



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

BRUNA SOUSA DE MENDONÇA PORTELA

**ANÁLISE DO POTENCIAL PREDITIVO DE MARCADORES DE EXAUSTÃO
CELULAR COMO INDICADORES DE SUCESSO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA
ANTITUBERCULOSE EM PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA**

Vitória

2016

BRUNA SOUSA DE MENDONÇA

**ANÁLISE DO POTENCIAL PREDITIVO DE MARCADORES DE EXAUSTÃO
CELULAR COMO INDICADORES DE SUCESSO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA
ANTITUBERCULOSE EM PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA**

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. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes

Vitória

2016



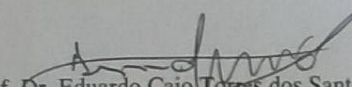
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

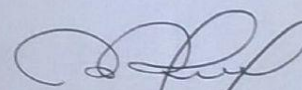
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

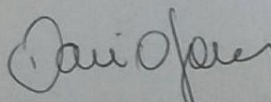
A mestranda BRUNA SOUSA DE MENDONÇA PORTELA apresentou a dissertação intitulada “ANÁLISE DO POTENCIAL PREDITIVO DE MARCADORES DE EXAUSTÃO CELULAR COMO INDICADORES DE SUCESSO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA ANTITUBERCULOSE EM PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA” em sessão pública, como requisito final para 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 **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar a biomédica BRUNA SOUSA DE MENDONÇA PORTELA a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 01 de julho de 2016


Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos
(Membro Externo)


Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues
(Membro Interno)


Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes
(Orientador)

Dedico a DEUS.

*“Porque Dele e por Ele e para Ele são todas as coisas. Glória,
pois, a Ele eternamente, Amém”.*

Romanos: 11:36

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Agradeço de coração ao meu orientador Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes pela oportunidade concedida, por ter acreditado em mim, pela confiança e paciência. Devo a você o meu crescimento científico e profissional.

Ao meu esposo, Marco Aurélio, que sempre foi paciente, me apoiando e ajudando incondicionalmente, sem você eu não teria conseguido. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Aos meus pais, Angelo e Mariana, a minha irmã, Luana, e cunhado, João Daniel, que sempre me apoiaram em todos os momentos.

Aos meus sogros, familiares e amigos que sempre torceram por mim.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular pelos momentos de alegrias e os de desesperos. Agradeço a todos que estiveram comigo nesta difícil caminhada, me apoiando, me dando forças, me ensinando. Agradeço pela paciência e sobretudo pelo amor, carinho e respeito que sempre tiveram por mim. Em particular, à Estevão, Glênia, Carla, Laís, Caio, Renan, Emannoel, Marcelle, Janine, Régia, Juliana, Divan e Andrés.

De forma especial, à Luciana Covre, Lorenzo Stringari, Naira Elane, Vivian de Oliveira, Flávia Coelho e Priscila Martins que sempre estiveram diretamente envolvidos neste trabalho, pelo auxílio tão precioso na execução deste projeto, agradeço pelo incentivo e ensinamentos. Obrigada pela amizade, pela atenção e por serem tão solícitos.

Ao Dr. David Jamil Hadad e as enfermeiras do Centro de Pesquisa Clínica e à Dra. Keila, à Alexandrina e à Cláudia da Unidade de Saúde de Maruípe 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 despertaram para o crescimento intelectual e humano.

A todos os integrantes do Laboratório de Microbacteriologia em especial à Solange, Ledüç, João, Mário, Brunelli, Gerson e Moises Palaci que me ajudaram com treinamentos, ensinamentos e apoio.

Aos queridos funcionários do NDI, Lau, Aryane, Rose, Dete, Andressa, Canal e Geraldo pela disponibilidade em ajudar, pelo bom trabalho e apoio de todos os dias.

Aos membros da minha banca examinadora, Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro-Rodrigues e Dr. Eduardo Caio Torres Santos, por terem aceitado o convite para a minha defesa de dissertação;

Ao Prof. Dr. Leandro Marelli que ainda na graduação me incentivou e acreditou em meu potencial de uma forma que eu não acreditava ser capaz.

À Cristina Reback que me fez acreditar que sonhos são possíveis de serem realizados e me impulsionou a realizar os meus.

Aos colegas de trabalho da Prefeitura Municipal de Anchieta, os quais sacrifiquei com a minha licença e aos colegas do Laboratório do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes que me acolheram e torcem por mim.

Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro e à FAPES pelo financiamento do projeto.

Ninguém vence sozinho...

OBRIGADA A TODOS!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Martin Luther King

RESUMO

A tuberculose (TB), causada pela infecção do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) continua a representar uma séria ameaça para a saúde pública. Regimes atuais de tratamento requerem longa duração e seus efeitos tóxicos muitas vezes levam à baixa adesão, favorecendo o surgimento de cepas multirresistentes. Processos infecciosos que resultam na persistência antigênica ou síndromes inflamatórias crônicas afetam as funções efetoras de células T antígeno-específicas, reduzindo a capacidade de proliferarem, produzirem mediadores inflamatórios ou desenvolverem funções citotóxicas. O fenômeno recentemente descrito como exaustão celular, caracterizado pela alta expressão de receptores tais como PD-1, TIM-3, CTLA-4 e KLRG-1, tem sido descrito como o principal mecanismo envolvido nesta desativação. A severidade de infecções causadas por alguns patógenos como HIV, HBV e HCV já foram correlacionadas ao aumento da expressão de alguns destes marcadores, sugerindo sua importância na patogênese. Além disso, indicam um potencial marcador preditivo da eficácia imunológica/terapêutica, que poderia ser mais explorado no contexto da TB. Neste trabalho objetivamos avaliar a expressão dos receptores de exaustão celular PD-1 e TIM-3 como um potencial alvo de eficácia terapêutica durante o tratamento quimioterápico contra a Tuberculose Pulmonar Ativa. Nós mostramos frequências mais altas de PD-1 e TIM-3 em pacientes com TB e a consequente perda da expressão após o início do tratamento. Simultaneamente foi verificado um aumento na produção de IFN- γ e diminuição da produção de IL-10, o que reflete diretamente sobre a capacidade microbida observada nos ensaios. De forma adicional, observamos uma correlação positiva entre a expressão de células T CD8 (TIM3⁺ e PD1⁺TIM3⁺) e a carga bacilar, indicando a correlação deste receptor à evolução clínica. Nossos resultados ampliam o conhecimento para o desenvolvimento de novas estratégias e de diagnóstico preditivo de eficácia terapêutica, que podem ser mais explorados para o auxílio da eliminação da tuberculose no mundo.

