



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

LORENZZO LYRIO STRINGARI

Influência de células T reguladoras na atividade microbida de pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos saudáveis com teste tuberculínico positivo e negativo frente ao desafio com cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e multidroga-resistentes.

Vitória
2012

LORENZZO LYRIO STRINGARI

Influência de células T reguladoras na atividade microbicida de pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos saudáveis com teste Tuberculínico positivo e negativo frente ao desafio com cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e multidroga-resistentes.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Reynaldo Dietze

Vitória
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

S918i Stringari, Lorenzo Lyrio, 1985-
Influência de células T reguladoras na atividade microbicida de pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos saudáveis com teste tuberculínico positivo e negativo frente ao desafio com cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e multidroga-resistentes / Lorenzo Lyrio Stringari. – 2012.
109 f. : il.

Orientador: Rodrigo Ribeiro-Rodrigues.
Coorientador: Reynaldo Dietze.
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Tuberculose. 3. Imunidade celular. 4. Citocinas. 5. Teste tuberculínico. I. Rodrigues, Rodrigo Ribeiro. II. Dietze, Reynaldo. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O mestrando LORENZZO LYRIO STRINGARI apresentou a dissertação intitulada **“Influência de Células T reguladoras na Atividade Microbiciada em Pacientes com Tuberculose Pulmonar e Indivíduos Saudáveis com Teste Tuberculínico Positivo e Negativo frente ao desafio com Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* Sensíveis e Multidroga-Resistentes”** em sessão pública, no dia 27 de agosto de 2012, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar o farmacêutico LORENZZO LYRIO STRINGARI a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 27 de agosto de 2012.

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães
(Membro Externo)

Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes
(Membro Interno)

Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues
(Orientador)

Prof. Dr. Reynaldo Dietze
(Co-orientador)

*Dedico esta monografia a Vitório Stringari e
Eveny Bernardes Sad Lyrio, avós que partiram
há algum tempo, mas nunca estiveram longe
de mim. Durante sua passagem em minha vida
me ensinaram que o conhecimento é o maior
bem e que devemos batalhar para adquiri-lo.*

Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTO(S)

A Deus, que se mostrou criador e que foi criativo. Seu fôlego de vida em mim é meu sustento, me dando coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

De forma mais que especial agradeço a minha família: meu Pai e minha Mãe, Vitor e Wayna, minha irmã Lorayna e meu cunhado Everson. Obrigado pelo amor incondicional, pelos ensinamentos, pela dedicação ao meu crescimento, pelas palavras amigáveis e pelo carinho dedicado a minha vida.

Ao meu amor, Adriana Tonani de Mattos pelos dias abdicados pelos experimentos e pela compreensão do incompreendido.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues, não há palavras de gratidão suficientes. Desde o projeto de pesquisa até à revisão final do texto desta dissertação, em todas as etapas foi marcante sua influência. Indiscutíveis sua diversidade de conhecimentos e ciência. Pela oportunidade, exemplo, aprendizado, incentivo e confiança.

Ao meu coorientador e coordenador do Núcleo de Doenças Infecciosas, Dr. Reynaldo Dietze, pelo aprendizado, incentivo e apoio.

Ao Dr. David Jamil Hadad e as enfermeiras do Centro de Pesquisa Clínica pela triagem e avaliação dos pacientes deste estudo.

A todos os pacientes que de forma voluntária e humilde permitiram que este estudo fosse realizado mesmo diante deste momento difícil em suas vidas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, pela clareza de ideias, pelo tempo, dedicação e conhecimentos oferecidos que desperta-nos para o crescimento intelectual e humano.

As secretárias do Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas, pela amizade e auxílio nas questões administrativas.

A todos os integrantes do Laboratório de Microbacteriologia em especial a Solange Alves Vinhas, Tatiana de Resende C6 Pelição, Ledüç Majeski e Moises Palaci que me ajudaram com treinamentos, ensinamentos sobre algo até então desconhecido para mim.

A todos do laboratório de Imunologia Molecular e Celular que me acolheram desde o meu ingresso na equipe até os dias de hoje, por isso muito obrigado Carla Barone Cunha, Valéria Pereira Cabral e Janete Costa Porto.

De forma especial a Flávia Dias Coelho, Maria Carolina Faiçal Campana e Luciana Polaco Covre pelo auxílio durante meus experimentos. Aos alunos de iniciação científica Iago Ornelas, Marcelle Mosquine e em especial Priscilla Martins.

A funcionária Lau, que se desdobrou para que meus materiais sempre estivessem limpos e em perfeito estado garantindo assim a qualidade dos experimentos.

Aos amigos do Núcleo de Doenças Infecciosas, pelas palavras amigas, conselhos e críticas que ajudaram no meu crescimento e aprendizagem.

A Banca Examinadora pelas novas ideias e sugestões apresentadas durante a defesa. Obrigado! Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes e Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães.

Ao Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira e Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães, por me receberem no Laboratório de Morfologia, permitindo assim o aumento da resolução das fotografias apresentadas. Obrigado pela contribuição que me foi dada.

Aos meus amigos do mestrado, pelos momentos de convivência inesquecíveis, onde aprendi muito.

Aos meus amigos de longa data Alexandre Zon, Alexandre Constantino de Santana, Diego Felisberto Brotas, Guilherme Mill, Lucas Barbosa Almeida, Lucas Cunha Resende, Rodolfo Bissoli, Rodolfo Giacomim, Ronaldo Bragança, Thiago Figueiredo, agradeço pelos momentos de descontração, força e amizade.

Aqueles que durante os anos da faculdade sempre me apoiaram e mesmo com esta distância de outra época continuam sempre a me apoiar, obrigado Laila Marques, Renata Martins Cardoso; em especial a Camila Giuberti de Souza, Ronaldo Bragança Martins Jr. e Aline Lyra os quais tive o prazer de conviver durante o mestrado.

A Fundação de Apoio a Pesquisa do Espírito Santo, pela bolsa concedida durante o mestrado.

Aos guias e mentores espirituais pela proteção recebida durante a minha caminhada.

“A experiência é uma escola onde são caras as lições,
mas em nenhuma outra os tolos podem aprender.”

Benjamin Franklin

Influência de células T reguladoras na atividade microbicida de pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos saudáveis com teste tuberculínico positivo e negativo frente ao desafio com cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e multidroga-resistentes

RESUMO

Indivíduos pré-sensibilizados (PPD+) desenvolvem uma forma latente de TB que pode ser reativada. No presente estudo, demonstramos que indivíduos PPD reativos e pacientes com TB apresentam uma menor atividade microbicida *in vitro* contra o *Mycobacterium tuberculosis* quando comparados com indivíduos não reativos ao teste de PPD (PPD-) em amostras de sangue total e CMSP. Neste estudo, foram arrolados 13 indivíduos PPD-, 13 indivíduos PPD+ e 11 pacientes com TB pulmonar. Para os experimentos de infecção, nós usamos dois isolados susceptíveis (2220-S1 e 0885-S5), dois isolados multidroga-resistentes (0530-R3 e 0669-R6) e uma cepa padrão (H37-Rv). Comparando o aumento da frequência das células T reguladoras com a atividade microbicida; mostramos que as Tregs podem modular de forma negativa a função da resposta microbicida, pois ao depletarmos as Tregs a função microbicida era reestabelecida nos grupos PPD+ e TB. O aumento da produção de TGF- β e IL-10 pelo grupo PPD+ sugere o envolvimento das células Tregs. Por outro lado, pacientes com TB apresentaram aumento nos níveis de produção de IFN- γ e IL-23, sugerindo o envolvimento da resposta via Th17. Nossos resultados corroboram a hipótese de que uma pré-exposição ao MTB seguida por sensibilização contra o patógeno, pode desencadear uma maior propensão para o desenvolvimento da latência/doença.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculose, *Purified Protein Derivative*, PPD, Células T reguladoras, Citocinas.

Influence of regulatory T cells in the microbicidal activity of patients with pulmonary tuberculosis and healthy subjects with positive and negative tuberculin test upon challenge with *Mycobacterium tuberculosis* strains sensitive and multidrug-resistant

ABSTRACT

Pre-sensitized/Tb exposed subjects may develop latent TB, which can be reactivated. Here we demonstrate that Purified Protein Derivative (PPD) skin test reactive individuals and TB patients show decreased in vitro microbicidal activity against *Mycobacterium tuberculosis* when compared to PPD negative individual (PPD-) using whole blood or CMSP samples. For the present study, we enrolled 13 PPD+, 13 PPD- individuals and 11 TB pulmonary. For microbicidal and infection experiments, we used two clinical susceptible isolates (2220-S1 and 0885-S5), two multidrug-resistant isolates (0530-R3 and 0669-R6) and H37-Rv strain as standard. Comparing increased frequency of regulatory T cells with microbicidal activity; we showed that Tregs could negatively modulate the microbicidal response function, since the Tregs depletion re-established this ability on both PPD+ and TB groups. TGF- β e IL-10 production were elevated among PPD+ individuals, suggesting that it may be related to Tregs cells participation. TB patient showed increased levels of IFN- γ e IL-23 production, suggesting an involvement of Th17 response. Our results suggest that pre-exposure followed by pathogen challenge may increase the chance for the latency/disease development.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, Purified Protein Derivative, PPD, Regulatory T cells, Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa das regiões endêmicas onde a TB é presente. (WHO, 2011)	25
Figura 2- Microscopia eletrônica do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e aparência das colônias do Mtb (Centers Disease Control and Prevention).	28
Figura 3- Estrutura do SL-1 (A) (MOUGOUS <i>et al.</i> , 2002).	29
Figura 4- Representação esquemática dos principais componentes da parede celular e de suas distribuições. (KLEINNIJENHUIS <i>et al.</i> , 2011).	30
Figura 5- Transmissão da tuberculose por meio da disseminação de partículas núcleos de Wells (Centers Disease Control and Prevention, 2010).	31
Figura 6- Reconhecimento de patógenos via PRR e/ou TLR. (MEDZHITOV, 2001).	33
Figura 7- O dímero ESAT-6 e CFP-10, secretado pelo Mtb. (ERNST, J. D. <i>et al.</i> , 2007).	35
Figura 8- Esquema da transdução de sinal via TLR4 e RAGE. (SAKAGUCHI, M. <i>et al.</i> , 2011).	38
Figura 9- Mecanismos de supressão via Treg. (modificada de VIGNALI, D. A. A. <i>et al.</i> , 2008).	42
Figura 10- Diluição da suspensão bacteriana para o controle da concentração do inóculo para a infecção.	51
Figura 11- Esquema de plaqueamento das cepas após a diluição.	52
Figura 12- Disposição das amostras quanto a cepa/isolado clínico utilizado para.	54
Figura 13- Disposição das populações de acordo com a granulosidade (SCC) e tamanho (FSC)	57
Figura 14- Representação do controle isotípico ideal, baixa presença de ligações inespecíficas.	58
Figura 15- Separação das Tregs	58
Figura 16- Reação do Griess.	65
Figura 17- Análise quantitativa do número de unidades formadoras de colônias (UFC) a partir de ensaios WBKA em amostras de sangue total de indivíduos PPD- (n=10), PPD+ (n=10) e pacientes com TB (n=11). Resultados de cada um dos grupos refletem as UFCs encontradas, após 72hs de incubação, para as diferentes cepas e isolados utilizadas em cada um dos grupos analisados	71
Figura 18- Análise quantitativa do número de unidades formadoras de colônias a partir de ensaios WBKA em amostras de sangue total de indivíduos PPD-, PPD+ e pacientes com TB individualizado por cepa/isolado. Resultados de cada um	

- dos grupos refletem as UFCs encontradas por tempo de incubação e cepa/isolado utilizado. 72
- Figura 19- Análise quantitativa do número de unidades formadoras de colônias estratificadas por cepas/isolados e tempo de exposição durante ensaios de WBKA nos grupos PPD-, PPD+ e TB. 73
- Figura 20- Ensaio de fagocitose in vitro utilizando amostras de indivíduos PPD- e PPD+ após incubação por 4 ou 24 horas com a cepa H37Rv ou com o isolado R6. Dados representados refletem o número total de células contendo em seu interior bacilos álcool-ácido. 74
- Figura 21- Imagens relacionadas ao ensaio fagocitário de indivíduos PPD- e PPD+. Poço controle no aumento de 100x. 75
- Figura 22- Ensaio de fagocitose, no tempo de 4 horas. A figura acima apresenta os aumentos de 40x e 100x. (A) Indivíduo PPD+ comparado com (B) indivíduo PPD- infectados com a cepa H37-Rv. 75
- Figura 23- Ensaio de fagocitose, no tempo de 4 horas. A figura acima apresenta os aumentos de 40x e 100x. (C) Indivíduo PPD+ comparado com (D) indivíduo PPD- infectados com o isolado clínico 669-R6. 76
- Figura 24- Ensaio de fagocitose, no tempo de 24 horas. A figura acima apresenta os aumentos de 40x e 100x. (E) Indivíduo PPD+ comparado com (F) indivíduo PPD- infectados com a cepa H37-Rv. 76
- Figura 25- Ensaio de fagocitose, no tempo de 4 horas. A figura acima apresenta os aumentos de 40x e 100x. (G) Indivíduo PPD+ comparado com (H) indivíduo PPD- infectados com o isolado clínico 669-R6. 77
- Figura 26- Análise quantitativa da produção de radicais de óxido nítrico em sobrenadantes de cultura de sangue total de indivíduos PPD- e PPD+ e pacientes com TB incubadas com os isolados S5 e R3 por 24 horas. 78
- Figura 27- Análise dos resultados obtidos pela ensaio imunoenzimático. Pacientes com PPD+ apresentam concentrações elevadas de IL-10 e TGF- β , indicando resposta moduladora além de apresentar níveis altos de IFN- γ (resposta inflamatória). Pacientes com TB apresentam uma tendência a respostas hiper-inflamatórias via Th17, apresentado altas concentrações de IFN- γ e de IL-23. 79
- Figura 28- Análise fenotípica por citometria de fluxo da frequência de células T reguladoras em amostras de cultura de sangue total dos grupos PPD-, PPD+ e TB incubadas por 24 ou 72 horas com a cepa H37Rv e aos isolados S1, S5, R3, e R6. 81
- Figura 29- Frequência de células T reguladoras em amostras de sangue total incubadas por 72 horas com as diferentes cepas/isolados nos grupos PPD-, PPD+ e TB. 82
- Figura 30- Comparação da atividade microbicida em amostras de sangue total e CMSP dos grupos PPD-, PPD+ e TB, incubadas por 4 ou 72hs com as diferentes cepas/isolados. 84

- Figura 31- Análise da amostra pós-depleção, apresentação de baixa população CD25^{low} e CD25^{high} 85
- Figura 32- Análise fenotípica por citometria de fluxo da frequência de células Tregs (CD4⁺CD25⁺) pré e pós-depleção. 85
- Figura 33- Atividade microbicida em culturas de CMSP de indivíduos PPD- e PPD+ e pacientes com TB na presença ou não de células Tregs frente às diferentes cepas/isolados, após 72h de incubação. 86
- Figura 34- Atividade microbicida em culturas de CMSP na presença ou não de células Tregs nos grupos PPD-, PPD+ e TB 4 e 72hs pós-incubação com as diferentes cepas/isolados. 87
- Figura 35- Atividade microbicida em culturas de CMSP de indivíduos PPD- e PPD+ e pacientes com TB na presença (T) ou não de células Tregs (ST) frente às diferentes cepas/isolados. 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.	55
Tabela 2- Informação sobre a procedência, subtipo e perfil de resistência a drogas anti-tuberculose dos isolado de <i>M. tuberculosis</i>	69
Tabela 3- Descrição das amostras utilizadas no estudo.	70

LISTA DE SIGLAS

AbD - Anticorpo de detecção

AC - Anticorpo de captura

AD - *Assay Diluent*

AhpC - Alquil hidroperóxido redutase subunidade C

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

AM - Ácido micólico

APC - Células apresentadoras de antígenos

BAAR - Bactérias Álcool-Ácido Resistentes

BCG - Bacilo *Calmette Guérin*

cAMP - Adenosina monofosfato cíclica

CCI - Controle de crescimento interno

CD - *Cluster of differentiation*

CFP-10 - *10kDa Culture Filtrate Protein encode ESX-B*

CLEC - *C-type lectin*

CTLA-4 - *Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4*

DC - Células dendríticas

EBM- Etambutol (E).

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ERK - *Extracellular-signal-regulated kinases*

ESAT-6 - *6kDa Early Secreted Antigenic Target encode ESX-A*

FASII - *Fatty Acid Synthase II*

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FOXP3 - *Forkhead transcription factor 3*

FSC - *Foward Scatter*

GATA-3 - *Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3*

HIV - *Human immunodeficiency virus*

HRP - Enzima Avidina-Horseradish peroxidase

i Treg – Células T reguladoras induzidas

IDO - *Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*

IFN - *Interferon*

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

INH - Isoniazida (H),

IRAK-4 - *IL-1R-Associated Kinase-4*

IκB - *Inhibitor of Kappa B*

LAG3 - *Lymphocyte-activation gene-3*

LM – Lipomanana

LTBI - Infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*

ManLAM - Lipoarabinomanana encapsulada com manose

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*

MS - Ministério da Saúde

Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*

MyD88 - *Myeloid differentiation primary response gene (88)*

MΦ - Macrófagos

NF-κB - *Factor Nuclear Kappa B*

NK – Células *Natural Killers*

NO - Óxido nítrico

NOD – (*Nucleotide binding oligomerization-domain*)-like receptors (NLRs)

nTreg – Células T reguladoras naturais

DO - Densidade ótica

PAMPs - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

CMSP - *Fluorescein isothiocyanate*

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PE - *Phycoerythrin*

PE-Cy5 - *Phycoerythrin and a cyanine dye*

PGE2 - Prostaglandina E2 (PGE2)

PKA - Proteína quinase A

PPD - *Purified Protein Derivative*

PRRs - *Pathogens Recognition Receptors*

PZA - Pirazinamida (Z)

RMP - Rifamicina (R)

RNI - Reativos intermediários do nitrogênio

SL-1 - Sulfatídio-1 (SL-1)

SSC - *Side Scatter*

STAT-4 - *Signal transducer and activator of transcription-4*

STAT-6 - *Signal transducer and activator of transcription-6*

SVS - Secretária de Vigilância em Saúde

TB – Tuberculose

TBEP – Tuberculose extrapulmonar

T-bet - *T-box transcription factor*

TDM - *6-6'-dimicotil-treolase*

TGF - *Transforming growth factor*

Th – Célula T *helper*

TIRAP - *Toll-interleukin 1 Receptor (TIR) Domain Containing Adaptor Protein*

TLR - *Toll-like receptor*

TMB - Tetrametilbenzidina

TNF - *Tumor Necrosis Factor*

TR1 – Células T reguladoras do tipo 1

TRAF6 - *TNFR-Associated Fator-6*

TRAM - *TRIF-related adaptor molecule*

Treg – Células T reguladoras

trHbs - *Group I truncated hemoglobin*

TRIF - *TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β*

TS - *Top Standards*

WBKA - *Whole Blood Killing Assay*

WHO/OMS - Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.1	A Tuberculose	23
1.2	Epidemiologia da Tuberculose	24
1.2.1	No Mundo	24
1.2.2	No Brasil	26
1.3	Agente Etiológico	27
1.3.1	Características	27
1.3.2	Estruturas	28
1.4	Clínica	30
1.4.1	Transmissão	30
1.4.2	Doença	31
1.4.3	Tratamento	32
1.5	Resposta Imune	33
1.5.1	Resposta Inata	33
1.5.2	Resposta Imune Adquirida	38
1.5.3	Células T reguladoras	41
1.6	Justificativa	44
2	OBJETIVOS	46
2.1	Geral	46
2.2	Específicos	46
3	MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1	Modelo do estudo	48
3.2	Seleção dos isolados de <i>M. tuberculosis</i>	48
3.3	Caracterização e coleta das amostras dos participantes do estudo.	48
3.4	Preparo das cepas/isolados clínicos	50
3.4.1	Preparo do Inóculo	51
3.5	Avaliação da Atividade Microbicida das Amostras de Sangue Total (<i>Whole Blood Killing Assay</i>)	52
3.5.1	Culturas de sangue total	53
3.5.2	Lise e plaqueamento das culturas de sangue total	53
3.6	Avaliação da indução de células T reguladores e da indução da produção de citocinas em culturas de sangue total estimulados com isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	54
3.6.1	Culturas de sangue total	54
3.6.2	Imunofenotipagem	55

3.7	Avaliação da capacidade de proliferação dos isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e dosagem de citocinas em culturas de CMSP com e sem presença de células T reguladoras.	59
3.8	Isolamento das Células Mononucleadas do Sangue Periférico (CMSP)	59
3.8.1	Depleção de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺	60
3.8.2	Cultura, Lise e Plaqueamento das culturas de CMSPs.	62
3.8.3	Detecção e quantificação de citocinas	62
3.8.4	Ensaio de Fagocitose	66
3.9	Análise Estatística	66
3.10	Considerações éticas	67
4	RESULTADOS	69
4.1	Características das Cepas Utilizadas.	69
4.2	Caracterização das amostras biológicas:	69
4.3	Atividade Microbica em Amostras de Sangue Total do Grupo PPD- é Significativamente Maior do que as Encontradas para os Grupos PPD+ e TB.	70
4.4	Atividade Fagocitaria <i>in vitro</i> nos Grupos PPD- e PPD+ são semelhantes independentes da cepa/isolado utilizado.	74
4.5	Produção de Óxido Nítrico nos Grupos Estudados foi Semelhante.	77
4.6	Indivíduos PPD+ apresentam um aumento na produção de IL-10 e TGF- β e pacientes com TB na produção de IFN- γ e IL-23.	78
4.7	Frequência de células Tregs é elevada nos grupos PPD+ e TB e independente da cepa/isolado de MTB utilizado	80
4.8	Depleção de Células Tregs Restaura a Atividade Microbica dos Grupos PPD+ e TB a Níveis Comparáveis ao Encontrado para o Grupo PPD-.	83
5	DISCUSSÃO	91
6	CONCLUSÕES	98
7	REFERÊNCIAS	100

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A Tuberculose

A tuberculose é uma das doenças contagiosas mais antigas de que se tem relato. Seu surgimento e disseminação pelo mundo é tema de várias teorias, uma delas corresponde a sua especiação que pode ter facilitado o seu desenvolvimento em humanos, tal hipótese pode ser explicada pelo efeito do gargalo evolucionário que o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) tenha sido submetido a mais de 15.000 anos (SREEVATSAN *et al.*, 1997). Outra corresponde à transmissão da *Mycobacterium bovis*, transmitidas de bovinos para o homem após divergências do organismo ancestral comum, a cerca de 8.000 a 10.000 anos atrás (DONOGHUE; SPIGELMAN, 2004; KAPUR, 1994; SREEVATSAN *et al.*, 1997). Independente da hipótese ou teoria é fato que a tuberculose acompanha o homem desde a antiguidade, e como demonstrado em vários registros arqueológicos. Estes registros mostram que povoados neolíticos localizados na porção oriental da região do Mediterrâneo já apresentavam indícios da doença, lesões causadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), foram encontradas em algumas múmias egípcias datadas de 3.000 a 2.400 AC.(ZINK; HAAS, 2001)

Hipócrates (460 AC), em suas observações, descreveu os sintomas de uma doença que causava tosse com sangue e febre. Esta doença era caracterizada pela sazonalidade a qual ele atribuiu altos picos durante longos períodos quentes. Este alto acometimento era acompanhado do aumento da incidência da doença, assim como um grande número de óbitos, destacando a severidade da mesma (FALAGAS *et al.*, 2010).

Apesar dos sintomas serem conhecidos, o que causava a tuberculose continuou sendo mistério até o final do século XVIII, quando seu agente etiológico foi descoberto. Em 24 de março de 1882, o cientista alemão Robert Koch identificou e descreveu o Mtb, também conhecido como Bacilo de Koch (BLEVINS; BRONZE, 2010; DANIEL, 2006; LALVANI; SRIDHA, 2010; MURRAY, J. F., 2004).

A identificação do bacilo foi o primeiro passo para a descoberta de uma possível cura, em 1913, Albert Calmette e Camille Guérin desenvolveram uma vacina composta por uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, que aumentava a resistência a uma infecção posterior pelo

Mtb, a qual foi denominada de BCG (*Bacilo Calmette Guérin*) (DANIEL, 2006; LALVANI; SRIDHA, 2010; MURRAY, J. F., 2004).

Durante a Segunda Guerra Mundial, com o advento da descoberta da penicilina por Fleming, outras grandes descobertas farmacológicas ocorreram contribuindo para o tratamento da tuberculose, dentre elas podemos citar a Estreptomicina (1944) e da Isoniasida (1945); e o conhecimento de que o tratamento com a utilização destes dois fármacos por 18 a 24 meses acarretava em 95% de cura. Nos anos 80 com o surgimento do *Human immunodeficiency virus* (HIV), a tuberculose voltou a ser considerada uma doença emergencial, devido à co-infecção TB/HIV e da crescente ineficiência dos fármacos utilizados até então (JENSEN *et al.*, 1999).

1.2 Epidemiologia da Tuberculose

1.2.1 No Mundo

No mundo estimasse que aproximadamente 2 bilhões de pessoas, um terço da população mundial, estejam infectadas pelo Mtb (DYE *et al.*, 1999; WHO, 2011). Deste montante, 5 a 10% irão desenvolver a doença em algum momento durante sua vida (WHO, 2011), isso considerando que o indivíduo não seja portador de infecção pelo HIV ou tenha desenvolvido a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Dentre os 90% restantes, uns eliminarão o bacilo de forma eficaz (70%) e os 20% restantes que não conseguirem eliminá-la permanecerão assintomáticos, desenvolvendo infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (LTBI) (DRUSZCZYŃSKA *et al.*, 2012). Acreditasse que nestes indivíduos a chance de desenvolver a doença é aumentada em 5-15% a cada ano que passa, e em casos de co-infecção com o HIV esse risco sobe para 50% (DYE *et al.*, 1999; WELLS *et al.*, 2007; WHO, 2011). A tuberculose é considerada a segunda doença com maior causa de mortes do mundo, ficando atrás apenas da AIDS que em 2008 matou 1,8 milhões de pessoas (WHO, 2011). A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011) mostrou que em 1993 a incidência de casos novos de TB foi de 7 a 8 milhões, atingindo a marca de 1,3-1,6 milhões de mortes. Dentre todos os casos notificados de tuberculose, grande parte deles está concentrada na Ásia (59%) e na África (26%) considerados zonas de alta incidência de TB, pois apresentam altas concentrações de jovens infectados com alta incidência de novas infecções e reinfecções. Outras regiões também aparecem na lista, porém em menores proporções: Região do

Mediterrâneo (7%), Oeste da Europa (5%) e América do Norte (3%), estas regiões são consideradas de baixa incidência da TB, pois a doença acomete pacientes mais idosos e imigrantes advindos de zonas de alta incidência TB (WHO, 2011). Vale ressaltar que a Índia (2,0-2,5 milhões de casos) é responsável por 26% de todos os casos de TB no mundo, sendo seguida pela China (0,9-1,2 milhões de casos), e que juntas respondem por cerca de 40% destes casos. No continente africano, em 82% dos casos de TB o paciente também é portador de infecção pelo HIV (WHO, 2011).

A tuberculose pulmonar é a forma mais comum da doença; porém, em 20-38% dos casos ela pode se manifestar na forma extrapulmonar (TBEP) (COLBERT *et al.*, 2012; EASTWOOD *et al.*, 2001; MOKADDAS *et al.*, 2008), esta forma é encontrada normalmente em regiões de baixa incidência de TB. Estas regiões são caracterizadas pela alta industrialização e pelo grande fluxo de imigrantes como é observado na Austrália e Reino Unido, em que fora reportado a prevalência de 40% (MOKADDAS *et al.*, 2008). Estes fatores se tornam obstáculos importantes para a eliminação do Mtb em vários países, principalmente nos EUA (KIPP *et al.*, 2008).

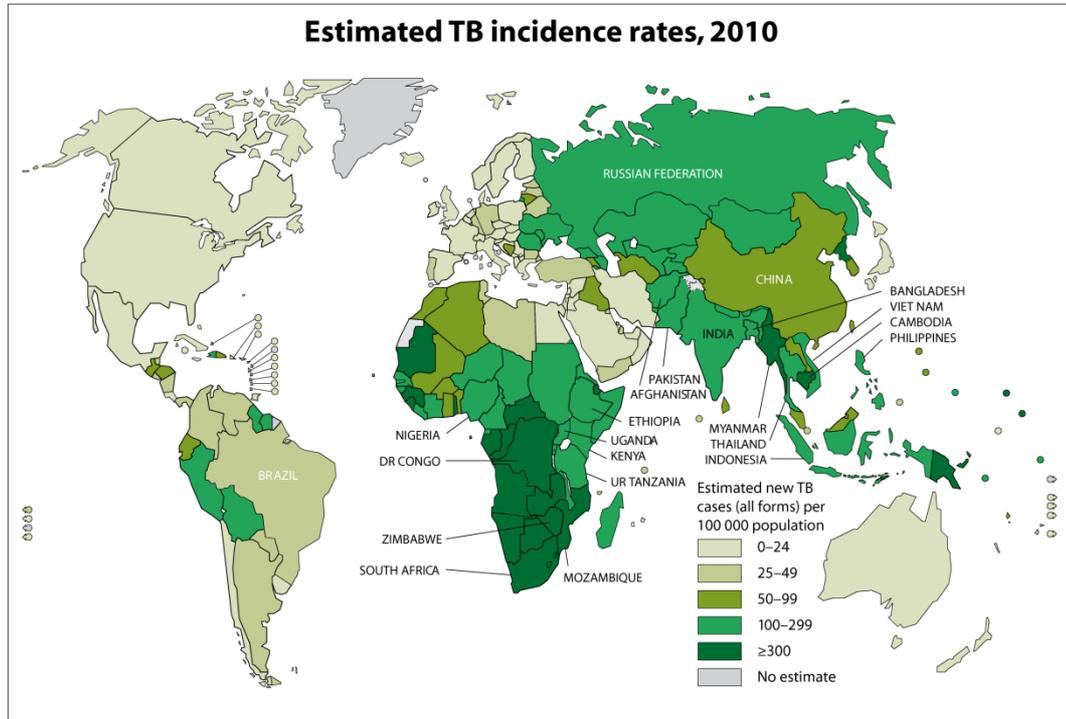


Figura 1: Mapa das regiões endêmicas onde a TB é presente. (WHO, 2011)

1.2.2 No Brasil

Em 2010 cerca de 70 mil novos casos e 4,5 mil mortes foram notificados. O País integra o grupo dos 22 países que juntos representam 80% da carga bacilar mundial. Em relação à carga bacilar, ocupa a 17ª posição e é o último em relação à taxa de incidência, prevalência e mortalidade (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). A TB é a 4ª maior causa de morte por doenças infectocontagiosas, perdendo apenas para septicemia (26,9%), HIV/AIDS (24,9%) e para a Doença de Chagas (9,9%), porém, quando os pacientes portadores de HIV/AIDS são considerados separadamente, a tuberculose tornasse a primeira causa de morte. (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2011)

De acordo com os dados da Secretária de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (2012), a taxa de incidência da TB sofreu uma redução significativa de 51,7/100.000 habitantes em 1990 para 37,7/100.000 em 2010, com a meta de reduzir para 35,3 em 2015. Em relação à taxa de mortalidade, também ocorreu uma redução de 3,6/100.000 em 1990 para 2,4/100.000 em 2010 com a meta de 2,2/100.000 para 2015. A região Sudeste (45,9%) apresenta a maior frequência de novos casos bacilíferos de TB, seguida pelo Nordeste (44,5%), regiões Sul (32,2%), Norte (10,9%) e Centro-Oeste (4,4%).

