no Ambulatório de Tuberculose - Ambulatório Bias Forte do Hospital das Clínicas – UFMG.

Finalidade do estudo: Saber se essas células e substâncias do seu sangue podem diferenciar se a pessoa está ou não com tuberculose e se o bacilo pode ser sensível ou resistente aos medicamentos que são usados no tratamento da tuberculose

Procedimentos: Vamos coletar o seu sangue, um volume de 20 ml (equivalente a um pouco mais que 1 colher de sopa). A sua participação no estudo não requer visitas adicionais à clínica. Seu sangue e seu escarro serão guardados em um banco de amostras para este estudo ou outros que se fizerem necessários e nós só utilizaremos caso você consinta. Você será avaliado por um médico da pesquisa que, com exames clínicos e complementares, se necessário, irá descartar se você está ou não com tuberculose, caso seu teste tuberculínico seja positivo.

Riscos/Desconfortos: A punção venosa para coleta de sangue causa leve dor local. Poderá haver formação de hematoma (derrame de sangue sob a pele) e edemas (ligeira inchaço do tecido sob a pele) locais e discreto sangramento.

Benefícios: Não há nenhum benefício direto para a sua participação. Porém, esperamos que este estudo ajude-nos a desenvolver outros tipos de testes que possam diferenciar a TB doença, permitindo assim, a identificação de indivíduos portadores do bacilo, que poderão ser monitorados para o controle da doença. Este estudo ainda irá proporcionar a detecção precoce de bacilos resistentes aos fármacos e, conseqüentemente, um melhor controle da transmissão de bacilos resistentes a indivíduos susceptíveis.

Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade: O melhor conhecimento sobre a tuberculose poderá contribuir para seu controle.

Custos: Você terá os custos do transporte para comparecer ao Ambulatório Bias Fortes na Av. Alfredo Balena, 190, quinto andar, onde será avaliado. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Confidencialidade: Toda informação obtida sobre você será mantida em poder do

ANEXO B (continuação)

pesquisador principal. Dados de identificação pessoal serão removidos dos questionários e guardados em arquivos separados. Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial, sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe médica. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados, meios que possam identificar os participantes.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode esclarecer com o investigador responsável por este estudo Professora TÂNIA MARA PINTO DABÉS GUIMARÃES, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Faculdade de Farmácia/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, Telefone 0xx-31-3409-6875 (0xx31-9701-2599) ou Professora Silvana Spíndola de Miranda, tel.: 0xx-31-8821-7283.

Procedimentos alternativos: Considerando que o vírus que causa a AIDS prejudica seu sistema imunológico e, dessa forma, a infecção por ele inviabiliza o presente estudo, é importante a realização do teste anti-HIV, que será feita apenas pela metodologia imunocromatográfica, como subsídio para sua inclusão ou não no projeto, nos casos em que o mesmo ainda não tiver sido realizado no âmbito ambulatorial. Assim, esses exames sorológicos serão realizados no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Esses testes somente serão realizados mediante sua autorização prévia assinalada abaixo:

- () AUTORIZO e permito que este teste seja realizado, desde que respeitados meus direitos à privacidade e sigilo das informações;
- () NÃO AUTORIZO que este teste seja realizado.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue. Favor assinalar uma das opções abaixo para indicar se deseja ou não ter as suas amostras de sangue, escarro ou outro material clínico armazenado para estudos futuros aprovados sobre tuberculose.

- () ACEITO que amostras clínica (sangue, escarro ou outros) sejam armazenadas, para estudos futuros aprovados sobre tuberculose.

ANEXO B (conclusão)

() NÃO ACEITO que amostras de meu sangue sejam armazenadas, para estudos futuros aprovados sobre tuberculose.

Se você concorda participar do estudo assine seu nome na linha abaixo.

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

Data: ____/____/____

(2 vias)

ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido – Pacientes curados**TCLE: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Pacientes curados de TB)**

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA O ESTUDO “Tuberculose humana: Validação de novos biomarcadores com potencial uso em diagnóstico e prognóstico da doença”.

Nome do Participante: _____

Número no Projeto: _____

Investigador Principal: Professora TÂNIA MARA PINTO DABÉS GUIMARÃES, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Faculdade de Farmácia/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, Telefone 0xx-31-3409-6875.

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP – Av. Antônio Carlos 6627 – Cidade Administrativa II – 2º andar – Sala 2005 – Campus da Pampulha – Belo Horizonte, MG, Brasil - telefone: 0xx-31-3409-4592.

DESCRIÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Convite e objetivo: Você está sendo convidado a participar de um estudo que tem como objetivo analisar e comparar a resposta imune utilizando células mononucleares do sangue periférico de pacientes curados de TB, portadores de TB ativa (alterações em células do seu sangue) e indivíduos reatores ou não ao teste tuberculínico (esse teste que será feito no seu antebraço) para identificação de biomarcadores (substâncias) que possam diferenciar se uma pessoa pode estar com ou sem a tuberculose. Após ser-lhe explicado o que contém neste questionário, você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado a assinar este termo de consentimento. Aproximadamente 30 pessoas participarão deste estudo.

Participação voluntária: Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar ou desistir de participar do estudo, não afetará de modo algum, qualquer cuidado ou tratamento que você pode estar recebendo no Ambulatório de Tuberculose – Ambulatório

/continua.

ANEXO C (continuação)

Bias Fortes do Hospital das Clínicas – UFMG.

Finalidade do estudo: Saber se essas células e substâncias do seu sangue podem diferenciar se a pessoa está ou não com tuberculose e se o bacilo pode ser sensível ou resistente aos medicamentos que são usados no tratamento da tuberculose.

Procedimentos: Vamos coletar o seu sangue, um volume de 20 mL (equivale a um pouco mais que 1 colher de sopa), para acompanhamento da evolução da doença antes de se iniciar o tratamento. Você será tratado até que seja considerado curado da tuberculose. A sua participação no estudo não requer visitas adicionais à clínica. Seu sangue e seu escarro serão guardados em um banco de amostras para este estudo ou outros que se fizerem necessários e nós só utilizaremos caso você consinta.

Riscos/Desconfortos: A punção venosa para coleta de sangue causa leve dor local. Poderá haver formação de hematoma (derrame de sangue sob a pele) e edemas (ligeira inchaço do tecido sob a pele) locais e discreto sangramento.

Benefícios: Não há nenhum benefício direto para a sua participação. Porém, esperamos que este estudo ajude-nos a desenvolver outros tipos de testes que possam diferenciar a TB doença, permitindo assim, a identificação de indivíduos portadores do bacilo, que poderão ser monitorados para o controle da doença. Este estudo ainda irá proporcionar a detecção precoce de bacilos resistentes aos fármacos e, conseqüentemente, um melhor controle da transmissão de bacilos resistentes a indivíduos susceptíveis.

Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade: O melhor conhecimento sobre a tuberculose poderá contribuir para seu controle.

Custos: Você não terá custos com a participação no estudo, pois o tratamento para tuberculose é fornecido gratuitamente. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Confidencialidade: Toda informação obtida sobre você será mantida em poder do pesquisador principal. Dados de identificação pessoal serão removidos dos questionários e guardados em arquivos separados. Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial, sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe médica. Embora

ANEXO C (conclusão)

os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados, meios que possam identificar os participantes.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode esclarecer com o investigador responsável por este estudo Professora TÂNIA MARA PINTO DABÉS GUIMARÃES, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Faculdade de Farmácia/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, Telefone 0xx-31-3409-6875 (0xx31-9701-2599) ou Professora Silvana Spíndola de Miranda, tel.: 0xx-31-8821-7283.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue. Favor assinalar uma das opções abaixo para indicar se deseja ou não ter as suas amostras de sangue, escarro ou outro material clínico armazenado para estudos futuros aprovados sobre tuberculose.

() ACEITO que amostras clínica (sangue, escarro ou outros) sejam armazenadas, para estudos futuros aprovados sobre tuberculose.

() NÃO ACEITO que amostras de meu sangue sejam armazenadas, para estudos futuros aprovados sobre tuberculose.

Se você concorda participar do estudo assine seu nome na linha abaixo.

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

Data: ____/____/____

(2 vias)

ANEXO D (conclusão)

38. Doença de autoimunidade: Não Sim

CLÍNICA

39. Início dos sintomas: _____

40. Tosse: Não Sim

41. Expectoração: Não Sim

42. Hemoptise/hemoptoicos: Não Sim

43. Dispneia: Não Sim

44. Dor torácica: Não Sim

45. Cianose: Não Sim

46. Chieira: Não Sim

47. Febre: Não Sim

48. Adinamia: Não Sim

49. Anorexia: Não Sim

50. Sudorese noturna: Não Sim

51. Emagrecimento: Não Sim Peso: _____ Kg

EXAMES LABORATORIAS

52. RX de tórax inicial: _____

- Acometimento pulmonar (zonas): Superior Médio Inferior

- Formas: Até 2 zonas forma leve (L) De 2 a 4 zonas forma moderada (M)

De 5 ou mais zonas forma extensa (E)

53. TC tórax: _____

54. 1º PPD: Pos Neg 2º PPD: Pos Neg 3º PPD: Pos Neg

55. Baciloscopia: Neg Pos:

56. Cultura: Neg Pos

HISTOPATOLÓGICO: _____

TI: _____

TS: _____

Testes imunológicos: _____

Testes moleculares: _____