Palavras-chave: Tuberculose. Exaustão Celular. Tratamento Anti-tuberculose.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) infection caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) continues to represent a serious risk to public health. Current treatment routines require long period of care and also are toxic, which often lead to low adherence and increase of multidrug-resistant strains. Infectious processes that result in antigen persistence or even chronic inflammatory syndromes affect the effector function of antigen-specific T cells reducing its ability to proliferate and to produce inflammatory mediators and develop the cytotoxic functions. The phenomenon described as cell exhaustion, which is characterized by a high expression of PD-1, TIM-3, CTLA-4 and KLRG-1 receptors has been described as the main mechanism involved in this immune deactivation. In addition, the severity of infections caused by pathogens such as HIV, HBV and HCV are correlated with increased expression of these markers, which suggest their association in the pathogenesis and also indicate a potential target as predictive marker of immunologic/therapeutic efficacy. In this work we aimed to evaluate the expression of the cell exhaustion receptors PD-1 and TIM-3 as a potential target for therapeutic efficacy during chemotherapy against active pulmonary Tuberculosis. We showed higher frequencies of PD-1 and TIM-3 in patients with TB and the consequent loss the expression after treatment initiation. Moreover, we observed an significant increase of IFN- γ and decreased IL-10 production, which directly reflected on the microbicidal capacity observed in the whole blood killing assay. Additionally a positive correlation between TIM3⁺ and PD1⁺TIM3⁺ expression in CD8 T cell and bacillary load was observed indicating a possible association of this receptor to clinical evolution. Our results extend the knowledge for development of new strategies in predictive diagnosis and therapeutic efficacy for TB, which may be exploited to elimination of tuberculosis.

Keywords: Tuberculosis, Immune exhaustion, Anti-tuberculosis treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxa de incidência estimada de tuberculose, 2013.....	26
Figura 2 – Fluxograma de seleção de pacientes e condução do estudo	54
Figura 3 – Diluição da suspensão bacteriana para o controle da concentração do inóculo para a infecção	58
Figura 4 – Esquema de plaqueamento das cepas após a diluição	59
Figura 5 – Representação do processo de análise das amostras estudadas por citometria de fluxo através do programa FlowJo 7.6.5	64
Figura 6 – Análise da cinética de expressão de PD-1 em células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ em amostras de sangue total de pacientes com tuberculose pulmonar ativa	67
Figura 7 – Análise da cinética de expressão de TIM-3 em células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ em amostras de sangue total de pacientes com tuberculose pulmonar ativa	68
Figura 8 – Análise da cinética de coexpressão de PD-1 e TIM-3 em células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ em amostras de sangue total de pacientes com tuberculose pulmonar ativa	68
Figura 9 – Análise da produção de citocinas (IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-17) no sobrenadante de cultura de sangue total de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, antes do tratamento (T0) ou após o primeiro mês (T1) ou segundo mês de tratamento (T2)	70
Figura 10 – Produção de NO entre os grupos de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, antes do tratamento (T0) ou após o primeiro mês (T1) ou	

segundo mês de tratamento (T2). Os níveis de NO foram determinados através da realização da reação de Griess e expressos em μM 71

Figura 11 – Análise quantitativa do número de unidades formadoras de colônias (UFC) a partir de ensaios WBKA em amostras de sangue total de indivíduos com tuberculose pulmonar ativa (n=19) nos tempos: T0, antes do tratamento; T1, um mês de tratamento; T2, dois meses de tratamento. Resultados de cada um dos grupo de tempo refletem as UFCs encontradas, após 4 horas de incubação 72

Figura 12 - Gráfico de dispersão correspondente aos valores da frequência da expressão de receptores de exaustão celular: PD-1 em células T CD4⁺ e CD8⁺; TIM-3 em células T CD4⁺ e CD8⁺; e duplo positivo (PD-1⁺TIM-3⁺) em células T CD4⁺ e CD8⁺ em relação à carga bacilar 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos Monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para Imunofenotipagem	63
Tabela 2 – Resultados dos Testes de Elegibilidade e Carga Bacilar	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Esquema Básico para tratamento de Tuberculose no Brasil	38
Quadro 2: Esquema de tratamento para a forma meningoencefálica	39

LISTA DE SIGLAS

AB	Anticorpo Biotinilado
ABTS	<i>2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)</i>
AC	Anticorpo de Captura
APC	<i>Allophycocyanin</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAAR	Bacilos-Álcool-Ácido-Resistentes
BD	<i>Becton Dickinson</i>
CCI	Controle de crescimento do inóculo
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Marcador de Diferenciação)
CD3 ⁺	Linfócitos T
CD4 ⁺	Linfócito T auxiliar
CD8 ⁺	Linfócito T citolítico
CFP	<i>Culture Filtrate Protein</i>
CPC	Centro de Pesquisa Clínica
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte – associated Antigen - 4</i>
DO	Densidade Óptica
E	Etambutol
EBV	Vírus Epstein Bar
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Assisted Cell Sorter</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
FSC	<i>Foward Scatter</i>
H	Isoniazida
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
H37RV	Cepa virulenta do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
HBSAG	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>