Paralelamente, o Brasil também se encontra aquém das metas estipuladas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em relação à Cura e Abandono. A OMS preconiza o índice de cura de 85% e o de abandono menor que 5%, porém possui índice de cura de 73% e de abandono de 10,9%, segundo dados de 2010. (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2011).

1.2.3 No Espírito Santo

Em 2010 foram notificados 1.291 novos casos de tuberculose no estado do Espírito Santo. Este grande número de casos foi acompanhado de uma taxa de incidência de 36,7 casos por 100.000 habitantes. A taxa de mortalidade, em 2009, era de 2 mortes por 100.000 habitantes. Considerando ainda o mesmo ano, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose mostrou que a taxa de cura para a doença foi de 79,1% enquanto a de abandono foi de 7,3%. Estes índices devem ser melhorados, pois, a meta para 2015 é de 85% de cura e de índices menores que 5,0% para o abandono (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011, p. 5).

Em 2009 o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, individualizou cada estado do país e observou o comportamento da doença nos municípios. No Estado do Espírito Santo, dos 72 municípios integrantes, 10 foram considerados prioridades (Cachoeiro de Itapemirim, Colatina, Cariacica, Guarapari, Linhares, São Mateus, Serra e por fim Vitória), pois representam cerca de 70% dos casos de tuberculose no estado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011, p. 5).

O município de Vitória em 2009 apresentou taxas de mortalidade de 2,2 mortes por 100.000 habitantes e em 2010 apresentou uma taxa de incidência de 52,5 casos por 100.000 habitantes. De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde e Ministério da Saúde, nos últimos 10 anos esses indicadores vem apresentando uma tendência à queda, que acaba por se assemelhar à taxa de incidência do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011, p. 5).

1.3 Agente Etiológico

1.3.1 Características

O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é um bacilo delgado, curvo e curto. Estes bacilos são imóveis e possuem uma parede celular formada por peptidoglicanos, com micolatos de arabinogalactana (arabinose e galactose), ou seja, a porção final é recoberta por ácido micólico, e não possuem endotoxinas. O Mtb possui uma parede celular, rica em lipídeos, a qual contém um vasto repertório de antígenos. Esta parede ainda promove ao bacilo uma barreira contra as drogas antimicobacterianas, se tornando um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos e de vacinas. (MISHRA *et al.*, 2011)

Bacilos do gênero *Mycobacterium* são aeróbios obrigatórios, de crescimento lento e possuem três características peculiares:

(1) Primeira característica marcante é a fraca coloração pelo método de Gram, apesar de possuírem em sua parede estruturas semelhantes às bactérias Gram “+”. Estas bactérias são denominadas de Bactérias Álcool-Ácido Resistentes (BAAR), ou seja, uma vez tingidas não descoram em presença álcool-ácido, o descolorante mais comum. Isto ocorre devido à alta concentração de lipídios em sua parede celular que retém a Fucsina, evitando assim sua descoloração.

(2) A segunda característica é a resistência à dessecação e a germicidas, tais capacidades são advindas da presença das ceras em seu entorno.



Figura 2: Microscopia eletrônica do *Mycobacterium tuberculosis* e aparência das colônias do Mtb (Centers Disease Control and Prevention).

(3) O crescimento lento destes bacilos seguidos de colônias de aspecto seco e de cor amarelada. Uma possível causa deste crescimento lento seria a dificuldade que a micobactéria possui em transportar os nutrientes necessários através da camada de cera que a recobre. O crescimento lento é um dos principais problemas para o diagnóstico da doença e para os testes de resistências às drogas.

1.3.2 Estruturas

Uma das principais estruturas envolvidas na patogenicidade do bacilo é o fator corda. Foi descrito em 1950 e é composto pelo 6-6'-dimicotil-treolase (TDM) (BLOCH, 1950). Tal substância é secretada em maior concentração pelo Mtb dentro dos macrófagos e seus substituintes micólicos influenciam em vários aspectos na virulência do bacilo (MONTAMAT-SICOTTE *et al.*, 2011). O fator corda não é tóxico para o patógeno e possui função protetora uma vez que evita a sua destruição pelos macrófagos, por meio da inibição da fusão do fagossomo e do lisossomo facilitando a permanência do bacilo (RAJNI *et al.*, 2011).

Além do fator corda temos o ácido micólico (AM) que são moléculas altamente hidrofóbicas e estão dispostas no entorno da parede celular do bacilo, esta disposição altera as propriedades de permeabilização da parede. Por estar ligada a virulência, a sua maior concentração acarreta em uma maior virulência, além é claro de ser responsável pela resistência e persistência aos agentes antimicrobianos (CANTALOUBE *et al.*, 2011) e pela formação de biofilmes

(MONTAMAT-SICOTTE *et al.*, 2011; OJHA *et al.*, 2008). O AM é formado por uma cadeia longa de α -alquil- β -hidroxi de ácido graxo, sua produção é realizada por sucessivos ciclos de alongação promovidos pela *Fatty Acid Synthase II* (FAS II). (KREMER; DOVER, 2002).

Por fim temos a Cera D, um glicolipídio macromolecular, responsável pela atividade de adjuvante do Mtb, e os Sulfatídeos. Os sulfatídeos são glicolipídios que contêm radicais sulfúricos, tais radicais potencializam a toxicidade do fator corda e promovem a sobrevivência intracelular, inibindo a fusão dos fagossomos com os lisossomos, suprimindo a formação de superóxidos. No Mtb, o sulfatídeo-1 (SL-1) possui uma notável correlação com a virulência da cepa (MOUGOUS *et al.*, 2002).

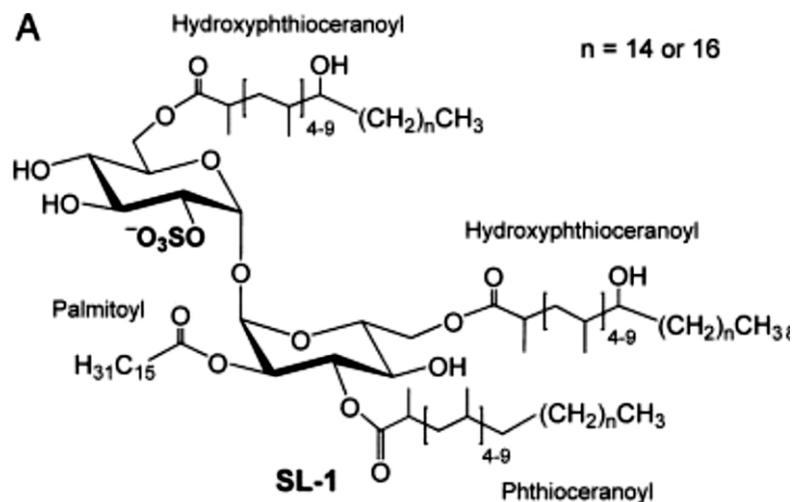


Figura 3: Estrutura do SL-1 (A) (MOUGOUS *et al.*, 2002).

Dentre os outros ligantes que interagem diretamente com receptores celulares, podemos citar as lipoproteínas de 19kDa e 27kDa, glicoproteínas de 38kDa, lipomanana (LM) e a lipoarabinomanana encapsulada com manose (ManLAM).

As lipoproteínas de 19kDa atuam inibindo a expressão de moléculas de *Major Histocompatibility Class* (MHC) - II, essa ação é dependente do receptor *Toll-like receptor 2* (TLR-2) e independente de TLR-4 (NOSS *et al.*, 2001). Já as glicoproteínas de 38kDa induzem a ativação de *extracellular-signal-regulated kinases* (ERK) 1/2 e *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38 via TLR 2 e 4, estimulando assim a produção de citocinas pro inflamatórias interleucina (IL)-6 e *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α , as quais promovem uma resposta inflamatória precoce durante a infecção do MTB (JUNG, SAET-BYEL *et al.*, 2006).

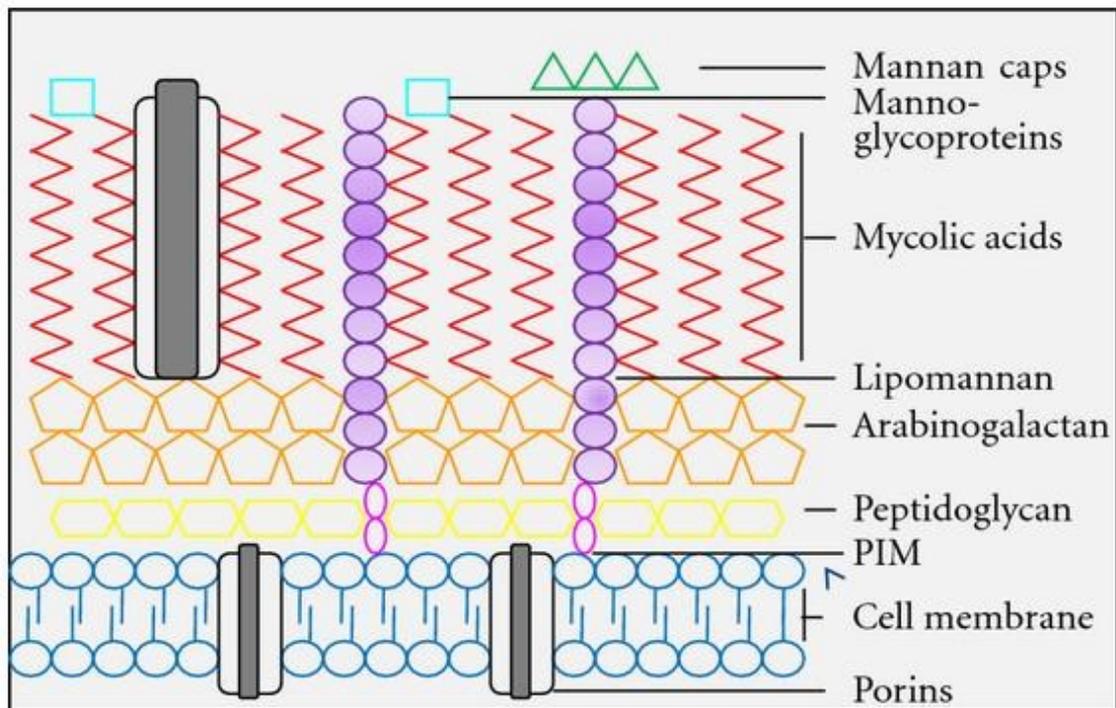


Figura 4: Representação esquemática dos principais componentes da parede celular e de suas distribuições. A camada interna da parede celular é composta de peptidoglicano, que é ligado covalentemente a camada de arabinogalactano. A membrana externa contém ácidos micólicos, glicolipídios como (manose-tampado) lipomanana e manose-glicoproteínas (KLEINNIJENHUIS *et al.*, 2011).

1.4 Clínica

1.4.1 Transmissão

A infecção se inicia por meio da inalação de gotículas de vapor (aerossol) contendo bacilos expelidos durante a respiração, a fala, o espirro ou a tosse por pacientes com tuberculose pulmonar ativa. Estas gotículas expelidas possuem tamanhos variados e assim, as maiores e mais pesadas acabam por se depositar ao solo e as gotículas menores e mais leves ficam em suspensão por horas. Apenas as partículas de um a cinco micrômetros conseguem passar pelas barreiras dos brônquios e chegar aos alvéolos. Normalmente estas partículas possuem um núcleo seco que contém de um a dois bacilos, são denominadas de *partículas núcleos de Wells*. (JENSEN *et al.*, 1999)

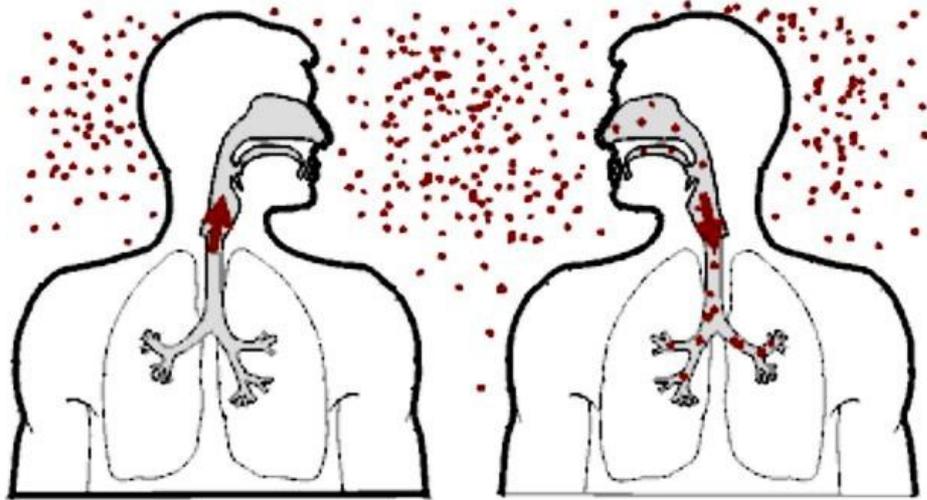


Figura 5: Transmissão da tuberculose por meio da disseminação de partículas núcleos de Wells (Centers Disease Control and Prevention, 2010).

O período de transmissão permanece ativo enquanto o paciente estiver eliminando bacilos e/ou não tiver iniciado o tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010a, p. 413). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os pacientes que estão em tratamento adequado, não são mais infecciosos. O que torna complicado a afirmação acima é não se saber, se paciente está recebendo/realizando o tratamento de forma adequada. (JENSEN *et al.*, 1999)

1.4.2 Doença

A tuberculose pulmonar é a manifestação mais comum, porém não devemos negligenciar as formas extrapulmonares (TBEP). A doença pulmonar ativa é caracterizada pela tosse crônica e persistente (três ou mais semanas de duração), com produção de muco com ou sem presença de sangue (indicativo de estágio avançado), associados a outros sintomas como, por exemplo: dor torácica, fadiga, sudorese noturna, febre, perda de peso, e calafrios (JENSEN *et al.*, 1999).

Após a infecção, o paciente pode ainda vir a desenvolver uma LTBI, durante a qual o bacilo pode ser reativado a qualquer momento, demonstrando assim a incapacidade do organismo em erradicar o Mtb, sendo apenas capaz de impedi-las de crescer. Apesar dos pacientes com LTBI não transmitirem a doença e não manifestarem sintomas clínicos, em qualquer desequilíbrio imune este paciente pode reativar a doença. (JENSEN *et al.*, 1999)

Por fim, a coinfeção com HIV, como comentado anteriormente, é uma das mais perigosas, e o Mtb se aproveita da vulnerabilidade imune criada pelo vírus da imunodeficiência humana. O desenvolvimento da tuberculose nestes pacientes esta aumentada de 50 a 300 vezes de

desenvolver uma nova doença ou de realizar uma reativação endógena. Podemos destacar que essa parceria é uma das principais causas de mortalidade.

A infecção por HIV/TB acarreta grandes dificuldades para a realização do diagnóstico e do tratamento, uma vez que a variedade de medicamentos a serem utilizados e a frequência de interações medicamentosas torna o trabalho extremamente laborioso e difícil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

1.4.3 Tratamento

O tratamento recomendado pelo Programa Nacional de Controle da TB é baseado na utilização de quatro drogas principais: Rifamicina (R), Isoniazida (H), Pirazinamida (Z) e Etambutol (E). Os esquemas são montados de acordo com as características da doença. O MS preconiza o esquema RHZE por dois meses denominados fase intensiva e RH por quatro meses como fase de manutenção. Este esquema principal é indicado para novos casos (TB pulmonar e/ou extrapulmonar) infectados ou não pelo HIV. Os casos de abandono e recidiva da doença seguem o mesmo esquema (HELIO *et al.*, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010b, pp. 418 - 420).

Nos casos de tuberculose meningoencefálica o esquema utilizado é o RHZE por dois meses (Fase Intensiva) e RH por sete meses (Fase de Manutenção). Caso ocorra falha terapêutica deverá ser solicitada a cultura com identificação, seguida dos testes de sensibilidade. A resistência aos fármacos é classificada em: monorresistência (apenas um fármaco), polirresistência (a mais de um fármaco que não seja a rifamicina e isoniazida), multirresistência (resistência simultânea a pelo menos, Rifamicina e Isoniazida) e por fim a resistência extensiva (resistência à Rifamicina, Isoniazida, Fluoroquinolona e a um medicamento injetável de segunda linha). Para os tratamentos alterados por reações adversas aos medicamentos, estas devem ser estudadas e ao final realizado a individualização das doses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010b, p. 318)

1.5 Resposta Imune

1.5.1 Resposta Inata

Os bacilos ao chegarem aos alvéolos acabam sendo fagocitados pelos macrófagos ($M\Phi$) e células dendríticas (DC), todavia é importante citar que o Mtb possui capacidade de infectar células não fagocitárias, tais como as células M (TEITELBAUM *et al.*, 1999), endoteliais e os pneumócitos (GOODMAN, 1996). GOODMAN (1996) mostrou, *in vitro*, que o Mtb consegue invadir estas células por meio de microfilamentos e mecanismos dependentes de microtúbulos, os quais se utilizam das integrinas como receptores.

Os $M\Phi$ e as DC reconhecem os PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) pelos receptores de reconhecimento de patógeno ou PRRs (*Pathogens Recognition Receptors*). Este reconhecimento pode ser feito pelos *Toll-like receptors* (TLR), *NOD (Nucleotide binding oligomerization-domain)-like receptors* (NLRs) e *C-type lectin* (CLEC) (JO, E.-K., 2008; SAIGA *et al.*, 2011).

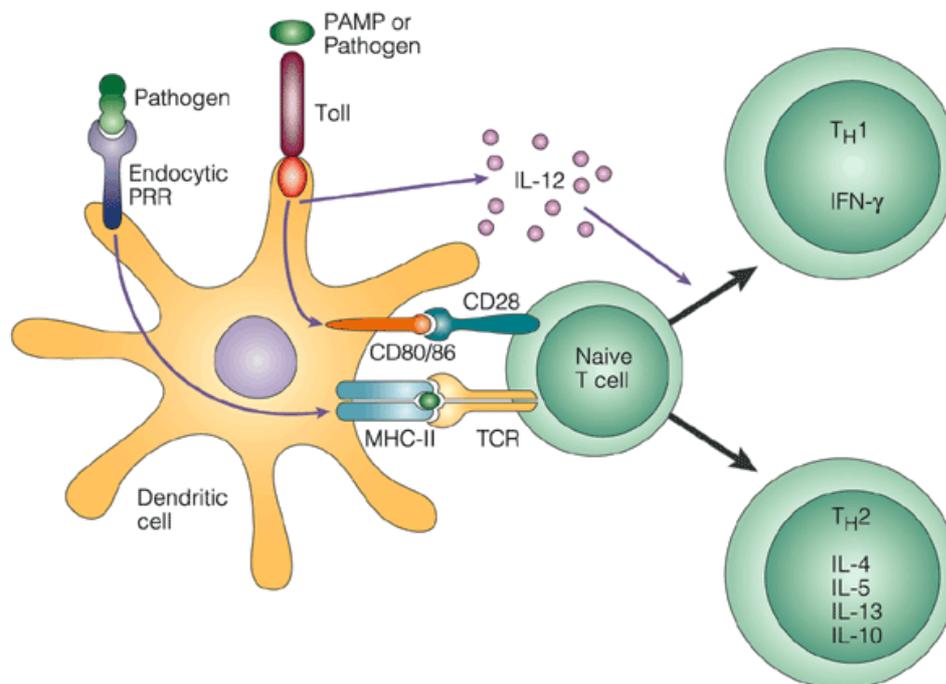


Figura 6: Reconhecimento de patógenos via PRR e/ou TLR. Receptores TLR expresso nas células apresentadoras de antígeno reconhecem os antígenos do patógeno estimulando a produção de citocinas. Diferenciação da resposta CD4 ocorre pela apresentação do antígeno via MHC-II e pela coestimulação CD28/(CD80/CD86). Seguido de produção de IFN- γ , citocina inflamatória, via Th1 ou ativação da via Th2 com a produção de citocinas anti-inflamatória (IL-4, IL-5, IL-10 e IL13) (MEDZHITOV, 2001).

Os receptores NOD atuam no reconhecimento de peptidoglicanos expressos por bactérias do tipo gram positiva e gram negativas (FERWERDA *et al.*, 2005; GIRARDIN *et al.*, 2003). Por

estarem localizados intracelularmente, estes receptores podem reconhecer o Mtb dentro da célula e nesta situação tornam-se os receptores mais adequados para este reconhecimento (FERWERDA *et al.*, 2005). Estes receptores são capazes de estimular a produção de citocinas pro-inflamatórias, isto foi demonstrado em camundongos *knockout* para NOD que apresentaram uma menor produção de citocinas inflamatórias assim como uma menor produção de óxido nítrico (NO) (FERWERDA *et al.*, 2007; GANDOTRA *et al.*, 2007).

O TLR é principal receptor dos PRRs. Dentre todos os TLRs acreditasse que os TLR-2 e TLR-4 são os mais relevantes na TB, e estão envolvidos com o reconhecimento de ligantes importantes presentes na parede do Mtb, tais como: lipoproteínas de 19 e 27kDa , glicoproteínas de 38kDa, LM, LAM, Man-LAM (JUNG, SAET-BYEL *et al.*, 2006; NOSS *et al.*, 2001).

Após o reconhecimento dos PAMPs, as porções citosólicas dos TLRs se dimerizam e recrutam o auxílio de moléculas adaptadoras, tais como o *Toll-interleukin 1 Receptor (TIR) Domain Containing Adaptor Protein (TIRAP)*, *Myeloid differentiation primary response gene (88) (MyD88)*, *TRIF-related adaptor molecule (TRAM)* e *TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β (TRIF)*. A MyD88 associada ao receptor, recruta *IL-1R-Associated Kinase-4 (IRAK-4)* que por sua vez fosforila IRAK-1. A IRAK-1 ativa o *TNFR-Associated Fator-6 (TRAF6)* cujo papel é ativar um complexo de quinases formado por IKK α , IKK β , & IKK γ . *Factor Nuclear Kappa B (NF- κ B)* esta associada a um *Inhibitor of Kappa B (I κ B α)* que deverá ser fosforilada para a liberação do NF- κ B. Este por sua vez desloca-se até o núcleo, para iniciar a tradução de sinais pró-inflamatórios (DOHERTY; ARDITI, 2004; SAKAGUCHI, M. *et al.*, 2011).

Para a produção de *Interferon (IFN) do tipo I*, os receptores TLR (3, 4, 7, 9) utilizam caminhos dependentes de TRIF. A ativação de TLR-4 esta envolvida na maturação de DC, conseqüentemente, aumentando a expressão de moléculas co-estimuladoras. Um fato curioso é que este receptor também tem atrelado a ele uma via de ativação independente de MyD88 para a produção de INF- α/β (KAISHO *et al.*, 2001).

Outros mecanismos de defesa inata é a formação do fagolisossomo (fagossomos + lisossomo) e a produção de óxido nítrico (NO) e reativos intermediários do nitrogênio (RNI), além de outros radicais do oxigênio. A formação do NO e de RNI está ligada à resposta ao estímulo de IFN- γ e TNF- α . Para estas respostas o Mtb possui dois grandes mecanismos de evasão, no

qual o primeiro é a utilização de uma *alquil hidroperóxido redutase subunidade C* (AhpC) que metaboliza peróxidos e peroxinitritos (BRYK *et al.*, 2002) e o outro é a utilização de duas proteínas do tipo *group I truncated hemoglobin* (trHbs), codificadas pelos genes *glbN* e *glbO*. Estas proteínas metabolizam o óxido nítrico em nitrato, diminuindo a toxicidade do NO (DAIGLE *et al.*, 2009; MILANI *et al.*, 2001; NIEMANN; TISA, 2008; PATHANIA; NAVANI; RAJAMOCHAN; DIKSHIT, 2002) .

O bacilo pode inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo. Para isso o Mtb secreta duas proteínas a 6kDa *Early Secreted Antigenic Target encode ESX-A* (ESAT-6) e a 10kDa *Culture Filtrate Protein encode ESX-B* (CFP-10), esta proteínas são secretadas dentro do fagolisossomo, e a medida que o pH diminui, a dissociação delas aumenta. O ESAT-6 acaba por se associar a membrana do fagolisossomo, desestabilizando-a; na membrana desestabilizada aparecem poros pelos quais o Mtb escapa (JONGE, DE *et al.*, 2007).

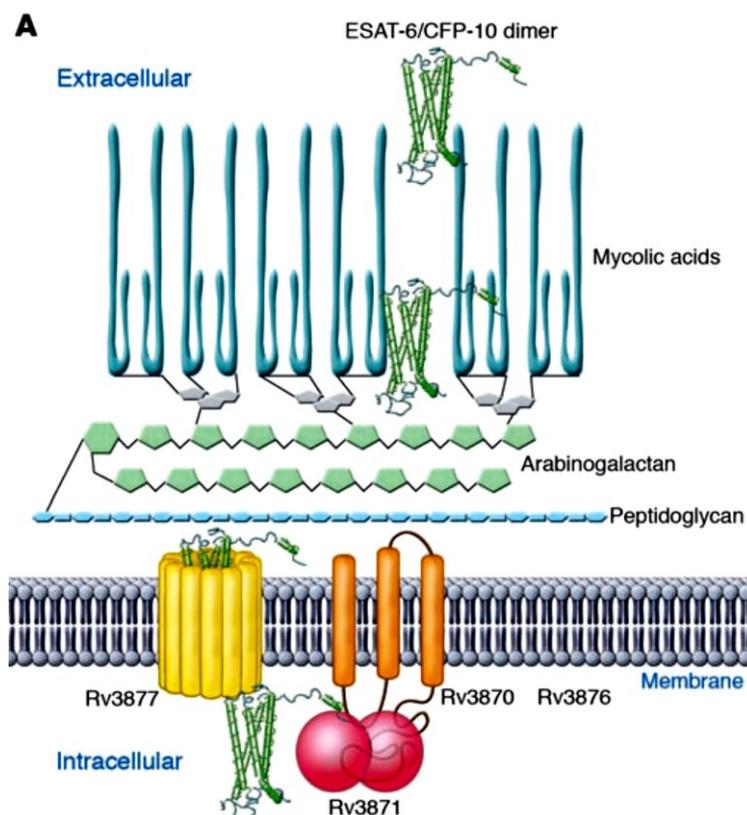


Figura 7: O dímero ESAT-6 e CFP-10, secretado pelo Mtb. Assim que entra em contato com o meio ácido do fagolisossomo este dímero se desfaz e assim o ESAT-6 passa a se ligar a membrana do fagolisossomo (ERNST, J. D. *et al.*, 2007).

Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio de infecção e assim desempenham papel importante na defesa contra o Mtb e a outros microrganismos invasores (APT *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2004). Estas células proporcionam ao pulmão mecanismos

de defesa contra os microrganismos invasores, assim esta ação acaba por levar a um dano tecidual extensivo ocasionando na perda da capacidade respiratória (ROOK; HERNANDEZ-PANDO, 1996), esta destruição é realizada pela liberação de produtos derivados do oxigênio, peptídeos catiônicos, eicosanoides e enzimas proteolíticas (LEE, W. L.; DOWNEY, 2001). Os neutrófilos são recrutados por intermédio da quimiocina IL-8 (CXCL8) produzidas pelos MΦ alveolares infectados (SAWANT; MCMURRAY, DAVID N, 2007). Vale ressaltar que a IL-8 também atua no recrutamento de mais células mononucleares, tais como monócitos e células T (SAWANT; MCMURRAY, DAVID N, 2007; SCAPINI *et al.*, 2000). Deste modo o recrutamento e a ativação dos neutrófilos no sítio de infecção é caracterizado pela produção de IL-8 e TNF- α , pelos neutrófilos, demonstrando assim a capacidade moduladora destas células ao regularem a atividade dos MΦ alveolares.

PEDROSA *et al.* (2000) mostrou que o ponto chave da participação dos neutrófilos durante a infecção pelo Mtb ocorre nas fases iniciais, assim sua função principal pode não estar associada a atividade fagocitária mas sim a uma atividade do tipo imuno-moduladora (PEDROSA *et al.*, 2000). Dos vários mecanismos utilizados pelos neutrófilos, o mais recente descrito, está relacionado a um mecanismo microbicida denominado *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs). RAMOS-KICHIK *et al.*, (2009) demonstrou ao utilizar dois genótipos diferentes do complexo Mtb que estas cepas foram capazes de induzir a formação das redes (NETs) porém não foram capazes de matar as Mtb que foram aprisionadas (RAMOS-KICHIK *et al.*, 2009).