HIV	<i>Human immunodeficiency vírus</i>
HRP	Enzima Avidina - Horseradish peroxidase
HUCAM	Hospital Universitário Antônio Cassiano de Moraes
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
INF	Interferon
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
kDa	Quilodáltons
KLRG-1	<i>Killer-cell lectin like receptor G1</i>
LAG-3	<i>Lymphocyte activation gene-3</i>
LAM	Lipoarabinomanana
LCMV	Vírus da Coriomeningite Linfocítica
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MS	Ministério da Saúde
NaOH	Hidróxido de Sódio
NDI	Núcleo de Doenças Infecciosas
NK	Células <i>Natural Killers</i>
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NOS ₂	Óxido nítrico sintase
NR	Não Reativo
OADC	ácido oléico-dextrose-catalase
O-K	Ogawa-Kudoh
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PECY-5	<i>Phycoerythrin and a cyanine dye</i>
pH	potencial de íons hidrogênio
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PPD	<i>Purified Protein Derivative</i>
R	Rifampicina
RHZE	Esquema Terapêutico Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SSC	<i>Side Scatter</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
T0	Tempo 0 (paciente sem tratamento)
T1	Tempo 1 (um mês de tratamento)
T2	Tempo 2 (dois meses de tratamento)
TB	Tuberculose
TCR	Receptores de Células T
TDM	Dimecolato de Trealose
TGF	<i>Transforming growth fator</i>
Th	Célula T <i>helper</i>
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-3</i>
Treg	Células T Reguladoras
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
WBKA	<i>Whole Blood Killing Assay</i>
WHO/OMS	Organização Mundial da Saúde
Z	Pirazinamida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. BREVE HISTÓRICO DA TUBERCULOSE	22
2.2. EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE	25
2.3. AGENTE ETIOLÓGICO E SEUS MECANISMOS DE TRANSMISSÃO...	27
2.4. IMUNOPATOGENESE	29
2.5. TRATAMENTO	34
2.6. RECEPTORES DE EXAUSTÃO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA	40
2.7. DIAGNÓSTICO E BIOMARCADORES	45
3. JUSTIFICATIVA	50
4. OBJETIVOS	51
4.1. OBJETIVO GERAL	51
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
5. METODOLOGIA	52
5.1. MODELO DO ESTUDO	52
5.2. TESTES DE ELEGIBILIDADE DO ESTUDO	52
5.3. SELEÇÃO DE PACIENTES	53
5.4. AVALIAÇÃO DA CARGA BACILAR ATRAVÉS DA BACILOSCOPIA E CULTURA DE ESCARRO	54
5.4.1. Baciloscopia	54
5.4.2. Cultura	55
5.5. SELEÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i>	56
5.5.1. Preparo das cepas	56
5.5.2. Preparação do inóculo	58
5.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBICIDA DAS AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL (WHOLE BLOOD KILLING ASSAY - WBKA)	59
5.6.1. Culturas de sangue total	60

5.6.2. Lise e Plaqueamento das culturas de sangue total	60
5.7. AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS	60
5.8. QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRITOS NOS SOBRENADANTES DAS CULTURAS DE SANGUE TOTAL (ENSAIO DE GRIESS)	61
5.9. IMUNOFENOTIPAGEM	62
5.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	65
6. RESULTADOS	66
6.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS	66
6.2. FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T COM FENÓTIPO DE EXAUSTÃO CELULAR NAS CULTURAS DE SANGUE TOTAL <i>EX VIVO</i> DE INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE PULMONAR	66
6.3. PERFIL DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS DE SANGUE TOTAL	69
6.4. QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRITO NOS SOBRENADANTES DAS CULTURAS DE SANGUE TOTAL	70
6.5. ATIVIDADE MICROBICIDA EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL	71
6.6. CORRELAÇÃO ENTRE A CARGA BACILAR E EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE EXAUSTÃO IMUNOLÓGICA	72
7. DISCUSSÃO	75
8. CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS	96

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é caracterizada como um grande problema de saúde pública com magnitude mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, onde contabiliza-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo causador desta enfermidade incidindo em, aproximadamente, 9 milhões de novos casos no mundo (WHO, 2014).

A Tuberculose é uma doença infecciosa ocasionada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* através da inalação dos bacilos, de modo que a transmissão necessita de hospedeiros humanos para sua sobrevivência, acometendo o organismo através do trato respiratório, onde normalmente se estabelece a infecção (GOLDMAN e AUSIELLO, 2005).

Uma característica peculiar do *Mycobacterium tuberculosis* é sua estratégia de sobrevivência, já que, devido ao seu crescimento lento, o bacilo consegue se manter em estado de latência fisiológica durante anos sem se reproduzir. Essa característica tem grande importância na clínica médica, pois, a tuberculose é frequentemente desenvolvida através da reativação de uma infecção antiga, subclínica, ocorrida há vários anos antes (COLSTON e COX, 1999; MADEGAN e PARKER, 1994).

Assim, uma vez nos pulmões, os bacilos do *M. tuberculosis* entram em contato com células fagocitárias do hospedeiro ativando eventos de sinalização entre as bactérias e os macrófagos alveolares (BRENNAN, 2003).

Bactérias do gênero *Mycobacterium spp.* apresentam uma ampla diversidade de polímeros complexos em 60% da parede celular, contribuindo para a dificuldade no combate a doenças micobacterianas por revestir o microrganismo com resistência inata a agentes terapêuticos e às defesas do hospedeiro (BEATTY et al., 2000; KOLATTUKUDY et al., 1997; NIKAIDO; JARLIER, 1991; RASTOGI, 1994).

Nesse ambiente, os bacilos da tuberculose conseguem modular o sistema imunológico do hospedeiro a partir da liberação de elementos de sua parede celular e subsequente tráfico do fagossoma micobacteriano, representando um possível mecanismo através do qual o *M. tuberculosis* influencia o ambiente dentro dos focos de infecção (BEATTY et al., 2000; KOLATTUKUDY et al., 1997).

Diante disto, a sobrevivência das micobactérias no interior dos macrófagos é um dos principais focos de pesquisa na atualidade, uma vez que estas bactérias não apenas são capazes de se ambientarem ao sistema do hospedeiro, como também

interferem ativamente na maquinaria de sinalização da célula hospedeira, neutralizando ou inibindo parte do mecanismo utilizado pelos macrófagos que matam as bactérias (HESTVIK; HMAMA; AV-GAY, 2005).

A característica de uma resposta imunológica competente é a geração de células efetoras que eliminam as células infectadas e/ou secretam citocinas que suprimem a replicação de agentes patogênicos, bem como o recrutamento de outros elementos dessa resposta a fim de estimular a eliminação destes patógenos. No entanto, emergentes evidências sugerem que algumas condições desfavoráveis à resposta imunológica ocorrem com a estimulação antigênica crônica ou devido à inflamação persistente exprimindo na perda da função das células T efetoras durante a infecção crônica, cujo fenômeno é conhecido como Exaustão (YI; COX; ZAJAC, 2010).

Diante disto, a exaustão de células T se desenvolve sob condições de persistência do antígeno, causada por uma infecção crônica através da exposição a uma alta carga antigênica, sendo associada a um programa molecular e fenotípico característico na superfície celular, cujo estímulo pode ser gerado por diversos agentes patogênicos, tais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), assim como em condições em que o organismo está submetido a uma estimulação antigênica crônica de uma infecção subclínica persistente, o qual pode induzir exaustão de células T e contribuir inclusive para a patogênese da tuberculose (SANCHEZ-FUEYO e MARKMANN, 2016; JAYARAMAN et al., 2016; WHERRY, 2011; YI; COX; ZAJAC, 2010).

Estudos recentes têm constatado que a expressão de receptores inibidores está associada com a função comprometida de células T antígeno-específicas em pacientes com infecções crônicas ou câncer, onde células T específicas ao patógeno permanecem sem resposta a estes antígenos e persistem em um estado de exaustão não funcional (JIN et. al, 2010; NGUYEN e OHASHI, 2015).

As atuais informações de sucesso terapêutico antituberculose baseia-se, principalmente, na resposta clínica favorável ao tratamento e na negativação da cultura do *M. tuberculosis* após o segundo mês do uso do quimioterápico (HENAOTAMAYO et al., 2011).

Até o presente momento nenhum marcador celular está sendo utilizado como referência na indicação de eficácia terapêutica da tuberculose. Logo, a presença de marcadores relacionados com a recuperação das funções efetoras e a exaustão imunológica de linfócitos TCD4 e TCD8, bem como de monócitos, poderia ser

empregada como uma importante ferramenta no entendimento dos processos de evolução e cura da tuberculose, além de ser um excelente método de acompanhamento de eficácia do regime quimioterápico.

Em suma, a busca por marcadores que possam fornecer elementos seguros para diferentes estágios da doença tuberculose contribuiria significativamente para a gestão clínica bem como para os ensaios clínicos de novos medicamentos contra a tuberculose. Além disso, a possibilidade de uma ferramenta que possa revelar a eficácia do tratamento e prognóstico clínico é de importância substancial e precisam ser intensificados, principalmente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BREVE HISTÓRICO DA TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) acomete a humanidade há pelo menos cerca de 8.000 anos (HERZOG, 1998; ZAJACZKOWSKI, 2012). Até a metade do século XIX não se reconhecia o caráter infectocontagioso da tuberculose, atribuindo-se à doença diversas causas como a hereditariedade, aos miasmas e a outros determinantes ambientais e sociais, tendo como principal argumento a favor dessas crenças a agregação familiar (COMSTOCK, 1994).

É certo que a tuberculose esteve presente antes do início da história registrada e foi relatada com diferentes nomes durante os séculos. A doença foi conhecida como tísica e consumpção de Hipócrates até o século XVIII, morte branca e grande peste branca durante o século XIX, e outros nomes que evocou o desespero e o horror da doença, como o “ladrão da juventude”, o “Capitão de todos estes homens de Morte”, a tosse cemitério e o “Mal do Rei”. Durante os séculos XVIII e XIX se tornou uma epidemia na Europa ocasionando milhões de mortes (DANIEL, 2006; DORMANDY, 1999; HERZOG, 1998).

Supõe-se que Hipócrates tenha sido o primeiro a estabelecer o entendimento sobre a doença bem como sua apresentação clínica, no qual reputava que a tuberculose era uma doença natural referindo-se a esta enfermidade como “tísica” devido ao esgotamento físico próprio da doença. Em seus relatos, descreve a enfermidade como “doença de consumpção extrema, de caquexia, e clinicamente caracterizada por febre, tosse, expectoração, hemoptises, dor torácica posterior e desnutrição” (ALMEIDA, 1995; DANIEL, 2006; SMITH, 2003).

Hipócrates classificou a tuberculose como sendo uma moléstia hereditária, enunciando que “todo tísico nasce de outro tísico” e ainda definiu o perfil específico de um tuberculoso, referindo que a doença acomete preferencialmente os homens, com idade entre dezoito e trinta e cinco anos, de pele entre o pálido e o amarelado, escápulas proeminentes e abundantes pituítas reconhecendo claramente a predileção dos jovens adultos para a tuberculose pulmonar ativa (ALMEIDA, 1995; COAR, 1982; DANIEL, 2006).