Não podemos nos esquecer de citar, mesmo que brevemente, o papel das células *Natural Killer* (NK) na resposta imune frente à infecção pelo Mtb, uma vez que estas células possuem a capacidade de lisar monócitos infectados e/ou os patógenos de forma direta (BLANCHARD *et al.*, 1992; ESIN *et al.*, 1996). Um fato interessante é que estas células, *in vitro*, possuem a capacidade de instruir linfócitos do T citotóxicos a lisar monócitos infectados com o Mtb em indivíduos PPD- (KORBEL *et al.*, 2008).

Estas células expandem em resposta ao Mtb e tão logo passam a produzir IFN- γ e perforinas (JUNQUEIRA-KIPNIS *et al.*, 2003). Também podemos citar a produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α (JOHNSON; MCMURRAY, D N, 1994), caracterizando sua importância na manutenção da resposta imune local. A atividade celular das NK são controladas por IL-12, IL-18 e especialmente de IFN- γ e a ativação destas se faz por um complexo repertório de

receptores os quais podemos citar o NKG2D e o receptor NKp46 (KORBEL *et al.*, 2008; VANKAYALAPATI *et al.*, 2002).

Em contraste, eventos anti-inflamatórios podem inibir a apresentação de antígenos, e assim, permitem o crescimento destes patógenos no interior dos MΦ (NOSS *et al.*, 2001). BLOMGRAN & ERNST (2011) mostraram que camundongos infectados com cepas virulentas de Mtb, apresentavam ativação de células T CD4 específicas graças à cooperação entre os neutrófilos e as DC no pulmão. Para contornar os eventos anti-inflamatórios e realizar esta cooperação com as DC, os neutrófilos ativam vias apoptóticas, para que os antígenos processados por eles possam ser fagocitados por outras células e assim apresentados futuramente. Esta ação tem dois lados, um beneficiando o patógeno que poderá entrar em qualquer célula fagocitária, atuando como um Cavalo de Tróia (ZHENG *et al.*, 2004), e o outro beneficiando o hospedeiro. Pois as células DC poderão fagocitar antígenos do Mtb e apresentá-los no linfonodo para células T CD4 e CD8, as quais poderão ativar os MΦ a produzir citocinas pró-inflamatórias. Para evitar a ativação destes mecanismos favoráveis ao sistema imune, o Mtb por meio da ManLAM e de outros componentes da parede celular atuam sobre as enzimas apoptóticas, via TLR, e assim inibem a apoptose, provocando a morte celular por necrose, e deixando o Mtb livre para uma nova infecção (GAN *et al.*, 2008).

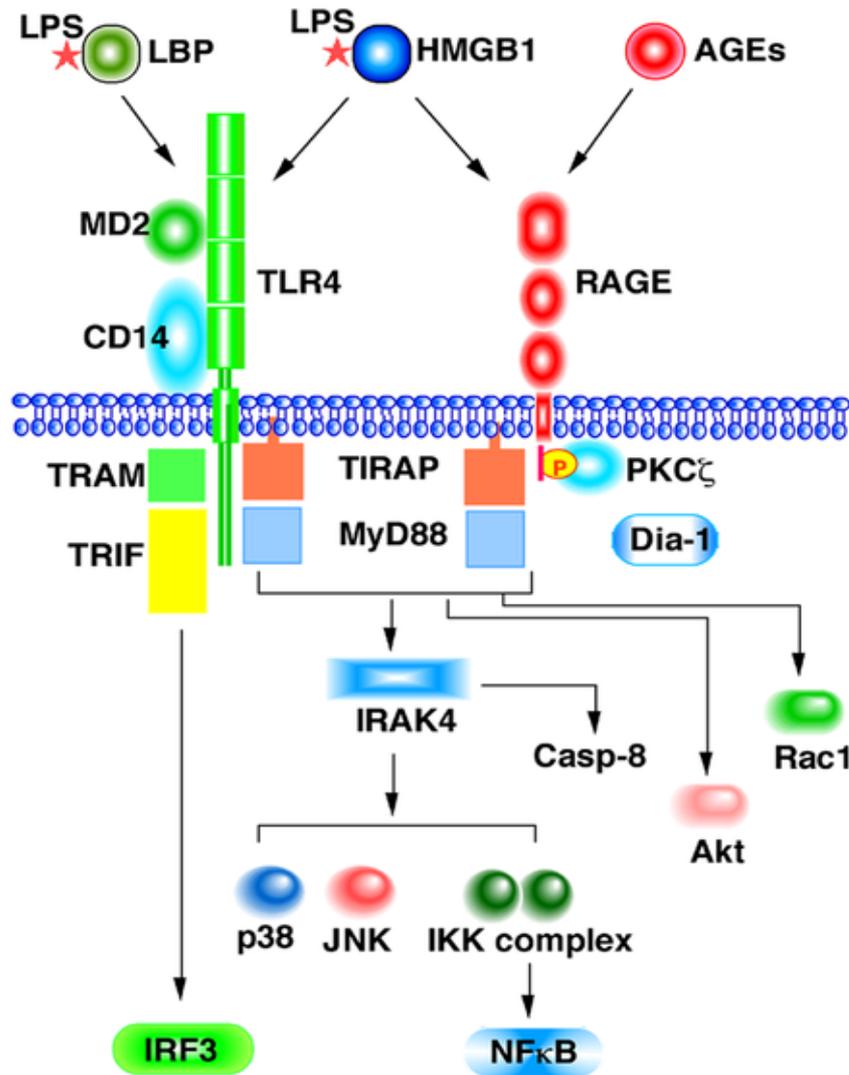


Figura 8: Esquema da transdução de sinal via TLR4 e RAGE. Ambos receptores partilham do TIRAP/MyD88. O receptor TLR4 transduz um sinal para NF- κ B via TIRAP, MyD88, IRAK4 e IRAK 3 via TRAM e TRIF. Já o receptor RAGE fosforila PKC ζ ativando TIRAP, MyD88 e IRAK4 e por fim ativando o NF- κ B (SAKAGUCHI, M. *et al.*, 2011).

1.5.2 Resposta Imune Adquirida

Após a ativação da resposta imune inata, as células apresentadoras de antígenos (APC), se encarregam de ativar os linfócitos presentes nos linfonodos proximais, dando assim início a resposta imune adquirida. A resposta adquirida atua por vários caminhos que pode ser por meio de vias humorais, via linfócitos citolíticos e/ou na amplificação da resposta imune inata. A amplificação da resposta inata ocorre no local da infecção, e as células são ativadas por meio de ligantes de CD40 e/ou por citocinas, por exemplo, o IFN- γ , que atua na ativação de M Φ aumentando a fagocitose/morte do Mtb (MENDELSON *et al.*, 2005). Já os linfócitos são ativados pelas APC, que passam a apresentar antígenos via MHC-I (WINAU *et al.*, 2006) e/ou MHC-II (LEE, K.-W. *et al.*, 2006; BONTRON *et al.*, 1997).

A resposta adaptativa ao Mtb segue de certa forma o caminho apresentado acima, de forma bastante simplificada. Uma das maiores características da resposta adaptativa em relação ao Mtb é, o quão tardio ela é, pois emerge a cerca de 40 dias após a exposição/infecção ao patógeno, isso se deve a diversas formas de evasão do parasita.

As células TCD4 ativadas sofrem expansão clonal. Essa expansão é mediada pela IL-2, produzida pela própria célula CD4. Estas células apresentam um fator de transcrição denominado *T-box transcription factor* (T-bet) (LU *et al.*, 2011; SZABO *et al.*, 2000), que por sua vez é estimulado por IFN- γ , atuando na amplificação do sinal para a resposta Th1. O IFN- γ , produzido pelas células *Natural Killers* (NK) também promove a ativação de M Φ e DC. Estes produzem IL-12 que estimula *Signal transducer and activator of transcription-4* (STAT-4) (DWIVEDI *et al.*, 2012), o qual atua na transformação celular de Th0 para Th1.

Uma vez estimuladas, células Th1 produzem mais IFN- γ , citocina característica da resposta (HERBST *et al.*, 2011), amplificando assim a ativação de M Φ e ativando células do tipo B que passarão a produzir anticorpos ligantes ao complemento e assim aumentando a opsonização do Mtb pelas APCs.

Além disso, outro fator de transcrição, o GATA-3 (Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3) (LU *et al.*, 2011; SZABO *et al.*, 2000), pode atuar nesta resposta e direcionar para outro caminho. O GATA-3 é produzido em resposta ao reconhecimento de antígeno e a sua produção é aumentada em resposta a IL-4. Esta via é dependente do *Signal transducer and activator of transcription-6* (STAT-6), originando a transformação de Th0 em Th2 (DWIVEDI *et al.*, 2012). As células Th2, por sua vez, produzem citocinas anti-inflamatórias, dentre elas destacamos a IL-4, responsável pela amplificação da resposta Th2 e da ativação de células B para a produção de IgG4 e IgE. A IgE atua diretamente na degranulação de mastócitos. A resposta Th2 está envolvida na ativação de eosinófilos (via IL-5) e na supressão da atividade dos M Φ via IL-4 e IL-10. A resposta Th2 é baseada na ativação do GATA-3 que pode ser via apresentação de antígeno ou pelo estímulo de IL-4.

As células T CD8 estão envolvidas de forma contundente na resposta do hospedeiro contra o Mtb. Após o contato com o antígeno, se proliferam e se diferenciam e assim entram na circulação e migram para o local da infecção (KOHLMEIER *et al.*, 2011). Com a intensa migração, estas células passam a estar presentes nos pulmões de forma numerosa e isso graças a constata ativação/estimulação via APCs.

A numerosidade destas células não reflete diretamente em sua capacidade microbicida, pois as células T CD4⁺ desempenham um papel muito mais importante. Não descredenciando da sua função microbicida, FLYNN *et al.* (1992) demonstrou que camundongos deficientes de beta microglobulina-2 ($\beta 2M$) e expostos a altas cargas bacilares não resistiram à infecção, morrendo em seis semanas, porém camundongos controles infectados sobreviveram por mais de 20 semanas, caracterizando a importância destas células durante a infecção. Um comparativo pode ser montado entre as células T CD4 e T CD8. A deficiência de células T CD4 é muito mais grave que as de T CD8. Quando depletamos ambas as células, a gravidade da doença é aumentada, e com isso podemos observar a importância das células T CD8 frente à infecção, caracterizando uma proteção parcial. Por fim as células T CD8⁺ estão presentes dentro do granuloma, local este que acabam por controlar a resposta, impedindo assim a disseminação de células infectadas. Após a eliminação dos bacilos, o *pool* de células CD8 entra em declínio o qual 95% das células específicas entram em apoptose e os 5% restantes passam a compor o grupo seletivo de células de memória (KOHLMEIER *et al.*, 2011).

Independente da resposta realizada, alguns patógenos se utilizam de mecanismo de evasão. O Mtb é capaz de utilizar a via do TLR em benefício próprio. O Mtb evita ser morto por MΦ ativadas, inibindo a produção de IFN- γ . A sinalização prolongada com a lipoproteína de 19 kDa do Mtb, a qual estimula o TLR2, inibe a produção de IFN- γ e o processamento e apresentação de antígenos pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II (DIVANGAHI *et al.*, 2009; NOSS *et al.*, 2001).

Além destas células apresentadas anteriormente, existem as células do tipo Th17. Estas células fazem parte de um grupo de linfócitos T CD4⁺ que produzem IL-17 (LIANG *et al.*, 2006). A produção de IL-17 estimula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, TNF- α , óxido nítrico e de outros fatores (NAKAE *et al.*, 2003; TAKATORI *et al.*, 2009). A produção de IL-17 e assim a indução do fenótipo Th17 está associado com a presença de TGF- β , IL-6 e/ou IL-21. Dentre as citocinas comentadas anteriormente, o TGF- β apresenta um fato interessante. O TGF- β atua diretamente no fator de transcrição ROR γ T, podendo inibir ou induzir a expressão de IL-17, atividade que depende de outras citocinas associadas, IL-1 β , IL-6 ou IL-21 (MANEL *et al.*, 2008).

1.5.3 Células T reguladoras

Juntamente com a resposta adaptativa, é observada a presença de células T reguladoras (Treg). Estas células são linfócitos CD3⁺CD4⁺, que expressam grandes quantidades de receptores IL-2 (CD25^{high}) em sua membrana (SAKAGUCHI, S. *et al.*, 1995), porém estas células com capacidade de suprimir as respostas imunes já haviam sido descritas no início dos anos 70s (GERSHON, R. K.; KONDO, 1970, 1971). Grande parte das células Treg tem origem no timo durante a ontogenia e são denominadas de naturais (nTreg) porém estas células podem ser induzidas a partir de linfócitos TCD4⁺ *naives* na periferia recebendo o nome de Treg induzida (iTreg) (CHEN, W. *et al.*, 2003).

Ambas estão ligadas diretamente na manutenção da tolerância periférica, ou seja, estas células suprimem a ativação e expansão de células T autorreativas ou que apresentam uma superativação (HORI *et al.*, 2003). As Tregs representam cerca de 5-10% do total dos linfócitos T CD4⁺ (SAKAGUCHI, S. *et al.*, 1995).

A caracterização destas células é muito vasta, pois apresentam o CD25 (SAKAGUCHI, S. *et al.*, 1995), *Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4* (CTLA-4⁺) (READ *et al.*, 2000) dentre outros marcadores, porém o mais importante é o marcador intracelular *Forkhead Box P3* (FOXP3) (HORI *et al.*, 2003).

As Tregs utilizam diversos mecanismos de supressão, que podem ser subdivididos em contato célula-célula, secreção de citocinas inibitórias ou competição por fatores de crescimento.

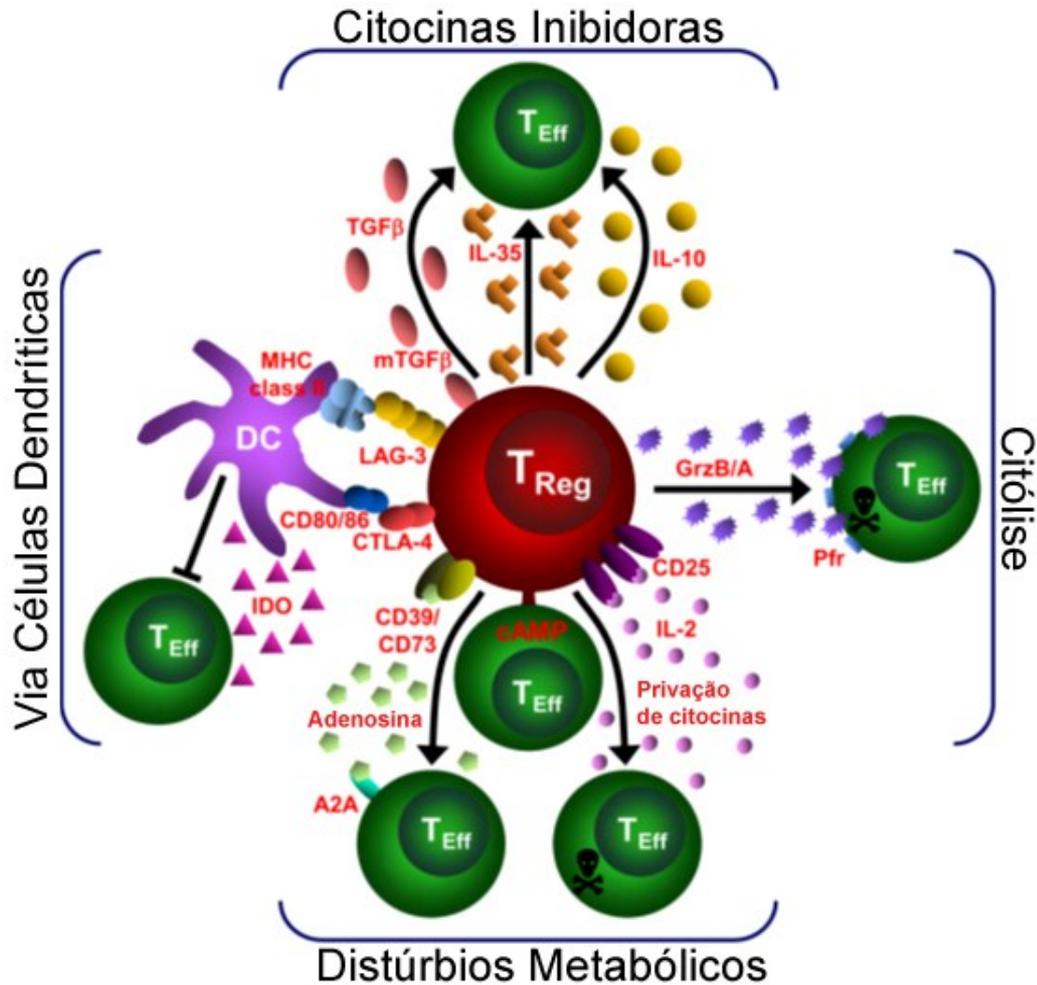


Figura 9: Mecanismos de supressão via Treg. A) Citocinas inibidoras. B) Citólise via perforina e/ou Granzima A e/ou B. C) Distúrbios metabólicos via cAMP. D) Inibição indireta via DC por estímulo de receptores CTLA-4/CD80/86 ou LAG3/MHC-II (modificada de VIGNALI, D. A. A. *et al.*, 2008).

No quesito supressão por contato, NAKAMURA *et al.*, em 2001 mostraram que células T CD4⁺CD25⁺ são fontes preferenciais de TGF-β1, tanto na produção e secreção quanto na apresentação via superfície. Outros mecanismos via contato podem ser citados, como por exemplo, a interação Fas-Fas ligante ou a degranulação de granzimas (JANSSENS *et al.*, 2003) ou por *Lymphocyte-activation gene-3* (LAG3), que por sua vez se liga ao MHC-II ativando um motivo que traduzirá um sinal antiproliferativo (HUANG, C.-T. *et al.*, 2004).

A atuação das Tregs pelos receptores CTLA-4 utiliza os ligantes CD80/CD86 para a realização da supressão em linfócitos ativados, porém esta relação se faz diferente nas DC. Esta relação CTLA-4-CD80/CD86 nas DC acarretam na ativação da *Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase* (IDO) que atua na degradação de triptofano, aminoácido essencial para ativação de células T, tornando este mecanismo dependente das DC (BOEHMER, VON, 2005).

Outro caminho importante é a elevação de adenosina monofosfato cíclica (cAMP). O aumento da concentração de cAMP inibe a proliferação e a diferenciação celular, além de inibir a secreção de IL-2 e IFN- γ , via bloqueio da proteína quinase A (PKA) do NF- κ B (BOEHMER, VON, 2005; BOPP *et al.*, 2007).

A secreção de citocinas inibidoras possui como principais o TGF- β e a IL-10. Estas possuem papel central na atividade efetora das Treg, e para isso cada célula recebe um nome diferente que está relacionado com a citocina produzida. As Tregs que produzem IL-10 são conhecidas com reguladoras do tipo-1 (TR1) e as que produzem TGF- β como células *T helper-3* (Th3)(WU, H. *et al.*, 2012). Por fim temos uma nova citocina que está ligada a supressão via Treg, a IL-35 (BETTINI; VIGNALI, D., 2010). A IL-35 é membro da família da IL-12, em contraste com os membros desta família, a IL-35 não é expressa por células T, mas sim por células reguladoras, contribuindo para a atividade supressora (WU, H. *et al.*, 2012).

A expressão constituinte de CD25 (IL-2R) torna as células Tregs capazes de atuarem como grandes captadores, de IL-2, dificultando assim a ativação das células T *naives* em células T efectoras.

Adentrando ao tema principal da dissertação, a expansão das Tregs durante a infecção pelo Mtb, está associada à resposta adaptativa do hospedeiro, que por sua vez é muito intensa nos sítios ativos de infecção, por exemplo, o pulmão. Porém essa propriedade imunoregulatória, paradoxalmente, deprime a resposta do tipo Th1, inibindo as células T anti-Mtb, necessárias para realizar o controle da infecção (RIBEIRO-RODRIGUES *et al.*, 2006). GUYOT-REVOL *et al.*(2006) e RIBEIRO-RODRIGUES *et al* (2006) observaram um aumento da frequência de células Treg em pacientes com TB.

1.6 Justificativa

Os trabalhos apresentados anteriormente (GUYOT-REVOL *et al.*, 2006; HERZMANN *et al.*, 2012; RIBEIRO-RODRIGUES *et al.*, 2006) sugerem um aumento das células Tregs em indivíduos reativos ao PPD ou que apresentavam a doença. VERVER *et al.* (2005), relatou que pacientes com tuberculose, tratados e curados com eficiência, apresentavam taxas de reinfecção maiores do que indivíduos que apresentavam infecções recentes.

Perante a estes fatos, a hipótese de que o contato com o Mtb melhoraria a resposta protetora frente a uma nova infecção, não se aplicaria à tuberculose, uma vez que a pré-exposição ao bacilo levaria a um aumento na susceptibilidade contra o Mtb. Nosso estudo tem por objetivo avaliar a existência de uma possível diminuição da atividade microbicida em indivíduos PPD+ e de pacientes com TB pulmonar quando comparados à indivíduos saudáveis PPD-.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Demonstrar que indivíduos reativos ao teste intradérmico PPD e pacientes com TB apresentam menor resposta imunológica frente ao bacilo *Mycobacterium tuberculosis* quando comparados a indivíduos saudáveis não reativos, e sua possível correlação com o aumento significativo da frequência de células T reguladoras.

2.2 Específicos

- Avaliar a frequência de células T reguladoras ($CD3^+CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$) nas culturas de sangue total infectadas com as cepas resistentes e sensíveis.
- Avaliar a capacidade microbicida dos indivíduos PPD+ e TB em culturas de sangue total, comparando-as com culturas de sangue total de indivíduos PPD-.
- Correlacionar parâmetros imunológicos, como atividade fagocitária, produção de óxido nítrico e de citocinas, tais como IL-10, IL-23, IFN- γ e TGF- β , entre os indivíduos PPD-, PPD+ e pacientes com TB, frente à resposta observada pelos experimentos.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo do estudo

O presente trabalho trata-se de um estudo descritivo transeccional para à avaliação da proliferação do *Mycobacterium tuberculosis*, através de ensaios de atividade microbicida, do perfil de citocinas e da frequência de células do tipo T reguladoras (Tregs) em culturas de sangue total e de células mononucleares de sangue periférico (CMSP).

O sangue e as células do CMSP foram adquiridos de pacientes com tuberculose ainda sem tratamento; além é claro de indivíduos com PPD- e PPD+ (sem manifestações clínicas da doença) assim formando o grupo controle. Tais amostras foram infectadas com cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e resistentes.

O estudo foi realizado nos laboratórios de Microbiologia e de Imunologia Celular e Molecular do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI), localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

3.2 Seleção dos isolados de *M. tuberculosis*

Foram selecionadas seis cepas de *Mycobacterium tuberculosis* dentre as oferecidas pelo Núcleo de Doenças Infecciosas. Os seis isolados foram subdivididos em dois grupos formados por isolados sensíveis as drogas antituberculosas (2220-S1 e 885-S5) e multidroga resistentes (3053-R3 e 669-R6), além é claro, das cepas-padrão H37-Rv e H37-Ra, com características de virulência ou não respectivamente. As cepas foram cultivadas em meio Ogawa e armazenadas em estufas a 37°C com 5% de CO₂, após 14 dias de crescimento foram feitas alíquotas destas bactérias, as quais foram armazenadas em freezers -70°C até posterior preparo para a infecção.

3.3 Caracterização e coleta das amostras dos participantes do estudo.

Para a inclusão dos participantes ao projeto, alguns critérios foram criados para minimizar possíveis erros futuros, assim para se tornar elegível para o protocolo o indivíduo deveria:

- Ser maior de dezoito anos;
- Não ser portador do vírus do HIV, Hepatite ou possuir qualquer outra doença crônica;
- Aceitar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo;

Após a inclusão, os participantes arrolados eram alocados em grupos específicos com características distintas.

O primeiro grupo era destinado aos Controles, formado exclusivamente por indivíduos não doentes. Tal grupo era subdividido perante o resultado do Teste Tuberculínico com *Purified Protein Derivative* (PPD), logo os indivíduos reativos ao teste compunham o grupo PPD+ (n=13) e os não reativos o grupo PPD- (n = 13).

O segundo grupo era formado por pacientes que apresentavam a doença e ainda não haviam iniciado o tratamento. O terceiro grupo era formado por pacientes que terminaram o tratamento e assim, se curaram da doença, cada grupo era formado por 11 pacientes.

Estes pacientes eram triados e encaminhados ao Centro de Pesquisas Clínicas do Núcleo de Doenças Infecciosas, supervisionado pelo Dr. David Haddad médico infectologista responsável pelo Centro.

De cada paciente eram coletados um total de 40 ml de amostra de sangue periférico, destes 15 ml eram utilizados para a realização de Cultura de Sangue Total, 5 ml para a avaliação da capacidade proliferativa bacteriana conhecida como *Whole Blood Killing Assay* (WBKA), e os 20 ml restantes foram utilizados para a realização da depleção das células T reguladoras.

Amostras de sangue foram coletadas em tubo contendo heparina sódica (Tubo Vacutainer) transportadas em temperatura ambiente, podendo ser analisadas em Citometria de Fluxo até 24 horas após a coleta desde que estivessem armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz. Já as amostras geladas ou congeladas, hemolisadas, lipêmicas, coaguladas ou com micro coágulos e/ou proporção volume de sangue/anticoagulante inadequado eram rejeitadas.

3.4 Preparo das cepas/isolados clínicos

A preparação das bactérias sempre ocorria pela parte da manhã, nos dias de infecção. As bactérias foram retiradas do meio de cultura após 14 dias com o auxílio de uma alça bacteriológica descartável, em torno de duas alças cheias, e assim foram transferidas para um tubo de cultura tampa de rosca, contendo 2 ml de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) com 0,25% *Tween* 80 e pérolas de vidro. Após a transferência o tubo era fechado e colocado em vórtex, por cerca de 1 minuto com pequenos intervalos, para que fossem desfeitos os grumos e a bactéria ficasse homogênea.

Assim que a etapa anterior era concluída, a amostra era deixada por 30 minutos em repouso para que os grumos ainda existentes fossem decantados. Passado este tempo, o sobrenadante era recolhido e transferido para outro tubo de vidro com tampa de rosca e sem pérolas de vidro. Em outro tubo sem pérola de vidro eram adicionados 4ml de PBS+0,25% *Tween* 80 e gotas do sobrenadante bacteriano transferido.

Após a adição de pelo menos 10 gotas de sobrenadante bacteriano o tubo de vidro era levado ao espectrofotômetro para realizar a medição da densidade ótica. A amostra era lida em comprimento de onda de 600 nanômetros (nm) e a densidade ótica ajustada para 0,35 (DO) que representava 1 na escala *MacFarland*, nos indicando a quantidade aproximada de 10^7 bactérias por ml.

De cada tubo de vidro era retirado o volume de 1 ml que era transferido para um microtubo de 1,5 ml devidamente registrado com as iniciais das bactérias em questão. Os tubos eram centrifugados por três ciclos a 13.000 RPM por 10 minutos. Após o primeiro ciclo era retirado o sobrenadante com a ajuda de uma micropipeta ou pipeta do tipo Pasteur com extremo cuidado para não perder o pellet. O microtubo era agitado em vórtex para a dissolução do *pellet* e em seguida era adicionado 1 ml de meio RPMI 1640 completo e repetia-se o ciclo. Este passo era repetido mais uma vez e assim se completava os três ciclos de lavagem.

Depois de lavagens os microtubos eram colocados em um sonicador e eram submetidos a três ciclos de 10 segundos com intervalos de cinco minutos. O *Lysor* (sonicador) é composto por uma plataforma vibratória que vibra rapidamente, neste processo, patógenos podem ser rompidos evitando assim uma contaminação da amostra preparada, além de diminuir os grumos formados pelas micobactérias.

3.4.1 Preparo do Inóculo

Antes da realização de qualquer experimento, era preparada uma suspensão bacteriana para posteriormente infectar as culturas. Optamos pela proporção de uma bactéria para um monócito (1:1) para realizar as infecções. Durante o processo anterior, as bactérias eram preparadas na concentração de 10^7 bactérias por ml, para igualarmos com a quantidade de monócitos eram realizadas diluições seriadas.

A partir do inóculo principal (10^7) eram realizadas cinco diluições na proporção de 1:10, logo:

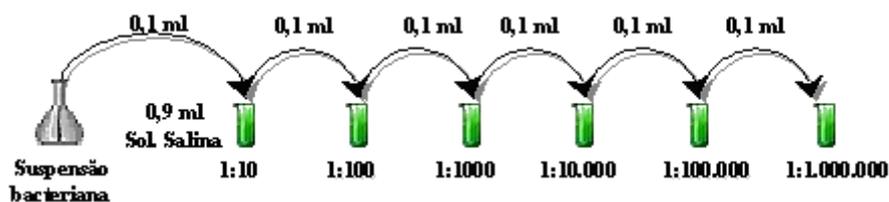


Figura 10: Diluição da suspensão bacteriana para o controle da concentração do inóculo para a infecção.

Como na figura, eram colocados 900 μ l de RPMI 1640 (*SIGMA-Aldrich*) suplementado (Soro Fetal Bovino Inativado, L-Glutamina, *HEPES* 1M - *Gibco Invitrogen*) em cada tubo de hemólise. Da suspensão bacteriana eram retirados 100 μ l e transferidos para o primeiro tubo de hemólise e assim teríamos a primeira diluição de 10x, neste caso teríamos uma suspensão de 10^6 de bactérias/ml. Para a produção da suspensão bacteriana de 10^5 , retirava-se 100 μ l da suspensão bacteriana de 10^6 e a diluía em 900 μ l de meio RPMI 1640 suplementado.