Desde então, a compreensão acerca da tuberculose foi se expandindo. Em 1546, Girolamo Fracastoro mencionou pela primeira vez a noção de contágio da tuberculose

dissociando-o da magia ou de miasmas, relacionando as infecções à presença de agentes, que, uma vez instalados, se multiplicavam e transmitiam as doenças (BLOOM e MURRAY, 1992); em 1679, Franciscus Sylvius descreveu os nódulos pulmonares característicos como "tubérculos", observando sua evolução para cavidades (úlceras pulmonares), no entanto, praticamente todos os grandes patologistas, incluindo Rudolf Virchow, acreditavam que a doença era constitucional, uma forma de tumor ou glândula anormal, e não infecciosa (BLOOM e MURRAY, 1992; CASTIGLIONI, 1933).

Em 1722, especulações plausíveis a respeito da natureza infecciosa da tuberculose foram feitas por Benjamin Marten, que propôs que a causa da tuberculose eram organismos microscópios (*animaliculae*) ou suas sementes, prejudiciais a nossa natureza, e que podem ser transmitidos pela respiração de um tuberculoso que os expele de seus pulmões, podendo ser capturados por uma pessoa sadia (BLOOM e MURRAY, 1992; CASTIGLIONI, 1933).

No entanto, devido as suas variadas formas de manifestação, as lesões eram consideradas como doenças diferentes, logo, em 1819, o francês Rene Laënnec, inventor do estetoscópio, foi o primeiro a reconhecer a unidade de manifestações da doença aparentemente distintas. Laënnec verificou durante as autópsias que as lesões características encontradas nos pulmões, os tubérculos, há muito associadas com a tuberculose, também estavam localizadas na coluna vertebral, nos intestinos e nos gânglios linfáticos, de modo que o mesmo processo patológico acontecia em todo o corpo (BLOOM e MURRAY, 1992; MEDCALF et al., 2013).

Somente em 1882, o médico e bacteriologista alemão e proponente da teoria dos germes Robert Koch publicou a sua descoberta concluindo que a causa da doença era a infecção por um microrganismo específico que ele isolou (MEDCALF et al., 2013; SAKULA, 1982).

Koch desenvolveu técnicas de cultura artificial que lhe permitiram observar mudanças em bactérias ao longo do tempo. Ele concluiu que a inoculação em córnea de coelho com um fluido repleto de bactérias causou alterações no humor aquoso: o fluido translúcido tornou-se turvo com bactérias. Logo, ele identificou o humor aquoso como um meio eficaz para cultura de bactérias (BLENVIS e BRONZE, 2010; KOCH, 1882).

Além disso, ele desenvolveu técnicas extremamente refinadas de microscopia e de aplicação de corantes como eosina, fucsina, safranina e violeta de metila para a

visualização das bactérias e estudo de características morfológicas sutis (BLENVIS e BRONZE 2010; KOCH, 1882).

Koch detectou o bacilo no escarro e em cavidade pulmonar de tuberculosos. Ele descobriu que podia induzir a doença em animais saudáveis inoculando-os com expectoração infectada, logo, concluiu que o escarro era a principal fonte de transmissão da doença, e que os pacientes com tuberculose pulmonar ou laríngea que expectoravam grandes quantidades de bacilos eram particularmente infecciosos. Embora não houvesse multiplicação dos bacilos fora de um hospedeiro vivo, no escarro seco era observado sua patogenicidade por semanas. Por conseguinte, a eliminação adequada de escarro infectado e a descontaminação do meio ambiente foram essenciais para a prevenção da doença (BLENVIS e BRONZE 2010; KOCH, 1882).

Através de seus achados foram possíveis a adoção de estratégias de prevenção e transmissão, sendo adotadas práticas como a esterilização de roupas e lençóis, e a restrição da escarradura em locais públicos foi imposta (BLENVIS e BRONZE 2010; KOCH, 1882; KOCH, 1932).

Progredindo nos achados acerca da tuberculose, em 1943, cerca de 60 anos após a descoberta do bacilo da tuberculose, Selman Waksman na Rutgers University, descobriu o primeiro agente antituberculose eficaz, a estreptomicina, que no ano seguinte foi utilizada pela primeira vez em uma paciente com tuberculose obtendo sucesso no tratamento, sendo, finalmente, declarada a cura para a doença (KESHAVJEE e FARMER, 2012).

Em 1948, o primeiro ensaio clínico em grande escala foi realizado, no entanto, observou-se que muitos pacientes foram curados, porém, uma proporção substancial teve uma recaída devido à resistência à estreptomicina. Desta forma, neste mesmo ano, dois novos agentes antituberculose, tiacetazona e ácido para-amino-salicílico, começaram a ser comercializados, tendo em vista que, quando qualquer um destes fármacos foi administrado com estreptomicina, as taxas de cura aumentaram e diminuíram a resistência adquirida aos antibióticos (CROFTON e MITCHISON, 1948).

A busca por novas drogas para o tratamento da doença continuou e em 1951, a isoniazida foi testada no Sea View Hospital, em Nova York, melhorando drasticamente os resultados clínicos sendo prontamente introduzida para uso. Em seguida, foram desenvolvidas outras drogas: pirazinamida (1952), cicloserina (1952), etionamida (1956), rifampicina (1957), e etambutol (1962) (KESHAVJEE e FARMER 2012).

É fato que com o desenvolvimento de drogas que combatiam a tuberculose, o otimismo que esta doença logo seria eliminada não era restrito a países ricos (KESHAVJEE e FARMER 2012). Entretanto, passados pouco mais de 130 anos da descoberta do bacilo de Koch como causador da tuberculose e 70 anos da descoberta da estreptomicina e outras drogas para seu tratamento, esta doença permanece como um grave problema de saúde pública, sendo atualmente classificada como a segunda principal causa de morte provocada por doenças infecciosas em todo o mundo.

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

Apesar do otimismo dos anos 1960 e 1970 em relação à possibilidade do controle da tuberculose, diante da redução contínua de sua incidência em quase todo o mundo, levou-se a acreditar que a tuberculose estava próxima de ser erradicada. No entanto, a tuberculose (TB) continua sendo um dos maiores desafios de saúde pública em todo o mundo (CHAIMOWICZ, 2001; VAN-LUME et al., 2008).

Tal episódio sucedeu, em especial, devido ao surgimento de novas cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos múltiplos quimioterápicos utilizados no tratamento dessa doença, às infecções concomitantes com a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) ocasionada pelo vírus HIV, bem como da ineficiência dos programas de controle da tuberculose e do declínio das condições socioeconômicas da população (CROFTON, 1992; LEROY et. al, 1997).

Neste contexto, o cenário da tuberculose mundial conecta-se, entre outros, aos seguintes fatores: empobrecimento da população; desigualdade social; advento da epidemia do vírus HIV; aumento dos índices de migrações internas e externas; envelhecimento da população mundial; elevadas taxas de abandono ao tratamento e o aparecimento da resistência a múltiplos medicamentos antituberculose (BRASIL, 2002).

Apesar de ser uma doença potencialmente passível de ser prevenida e curável, a tuberculose é ainda nos dias de hoje um grande problema de saúde pública de relevância mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, tendo em vista que a prevalência global da tuberculose concentra-se em 22 países prioritários responsáveis por aproximadamente 80% do total de casos novos estimados. São eles: Afeganistão, Bangladesh, Brasil, Camboja, China, República Democrática do Congo, Etiópia, Índia, Indonésia, Quênia, Moçambique, Mianmar, Nigéria, Paquistão,

Filipinas, Federação Russa, África do Sul, Tailândia, Uganda, Tanzânia, Vietnã e Zimbawe (WHO, 2014).

Em 2013, a Organização Mundial de Saúde (OMS) destacou a tuberculose (TB) como uma importante doença infecciosa em todo o mundo, estimando-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo da tuberculose e que anualmente ocorrem aproximadamente 9 milhões de novos casos no mundo, correspondendo a uma taxa de incidência de 126 casos por 100.000 habitantes. Em geral, a maioria do número estimado de casos, nesse ano, ocorreu na Ásia (56,0%) e África (29,0%), menor proporção na região do Mediterrâneo Oriental (8,0%), na Região Europeia (4,0%) e na Região das Américas (3,0%) (figura 1) (WHO, 2014).

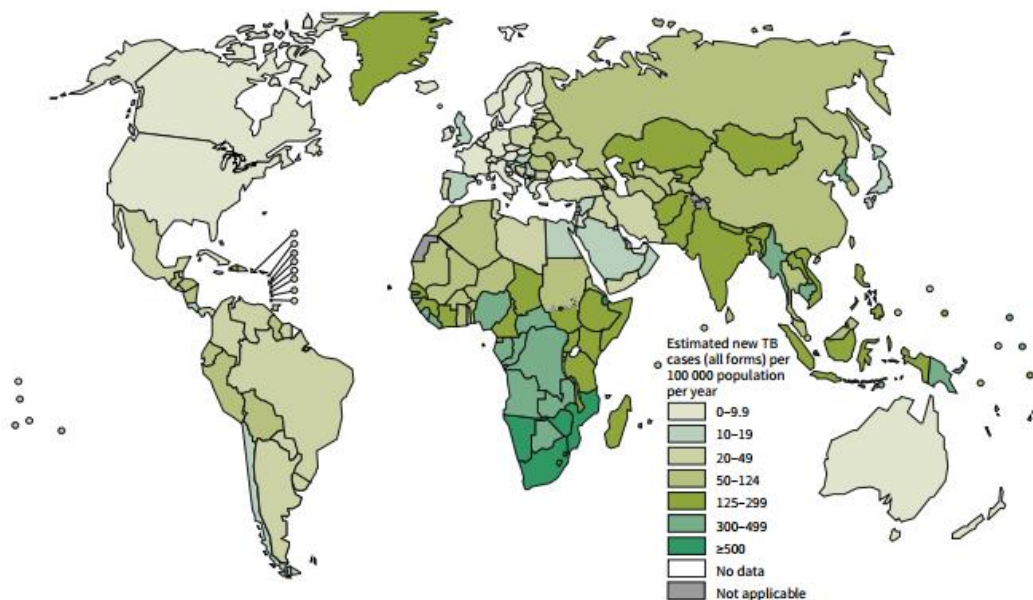


Figura 1 - Taxa de Incidência estimada de tuberculose , 2013.
Fonte: World Health Organization, 2014 (p. 18)

Ainda segundo a OMS, em 2013, ocorreram cerca de 1,5 milhões de mortes por tuberculose, sendo 1,1 milhões entre os HIV-negativos e 0,4 milhões entre pessoas coinfetadas pelo vírus HIV e tuberculose, sendo estas últimas mortes classificadas como decorrentes do HIV (WHO, 2014).

O Brasil ocupa a 16ª posição em número de casos, entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos no mundo. De acordo com os dados do Ministério da Saúde (MS), em 2014, foram diagnosticados 67.966 casos novos de tuberculose, com uma taxa de incidência de 33,5 casos por 100.000 habitantes e, no período de 2003 a 2013, foram registrados, em média, 4.700 óbitos por ano, sendo a

taxa de mortalidade, nesse último ano, de 2,3 por 100.000 habitantes (BRASIL, 2011b; BRASIL, 2015; HIJAR et al., 2014).