Terminada a diluição, placas quadripartidas contendo meio *Middlebrook 7H11* (*Becton Dickinson*), *Middlebrook OADC Enrichment* (*Becton Dickinson*) e Glicerol (*Vetec* - $C_3H_5(OH)_3$) eram identificadas com a data, cepa, diluição de cada quadrante e assim estava pronto para começar o plaqueamento do controle de crescimento interno (CCI).

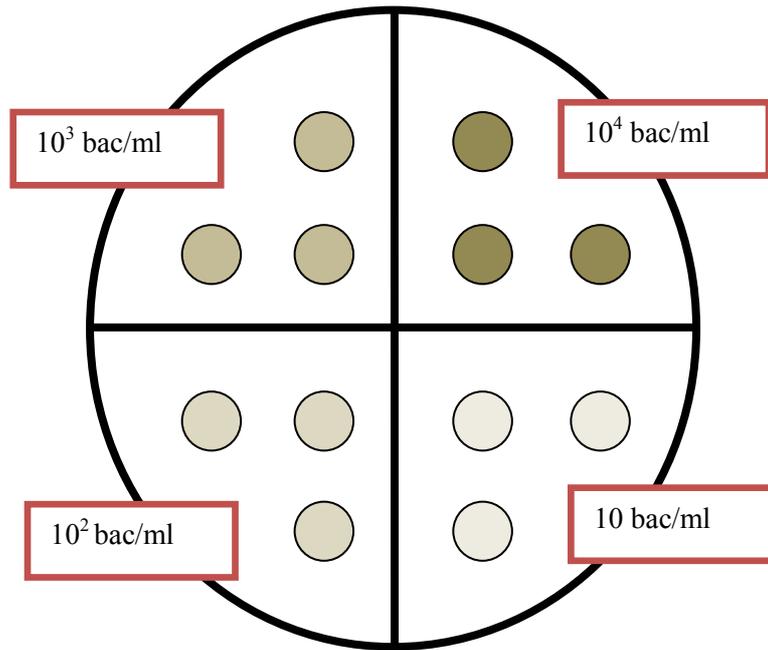


Figura 11: Esquema de plaqueamento das cepas após a diluição.

Para realizar o CCI, era necessário homogeneizar cada tubo de hemólise com a pipeta, começando do mais diluído para o menos diluído. Em cada quadrante era colocada três alíquotas de 30 µl de inóculo diluído.

Para a realização dos experimentos aqui descritos, utilizávamos a concentração de 10⁵ de bactérias, pois normalmente uma pessoa possui cerca de 1 x 10⁶ de leucócitos os quais cerca de 10% são monócitos (10⁵).

As placas eram armazenadas em *samples bag* (*Low Density Polyethylene* - Nalgene) aos pares e incubadas em estufa a 37°C com 5% CO₂, eram contadas após 14 dias e recontadas quando completavam 21 dias. Contadas todas as colônias da menor diluição, efetuávamos os cálculos a fim de sabermos a quantidade inoculada.

3.5 Avaliação da Atividade Microbicida das Amostras de Sangue Total (*Whole Blood Killing Assay*)

Este experimento foi aplicado nos pacientes com tuberculose pulmonar e em todos os controles, para assim termos uma melhor análise desta resposta.

A preparação dos isolados bacterianos e dos inóculos seguiram o mesmo protocolo apresentado anteriormente.

3.5.1 Culturas de sangue total

Para a realização das culturas de sangue total eram necessários microtubos devidamente identificados, um rotor do tipo rotisserie, sangue heparinizados, além é claro, dos inóculos preparados na proporção de 10^5 /ml.

Eram colocados 300 μ l de sangue total e 300 μ l de inóculo bacteriano dentro microtubos de 1,5 ml, em duplicata, pois seriam utilizados em dois tempos distintos. Estes por sua vez foram agitados em vórtex e colocados em rotação com o auxílio de uma rotisserie para microtubos.

Os microtubos foram incubados em estufa com 5% de CO_2 a 37°C durante 4 h, determinando o tempo zero (T0) e durante 72 h. O T0 era momento em que se iniciava a fagocitose dos macrófagos.

3.5.2 Lise e plaqueamento das culturas de sangue total

Passado o tempo de cultura, os microtubos eram retirados da rotisserie e colocados em centrífuga lacrada por 5 minutos a 13000 RPM, em seguida eram retirados 400 μ l do sobrenadante que foram estocados para pesquisas posteriores em relação à produção de citocinas.

Para podermos lisar as células e libertar as bactérias, eram adicionados 900 μ l de Água MILLI-Q estéril a cada microtubo de cultura de sangue total, assim eles eram agitados em vórtex por 30 segundos, ficando em repouso por 10 minutos, e por fim, eram agitados novamente em vórtex, para aumentar o sucesso da lise. Após a última agitação, os tubos eram centrifugados a 13.000 RPM durante 10 minutos.

Retirados da centrifuga, eram removidos e descartados 800 μ l do sobrenadante. Para poder plaquear cada amostra passou por uma diluição seriada, saindo de 10^5 de bactérias até 10^2 . Nesta diluição existe apenas uma diferença das anteriormente realizadas, ao invés de utilizar

RPMI 1640 utilizamos PBS+0,25% Tween-80 estéreis. Para realizar o plaqueamento, era seguido o mesmo protocolo de realização do CCI.

3.6 Avaliação da indução de células T reguladores e da indução da produção de citocinas em culturas de sangue total estimulados com isolados de *Mycobacterium tuberculosis*.

3.6.1 Culturas de sangue total

Para a realização deste ensaio foram utilizadas placas de 24 poços, sangue total coletado em tubos heparinizados do tipo BD *Vacutainer* e os inóculos preparados (descritos anteriormente). Os poços eram devidamente identificados. O experimento foi realizado em duplicata, sendo um poço utilizado para a realização da imunofenotipagem e o outro para obtenção do sobrenadante para a realização do *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). As placas de cultura também foram feitas em duplicata uma vez que teríamos dois tempos de cultura: 24 horas e 72 horas. Para a realização deste ensaio, utilizamos as seis cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (2220-S1, 885-S5, H37-Ra, H37-Rv, 3053-R3 e 669-R6), assim em cada poço demarcado para o ensaio eram colocados 500 µl de inóculo contendo 10^5 de bactérias e 500 µl de sangue total. Cada placa possuía dois poços controles nos quais continham 500 µl de sangue total e 500 µl de meio RPMI 1640.

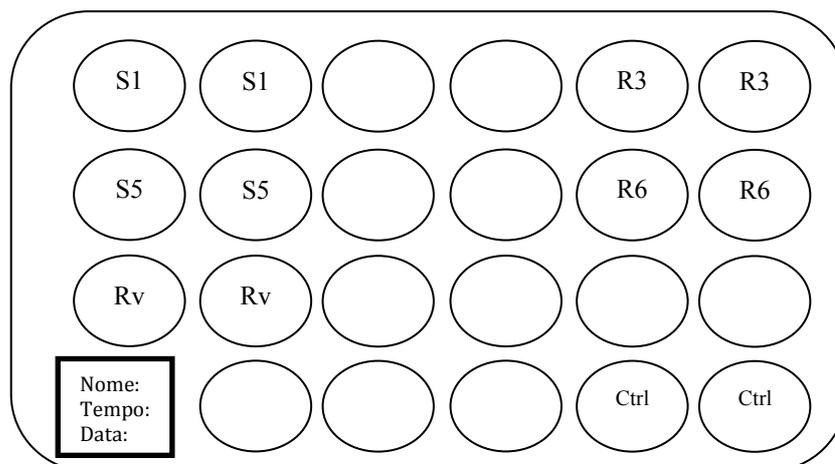


Figura 12: Disposição das amostras quanto a cepa/isolado clínico utilizado para.

As placas eram identificadas com o nome do paciente, data e tempo de cultura. Eram guardadas dentro de *sample bag* (Nalgene) de forma individualizada e acomodadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂.

Passado o tempo de cultura, as placas eram retiradas da estufa, o sobrenadante era retirado para realização do ELISA e as células para a imunofenotipagem. O sobrenadante era coletado em dois criotubos contendo informações quanto ao tempo de cultura, cepa, nome do paciente e data da coleta e congelados em *freezers* -70°C. Os poços destinados a imunofenotipagem eram homogeneizados e 200 µl de amostra eram coletados.

3.6.2 Imunofenotipagem

Neste estudo utilizamos como marcadores anticorpos adquiridos junto a BD e os utilizamos acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante.

3.6.2.1 Marcação dos Linfócitos T reguladores

Para a realização da caracterização das células T reguladores foram utilizados marcadores específicos para os receptores extracelulares CD4 e CD25 e para um marcador intracelular relacionado ao fator de transcrição nuclear *Foxp3*. Também realizamos marcação controle, utilizando marcadores específicos para imunoglobulinas de camundongo a fim de avaliar a ocorrência de ligações inespecíficas.

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.

<i>Tubos</i>	<i>Anticorpos</i>	<i>Marcadores</i>	<i>Clone</i>
Controle Isotípico	IgG-1	PE	P3
	IgG-2a	FITC	eBM2a
	IgG-2b	PE-Cy5	eBMG2b
Células T Reguladoras	CD4	PE-Cy5	RPA-T4
	CD25	FITC	BC96
	<i>FoxP3</i>	PE	236A/E7

A marcação para as células T reguladoras é realizada em duas etapas distintas. A primeira etapa, comum também para a realização do controle isotópico, é iniciada com mistura de 200 µl de amostra cultivada com 2 µl de cada anticorpo selecionado, exceto o anti-*FoxP3*, em tubos de polipropileno e incubados à 4° por 30 minutos.

Após a incubação, 1 ml de solução de Lise (*FACS Lysing Solution* – Becton Dickinson) diluída 10 vezes (1:10) foi adicionada cada um dos tubos, com a finalidade de lisar as hemácias. As suspensões foram homogeneizadas em vortex e incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz, homogeneizadas novamente em vortex, e em seguida centrifugados a 1.400 RPM durante 7 minutos. Ao fim deste processo, o sobrenadante era descartado cuidadosamente para que o *pellet* não se desprendesse do fundo. Caso fosse necessário, o processo de lise era repetido. Seguindo o protocolo, depois da lise das hemácias os *pellets* eram lavados com 2 ml de PBS a 1% gelado e centrifugados novamente a 1.400 RPM durante 7 minutos.

Passada a centrifugação, o sobrenadante era então descartado, nos tubos com o controle isotópico eram adicionados 300 µl de *Mac's Facs* (paraformaldeído 1%, cacodilato de sódio 1,08%, cloreto de sódio 0,67%), para fixar a marcação e eram guardadas em geladeira. Nos tubos para a marcação de Treg foi adicionado 100 µl de solução comercial de fixação adquirido da *eBioscience* (*IC Fixation Buffer - eBioscience*) eram armazenadas por meia hora em geladeira para assim darmos seguimento a segunda etapa da marcação.

A marcação intracelular era iniciada com a adição de 1 ml de solução comercial de permeabilização (*10x Permeabilization Buffer* – Becton Dickinson). Após a homogeneização, os tubos eram centrifugados a 1.400 RPM por 5 minutos. Novamente, o sobrenadante era descartado, em seguida foram adicionados 2 µl de anti-*FoxP3 PE* e 100 µl de solução de permeabilização. Os tubos eram re-incubados 30 minutos à 4°C para a permeabilização efetiva das membranas celulares. Após a incubação 1 ml de solução de permeabilização era adicionado, e em seguida os tubos eram centrifugados a 1.400 RPM por 5 minutos, o sobrenadante era descartado e 300 µl de solução de *Macs Facs*.

Em seguida, os tubos eram centrifugados a 1400 RPM por 5 minutos, o sobrenadante era descartado e adicionado 300µL de *Macs Facs* ao tubo.

3.6.2.2 Citometria de Fluxo

A leitura da marcação foi realizada por citometria de fluxo, seguindo todos os protocolos e após treinamento para a utilização do aparelho e do programa para aquisição de amostras *CellQuest Pro* (Becton-Dickinson). Após a marcação e leitura das amostras, os resultados eram analisados pelo CellQuest.

Primeiramente era realizado o gate no grupo celular de interesse, neste caso, a marcação foi realizada sobre a população de linfócitos. Normalmente as populações celulares aparecem bem definidas, exceto em alguns casos, o que facilita a identificação e consequentemente a sua marcação.

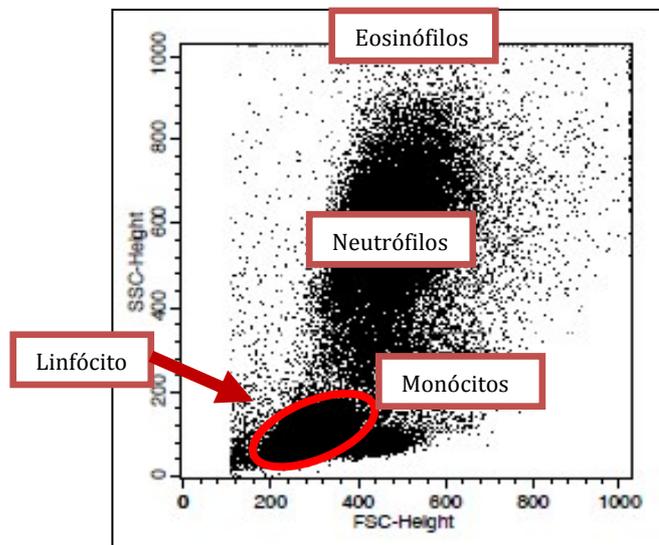


Figura 13: Disposição das populações de acordo com a granulosidade (SSC) e tamanho (FSC)

Marcada a população de interesse, estas células eram analisadas em um novo gráfico. Neste novo gráfico foi possível analisar a disposição deste conjunto celular de várias maneiras.

Seguindo a ordem dos tubos, o primeiro caso se referia à análise do controle isotópico. A utilização destes anticorpos tem como finalidade indicar existência de reações inespecíficas, uma vez que estes monoclonais são específicos para proteínas que não são expressas em células humanas.

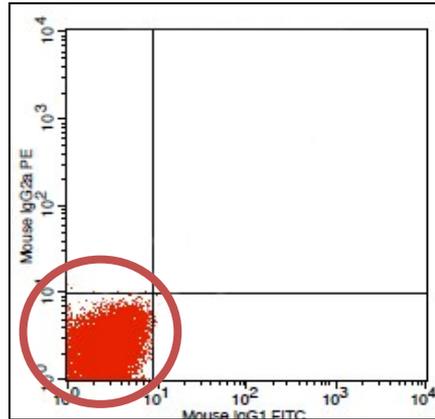


Figura 14: Representação do controle isotípico ideal, baixa presença de ligações inespecíficas.

No que diz respeito às células T reguladoras, os linfócitos foram plotados em um novo gráfico e separados por CD25 X CD4. As células T reguladoras possuem fenótipo $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$, o primeiro gráfico irá separar as células que apresentam $CD4^+CD25^{high}$.

Utilizando a ferramenta de marcação, dividimos o gráfico em quatro quadrantes (Q), então teremos divididas as células que expressão, $CD4^-CD25^+$ (Q1), $CD4^+CD25^+$ (Q2), $CD4^-CD25^-$ (Q3) e as $CD4^+CD25^-$ (Q4). No Q2 estão as células com características próximas das células T reguladoras, assim como é sabido a alta expressão de CD25 (em torno de 10^2) nos indica a possível presença destas células. No passo seguinte era realizada a criação de um novo *scatter*, mas para isso era criado um novo *gate* que abordava a região com alta expressão de $CD25^{high}$ e com presença de $CD4^+$ (R6). Este novo gráfico era utilizado para podermos quantificar a quantidade de eventos que possuíam a presença de $CD25^{high}$ e $FoxP3$.

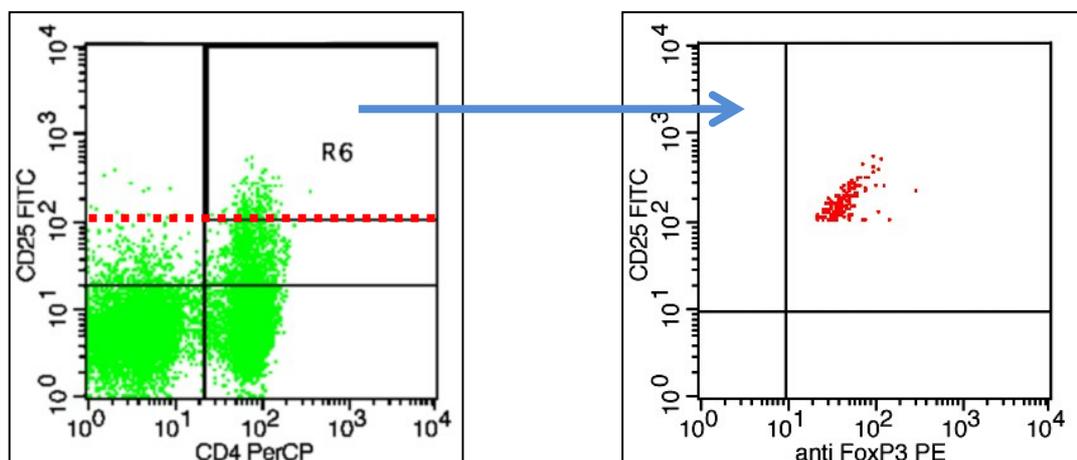


Figura 15: Separação das Tregs

3.7 Avaliação da capacidade de proliferação dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis* e dosagem de citocinas em culturas de CMSP com e sem presença de células T reguladoras.

Este ensaio se resume na estimulação bacteriana em culturas que possuem ou não a presença de células T reguladoras. Este experimento se torna muito importante na avaliação direta da regulação que as Tregs causam perante o estímulo. Foram estimuladas amostras de sangue periférico de pacientes controles (PPD positivo e negativo), pacientes diagnosticados com tuberculose sem tratamento.

3.8 Isolamento das Células Mononucleadas do Sangue Periférico (CMSP)

Inicialmente, foram transferidos 15 ml de sangue anticoagulado (tratados com EDTA) para um tubo de fundo cônico de polipropileno de 50 ml. O sangue era diluído 1:2 em 15 ml de PBS e homogeneizado por inversão, em outro tubo semelhante (50 ml) eram adicionados 15 ml de *Ficoll-Histopaque 1077* (SIGMA-Aldrich). O sangue foi transferido vagarosamente para o tubo contendo o *Ficoll-Histopaque 1077* (SIGMA-Aldrich) e assim o tubo é centrifugado a 1400 RPM por 30 minutos em temperatura ambiente e sem freio, neste caso para evitar que ocorra mistura entre as fases. Após a centrifugação temos a separação do plasma com seus constituintes (parte superior). Entre o plasma e o *Ficoll-Histopaque* ficam as células mononucleares, em uma fase semelhante a uma nuvem de cor branco-cinzenta. Abaixo ficam os eritrócitos e os granulócitos.

Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* estéril foi coletado as células mononucleares localizadas na interface *Plasma-Ficoll*, e transferidas para um novo tubo de fundo cônico de polipropileno de 50 ml. Em seguida as células foram lavadas através da adição de PBS 1X, gelado, pH 7.2, q.s.p. para o volume do tubo, e centrifuga. O tubo era centrifugado a 1.200 RPM por 10 minutos. O sobrenadante era descartado e o processo de lavagem repetido mais duas vezes.

Ao final do processo as células foram ressuspensas em um volume conhecido de RPMI 1640 suplementado (10 ml) e eram contadas em câmara de Neubauer. Após o cálculo as células eram divididas em dois tubos, sendo um mantido como controle intacto e o outro onde seriam depletadas as células Tregs. Após a contagem, a concentração de células

mononucleadas era ajustada para 10^6 células/ml, tendo sido padronizado a uma frequência de 10% para MΦ.

Foram seguidas as recomendações de deixar as células em gelo ou geladeira para que fossem minimizadas as ligações inespecíficas com os anticorpos.

3.9 Depleção celular de células T reguladoras

As amostras de CMSP foram submetidas ao ensaio de depleção. Foi utilizado para a realização do ensaio o *Mini & MidiMACS Starting Kit (MS, LD columns)* e *CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec GmbH – Germany) conforme as orientações do fabricante.

3.9.1 Depleção de linfócitos T CD4⁺CD25⁺

Depois de separadas as células T CD4⁺CD25⁻ das células T CD4⁺CD25⁺ era iniciado a depleção. Os volumes dos reagentes abaixo são indicados para uma concentração celular até 10^7 . Antes do início do procedimento as células T CD4⁺CD25⁺ eram centrifugadas a 1.400 RPM durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado.

3.9.1.1 Marcação bio-magnética de células CD4⁺

O primeiro passo da depleção é a separação das células CD4⁺ das demais, para isso o pellet de células era suspenso em 90 µl de tampão de depleção (1,25 g BSA + 0,28 g EDTA para 250 ml) para cada 10^7 de células.

Eram adicionadas 10 µl de CD4⁺ T Cell Anti-Biotin *MicroBeads* (Miltenyi Biotec) e em seguida as células eram incubadas por 10 minutos em geladeira. Passados 10 minutos 20 µl de *Anti-Biotin MicroBeads* eram adicionados, e o tubo era incubado por mais 15 minutos em geladeira.

Passado este tempo eram adicionados 1,5 ml de tampão de depleção. As amostras eram centrifugadas a 1.400 RPM por 10 minutos, o sobrenadante era descartado e as células eram ressuspensas em 500 µl de tampão.

3.9.1.2 Depleção das células CD4⁺

Para a realização da depleção foram utilizadas as colunas de separação *LD MACS Separation Columns*. Enquanto as células eram centrifugadas por 10 minutos, a coluna era acoplada ao separador magnético *MidiMACS* e em seguida era lavada com 2 ml de tampão de depleção.

Após a lavagem, a suspensão das células era aplicada à coluna e então se realizava a depleção. As células CD4⁺ ligadas aos anticorpos presentes na superfície dos *beads paramagnéticos* ficam retidas no campo magnético do separador. O filtrado era recolhido e a coluna era lavada três vezes com 1 ml de tampão, sempre tomando o cuidado para não forçar a passagem e assim liberar as células aderidas ou para não lisarem as mesmas por excesso de pressão positiva.

Depois de lavada o tubo recolhedor de amostra era mudado e a coluna retirada do separador magnético. A coluna era lavada novamente três vezes com 1 ml de tampão, realizando assim a recuperação das células CD4⁺.

3.9.1.3 Marcação magnética de células CD25⁺

A suspensão contendo as células CD4⁺ foi centrifugada a 1.400 RPM por 10 minutos, sendo seu sobrenadante descartado. As amostras foram novamente suspensas com 90 µl de tampão de depleção e 10 µl de *MicroBeads CD25* (Milteny Biotec) homogeneizadas por inversão e incubadas à 4°C por 15 minutos. Decorrido o tempo de incubação, as células eram lavadas com 2 ml de tampão de depleção e centrifugadas a 1.400 por 10 minutos.

3.9.1.4 Seleção positiva de células CD25⁺

A coluna MS Macs Separator Columns foi selecionada para a realização da parte final do ensaio. A coluna era lavada com 500 µl de tampão de depleção antes de a amostra ser colocada. Após amostra ser passada pela coluna e esta era lavada três vezes com 500 µl de tampão, em seguida a coluna era removida do suporte magnético e novamente lavada, o que levava ao descarte das células CD25⁺. Para aumentar a pureza, a fração coletada era passada novamente pela coluna.

3.9.2 Cultura, Lise e Plaqueamento das culturas de CMSPs.

O processo de cultura, lise e plaqueamento seguiu o mesmo protocolo do ensaio anterior.

3.9.3 Detecção e quantificação de citocinas

Foi utilizado o método de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) de acordo com o manual do fabricante.

3.9.3.1 Ensaio Imunoenzimático:

Para o ensaio imunoenzimático, foi utilizado o kit da *eBioscience ELISA Ready-SET-Go!*. O kit era composto por:

- Solução *Coating buffer 10x*, para sua utilização era necessário proceder com a diluição: 1,5 ml de *Coating buffer 10x* em 13,5 ml de água deionizada.
- Anticorpo de captura (AC) 250X: 48 µl de AC em 12 ml de *Coating buffer 1X*.
- *Assay Diluent 5X* (AD): 10 ml AD 10X em 40 ml de água deionizada.
- Padrão de citocinas recombinantes (*Top Standards, TS*):
 - IL-10 (300 pg/mL): 3 µl de IL-10 TS em 10 ml de AD

- IL-17A (500 pg/mL): 2,5 µl de IL-17A TS em 5 ml de AD
 - IL-23 (2000 pg/mL): 10 µl de IL-23 TS em 5 ml de *Sample diluente* (Fornecido no Kit).
 - IFN- γ (500 pg/mL): 2,5 µl de o IFN- γ TS em 5 ml de AD
 - TGF- β (8000 pg/mL): 10 µl de o TGF- β TS em 1,25 ml AD
- Anticorpo de detecção (AbD) 250X: 24 µl de Ab em 6 ml de AD
 - Enzima Avidina-*Horseradish peroxidase* (HRP) 250X: 24 µl de Avidina-HRP em 6 ml de AD.
 - Solução de substrato, a Tetrametilbenzidina (TMB) 1x.

Foram dosados por este método a seguintes citocinas: IL-10, IL-17A, IL-23, IFN- γ e TGF- β . Cada Kit possui seus anticorpos de captura e detecção específicos. Os volumes apresentados acima se referem aqueles utilizados para a realização de detecção em apenas uma placa.

Utilizamos placas de poliestireno de alta afinidade (COSTAR 9018 - Corning Life Sciences) de 92 poços, 100 µl de solução AC diluído em coating buffer 1x foi adicionado a cada poço, em seguida a placa foi selada e incubada à 4°C overnight. Após a incubação, os poços foram lavados cinco vezes com 300 µl/poço com solução de lavagem (PBS 1X, 0,05% Tween 20), entre cada lavagem era respeitado o tempo de um minuto (“Tempo de molho”). Terminada as lavagens a placa era vertida em papel absorvente a fim de remover resíduos da solução de lavagem. Terminada a etapa de lavagem, a placa era submetida ao processo de bloqueio e para isso, foram adicionados 200 µl/poço de AD 1X e assim terminada a aplicação, a placa era incubada por uma hora em temperatura ambiente.

Passado o tempo de incubação a placa era novamente lavada, seguindo o processo descrito anteriormente. Para os testes de IL-10, IL-17A, IL-23 e IFN- γ foram adicionados 50 µl de amostra em cada poço, reservando duas colunas para a aplicação dos padrões (TS). O TS era submetido a sete diluições seriadas, realizadas em tubos do tipo eppendorf, cada diluição era aplicada em duplicata e o branco (apenas AD1x) era aplicado na coluna que sobrava.

Terminada esta etapa, as placas poderiam ser incubadas por duas horas em temperatura ambiente ou incubadas à 4°C overnight. Em nossos experimentos utilizamos a segunda opção, uma vez que o fabricante afirmava o aumento da sensibilidade do teste.

Para realizar o ensaio do TGF- β era necessário à realização de duas etapas antes de aplicar as amostras. Uma era a acidificação com 10 μ l de HCl 1N (0,411 ml de HCl P.A. em 1,25 ml de água deionizada; completando com água deionizada q.s.p. para 5mL) para a ativação do TGF- β , as amostras eram incubadas em temperatura ambiente durante dez minutos e em seguida eram neutralizadas com 10 μ l de NaOH 1N (0,264 ml de solução estoque de NaOH em 1,25 ml de água deionizada; completando com água deionizada q.s.p. para 5 ml). Além do branco, era aplicado 50 μ l de meio de cultura (RPMI completo), pois este continha soro fetal bovino que poderia conter níveis altos de TGF- β latente.

Terminada a incubação, a placa era novamente lavada seguindo as mesmas etapas já descritas anteriormente e assim era adicionado 50 μ l/poço de AbD diluído seguida de incubação por uma hora em temperatura ambiente. Passada a incubação a placa era novamente lavada e ao término eram adicionados 50 μ l/poço de Avidina-HRP diluída e incubada por meia hora em temperatura ambiente.

Após meia hora a placa era lavada novamente, por sete vezes com tempo de molho de 1 a 2 minutos em seguida eram adicionados 50 μ l/poço de substrato, sendo incubada novamente por 15 minutos.

Para finalizar o experimento era utilizado H₃PO₄ 1M ou H₂SO₄ 2N, tal solução é denominada de *stop solution*. Para o preparo de H₃PO₄ 1M, fora utilizado 3421 μ l de H₃PO₄ P.A., diluído em 12,5 ml de água deionizada. Após a diluição o volume era ajustado para 50 ml com água deionizada.

Foram adicionados 25 μ l/poço de *stop solution*, seguido de leitura em espectrofotômetro utilizando a diferença entre os comprimentos 570 nm e 450 nm. Os valores obtidos como padrão foram utilizados para a construção da equação da reta. Os resultados das amostras foram submetidos à equação da reta e de seus resultados foram subtraídos dos valores dos controles das amostras, retirando assim qualquer interferente relacionado às citocinas basais.

3.9.4 Dosagem da produção de Óxido Nítrico (NO)

Para a realização da dosagem de NO, foi usado o método de *Griess*. Para tal realização foi utilizado um volume de 50 µl de amostra mais 50 µl de solução de *Griess*. A Solução de *Griess* é composta de duas outras soluções:

- Solução A (para 25 ml)
 - 0,025 g de naftil-etilenodiamina
 - 25 ml de H₂O miliQ
- Solução B (para 25 ml)
 - 0,25 g de sulfanilamida
 - 1,25 ml de ácido fosfórico (H₃PO₄)
 - 23,75 ml de H₂O miliQ.

Em cada poço da placa eram adicionados 50 µl de amostra mais 50 µl de solução de *Griess* (Solução A + B (1:1)), para o branco da placa era utilizado 50 µl de RPMI completo mais a Solução de *Griess*.