O quadro epidemiológico da tuberculose no Espírito Santo se aproxima da média nacional apresentando uma taxa de incidência de 31,1 por 100.000 habitantes e taxa de mortalidade de 2,1 óbitos por 100.000 habitantes, ocupando a 15ª posição em número de casos entre os 26 estados brasileiros e o Distrito Federal (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2014).

2.3 AGENTE ETIOLÓGICO E SEUS MECANISMOS DE TRANSMISSÃO

A Tuberculose é uma doença infecciosa provocada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Desta forma, se trata de infecção bacteriana crônica causada pela inalação das micobactérias, que, normalmente, afeta os pulmões, podendo também atingir qualquer outro órgão ou sistema do organismo (GOLDMAN e AUSIELLO, 2005).

Bactérias deste gênero são bacilos aeróbios imóveis, sem flagelos, intracelular facultativo, não formadores de esporos nem produtores de toxinas, capazes de sobreviver e de se multiplicar no interior de células fagocitárias (KONEMAN et al., 2001).

A morfologia celular típica do *M. tuberculosis* é a de um bacilo delgado, ligeiramente curvo, que mede de 1 – 4 µm de comprimento por 0,3 – 0,6 µm de largura. Possuem longo período de duplicação (16 a 20 h), são corados em vermelho intenso pela coloração de Ziehl-Neelsen, sendo classificadas como micobactérias não pigmentadas de crescimento lento. Seu crescimento é dependente da disponibilidade de oxigênio, nutrientes e pH, devido a isso, para serem cultivados *in vitro* são necessários uso de meios enriquecidos, sólidos ou líquidos, como Lowenstein-Jensen e Middlebrook 7H10 ou 7H11. As colônias apresentam aspecto rugoso, não pigmentado, cor camurça após 14 a 28 dias de incubação a 37 °C (ADLER; STRAUB; FREI, 2005; CRUMP et al. 2003; KONEMAN et al., 2001; VAN-LUME et al., 2008).

A parede celular dos bacilos é rica em lipídeos, formando uma superfície hidrofóbica, a qual os torna resistentes a muitos desinfetantes e corantes comuns de laboratórios. Dificilmente coram-se pelo método de Gram devido às características da sua parede celular. O complexo de ácidos micólicos, arabinogalactanas, e peptidoglicana que compõem a parede celular, constituem uma barreira periférica

hidrofóbica, que durante a coloração por Ziehl-Nielsen retém a fucsina, não sendo descorados pelo álcool-ácido, caracterizando-os como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Os ácidos micólicos (ácidos graxos de cadeia longa) encontrados na parede celular parecem ser o suporte molecular da álcool-ácido-resistência (ADEREM e UNDERHILL, 1999; KONEMAN et al., 2001; MADEGAN e PARKER, 1994; VAN-LUME et al., 2008).

Além dessas características, o agrupamento dos bacilos formando ramos longos e tortuosos conhecidos como cordas, é peculiar da espécie *M. tuberculosis*, e estão diretamente envolvidos em sua patogenicidade. Essa característica foi descrita em 1950 e é originada devido ao composto 6-6' -dimicotil-treolase (TDM) (BLOCH, 1950), substância secretada em maior concentração pelo *M. tuberculosis* no interior dos macrófagos. Tal substância não é tóxica para o patógeno e possui função protetora uma vez que evita a sua destruição pelos macrófagos, atuando sobre a atividade das mitocôndrias, onde é capaz de inibir a respiração e a fosforilação oxidativa (LIMA et al. 2001; RAJNI; RAO; MEENA, 2011).

Outro fator peculiar apresentado pelo *M. tuberculosis* é sua estratégia de sobrevivência, já que, devido ao seu crescimento lento, o bacilo consegue se manter praticamente inativo no interior do hospedeiro, permanecendo em estado de latência fisiológica durante anos sem se reproduzir. Essa característica apresenta grande relevância na clínica médica, uma vez que, a tuberculose, é frequentemente desenvolvida através de uma reativação de uma infecção antiga, subclínica, ocorrida há vários anos antes (COLSTON e COX, 1999; MADEGAN e PARKER, 1994).

Quanto à sua transmissão, o *M. tuberculosis* necessita de hospedeiros humanos para sua sobrevivência, de modo que, sua entrada no organismo se dá através do trato respiratório, onde, normalmente, se estabelece a infecção (SCHLUGER; ROM, 1998).

A transmissão ocorre pela via respiratória através da inalação de bacilos contidos na fala, tosse ou espirro de indivíduos que apresentem a doença clinicamente ativa, que disseminam núcleos secos de gotículas – denominado de núcleo de Wells – com diâmetro menor que 5 µm e contendo de 1 a 3 bacilos que conseguem atingir os bronquíolos, e aí iniciar a sua multiplicação (EDWARDS e KIRKPATRICK, 1986; RAJA, 2004; SALGAME, 2005). Os adultos infectados com mais de 5.000 bacilos/ml no escarro têm grande capacidade de transmissão da tuberculose (AIT-KHALED; ENARSON, 2003).

Após a transmissão, o estabelecimento da infecção ativa depende de vários fatores associados ao bacilo, como a virulência da cepa infectante e a quantidade de bacilos viáveis que atingem o pulmão, quanto fatores associados ao hospedeiro, como a predisposição genética e o grau de ativação do sistema imunológico (COLLINS e KAUFMANN, 2001; VAN-LUME et al., 2008).