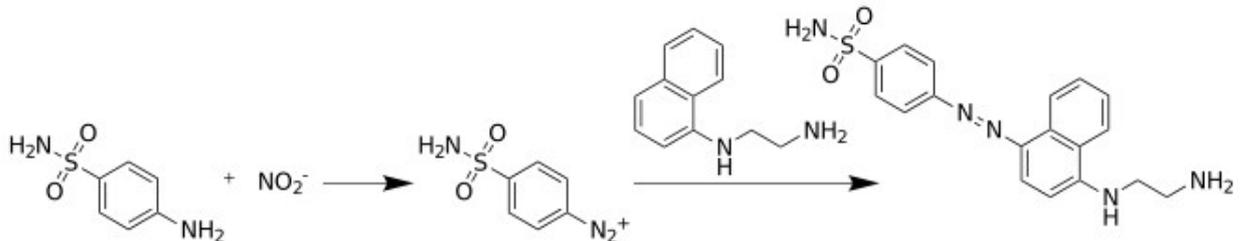


Figura 16: Reação do Griess, radicais de óxido nítrico reagem com ácido sulfanílico formando sais de diazônio. Reação do sal de diazônio com agente alfa-naftilamina.

Para realização da curva padrão era utilizado 50 µl de nitrito de sódio (NaNO₂) mais 50 µl de solução de Griess .

- NaNO₂ 50 mM (25 ml)
 - 0,086225 g de NaNO₂
 - 25 ml de H₂O miliQ.

A curva padrão era diluída na proporção de 1:2.

3.9.5 Ensaio de Fagocitose

Para a realização do ensaio de fagocitose, foram utilizadas amostras de CMSP de indivíduos PPD- e PPD+. O CMSP obtido da mesma forma que foi explicado anteriormente e assim que era realizada a contagem das células mononucleares, eram adicionados 200 μ L em um poço da *Chamber Slide (Chamber Slide System 178599 16 well glass slide - Lab-Tek (Part Of Thermo Fisher Scientific))*. As amostras foram incubadas em estufa por quatro dias, para que os monócitos se aderissem a lamina. Após o tempo de incubação o sobrenadante era retirado e infectado com 200 μ l de solução bacteriana com concentração de (10^5 bac/ml). Para este experimento foram utilizados a cepa H37-Rv e o isolado R6.

As amostras foram incubadas por 4 e 24 horas. Após as 4 e 24 horas, o sobrenadante era retirado e as Chambers Sliders eram fixadas em estufa a 37°C por 72 horas. Passada às 72 horas de fixação, as lâminas eram coradas pelo método de Ziehl Neelsen.

A coloração de Ziehl Neelsen foi realizada seguindo o procedimento padrão: A lâmina era coberta por fucsina fenicada durante 5 minutos. Após este tempo era lavada rapidamente com água, em seguida era utilizado uma solução de álcool-acido para realizar a descoloração, esta etapa durava um minuto e em seguida a lâmina era lavada novamente. Por fim era adicionado azul de metileno por um minuto e em seguida a lâmina era lavada e colocada para secar. As lâminas preparadas foram contadas em microscópio ótico em aumento de 100x com o auxílio de óleo de imersão.

3.10 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o Teste T pareado para as análises dentro dos grupos relacionadas ao tempo de experimento e o teste T não pareado para relações intergrupos. Os dados com $p < 0,05$ foram considerados significantes. Para a os dados do ensaio de ELISA foi utilizado o Excel para confecção da equação da reta e do cálculo referente às concentrações encontradas, a análise estatística foi realizada pelo *GraphPad Prism 5*.

3.11 Considerações éticas

Todos os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. A aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico (CEP) foi obtida em 25 de maio de 2011, registro nº. 080/11.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Características das Cepas Utilizadas.

Neste estudo utilizamos as amostras de *M. tuberculosis* H37Ra, H37Rv, 2220-S1, 885-S5, 053-R3 e 669-R6, sendo que as duas primeiras são cepas padrão ATCC (American Type Cell Collection) e os demais isolados clínicos caracterizados pelo Dr. Moises Palaci e utilizados em outros estudos conduzidos no Núcleo de Doenças Infecciosas. A Tabela abaixo resume as características destes isolados.

Tabela 2: Informação sobre a procedência, subtipo e perfil de resistência a drogas anti-tuberculose dos isolado de *M. tuberculosis*

RFLP ^a	Espécie ^b	Baciloscopia ^c	Nº Isolado	CIM (µ/mL) ^d				
				INH	RMP	PZA	EMB	SM
S1	Escarro	Positivo	59502220	< 0,1	< 2,0	< 100,0	< 2,5	< 2,0
S5	Escarro	Positivo	59400885	< 0,1	< 2,0	< 100,0	< 2,5	< 2,0
R3	Escarro	Positivo	59803053	4,0	32,0	> 900,0	< 2,5	> 128,0
R6	Escarro	Positivo	59800669	> 4,0	> 32,0	< 100,0	< 2,5	< 2,0

Legenda 1: (a) Subtipos genéticos do *M.tuberculosis* caracterizados pela técnica de RFLP-IS6110; (b) Origem da amostra do isolado; (c) Resultado do exame de baciloscopia (positiva ou negativa) no momento da consulta inicial; (d) Concentração inibitórias mínimas das seguintes drogas: Isoniazida (INH), Rifampicina (RMP), Pirazinamida (PZA), Etambutol (EBM) e Estreptomicina (SM) (CAMPANA, 2010).

As amostras foram selecionadas de acordo com as informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais, assim foram estratificadas em dois grupos: Um formado por cepas multidrogas resistentes (dois isolados: 0530-R3 e 0669-R6) e outro formado por cepas sensíveis as drogas antituberculose (dois isolados: 2220-S1 e 0885-S5).

4.2 Caracterização das amostras biológicas:

As amostras biológicas, sangue total e células mononucleares do sangue periférico utilizadas em nosso estudo foram selecionados de acordo com o protocolo descrito anteriormente na

seção Material e Métodos (páginas 40-41). Foram coletadas amostras de indivíduos PPD-(n=13), de PPD+ (n=13), e de pacientes com TB pulmonar (n=11).

Tabela 3: Descrição das amostras utilizadas no estudo.

Amostras	N	Sexo	Idade (mediana+/- DP)
PPD-	3	Masculino	31 (+/-10,66)
	10	Feminino	26,5 (+/-5,10)
PPD+	4	Masculino	29 (+/-6,22)
	9	Feminino	30 (+/-9,77)
TB	6	Masculino	39 (+/-8,56)
	5	Feminino	28 (+/-6,55)

4.3 Atividade Microbida em Amostras de Sangue Total do Grupo PPD- é Significativamente Maior do que as Encontradas para os Grupos PPD+ e TB.

Sabe-se que na tuberculose, do momento da exposição/infecção ao surgimento da doença, a imunidade inata e a adaptativa atuam em sinergismo. Com o objetivo de avaliarmos a capacidade microbida dos indivíduos frente à exposição ao MTB, realizamos o ensaio de Atividade Microbida no Sangue Total (Whole Blood Killing Assay - WBKA). Culturas de sangue total foram estabelecidas utilizando-se amostras de cada um dos indivíduos (PPD+ e PPD-) e pacientes (TB), as quais foram incubadas por 72 horas com cada uma das seguintes cepas/isolados: H37Rv, S1, S5, R3 e R6.

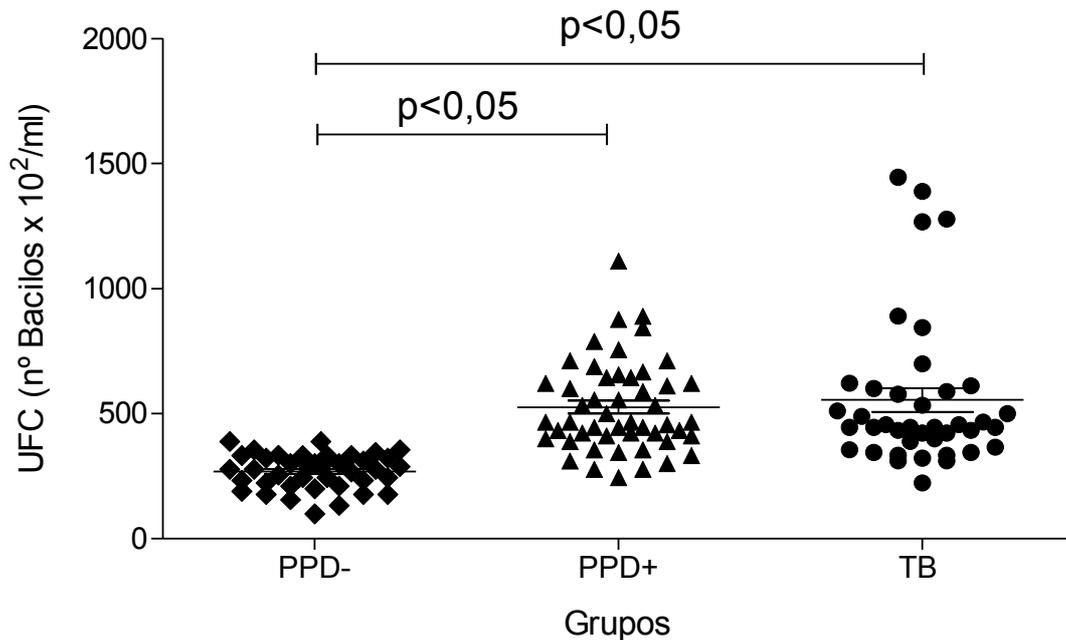


Figura 17: Análise quantitativa do número de unidades formadoras de colônias (UFC) a partir de ensaios WBKA em amostras de sangue total de indivíduos PPD- (n=10), PPD+ (n=10) e pacientes com TB (n=11). Resultados de cada um dos grupos refletem as UFCs encontradas, após 72hs de incubação, para as diferentes cepas e isolados utilizadas em cada um dos grupos analisados

Dados do experimento de WBKA demonstram que após 72h, a atividade microbicida do grupo PPD- foi significativamente maior ($p < 0,005$) à dos demais grupos (Figura 17). Considerando-se que indivíduos PPD+ e TB foram expostos anteriormente e, portanto já possuem uma memória imunológica contra o MTB, esperávamos um resultado oposto ao encontrado, onde os indivíduos PPD+ e pacientes apresentassem uma maior atividade microbicida frente ao bacilo.

Como o resultado apresentado considerou a atividade microbicida de cada um dos grupos contra todas as cepas/isolados utilizados, decidimos verificar se tal agrupamento das cepas/isolados poderia ter afetado de alguma forma o resultado encontrado. Portanto procedemos a uma análise que considerava a estratificação dos resultados obtidos para cada cepa/isolado versus os grupos estudados (Figura 18).

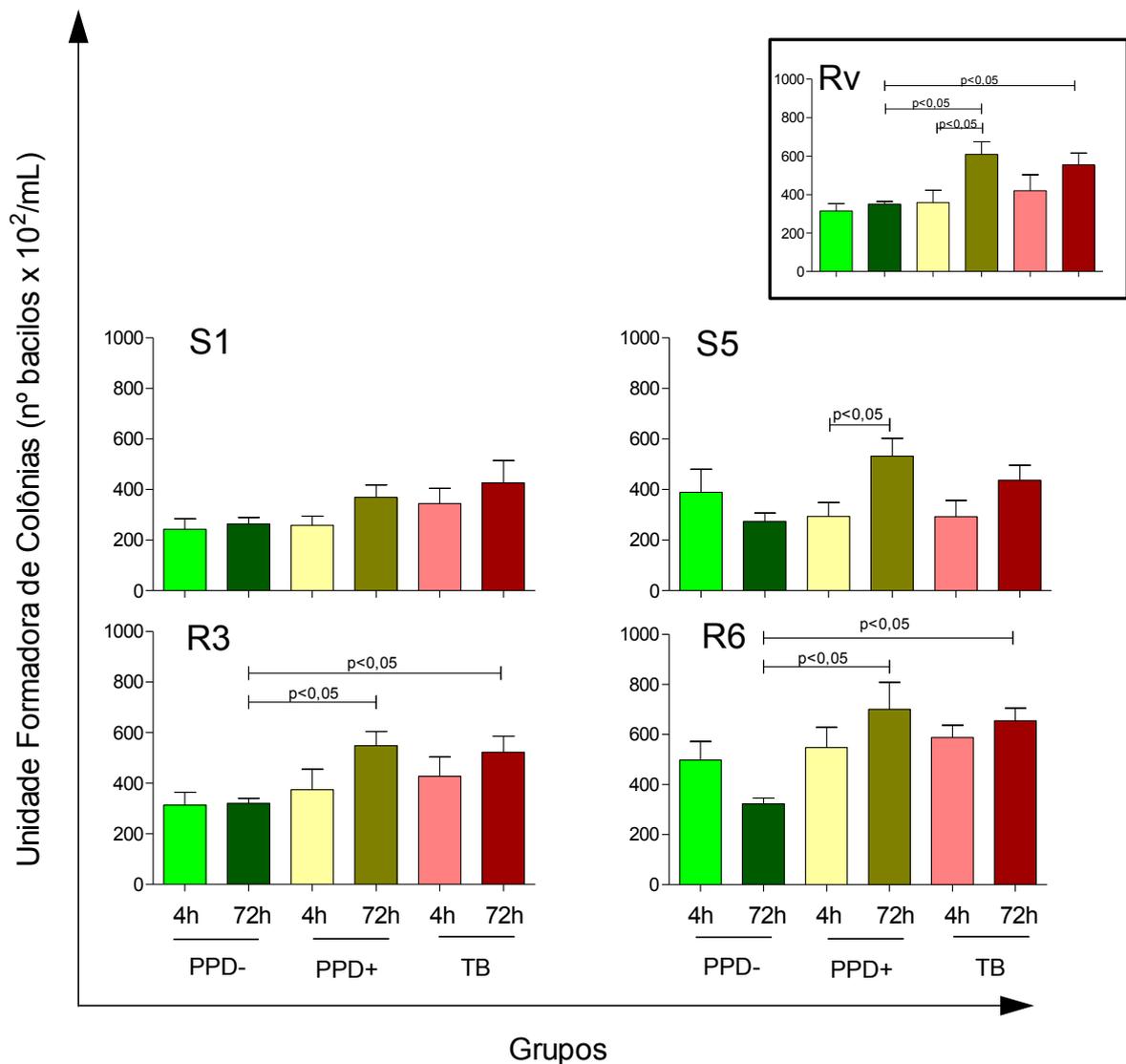


Figura 18: Análise quantitativa do número de unidades formadoras de colônias a partir de ensaios WBKA em amostras de sangue total de indivíduos PPD-, PPD+ e pacientes com TB individualizado por cepa/isolado. Resultados de cada um dos grupos refletem as UFCs encontradas por tempo de incubação e cepa/isolado utilizado.

A análise estratificada dos dados confirmou o melhor desempenho microbicida apresentado pelo grupo PPD- em comparação aos demais, independente da cepa/isolado utilizados, com exceção para cepa S1, cujos resultados foram similares entre todos os grupos estudados.

A atividade microbicida frente ao tempo de incubação (4 x 72 horas) por cepa/isolado para cada um dos grupos estudados também foi avaliada (Figura 19). Como esperado a atividade microbicida em amostras de sangue total foi semelhante nos três grupos durante a exposição por quatro horas; porém após 72 horas, os grupos PPD+ e TB apresentavam uma atividade microbicida significativamente inferior àquela observada entre os indivíduos PPD-. Esses dados sugerem que a diferença observada depende de um período de incubação maior para que os mecanismos envolvidos na atividade microbicida possam ser ativados.

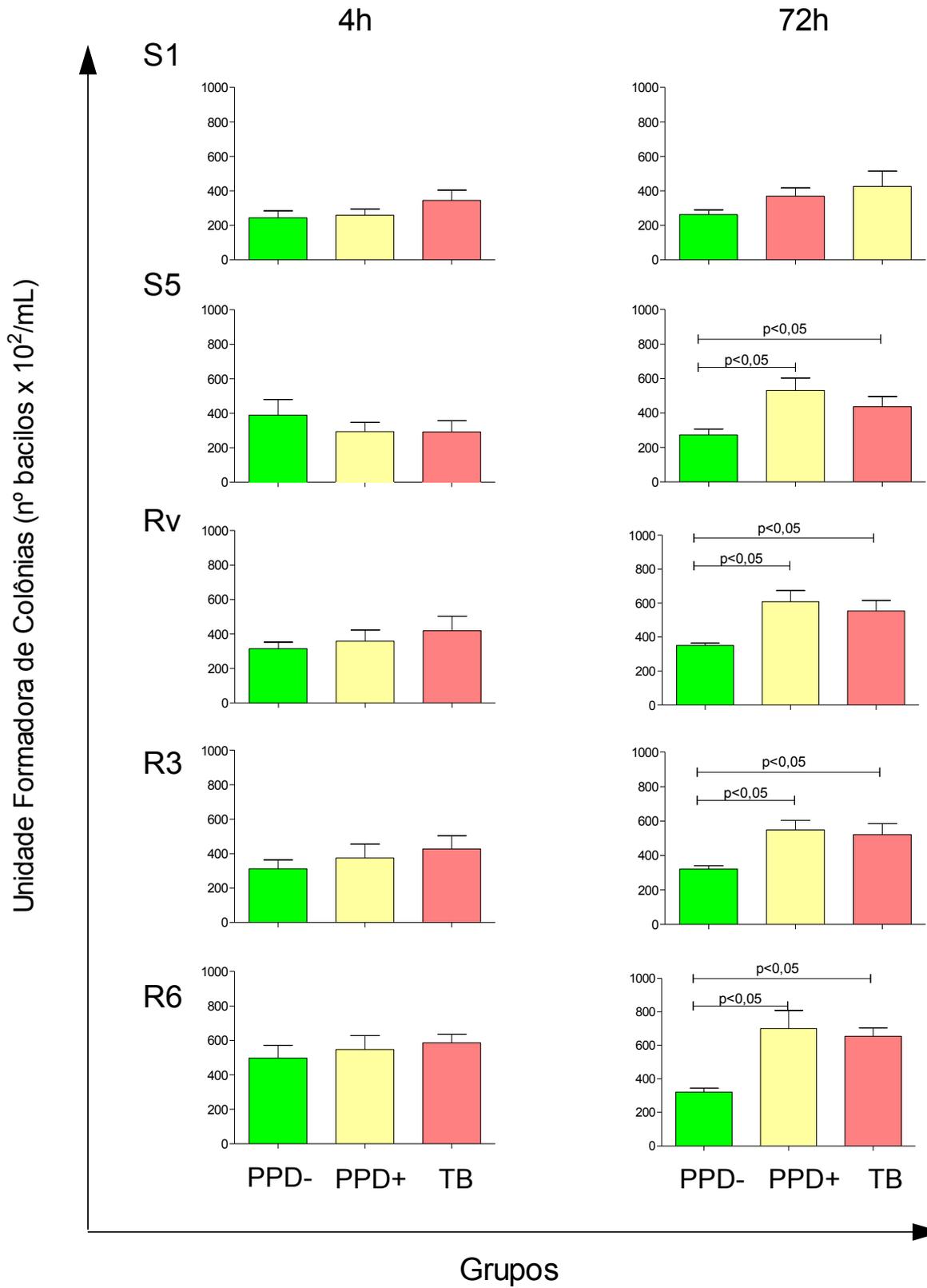


Figura 19: Análise quantitativa do número de unidades formadoras de colônias estratificadas por cepas/isolados e tempo de exposição durante ensaios de WBKA nos grupos PPD-, PPD+ e TB.

Como podemos explicar a diminuição na atividade microbicida observada nos grupos PPD+ e TB? Estaria ela relacionada a alguma alteração na atividade fagocitária de macrófagos *in vitro*?

4.4 Atividade Fagocitária *in vitro* nos Grupos PPD- e PPD+ são semelhantes e independentes da cepa/isolado utilizado.

Considerando-se que: 1) os grupos PPD+ e TB apresentaram uma atividade microbicida estatisticamente similar, e 2) que os experimentos de fagocitose implicam em contagem de todos os campos ao microscópio ótico, decidimos avaliar a atividade fagocitária em amostras de indivíduos PPD- e PPD+. Neste ensaio foram utilizados para cada grupo amostras de cinco indivíduos incubadas com a cepa padrão H37Rv ou com o isolado virulento multidroga-resistente R6. Este ensaio foi realizado em dois tempos de incubação: quatro horas e 24 horas.

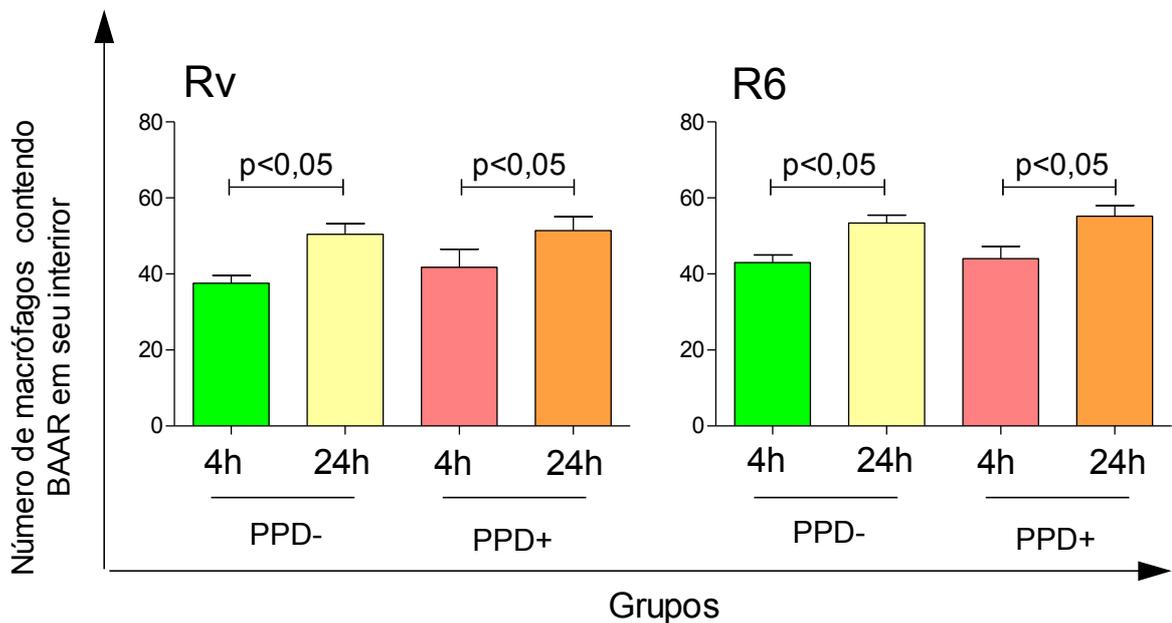


Figura 20: Ensaio de fagocitose *in vitro* utilizando amostras de indivíduos PPD- e PPD+ após incubação por 4 ou 24 horas com a cepa H37Rv ou com o isolado R6. Dados representados refletem o número total de células contendo em seu interior bacilos álcool-ácido.

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos, independente da cepa/isolado e/ou tempo de incubação utilizados. Estes resultados sugerem que as diferenças observadas anteriormente na atividade microbicida (Figuras 17, 18, e 19) não foram provocadas por alterações na atividade fagocitária dos grupos pré-expostos ao bacilo (PPD+ e TB).

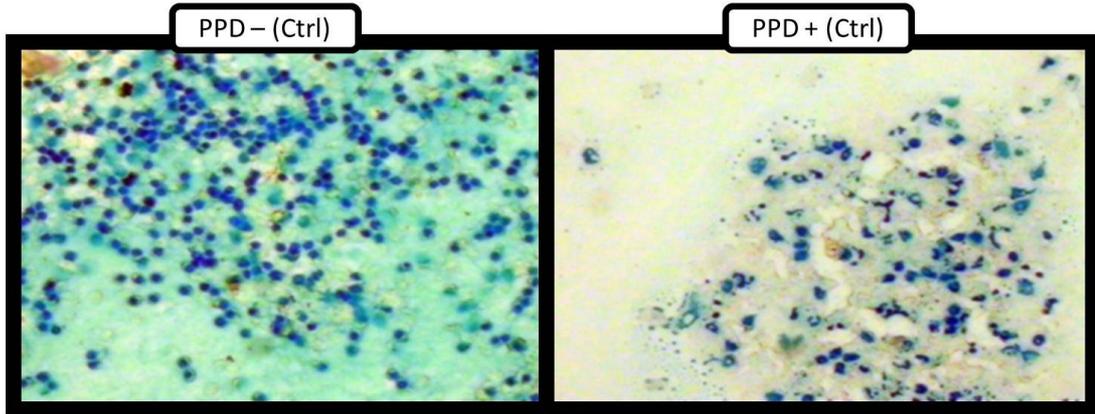


Figura 21: Imagens relacionadas ao ensaio fagocitário de indivíduos PPD- e PPD+. Poço controle no aumento de 100x.

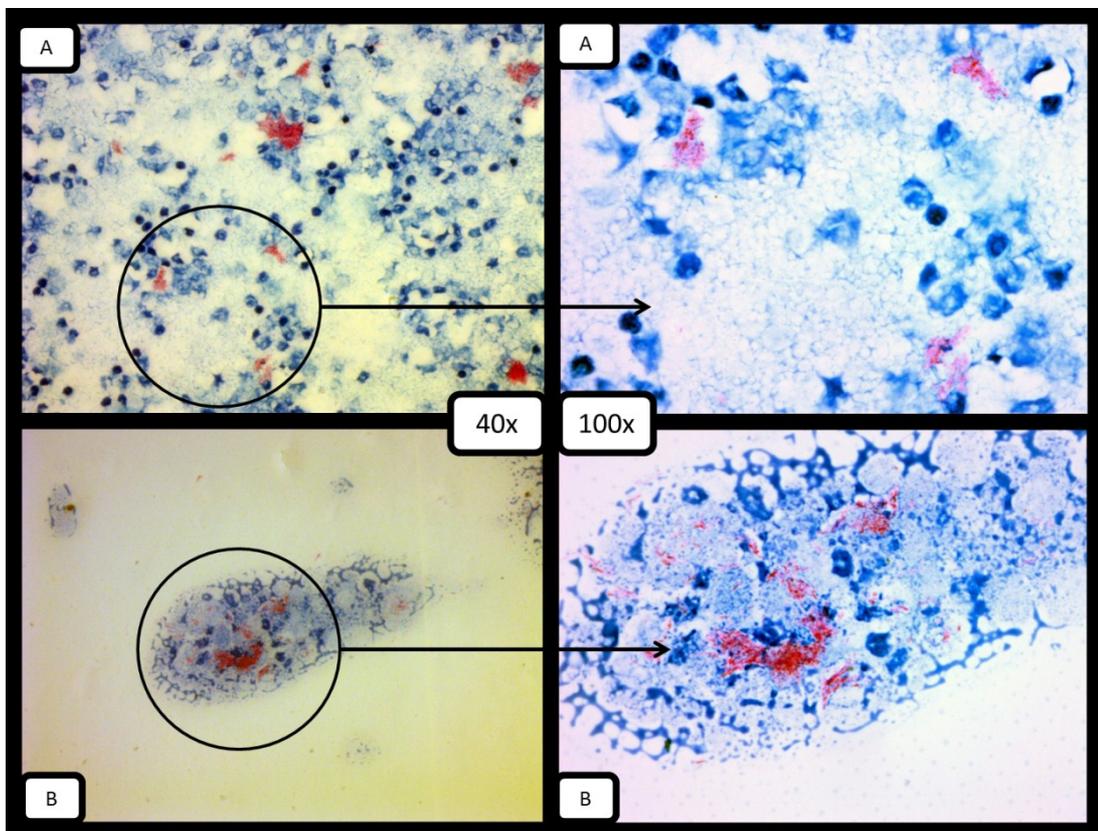


Figura 22: Ensaio de fagocitose, no tempo de 4 horas. A figura acima apresenta os aumentos de 40x e 100x. (A) Indivíduo PPD+ comparado com (B) indivíduo PPD- infectados com a cepa H37-Rv.

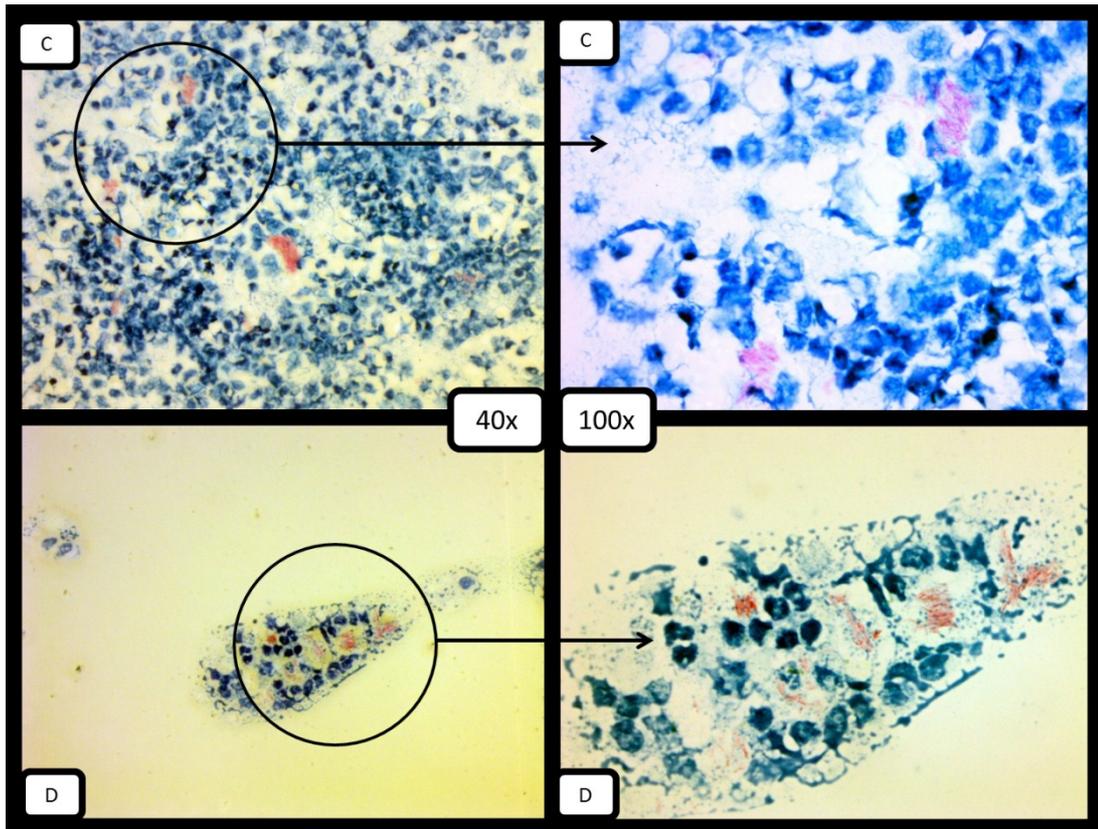


Figura 23: Ensaio de fagocitose, no tempo de 4 horas. A figura acima apresenta os aumentos de 40x e 100x. (C) Indivíduo PPD+ comparado com (D) indivíduo PPD- infectados com o isolado clínico 669-R6.

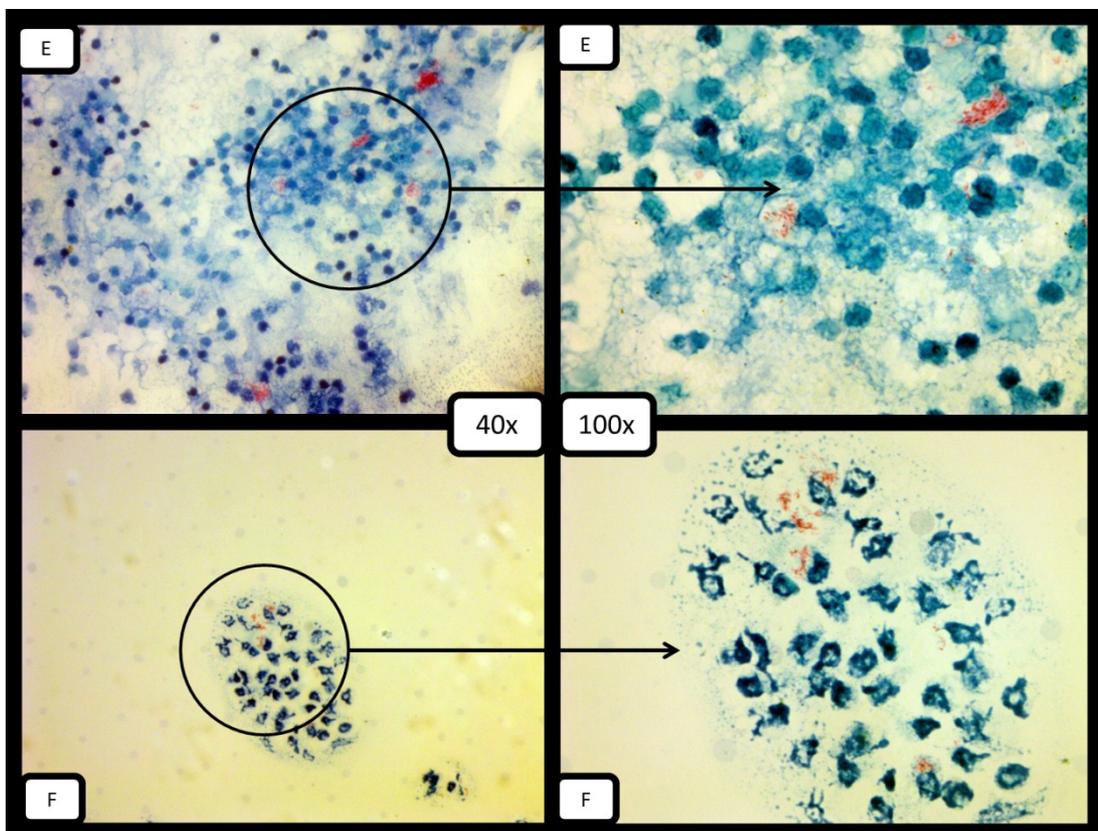


Figura 24: Ensaio de fagocitose, no tempo de 24 horas. A figura acima apresenta os aumentos de 40x e 100x. (E) Indivíduo PPD+ comparado com (F) indivíduo PPD- infectados com a cepa H37-Rv.

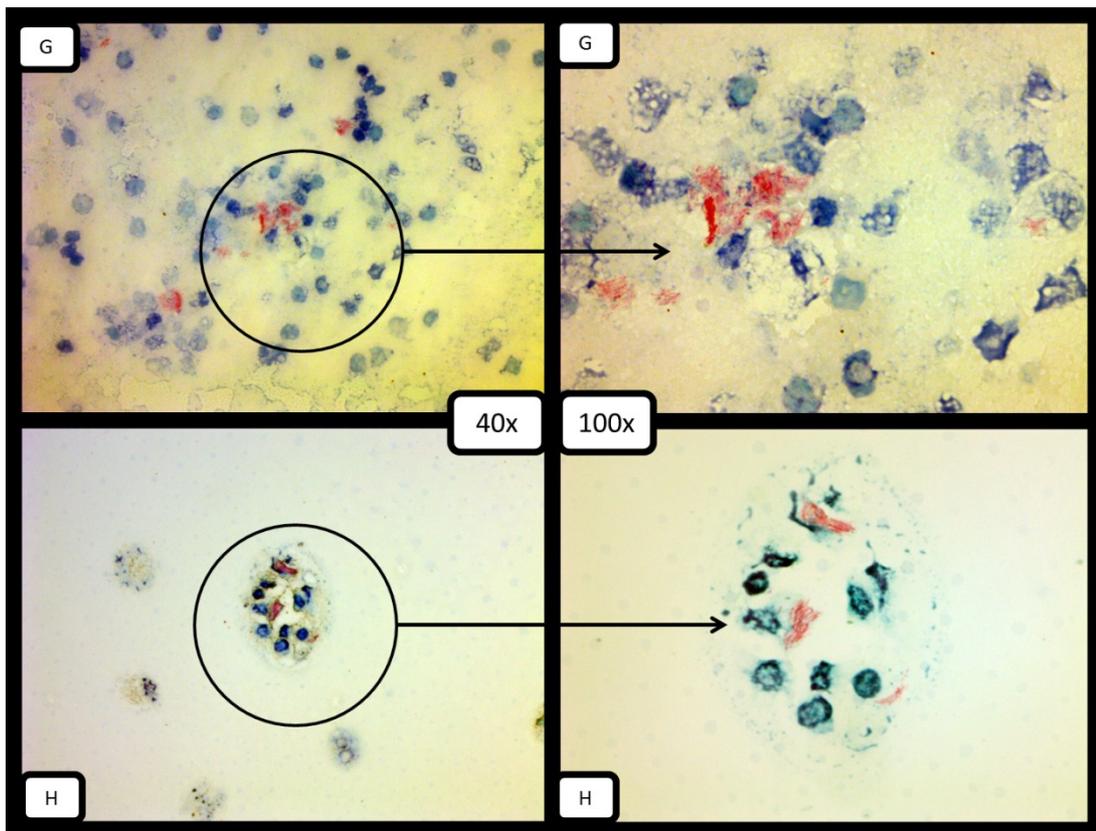


Figura 25: Ensaio de fagocitose, no tempo de 4 horas. A figura acima apresenta os aumentos de 40x e 100x. (G) Indivíduo PPD+ comparado com (H) indivíduo PPD- infectados com o isolado clínico 669-R6.

Considerando-se que diferenças na atividade microbicida não estavam relacionadas a alterações na atividade fagocitária, decidimos avaliar se estes grupos apresentavam alterações na produção de óxido nítrico?

4.5 Produção de Óxido Nítrico nos Grupos Estudados foi Semelhante.

A produção de óxido nítrico foi avaliada em amostras de sobrenadantes de culturas de sangue total de indivíduos PPD- e PPD+ (n=6/grupo) e pacientes com TB (n=6) através da técnica de Griess, conforme descrito anteriormente. Neste experimento foram utilizados apenas os sobrenadantes de cultura de 24 horas.

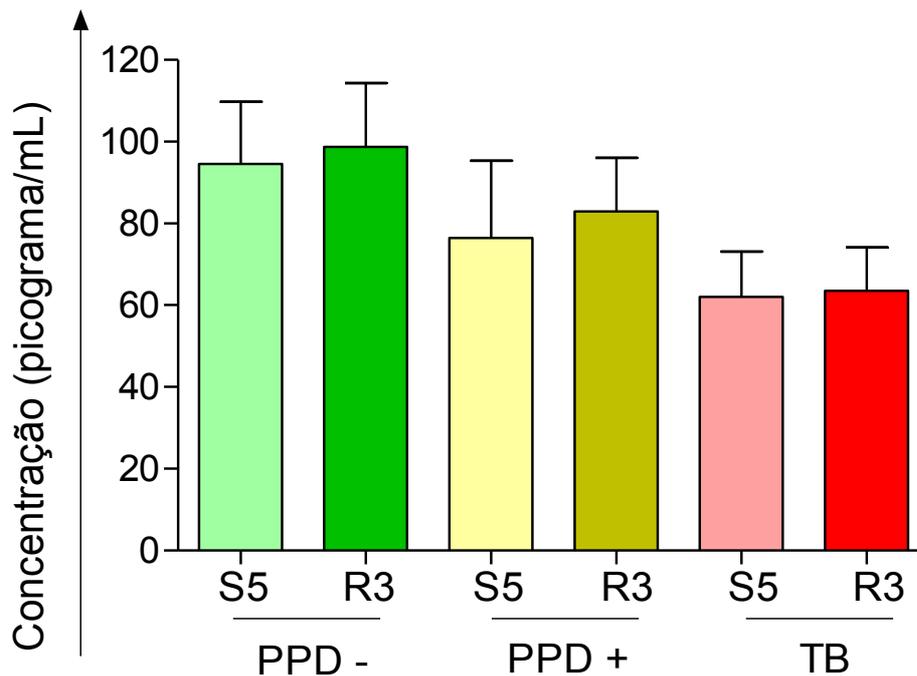


Figura 26: – Análise quantitativa da produção de radicais de óxido nítrico em sobrenadantes de cultura de sangue total de indivíduos PPD- e PPD+ e pacientes com TB incubadas com os isolados S5 e R3 por 24 horas.

Apesar de uma tendência para diminuição da produção de óxido nítrico ter sido observado nos grupos PPD+ e TB, quando comparados ao grupo PPD-, essa redução não foi significativa, independente do isolado utilizado.

Quando somados os resultados apresentados até aqui sugerem que os grupos PPD+ e TB apesar de possuírem atividade fagocitária e produção de óxido nítrico similar às observadas para o grupo PPD-, apresentam uma diminuição na sua atividade microbicida. Esses dados sugerem que a diminuição na atividade microbicida seja regulada por outros mecanismos. Modelos experimentais já demonstraram que a atividade microbicida pode ser modulada pela produção de citocinas.

4.6 Indivíduos PPD+ apresentam um aumento na produção de IL-10 e TGF- β e pacientes com TB na produção de IFN- γ e IL-23.

Visando verificar se as diferenças observadas na atividade microbicida dos grupos PPD+ e TB estão associadas às alterações na produção de citocinas, foram dosadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) em amostras de sobrenadante de cultura dos experimentos de

WBKA as seguintes citocinas: IFN- γ , TGF- β , IL-10 e IL-23. As quais foram escolhidas dadas a sua relevância na resposta imune contra micobactérias. Nestes experimentos utilizamos as amostras de sobrenadantes de cultura estimulados com a cepa H37Rv e os isolados S1 e R6.

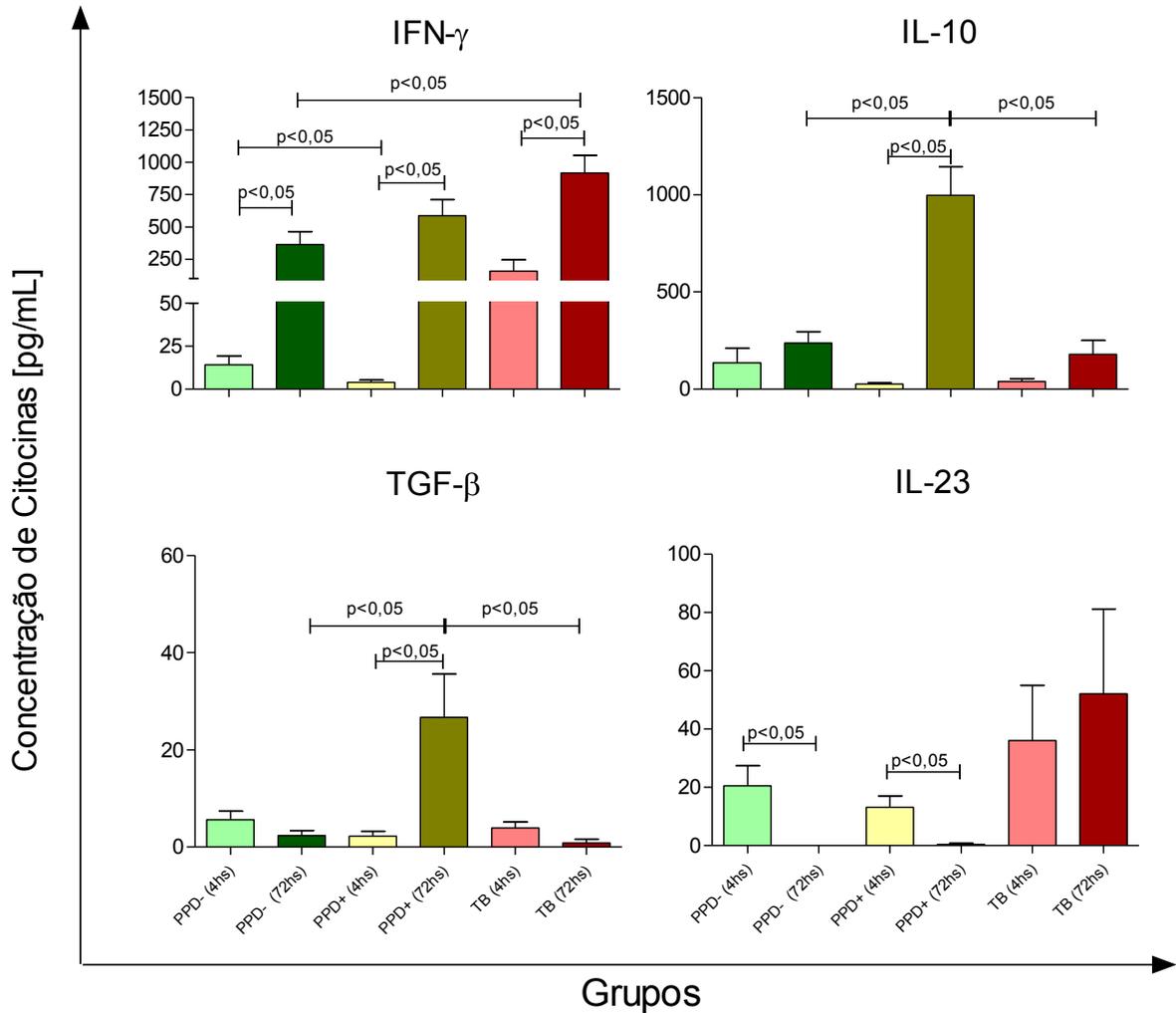


Figura 27: Análise dos resultados obtidos pela ensaio imunoenzimático. Pacientes com PPD+ apresentam concentrações elevadas de IL-10 e TGF- β , indicando resposta moduladora além de apresentar níveis altos de IFN- γ (resposta inflamatória). Pacientes com TB apresentam uma tendência a respostas hiper-inflamatórias via Th17, apresentado altas concentrações de IFN- γ e de IL-23.

A análise dos dados obtidos demonstra um aumento significativo na produção de IFN- γ após 72 horas em todos os grupos estudados. A produção de IFN- γ no grupo TB após 4 horas de incubação foi significativamente maior do que o observado para os grupos PPD- e PPD+. Após 72 horas os níveis desta citocina em amostras do grupo PPD- continuavam

significativamente distintos dos demais (Figura 27). Esta alta produção às 4 horas pode estar associada à presença de doença ativa no paciente, o que não ocorre nos grupos PPD- e PPD+.

A produção de IL-23 tanto no grupo PPD-, quanto no grupo PPD+, sofreu uma diminuição significativa após 72 horas de exposição ao MTB. Estes dados sugerem que esta diminuição pode estar associada à resolução do problema (PPD-) ou ao aumento da frequência das células Tregs (PPD+). Fato curioso observado foi à manutenção dos níveis de IL-23 no grupo “TB”, sugerindo que ativação da resposta Th17 possa estar ocorrendo.

Por outro lado, o grupo “PPD+” apresentou um aumento significativo na produção de tanto IL-10 quanto TGF- β quando comparados aos grupos “PPD-” e “TB”, sugerindo um possível direcionamento para a participação de células Treg e iTreg.

Seriam as diferenças observadas na atividade microbicida dos grupos PPD+ e TB resultantes de alterações na frequência de células T reguladoras?

4.7 Frequência de células Tregs é elevada nos grupos PPD+ e TB e independente da cepa/isolado de MTB utilizado

Considerando-se que nenhuma diferença foi detectada entre os grupos estudados durante a análise da atividade fagocitária; e da produção de NO e que a produção de IFN- γ , TGF- β , IL-10 e IL-23 foi distintas entre os grupos, consideramos a hipótese de que alterações na frequência de células Tregs no sangue periférico poderiam estar relacionadas à atividade microbicida.

A análise fenotípica de células Treg em amostras de sangue total dos grupos PPD- (n=10) e PPD+ (n=10) e TB (n=6) foram realizadas após 24 e 72 horas de exposição à cepa H37Rv e aos isolados S1, S5, R3, e R6.

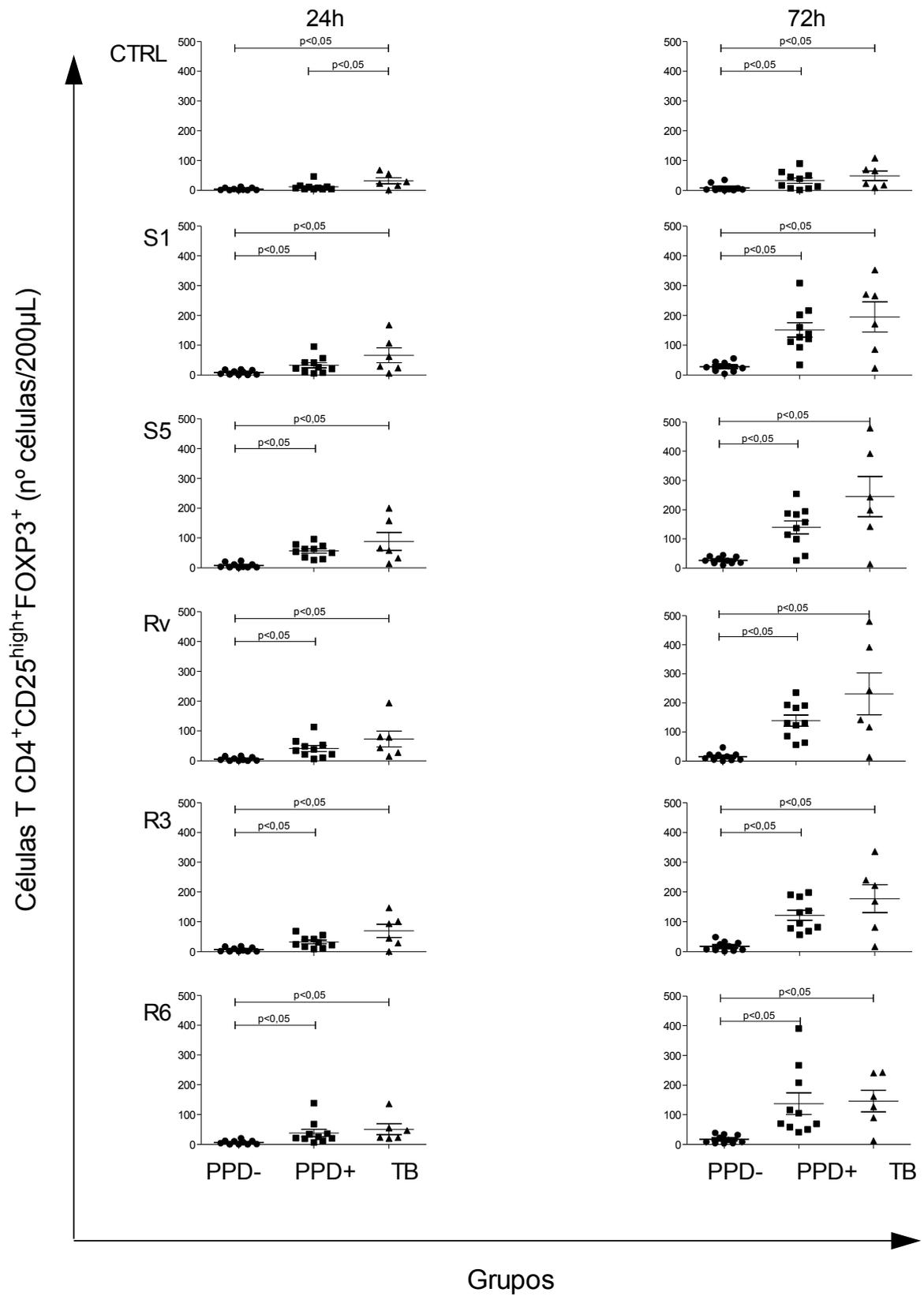


Figura 28: Análise fenotípica por citometria de fluxo da frequência de células T reguladoras em amostras de cultura de sangue total dos grupos PPD-, PPD+ e TB incubadas por 24 ou 72 horas com a cepa H37Rv e aos isolados S1, S5, R3, e R6.

A frequência de células Tregs ($CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$) em culturas de sangue total foi significativamente maior nos grupos PPD+ e TB quando comparados ao grupo PPD- ($p < 0,05$) (Figura 28). Sendo que no grupo TB, a presença de células Tregs foi significativamente maior do que nos grupos PPD- e PPD+ inclusive nas amostras controle, as quais não utilizavam bacilos como estímulo, demonstrando que neste grupo a frequência de Tregs é constitutivamente elevada, como já demonstrado anteriormente pelo nosso grupo.

O aumento na frequência de células Tregs tornou-se mais evidente após 72 horas de incubação, a frequência de células Tregs nos grupos PPD+ e TB foi semelhante, porém significativamente maiores do que a encontrada no PPD-. Para verificarmos se a expansão das células Tregs poderia ser influenciada pelas diferentes cepas/isolados, analisamos os dados separadamente por grupo.

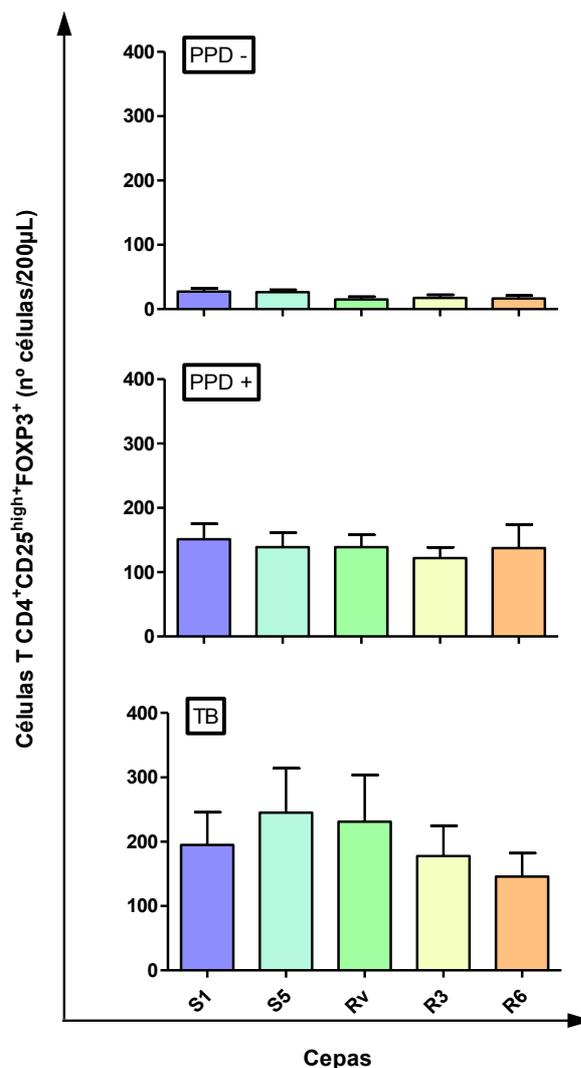


Figura 29: Frequência de células T reguladoras em amostras de sangue total incubadas por 72 horas com as diferentes cepas/isolados nos grupos PPD-, PPD+ e TB.

Esta análise demonstrou que a frequência das células Tregs intragrupo foram semelhantes, portanto independente da cepa/isolado utilizada (Figura 29).

Poderia o aumento na frequência das células Tregs afetarem a atividade microbica?

4.8 Depleção de Células Tregs Restaura a Atividade Microbica dos Grupos PPD+ e TB a Níveis Comparáveis ao Encontrado para o Grupo PPD-.

Com o objetivo de avaliarmos se a presença de células Treg poderia interferir na atividade microbica dos grupos estudados, culturas de CMSP foram estabelecidas na presença e na ausência de células Tregs.

Visando avaliar se resultados dos experimentos de atividade microbica *in vitro* utilizando sangue total e CMSP eram comparáveis, foram estabelecidos dois experimentos, realizados simultaneamente, com amostras de sangue total e de CMSP dos mesmos indivíduos.

Após confirmarmos que experimentos de atividade microbica poderiam ser realizados com amostras de sangue periférico ou com amostras de CMSP sem prejuízo para a comparação dos resultados encontrados (Figura 30), partimos para a depleção de células $CD4^+CD25^+$ (Tregs) em amostras de CMSP de todos os grupos estudados. Experimentos de atividade microbica *in vitro* foram estabelecidos na presença e ausência de Tregs.

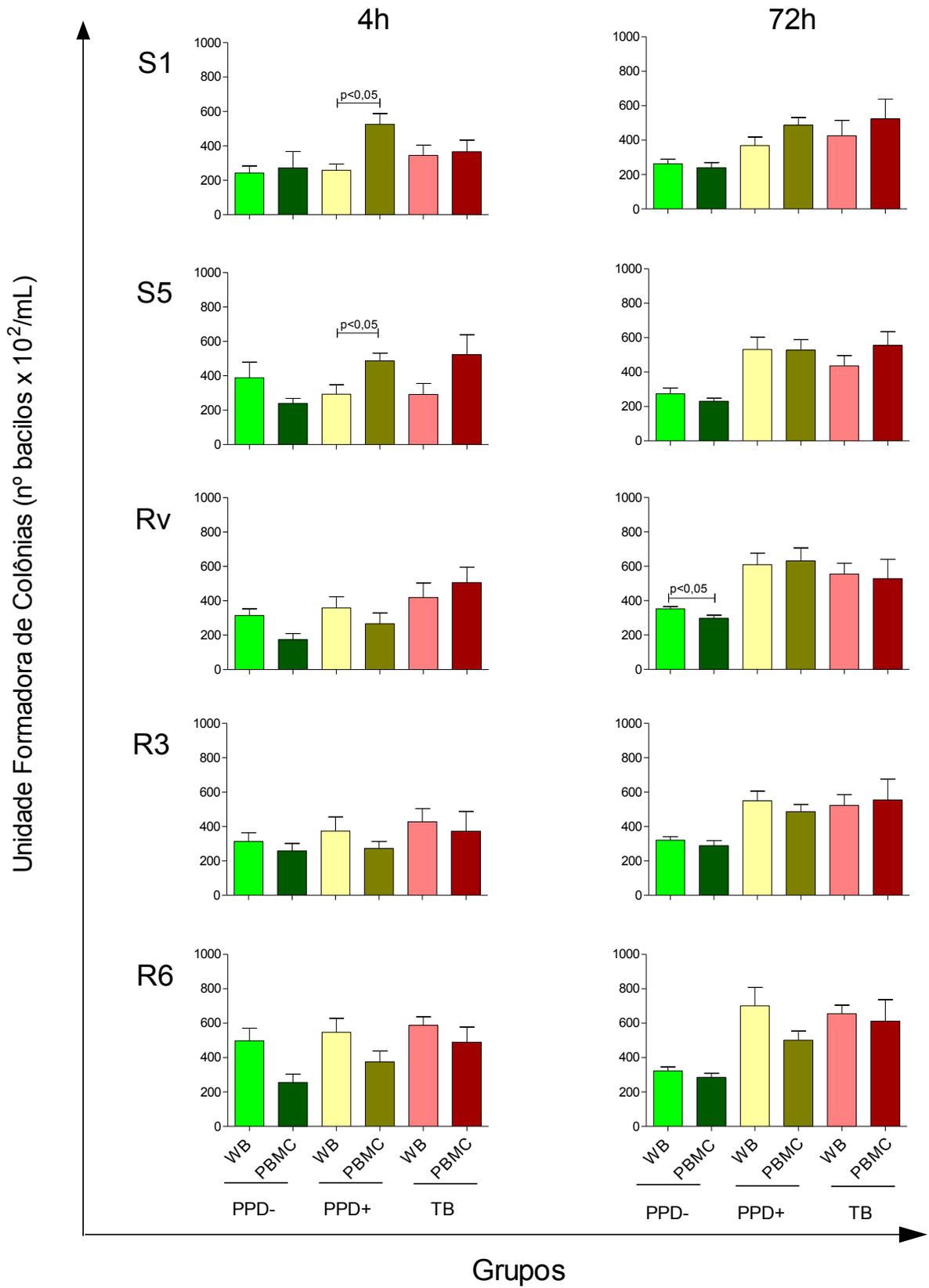


Figura 30: Comparação da atividade microbicida em amostras de sangue total e CMSP dos grupos PPD-, PPD+ e TB, incubadas por 4 ou 72hs com as diferentes cepas/isolados.

Após a depleção das células T reguladoras, a amostra foi submetida a uma imunofenotipagem para verificar a pureza da amostra. A amostra foi marcada para controle isotópico, para assegurar a não existência de ligações inespecíficas e eram marcadas para as células T reguladoras. O método para a realização desta imunofenotipagem é o mesmo descrito anteriormente.

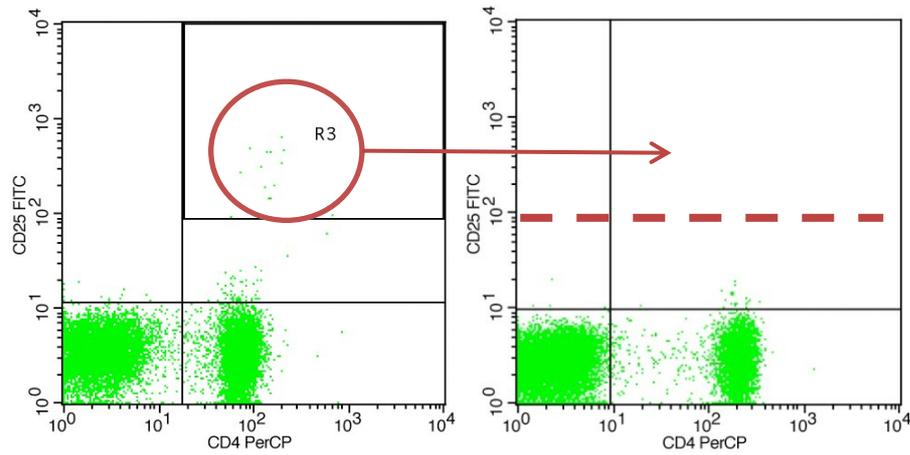


Figura 31: Análise da amostra pós-depleção, apresentação de baixa população CD25^{low} e CD25^{high}

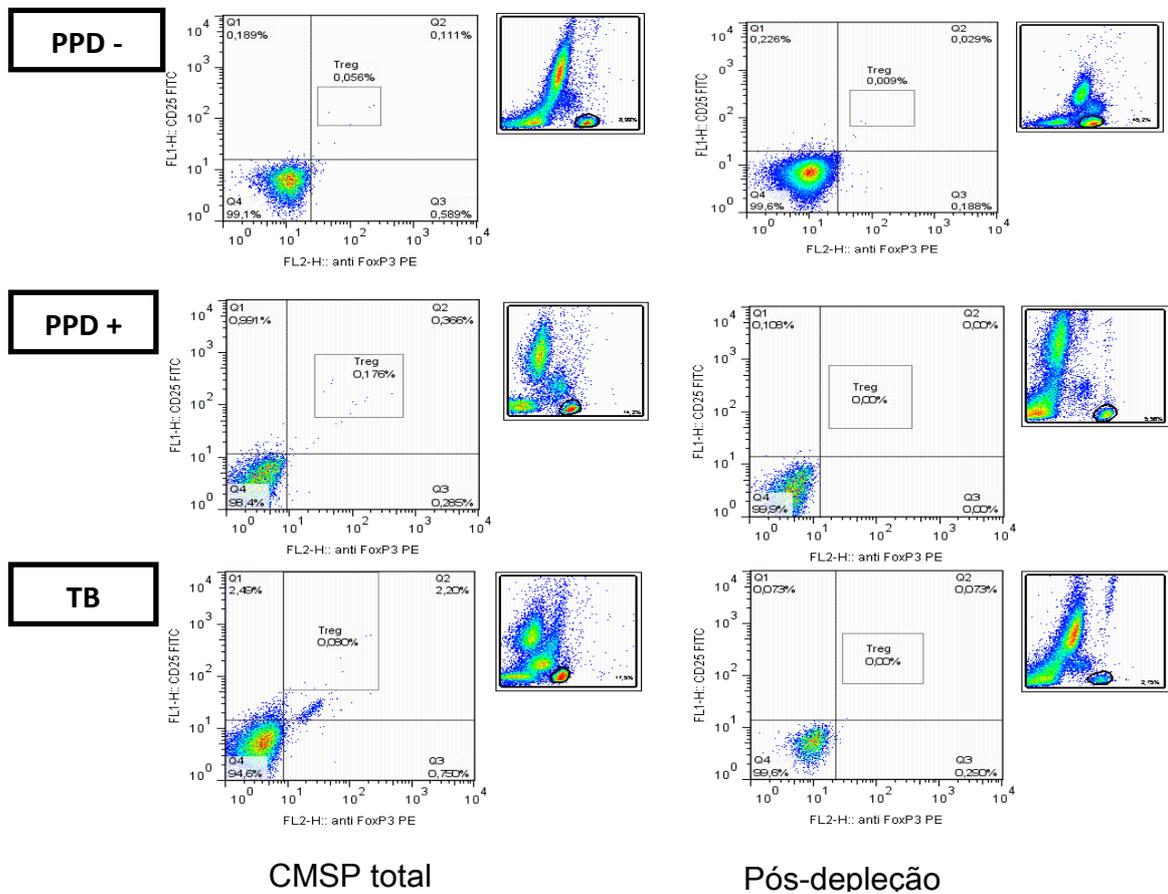


Figura 32: Análise fenotípica por citometria de fluxo da frequência de células Tregs (CD4⁺CD25⁺) pré e pós-depleção.

De acordo com o fabricante, uma depleção é considerada adequada quando acima de 90% das células Tregs presentes forem removidas. Durante nossos experimentos, amostras dos grupos PPD-, PPD+ e TB obtiveram rendimentos superiores a 97% de depleção destas células como pode ser observado na figura 32.

Imediatamente após a depleção de Tregs ser confirmada imunofenotipicamente pela citometria de fluxo, experimentos utilizando amostras de CMSP depletadas de Tregs ou não eram incubadas por 24 ou 72hs com a cepa H37Rv e os isolados S1, S5, R3, e R6; e processadas da mesma forma como descrito anteriormente para os experimentos de WBKA.

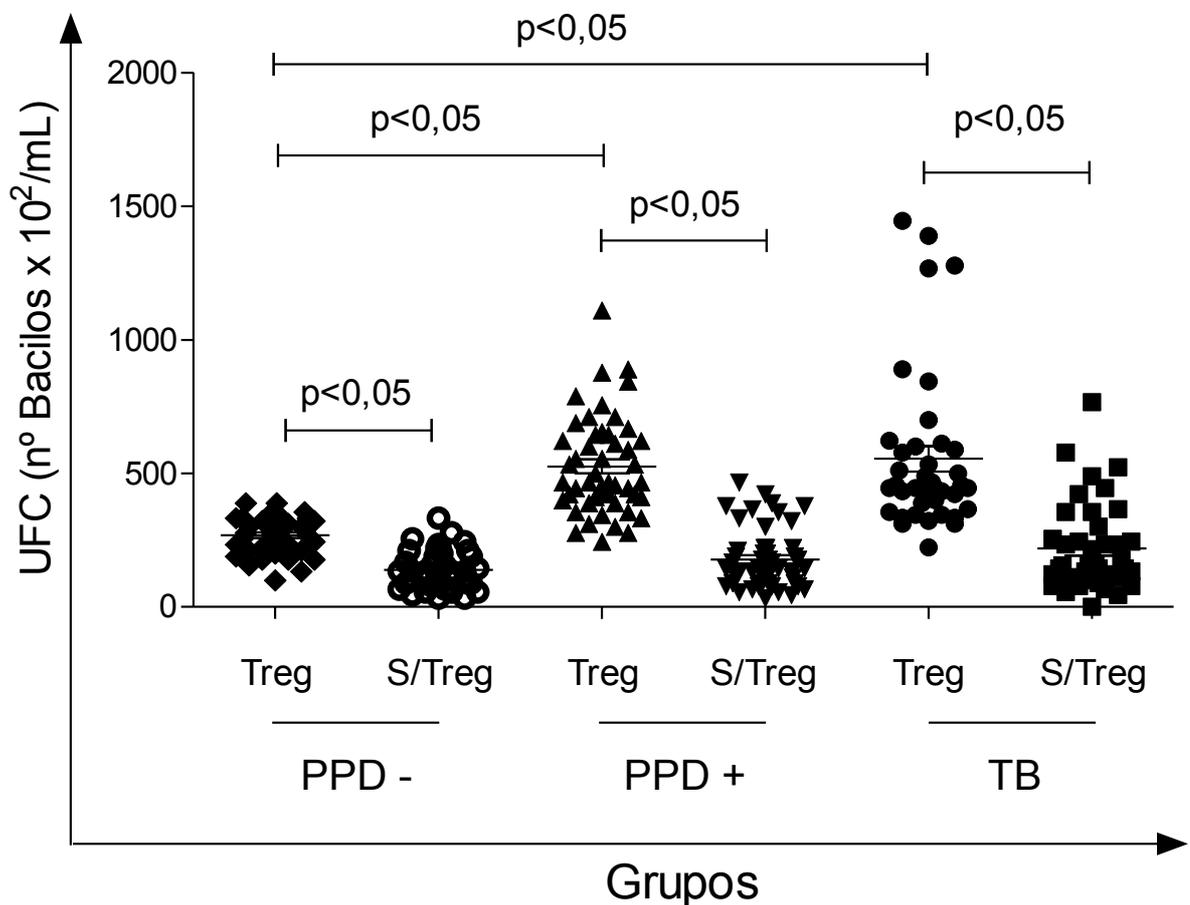


Figura 33: Atividade microbiana em culturas de CMSP de indivíduos PPD- e PPD+ e pacientes com TB na presença ou não de células Tregs frente às diferentes cepas/isolados, após 72h de incubação.

Dados obtidos com a depleção de células Tregs sugerem que a remoção destas células restaura a atividade microbiana nas amostras dos grupos PPD+ e TB.

Com a depleção das células T reguladoras observamos um aumento significativo da atividade microbica em todos os grupos quando comparados aos resultados obtidos na presença destas células (Figura 33).

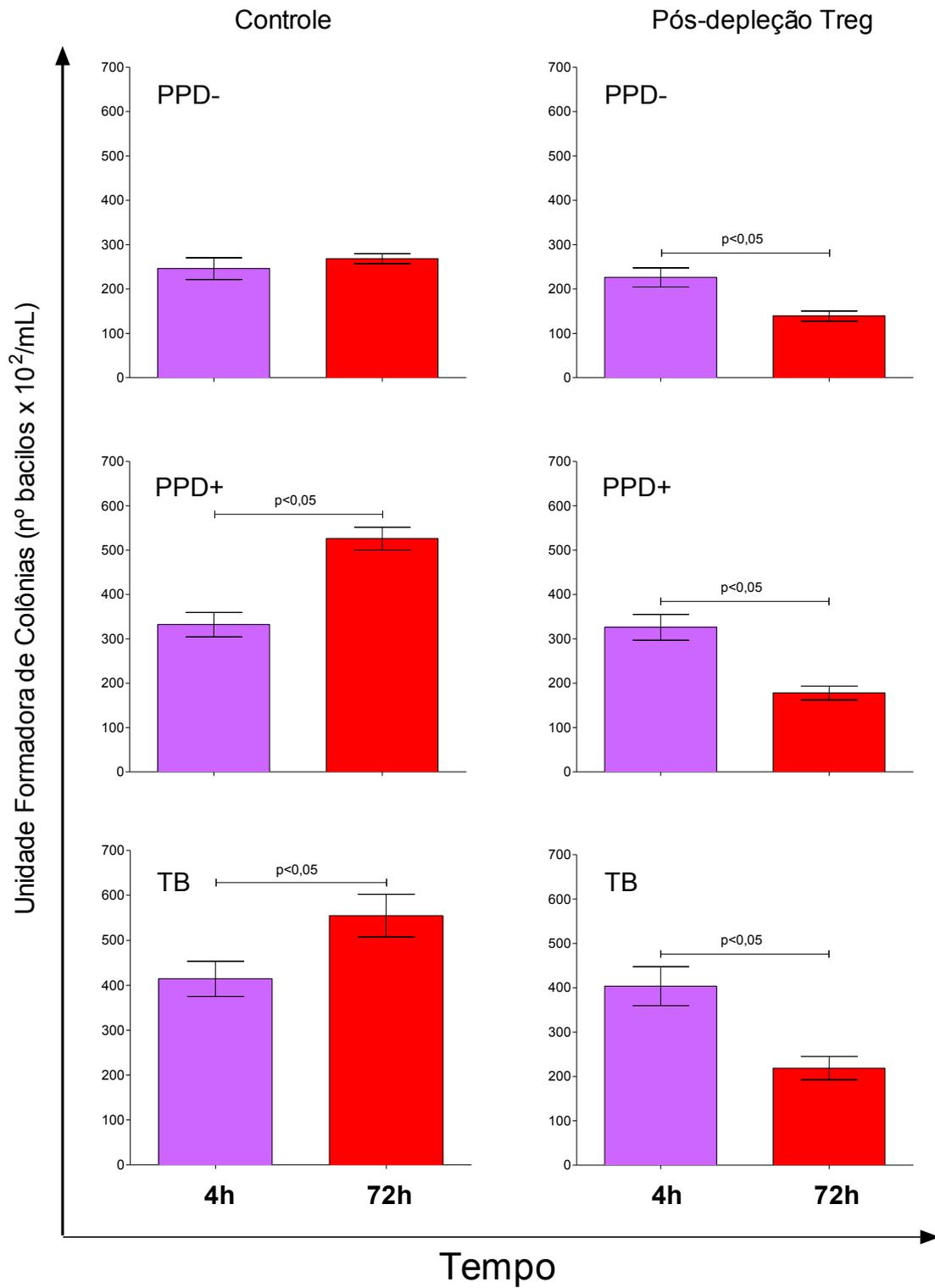


Figura 34: Atividade microbica em culturas de CMSP na presença ou não de células Tregs nos grupos PPD-, PPD+ e TB 4 e 72hs pós-incubação com as diferentes cepas/isolados.

A atividade microbiciada em culturas de CMSP na presença ou não de células Tregs são apresentadas de forma mais clara na figura 34, ficando evidente que a remoção de células Treg impacta diretamente no número de unidades formadoras de colônias observadas.

Dados dos experimentos de depleção de células $CD4^+CD25^+$ demonstram claramente um aumento significativo na atividade microbiciada em todos os grupos estudados, inclusive no grupo PPD-, o qual mesmo respondendo com excelência ao desafio micobacteriano, teve sua resposta amplificada significativamente após a depleção das células Tregs. Nos grupos PPD+ e TB a modulação da resposta foi dramática, levando a uma resposta esta caracterizada pela diminuição significativa do número de unidades formadoras de colônias observadas..

Nossos dados sugerem que depleção de células Tregs esta associada a um aumento significativo da atividade microbiciada nos grupos estudados, especialmente após 72hs de incubação, independente da cepa/isolado utilizado, como mostrado na figura 35.

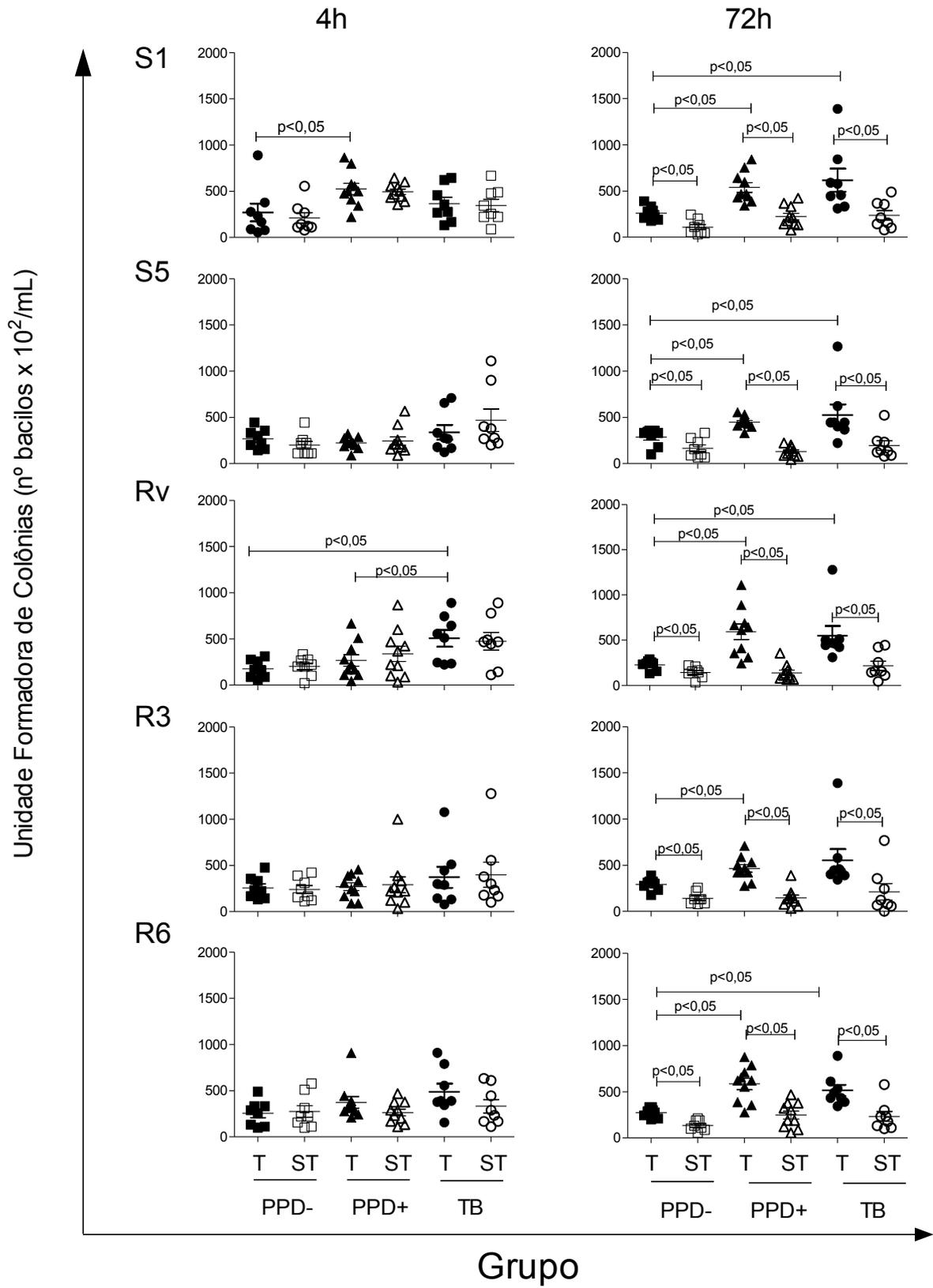


Figura 35: Atividade microbicida em culturas de CMSP de indivíduos PPD- e PPD+ e pacientes com TB na presença (T) ou não de células Tregs (ST) frente às diferentes cepas/isolados.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo utilizamos diferentes cepas e os isolados clínicos sensíveis e resistentes à antibióticos com o objetivo de verificar a existência de diferenças na resposta celular frente aos mesmos. No decorrer de nossos experimentos nenhuma diferença significativa entre as cepas/isolados sensíveis e multidroga resistente foi observada. (cepa S1 mais susceptível). Como esperado, as cepas/isolados resistentes e virulentos foram menos vulneráveis. Nossa cepa H37-Rv se portou de forma semelhante ao trabalho apresentado por KEANE *et al.*, (2001), que mostrou a capacidade desta cepa em evadir do sistema fagocitário de MΦ alveolares. Além da alta resistência ao sistema imune, as cepas/isolados virulentos e resistentes apresentam maior capacidade em se desenvolver dentro dos MΦ (ORDWAY *et al.*, 1995; SILVER; LI, Q., 1998).

Escolhidas as cepas/isolados, dividimos as amostras em três grupos. O primeiro grupo foi formado por indivíduos que provavelmente entraram em contato com o bacilo, mas não foram infectados. Este grupo é caracterizado por não ser reativo ao teste tuberculínico intradérmico e assim são denominados PPD-. O segundo grupo formado por indivíduos que apresentavam reações de hipersensibilidade do tipo IV, ou seja, uma reação positiva à intradermoreação, porém não desenvolveram a doença (PPD+). Por fim, o terceiro grupo formado por pacientes com tuberculose pulmonar ativa. A divisão destes grupos é crucial, pois assim poderíamos relacionar a resposta imune (atividade microbicida) frente à infecção *in vitro* com cada grupo. Dados da literatura sugerem que pacientes com PPD+, apresentam certa susceptibilidade em desenvolver a doença quando adultos (KORBEL *et al.*, 2008).

A dificuldade em eliminar o bacilo, torna-se o ponto chave desta pesquisa, pois uma das formas mais comuns de TB em adultos é a reativação endógena do bacilo, que pode ocorrer muitos anos após do primeiro contato (KORBEL *et al.*, 2008; MOKADDAS *et al.*, 2008; PATHANIA; NAVANI; RAJAMOHAN; DIKSHIT; *et al.*, 2002). Acreditasse que o desenvolvimento da TB ou de sua latência está associado a um comprometimento da resposta Th1. A resposta Th1 contra o Mtb é mediada por citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ e TNF- α (GARG *et al.*, 2010; GERCKEN *et al.*, 1994; KHADER *et al.*, 2005), porém podem sofrer limitações provocadas por citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o TGF- β (ALMEIDA, P. E. *et al.*, 2009) as quais atuam diminuindo o dano inflamatório ao tecido/orgão no sítio de infecção.

A ação das células Tregs ($CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$) (HORI *et al.*, 2003; SAKAGUCHI, S. *et al.*, 1995), que são responsáveis pelo equilíbrio entre a resposta imune inflamatória e o dano aos tecidos, foi avaliada ficando evidente o aumento da frequência destas células pós-exposição ao MTB.

Conforme demonstrado anteriormente e confirmado pelo presente estudo, pacientes com TB apresentam constitutivamente uma maior frequência de células Tregs (GUYOT-REVOL *et al.*, 2006; HOUGARDY *et al.*, 2007). RIBEIRO-RODRIGUES *et al.* (2006), também observou que indivíduos com tuberculose pulmonar apresentavam maior frequência de células Tregs quando comparadas a controles saudáveis reativos ao PPD. Esta diferença não está apenas presente em infecções pelo Mtb, mas também em infecções por *Plasmodium vivax* (BUENO *et al.*, 2010), *Leishmania major* (BELKAID *et al.*, 2002), e outros patógenos.

Frente a estes indícios, foram realizadas culturas de sangue total, nas quais as amostras eram incubadas juntamente com as cepas/isolados sensíveis e multidroga resistentes. Após 24 e 72 horas de incubação foram observadas que as culturas de indivíduos PPD+ e de pacientes com TB apresentaram significativamente uma maior frequência de células Tregs que o grupo PPD-, sugerindo que células Treg de memória poderiam estar sendo ativadas.

Uma possível explicação para a expansão destas células observada nos três grupos pode ser a indução via constituintes da parede celular dos bacilos. De acordo com GARG *et al.*, (2010), o ManLAM, maior constituinte da parede celular do MTB, induz a produção de prostaglandina E2 (PGE2) induzindo a expansão de células Treg. O aumento da frequência das células Tregs nos grupos PPD+ e TB tem como objetivo limitar a resposta inflamatória cuja ação pode vir a causar grandes danos teciduais (RIBEIRO-RODRIGUES *et al.*, 2006). A presença desta expansão *in vitro*, pode estar relacionada com a transformação de células $CD4^+CD25^-$, sendo denominadas de iTreg, assim esta rápida conversão pode estar atrelada a um encontro prévio como Mtb (HOUGARDY *et al.*, 2007), fato este que corrobora com nossos achados.

De acordo com SCOTT-BROWNE *et al.* (2007), as células Tregs não são patógenos específicos e simplesmente expandem em função da inflamação e do dano tecidual e assim a presença maciça destas células pode explicar em parte a persistência do patógeno no hospedeiro. Se as Tregs não são patógeno específico, logo sua maior frequência nos grupos

PPD+ e TB esta relacionada a uma atividade inflamatória precoce no local e/ou pela presença de alguma célula de memória patógeno-específica presente no indivíduo.

Segundo MOSER & BRANDES, (2006), as células T- $\gamma\delta$, podem ser responsáveis por essa ativação inflamatória, pois aparecem precocemente durante as respostas imununes, produzindo IFN- γ e TNF- α . Sua resposta primária inclui a proliferação de células T- $\alpha\beta$, induzindo a geração de células T auxiliares e de linfócitos T citotóxicos (MOSER; BRANDES, 2006). Então quanto maior a frequência de células T- $\gamma\delta$ ativadas, maior será a resposta Th1, para demonstrar isso, BRANDES *et al.*, (2005), estimulou estas células com toxina tetânica e com PPD. Estes autores observaram que o aumento na proliferação de células T CD4- $\alpha\beta$, era realizado em maior parte pelas DC e não as células T- $\gamma\delta$, porém quando observaram a resposta via células T CD8- $\alpha\beta$, elas foram mais eficientes que as DC. Com estes resultados pode-se observar que estas células possuem uma resposta efetora rápida no local (BRANDES *et al.*, 2005), porém estas células também produzem IL-10, que de forma indireta aumenta a produção de TGF- β (KÜHL *et al.*, 2009). É bem possível que tanto sua função inflamatória quanto regulatória possa estar contribuindo para o aumento da frequência das células Tregs.

LI & WU (2008), mostraram que o ESAT-6, antígeno secretado pelo Mtb (DEMISSIE; LEYTEN, 2006), estimulava as células T- $\gamma\delta$ a produzir IFN- γ e TNF- α em indivíduos PPD+. Também mostrou que as células T- $\gamma\delta$ apresentavam alta expressão de CD45RO, o que relacionada com a capacidade de desenvolvimento de memória (LI, LI; WU, C.-Y., 2008).

Uma vez caracterizado a expansão das células Tregs, observamos a atividade microbicida. Os grupos PPD+ e TB apresentaram um baixo rendimento em relação ao grupo PPD-. Para a averiguação deste achado, foram realizados mais dois experimentos complementares, o ensaio de fagocitose e a dosagem de óxido nítrico, com o intuito de verificar problemas relacionados aos M Φ .

A atividade fagocitária foi mensurada nos grupos PPD- e PPD+. O experimento foi realizado em dois tempos de cultura, uma incubação por 4 horas e outro por 24 horas. Não foram encontradas diferenças significativas, como é mostrado na figura 20, mas foram encontrados bacilos no interior dos M Φ como visto nas figuras 22, 23, 24 e 25, indicando a normalidade da função fagocitária dos M Φ . Para responder o porquê da diminuição da atividade microbicida do grupo PPD+ e TB, podemos atrelar o problema a fatores que possam

conferindo proteção ao Mtb. Dentre estes fatores podemos citar a capacidade do Mtb em inibir mecanismos de reparo da membrana celular, que estariam prevenindo a morte por necrose (DIVANGAHI *et al.*, 2009) ou por induzir proteínas anti-apoptóticas (SLY *et al.*, 2003), o que facilitaria a saída do bacilo de dentro da célula infectada.

A produção de óxido nítrico foi avaliada e apesar de nenhuma diferença significativa ter sido observada, encontramos uma tendência à diminuição na produção de NO nos grupos PPD+ e TB, tendo destaque o grupo TB com a menor produção. Apesar de não significativo essa diferença sugere uma possível associação entre a baixa produção de NO com atividade microbicida apresentada. A falta de diferenças significativas entre os valores obtidos na dosagem de NO podem ter sido causados pelo pequeno número de amostras utilizado (n=6/grupo).

Mesmo assim, diminuição da produção de NO pode ser explicada por alguns mecanismos de evasão micobacterianos. O Mtb pode ativar os *Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo-gama* (PPAR- γ) que estão associados à ativação de macrófagos do tipo M2 (M Φ -M2) (RAJARAM *et al.*, 2010). Os M Φ -M2 passariam a estimular a produção de IL-8, IL-10, COX2 e PGE2, que atuariam na inibição da produção de óxido nítrico, tornando assim o ambiente favorável à sobrevivência/replicação do bacilo dentro da célula (ALMEIDA, A. S. *et al.*, 2009). Também se pode associar a presença das células Tregs, pois elas contribuem para esta mudança fenotípica, uma vez que estimulam produção de IL-10 e TGF- β , que acabam por amplificar a resposta Th2 e estimular o fenótipo M2 dos M Φ (LIU *et al.*, 2011).

Considerando-se que o dogma da memória imunológica se baseia no fato de que a resposta contra um determinado agente patogênico é aprimorada a cada exposição/infecção subsequente pelo mesmo patógeno; logo indivíduos expostos ao Mtb e sensibilizados (PPD+) deveriam ter uma resposta mais eficaz que o grupo (PPD-), porém será que isso poderia ser realidade entre os pacientes com TB?

Em nossos achados as exposições prévias e seguidas de sensibilização mostraram uma menor eficiência da atividade microbicida nos grupos PPD+ e TB. Nossos achados corroboram com VERVER *et al.*, (2005), que demonstraram a existência de uma maior incidência de reinfecções pelo Mtb em pacientes, de áreas endêmicas, que obtiveram sucesso no tratamento. Este fato mostra que o contato prévio e a possível sensibilização ao patógeno induzem a uma falha na resposta imune para a erradicação do Mtb. Talvez esse espectro possa ser ampliado

para o uso da vacina BCG, que possui taxas de eficiência menores em zonas endêmicas. No trabalho de JARON *et al.*, (2008), foi demonstrado que camundongos vacinados com BCG e depois infectados com Mtb apresentavam uma resposta Th1 problemática, corroborando com os nossos achados até o presente momento. Então como o aumento das células Tregs, pode influenciar na atividade microbicida?

De acordo com nossos resultados, o grupo PPD+ apresentou valores significativos de IL-10 e TGF- β , o que nos mostra um direcionamento para a resposta moduladora via células Tregs. A presença da citocina IL-10 atua como um forte antagonista para a produção de IL-1, IL-2, IL-6 e IL-12, IFN- γ e TNF- α (GLOCKER *et al.*, 2011). O envolvimento da TGF- β durante a regulação da resposta imune é mais crítica, pois atua na geração de células iTregs nos locais da infecção contribuindo para o desenvolvimento da patogênese da doença (CHEN, W. *et al.*, 2003; HOUGARDY *et al.*, 2007).

O grupo TB apresentou após 72 horas uma grande produção de duas citocinas. Uma foi o IFN- γ que está associado ao aumento da carga bacteriana (BURCHILL *et al.*, 2008). Sobre esta alta produção de IFN- γ , MARIN *et al.*, (2010) também encontrou elevados níveis desta citocina, o que é contrário ao demonstrado por outros grupos de pesquisadores (GEFFNER *et al.*, 2009; LI, LI; WU, C.-Y., 2008). Para MARIN *et al.*, (2010), este aumento pode estar relacionado ao tempo de cultura utilizado (24-48h), semelhante ao adotado por nós (24-72h), assim esta produção estaria relacionada a células T efetoras propriamente ditas, que passam a produzir IFN- γ sem necessidade de proliferação.

A outra citocina encontrada em altas concentrações foi a IL-23, o que pode caracterizar uma possível resposta do tipo Th17. A citocina IL-23 possui papel fundamental na imunidade contra vários patógenos, incluindo o Mtb (ZUÑIGA *et al.*, 2012). A IL-23 estimula a expansão de células do tipo Th17 além de atuar na maturação das mesmas (MCGEACHY *et al.*, 2009), aumentando a capacidade de produção/secreção de IL-17 (VELDHOEN *et al.*, 2006) e desligando a expressão de genes responsáveis por citocinas anti-inflamatórias (IL-10) (MCGEACHY *et al.*, 2009). Sua produção é associada a respostas hiper-inflamatórias que podem levar a lesão tecidual e ao desenvolvimento de doenças cavitárias (ALMEIDA, A. S. *et al.*, 2009). Mesmo não apresentado neste trabalho, MARIN *et al.*, (2010) mostrou que pacientes com TB ativa apresentavam altos níveis de IL-17, citocina esta produzida por células Th17 corroborando com os nossos achados. Fato a ser considerado é que a presença destas células pode estar ligado com a frequência das células nTregs. VALMORI &

RAFFIN, (2010) mostraram que células do tipo Th17 podem ser advindas de células nTregs, porém para que isso ocorra devem estar presentes fatores de diferenciação específicos, por exemplo, IL-1 β . Esta diferenciação de nTreg em Th17 é acompanhada do aumento da expressão de *ROR γ t* que inibe a expressão de FOXP3 (VALMORI; RAFFIN, 2010). Esta relação pode explicar a alta atividade inflamatória presente nos sítios de infecção durante a tuberculose ativa.

Nossa resposta *in vitro* nos direciona para um tempo de incubação maior que 72 horas, para que haja a confirmação deste quadro, além da pesquisa de citocinas adicionais como a IL-6 e IL-21 importantes para o desenvolvimento da resposta Th17.

Pensando nisso, realizamos a depleção das células Tregs de todos os grupos utilizados no estudo. Os experimentos foram conduzidos com tempos de incubação de 4 e 72 horas. Após 72 horas de incubação, os grupos apresentaram uma melhora significativa na atividade microbicida, inclusive o grupo PPD-. Com base nestes dados podemos afirmar que o contato prévio pode desencadear uma reação de tolerância ao bacilo, através da indução de células Treg de memória, e assim colaborar em sua permanência do Mtb no organismo.

Nossos resultados complementam de certa forma os dados de VERVER *et al.*, (2005), citado anteriormente, pois demonstramos que indivíduos PPD+ e TB apresentam uma propensão maior a desenvolver TB (aqui sugerido pela diminuição da atividade microbicida), pelo aumento da frequência das células Tregs que acabaria por auxiliar na permanência do patógeno no organismo. Aliado a isso, dados mostrados por VERVER *et al.* (2005), confrontam a hipótese de que imunocompetentes expostos ao Mtb estariam protegidos de uma reinfecção. Estes fatos podem ser associados à baixa eficácia da vacina BCG, na qual o ato de imunizar o paciente acaba por induzir o aparecimento de células de memória que futuramente, após um novo contato com o Mtb estimularia uma resposta ineficaz, uma resposta de célula T reguladora, as quais diminuiriam a ativação das células Th1. Quanto à capacidade do grupo PPD- em resistir a sucessivas infecções são necessários mais estudos para a observação de mecanismos de indução de memória e a sua associação ao aumento da frequência das células Tregs.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

De acordo com os dados encontrados em nosso estudo, o contato prévio com o bacilo do Mtb, desencadeou nos grupos PPD+ e TB uma maior propensão para o desenvolvimento da doença. Esta propensão pode estar associada ao aumento da frequência das células Tregs. Estas células por apresentarem mecanismos moduladores acabam por limitar a resposta inflamatória local, facilitando assim a permanência do bacilo no loco.

Esta permanência está associada à reativação endógena que pode acontecer a qualquer momento nos indivíduos pertencentes ao grupo PPD+, uma vez que os mesmos podem apresentar uma forma de doença latente. Quanto ao grupo TB, essa massiva presença de células Tregs pode estar associada à replicação do bacilo e, por conseguinte na complicação da doença propriamente dita.

O grupo PPD- apresentou uma resposta imune mais competente frente aos demais grupos. Essa competência pode estar ligada diretamente a menor frequência das células Tregs o que tornam o organismo mais competente para erradicar os bacilos. Talvez possamos associar esta resposta a uma menor formação de células de memória, o que poderíamos associar aos casos de viragem de PPD, o qual um indivíduo passa de PPD- para PPD+.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. S. DE; FISKE, C. T.; STERLING, T. R.; KALAMS, S. A. Increased frequency of regulatory T cells and T lymphocyte activation in persons with previously treated extrapulmonary tuberculosis. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 19, n. 1, p. 45-52, jan 2012.

ALMEIDA, A. S.; LAGO, P. M.; BOECHAT, N. *et al.* Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung immune response that impairs Th1-type immunity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 1, p. 718-31, 1 jul 2009.

ALMEIDA, P. E.; SILVA, A. R.; MAYA-MONTEIRO, C. M. *et al.* Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 2, p. 1337-45, 15 jul 2009.

APT, A. S.; ERUSLANOV, E. B.; LYADOVA, I. V. *et al.* Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice. **Infection and ...**, v. 73, n. 3, p. 1744-1753, 2005.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. v. 420, n. September, p. 633-637, 2002.

BETTINI, M.; VIGNALI, D. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 6, p. 612-618, 2010.

BLANCHARD, D. K.; MCMILLEN, S.; HOFFMAN, S. L.; DJEU, J. Y. Mycobacterial induction of activated killer cells: possible role of tyrosine kinase activity in interleukin-2 receptor alpha expression. **Infection and immunity**, v. 60, n. 7, p. 2843-9, jul 1992.

BLEVINS, S. M.; BRONZE, M. S. Robert Koch and the “golden age” of bacteriology. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 9, p. e744-51, set 2010.

BLOCH, H. Studies on the virulence of tubercle bacilli. **The Journal of experimental medicine**, p. 197-219, 1950.

BLOMGRAN, R.; ERNST, J. D. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4⁺ T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, n. 12, p. 7110-9, 15 jun 2011.

BOEHMER, H. VON. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. **Nature immunology**, v. 6, n. 4, p. 338-44, abr 2005.

BONTRON, S.; UCLA, C.; MACH, B.; STEIMLE, V. Efficient repression of endogenous major histocompatibility complex class II expression through dominant negative CIITA mutants isolated by a functional selection strategy. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 8, p. 4249-58, ago 1997.

BOPP, T.; BECKER, C.; KLEIN, M. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 6, p. 1303-10, 11 jun 2007.

BRANDES, M.; WILLIMANN, K.; MOSER, B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5732, p. 264-8, 8 jul 2005.

BRYK, R.; LIMA, C. D.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; NATHAN, C. Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. **Science (New York, N.Y.)**, v. 295, n. 5557, p. 1073-7, 8 fev 2002.

BUENO, L. L.; MORAIS, C. G.; ARAÚJO, F. F. *et al.* Plasmodium vivax: induction of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9623, jan 2010.

BURCHILL, M. A.; YANG, J.; VANG, K. B. *et al.* Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. **Immunity**, v. 28, n. 1, p. 112-21, jan 2008.

CAMPANA, M. C. F. **AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA PRESENÇA DE CÉLULAS T REGULADORAS NA RESPOSTA IMUNE CONTRA O Mycobacterium tuberculosis EM INDIVÍDUOS PPD+ E PPD-**. Vitória: Programa de Pós-Graduação em Doenças Infeciosas - Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 2010. p. 107

CANTALOUBE, S.; VEYRON-CHURLET, R.; HADDACHE, N.; DAFFÉ, M.; ZERBIB, D. The Mycobacterium tuberculosis FAS-II dehydratases and methyltransferases define the specificity of the mycolic acid elongation complexes. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e29564, jan 2011.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N. *et al.* Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **The Journal of experimental medicine**, v. 198, n. 12, p. 1875-86, 15 dez 2003.

COLBERT, G.; RICHEY, D.; SCHWARTZ, J. C. Widespread tuberculosis including renal involvement. **Proceedings (Baylor University. Medical Center)**, v. 25, n. 3, p. 236-9, jul 2012.

DAIGLE, R.; ROUSSEAU, J.-A.; GUERTIN, MICHEL; LAGÜE, P. Theoretical investigations of nitric oxide channeling in Mycobacterium tuberculosis truncated hemoglobin N. **Biophysical journal**, v. 97, n. 11, p. 2967-77, 2 dez 2009.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862-70, nov 2006.

DEMISSIE, A.; LEYTEN, E. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with Mycobacterium tuberculosis. **Clinical and vaccine ...**, v. 13, n. 2, p. 179-186, 2006.

DIVANGAHI, M.; CHEN, M.; GAN, H. *et al.* Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. **Nature immunology**, v. 10, n. 8, p. 899-906, ago 2009.

DOHERTY, T.; ARDITI, M. TB , or not TB : that is the question — does TLR signaling hold the answer ? **J Clin Invest**, n. 12, 2004.

DONOGHUE, H.; SPIGELMAN, M. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. **The Lancet infectious ...**, v. 4, n. September, p. 584-592, 2004.

DRUSZCZYŃSKA, M.; KOWALEWICZ-KULBAT, M.; FOL, M.; WŁODARCZYK, M.; RUDNICKA, W. Latent M. tuberculosis infection--pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention strategies. **Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists**, v. 61, n. 1, p. 3-10, jan 2012.

DWIVEDI, V. P.; BHATTACHARYA, D.; CHATTERJEE, S. *et al.* Mycobacterium tuberculosis directs T helper 2 cell differentiation by inducing interleukin-1 β production in dendritic cells. **The Journal of biological chemistry**, 18 jul 2012.

DYE, C.; SCHEELE, S.; DOLIN, P.; RAVIGLIONE, M. C.; PAGE, P. Global Burden of Tuberculosis Estimated Incidence , Prevalence , and Mortality by Country assessing present control efforts and. **JAMA : The Journal of the American Medical Association**, v. 282, p. 677-86, 1999.

EASTWOOD, J. B.; CORBISHLEY, C. M.; GRANGE, J. M. Tuberculosis and the kidney. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 12, n. 6, p. 1307-14, jun 2001.

ERNST, J. D.; TREVEJO-NUÑEZ, G.; BANAIIEE, N. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 7, p. 1738-45, 2007.

ESIN, S.; BATONI, G.; KÄLLENIUS, G. *et al.* Proliferation of distinct human T cell subsets in response to live, killed or soluble extracts of Mycobacterium tuberculosis and Myco. avium. **Clinical and experimental immunology**, v. 104, n. 3, p. 419-25, jun 1996.

FALAGAS, M. E.; BLIZIOTIS, I. A; KOSMIDIS, J.; DAIKOS, G. K. Unusual climatic conditions and infectious diseases: observations made by Hippocrates. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 28, n. 10, p. 716-8, dez 2010.

FERWERDA, G.; GIRARDIN, S. E.; KULLBERG, B.-J. *et al.* NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis. **PLoS pathogens**, v. 1, n. 3, p. 279-85, nov 2005.

FERWERDA, G.; KULLBERG, B. J.; JONG, D. J. DE; *et al.* Mycobacterium paratuberculosis is recognized by Toll-like receptors and NOD2. **Journal of leukocyte biology**, v. 82, n. 4, p. 1011-8, out 2007.

FLYNN, J. L.; GOLDSTEIN, M. M.; TRIEBOLD, K. J.; KOLLER, B.; BLOOM, B. R. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to

Mycobacterium tuberculosis infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 24, p. 12013-7, 15 dez 1992.

GAN, H.; LEE, JINHEE; REN, F. *et al.* Mycobacterium tuberculosis blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence. **Nature immunology**, v. 9, n. 10, p. 1189-97, out 2008.

GANDOTRA, S.; JANG, S.; MURRAY, P. J.; SALGAME, P.; EHRT, S. Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2-deficient mice control infection with Mycobacterium tuberculosis. **Infection and immunity**, v. 75, n. 11, p. 5127-34, nov 2007.

GARG, A.; BARNES, P. F.; ROY, S. *et al.* PROSTAGLANDIN E2-DEPENDENT EXPANSION OF REGULATORY T CELLS IN HUMAN Mycobacterium tuberculosis. **European journal of immunology**, v. 38, n. 2, p. 459-469, 2010.

GEFFNER, L.; YOKOBORI, N.; BASILE, J. *et al.* Patients with multidrug-resistant tuberculosis display impaired Th1 responses and enhanced regulatory T-cell levels in response to an outbreak of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis M and Ra strains. **Infection and immunity**, v. 77, n. 11, p. 5025-34, nov 2009.

GERCKEN, J.; PRYJMA, J.; ERNST, M; FLAD, H. D. Defective antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes. **Infection and immunity**, v. 62, n. 8, p. 3472-8, ago 1994.

GERSHON, R. K.; KONDO, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. **Immunology**, v. 18, n. 5, p. 723-37, maio 1970.

GERSHON, R. K.; KONDO, K. Infectious immunological tolerance. **Immunology**, v. 21, n. 6, p. 903-14, dez 1971.

GIRARDIN, S. E.; BONECA, I. G.; VIALA, J. *et al.* Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 11, p. 8869-72, 14 mar 2003.

GLOCKER, E.-O.; KOTLARZ, D.; KLEIN, C.; SHAH, N.; GRIMBACHER, B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1246, p. 102-7, dez 2011.

GOODMAN, J. Mycobacterium tuberculosis Invades and Replicates within Type II Alveolar Cells. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 4, p. 1400-06, 1996.

GUYOT-REVOL, V.; INNES, J. A; HACKFORTH, SARAH; HINKS, T.; LALVANI, A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 173, n. 7, p. 803-10, 1 abr 2006.

HELIO, R.; TEREZINHA, S.; VARGAS, C. O TRATAMENTO ATUAL DA TUBERCULOSE (PARA ADOLESCENTES E ADULTOS) COMENTADO. **Hospital Pedro hernesto**, p. 61-71, 2011.

HERBST, S.; SCHAIBLE, U. E.; SCHNEIDER, B. E. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. **PLoS one**, v. 6, n. 5, p. e19105, jan 2011.

HERZMANN, C.; ERNST, MARTIN; EHLERS, S. *et al.* Increased frequencies of pulmonary Treg cells in latent M. tuberculosis infection. **The European Respiratory Journal**, n. 1399-3003, p. 1-28, 22 mar 2012.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science (New York, N.Y.)**, v. 299, n. 5609, p. 1057-61, 14 fev 2003.

HOUGARDY, J.-M.; VERSCHEURE, V.; LOCHT, C.; MASCART, F. In vitro expansion of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low/-} regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy Mycobacterium tuberculosis-infected humans. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 9, n. 11, p. 1325-32, set 2007.

HUANG, C.-T.; WORKMAN, C. J.; FLIES, D. *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 503-13, out 2004.

JANSSENS, W.; CARLIER, V.; WU, B.; VANDERELST, L.; JACQUEMIN, M. G. CD4⁺CD25⁺ T Cells Lyse Antigen-Presenting B Cells by Fas-Fas Ligand Interaction in an Epitope-Specific Manner 1. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 9, p. 4604-12, 2003.

JARON, B.; MARANGHI, E.; LECLERC, C.; MAJLESSI, L. Effect of Attenuation of Treg during BCG Immunization on Anti-Mycobacterial Th1 Responses and Protection against Mycobacterium tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. 10, 2008.

JENSEN, P.; WALTON, W.; IADEMARCO, M. TUBERCULOSIS INFECTION CONTROL IN THE ERA OF EXPANDING HIV CARE AND TREATMENT. **who.int**, 1999.

JO, E.-K. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 3, p. 279-86, jun 2008.

JOHNSON, B. J.; MCMURRAY, D N. Cytokine gene expression by cultures of human lymphocytes with autologous Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes. **Infection and immunity**, v. 62, n. 4, p. 1444-50, abr 1994.

JONGE, M. I. DE; PEHAU-ARNAUDET, G.; FRETZ, M. M. *et al.* ESAT-6 from Mycobacterium tuberculosis dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 16, p. 6028-34, ago 2007.

JUNG, SAET-BYEL; YANG, C.; LEE, JI-SOOK; *et al.* The Mycobacterial 38-Kilodalton Glycolipoprotein Antigen Activates the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway and Release of Proinflammatory Cytokines through Toll-Like Receptors 2 and 4 in Human Monocytes. **American Society for Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 2686-2696, 2006.

JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A.; JAMIESON, A. *et al.* NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 11, p. 6039-45, 1 dez 2003.

KAISHO, T.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; HOSHINO, K.; AKIRA, S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 9, p. 5688-94, 1 maio 2001.

KAPUR, V. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 years old? **Journal of Infectious ...**, v. 170, p. 1348-1349, 1994.

KEANE, J.; GERSHON, S.; WISE, R. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. **England Journal of**, v. 345, n. 15, p. 1098-1104, 2001.

KHADER, S.; PEARL, J.; SAKAMOTO, K. of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN- γ responses if IL-12p70 is available. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 788-795, 2005.

KIPP, A. M.; STOUT, J. E.; HAMILTON, C. D.; RIE, A. VAN. Extrapulmonary tuberculosis, human immunodeficiency virus, and foreign birth in North Carolina, 1993 - 2006. **BMC public health**, v. 8, p. 107, jan 2008.

KLEINNIJENHUIS, J.; OOSTING, M.; JOOSTEN, L. A B.; NETEA, M. G.; CREVEL, R. VAN. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical & developmental immunology**, v. 2011, p. 405310, jan 2011.

KOHLMEIER, J. E.; REILEY, W. W.; PERONA-WRIGHT, G. *et al.* Inflammatory chemokine receptors regulate CD8(+) T cell contraction and memory generation following infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 8, p. 1621-34, 1 ago 2011.

KORBEL, D. S.; SCHNEIDER, B. E.; SCHAIBLE, U. E. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 10, n. 9, p. 995-1004, jul 2008.

KREMER, L.; DOVER, L. Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the beta-ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemical**, v. 430, p. 423-430, 2002.

KÜHL, A. A; PAWLOWSKI, N. N.; GROLLICH, K. *et al.* Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. **Immunology**, v. 128, n. 4, p. 580-8, dez 2009.

LALVANI, A.; SRIDHA, S. BCG vaccination: 90 years on and still so much to learn . **Thorax**, v. 65, n. 12, p. 1035-6, dez 2010.

LEE, K.-W.; LEE, Y.; KIM, D.-S.; KWON, H.-J. Direct role of NF-kappaB activation in Toll-like receptor-triggered HLA-DRA expression. **European journal of immunology**, v. 36, n. 5, p. 1254-66, maio 2006.

LEE, W. L.; DOWNEY, G. P. Neutrophil activation and acute lung injury. **Current Opinion in Critical Care**, v. 7, n. 1, p. 1-7, fev 2001.

LI, LI; WU, C.-Y. CD4⁺ CD25⁺ Treg cells inhibit human memory gammadelta T cells to produce IFN-gamma in response to M tuberculosis antigen ESAT-6. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5629-36, 15 jun 2008.

LIANG, S. C.; TAN, X.-Y.; LUXENBERG, D. P. *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 10, p. 2271-9, 2 out 2006.

LIU, G.; MA, H.; QIU, L. *et al.* Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in mice. **Immunology and cell biology**, v. 89, n. 1, p. 130-42, jan 2011.

LU, Y.; MALMHÄLL, C.; SJÖSTRAND, M. *et al.* Expansion of CD4(+) CD25(+) and CD25(-) T-Bet, GATA-3, Foxp3 and ROR γ t cells in allergic inflammation, local lung distribution and chemokine gene expression. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19889, jan 2011.

MANEL, N.; UNUTMAZ, D.; LITTMAN, D. R. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ t. **Nature immunology**, v. 9, n. 6, p. 641-9, jun 2008.

MARIN, N. D.; PARÍS, S. C.; VÉLEZ, V. M. *et al.* Regulatory T cell frequency and modulation of IFN-gamma and IL-17 in active and latent tuberculosis. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 90, n. 4, p. 252-61, jul 2010.

MCGEACHY, M. J.; CHEN, Y.; TATO, C. M. *et al.* Interleukin 23 receptor is essential for terminal differentiation of effector T helper type 17 cells in vivo. **Nature Immunology**, v. 10, n. 3, p. 314-324, 2009.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. November, 2001.

MENDELSON, M.; WALTERS, S.; SMITH, I.; KAPLAN, G. Strain-specific mycobacterial lipids and the stimulation of protective immunity to tuberculosis. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 85, n. 5-6, p. 407-13, 2005.

MILANI, M.; PESCE, A; OUELLET, Y. *et al.* Mycobacterium tuberculosis hemoglobin N displays a protein tunnel suited for O₂ diffusion to the heme. **The EMBO journal**, v. 20, n. 15, p. 3902-9, 1 ago 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8^a. ed. [S.l: s.n.], 2010a. p. 444

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. http://www.fundoglobaltb.org.br/download/MS-manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf, 2010b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. DE V. EM S. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de Situação - Espírito Santo. 5a ed. Brasília - DF; 2011. p. 39.** 5^a. ed. Brasília - DF: [s.n.], 2011. p. 39

MISHRA, A. K.; DRIESSEN, N. N.; APPELMELK, B. J.; BESRA, G. S. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in Mycobacterium tuberculosis physiology and host-pathogen interaction. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 6, p. 1126-57, nov 2011.

MOKADDAS, E.; AHMAD, S.; SAMIR, I. Secular trends in susceptibility patterns of Mycobacterium tuberculosis isolates in Kuwait, 1996-2005. **The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 12, n. 3, p. 319-25, mar 2008.

MONTAMAT-SICOTTE, D. J.; MILLINGTON, K. A.; WILLCOX, C. R. *et al.* A mycolic acid – specific CD1-restricted T cell population contributes to acute and memory immune responses in human tuberculosis infection. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2493-2503, 2011.

MOSER, B.; BRANDES, M. Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC. **Trends in immunology**, v. 27, n. 3, p. 112-8, mar 2006.

MOUGOUS, J. D.; LEAVELL, M. D.; SENARATNE, R. H. *et al.* Discovery of sulfated metabolites in mycobacteria with a genetic and mass spectrometric approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 26, p. 17037-42, 24 dez 2002.

MURRAY, J. F. A century of tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 169, n. 11, p. 1181-6, 1 jun 2004.

NAKAE, S.; SAIJO, S.; HORAI, R. *et al.* IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5986-90, 13 maio 2003.

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; STROBER, W. Cell Contact – dependent Immunosuppression by CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface – bound Transforming Growth Factor β . **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 5, p. 629-44, 2001.

NIEMANN, J.; TISA, L. S. Nitric oxide and oxygen regulate truncated hemoglobin gene expression in Frankia strain Cc13. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 23, p. 7864-7, dez 2008.

NOSS, E. H.; PAI, R. K.; SELLATI, T. J. *et al.* Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 167, n. 2, p. 910-8, 15 jul 2001.

OJHA, A. K.; BAUGHN, A. D.; SAMBANDAN, D. *et al.* Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. **Molecular microbiology**, v. 69, n. 1, p. 164-74, jul 2008.

ORDWAY, D. J.; SONNENBERG, M. G.; DONAHUE, S. A.; BELISLE, J. T.; ORME, I M. Drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis exhibit a range of virulence for mice. **Infection and immunity**, v. 63, n. 2, p. 741-3, fev 1995.

PATHANIA, R.; NAVANI, N. K.; RAJAMOCHAN, G.; DIKSHIT, K. L. *et al.* Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 10, n. 9, p. 15293-302, 3 maio 2002.

PATHANIA, R.; NAVANI, N. K.; RAJAMOCHAN, G.; DIKSHIT, K. L. Mycobacterium tuberculosis hemoglobin HbO associates with membranes and stimulates cellular respiration of recombinant Escherichia coli. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 18, p. 15293-302, 3 maio 2002.

PEDROSA, J.; SAUNDERS, B. M.; APPELBERG, R. *et al.* Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic Mycobacterium tuberculosis infection of mice. **Infection and immunity**, v. 68, n. 2, p. 577-83, fev 2000.

RAJARAM, M. V. S.; BROOKS, M. N.; MORRIS, J. D. *et al.* Mycobacterium tuberculosis activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 2, p. 929-42, 15 jul 2010.

RAJNI; RAO, N.; MEENA, L. S. Biosynthesis and Virulent Behavior of Lipids Produced by Mycobacterium tuberculosis: LAM and Cord Factor: An Overview. **Biotechnology research international**, v. 2011, p. 274693, jan 2011.

RAMOS-KICHIK, V.; MONDRAGÓN-FLORES, R.; MONDRAGÓN-CASTELÁN, M. *et al.* Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 89, n. 1, p. 29-37, jan 2009.

READ, S.; MALMSTRÖM, V.; POWRIE, F. Cytotoxic T Lymphocyte – associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of CD25⁺ CD4⁺ Regulatory Cells that Control Intestinal Inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 2, p. 295-302, 2000.

RIBEIRO-RODRIGUES, R.; RESENDE CO, T.; ROJAS, R. *et al.* A role for CD4⁺CD25⁺ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clinical and experimental immunology**, v. 144, n. 1, p. 25-34, abr 2006.

ROOK, G. A. W.; HERNANDEZ-PANDO, R. The pathogenesis of tuberculosis. **Annual Reviews of microbiology**, v. 50, p. 259-84, 1996.

SAIGA, H.; SHIMADA, Y.; TAKEDA, K. Innate immune effectors in mycobacterial infection. **Clinical & developmental immunology**, v. 2011, p. 347594, jan 2011.

SAKAGUCHI, M.; MURATA, H.; YAMAMOTO, K. *et al.* TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e23132, jan 2011.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes. **The Journal of Immunology**, v. 155(3), p. 1151-64, 1995.

SAWANT, K. V.; MCMURRAY, DAVID N. Guinea pig neutrophils infected with *Mycobacterium tuberculosis* produce cytokines which activate alveolar macrophages in noncontact cultures. **Infection and immunity**, v. 75, n. 4, p. 1870-7, abr 2007.

SCAPINI, P.; LAPINET-VERA, J. A; GASPERINI, S. *et al.* The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological reviews**, v. 177, n. 4, p. 195-203, out 2000.

SCOTT-BROWNE, J. P.; SHAFIANI, S.; TUCKER-HEARD, G. *et al.* Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 9, p. 2159-69, 3 set 2007.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Programa Nacional de Controle da Tuberculose.
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2ap_padrao_tb_20_10_11.pdf, 2011.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Especial Tuberculose**. . Brasília - DF: [s.n.], 2012

SILVER, R.; LI, Q. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv within human monocytes: requirement for CD4+ T cells in purified protein derivative-positive, but not in purified protein derivative-. **The Journal of Immunology**, n. 15, 1998.

SLY, L. M.; HINGLEY-WILSON, S. M.; REINER, N. E.; MCMASTER, W. R. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. **Journal of immunology**, v. 170, n. 1, p. 430-7, 1 jan 2003.

SREEVATSAN, S.; PAN, X; STOCKBAUER, K. E. *et al.* Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 18, p. 9869-74, 2 set 1997.

SZABO, S. J.; KIM, S. T.; COSTA, G. L. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 655-69, 17 mar 2000.

TAKATORI, H.; KANNO, Y.; WATFORD, W. T. *et al.* Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 1, p. 35-41, 16 jan 2009.

TEITELBAUM, R.; SCHUBERT, W.; GUNTHER, L. *et al.* The M cell as a portal of entry to the lung for the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunity**, v. 10, n. 6, p. 641-50, jun 1999.

VALMORI, D.; RAFFIN, C. Human ROR γ^3 + TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+ Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 45, p. 19402-07, 2010.

VANKAYALAPATI, R.; WIZEL, B.; WEIS, S. E. *et al.* The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. **The Journal of immunology**, v. 168, n. 7, p. 3451-3457, 2002.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; FLAVELL, R. A.; STOCKINGER, B. Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. **Nature immunology**, v. 7, n. 11, p. 1151-6, nov 2006.

VERVER, S.; WARREN, R. M.; BEYERS, N. *et al.* Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 171, n. 12, p. 1430-5, 15 jun 2005.

VIGNALI, D. A. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 7, p. 523-532, 2008.

WELLS, C. D.; CEGIELSKI, J. P.; NELSON, L. J. *et al.* HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis: the perfect storm. **The Journal of infectious diseases**, v. 196 Suppl , n. Suppl 1, p. S86-107, 15 ago 2007.

WHO. Global tuberculosis control: WHO report 2011. **World Health Organization**, 2011.

WINAU, F.; WEBER, S.; SAD, S. *et al.* Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. **Immunity**, v. 24, n. 1, p. 105-17, jan 2006.

WU, H.; LI, P.; SHAO, N. *et al.* Aberrant expression of Treg-associated cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF- β in acute myeloid leukemia. **Oncology letters**, v. 3, n. 5, p. 1119-1123, maio 2012.

ZHENG, L.; HE, M.; LONG, M.; BLOMGRAN, R.; STENDAHL, O. Pathogen-induced apoptotic neutrophils express heat shock proteins and elicit activation of human macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 10, p. 6319-26, 15 nov 2004.

ZINK, A.; HAAS, C. Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 355-366, 2001.

ZUÑIGA, J.; TORRES-GARCÍA, D.; SANTOS-MENDOZA, T. *et al.* Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. **Clinical & developmental immunology**, v. 2012, p. 193923, jan 2012.