2.4 IMUNOPATOGENESE

Apesar de ser causada por um microrganismo simples, a tuberculose é uma doença multifatorial com um amplo espectro de vias efetoras antimicrobianas durante as diferentes fases da infecção, que vão desde respostas imunológicas precoces, imunidade inata, até respostas imunológicas tardia e imunidade adaptativa (BRIGHENTI e LERM, 2012; VAN CREVEL et al., 2002).

Moléculas efetoras, em especial, lipídeos, proteínas e lipoglicanos (como lipoarabinomanano - LAM), presentes na parede celular do bacilo ativam eventos de sinalização entre as bactérias e os macrófagos alveolares (BRENNAN, 2003).

Logo, uma característica de *Mycobacterium spp.* é a presença de uma ampla diversidade de lipídeos complexos originais, que constitui 60% da parede celular, dentre eles destacam-se polissacarídeos, glicopeptídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos, sulfolipídeos e outros lipídeos complexos (RASTOGI, 1994). Assim, esta matriz de baixa permeabilidade e rica em lípidos contribui para a dificuldade no combate a doenças micobacterianas por revestir o microrganismo com resistência inata a agentes terapêuticos e às defesas do hospedeiro (BEATTY et al., 2000; KOLATTUKUDY et al., 1997; NIKAIDO; JARLIER, 1991).

Desta forma, os bacilos são capazes de modular o sistema imunológico do hospedeiro a partir da liberação de componentes de sua parede celular e subsequente tráfico do fagossoma micobacteriano, representando um possível mecanismo através do qual o *M. tuberculosis* influencia o ambiente dentro dos focos de infecção (BEATTY et al., 2000; KOLATTUKUDY et al., 1997).

Por conseguinte, lipídeos micobacterianos são mediadores ideais para subverter as funções microbicidas do hospedeiro estando envolvidos com a atividade biológica, tais como a supressão da proliferação de células mononucleares do sangue periférico, a indução de citocinas e a exacerbação da resposta granulomatosa (BEATTY et al.,

2000; LEE; HARTMAN; KORNFELD, 2009; WILLIAMS; WILLIAMS, 1983; ZAHRT, 2003).

Esta resposta foi descrita há mais de cem anos por Virchow é um substrato morfológico de muitas doenças infecciosas, incluindo a tuberculose, sendo os granulomas sua marca principal, resultado de uma estimulação antigênica crônica em que as células do sistema fagocítico mononuclear são predominantes, dentre elas, macrófagos, células epitelióides e células gigantes multinucleadas, que se agregam em lesões focais bem demarcadas, sendo também compostos por outras células, especialmente os linfócitos, células plasmáticas e fibroblastos (BEATTY et al., 2000; LEE; HARTMAN; KORNFELD, 2009; WILLIAMS; WILLIAMS, 1983; ZAHRT, 2003).

À vista disso, a primeira fase começa com a inalação de bacilos da tuberculose, culminando no primeiro acontecimento na relação do patógeno com o hospedeiro que é a fagocitose por macrófagos alveolares, estando diretamente envolvida na evolução da doença, representando a primeira linha de defesa celular contra a invasão microbiana. Os processos envolvidos na fagocitose incluem a ligação da bactéria na célula hospedeira, internalização, e, finalmente, a inibição do crescimento ou morte (HESTVIK; HMAMA; AV-GAY, 2005; KAUFMANN, 2006; SCHLUGER; ROM, 1998).

Desta maneira, a infecção inicial por *M. tuberculosis* leva rapidamente à ativação de macrófagos alveolares, à indução de citocinas, que são responsáveis por limitar o crescimento dos organismos fagocitados, e o recrutamento de leucócitos adicionais a partir da circulação periférica (FENTON e VERMEULEN, 1996).

A resposta imunológica inata desempenha um papel importante na proteção contra a tuberculose, uma vez que proporciona a primeira linha de defesa contra o agente patogênico, sendo capaz de eliminar a infecção, em muitos casos, se ativado corretamente, de modo que macrófagos alveolares fagocitam o bacilo e, muitas vezes conseguem destruí-los (DHEDA et al., 2010; VAN CREVEL et al., 2002).

Isto posto, a imunidade à infecção por *M. tuberculosis* envolve a indução de uma resposta imunológica mediada por células, em que células T produtoras de IFN- γ ativam os mecanismos de defesa bacterianas de macrófagos infectados, de modo que a via de sinalização e os mecanismos efetores do IFN- γ são cruciais para destruir ou conter a infecção micobacteriana. As células T CD4⁺ secretam IFN- γ para ativar macrófagos infectados e induzir funções microbicidas. As células T CD8⁺ e células

Natural killers também produzem IFN- γ em resposta à infecção por *M. tuberculosis*. (COOPER et al., 1993; SAUNDERS; FRANK; ORME, 1999).

Isto ocorre devido às interações entre *M. tuberculosis* e células do sistema imunológico inato e adaptativo que resultam na secreção de quimiocinas e citocinas, as quais IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF) são particularmente importantes na tuberculose. Entre os seus muitos efeitos, IFN- γ desempenha um papel importante na ativação de macrófagos aumentando a expressão de moléculas de MHC de classe II, resultando na otimização da apresentação de antígenos para as células T (HARDING; BOOM, 2010).

Nesta fase, eliminação dos bacilos depende da capacidade microbicida intrínseca de fagócitos do hospedeiro e fatores de virulência das micobactérias fagocitadas, incluindo aqueles envolvidos em respostas ao estresse oxidativo e nitrosativo, estratégia utilizadas para neutralizar as ações antimicrobianas dos macrófagos subvertendo a progressão normal do compartimento fagossomal impedindo a maturação de um fagolisossomo ativo e inibição de apoptose (DANNENBERG, 1989; FORRELLAD et al., 2013).

Assim, a resposta do hospedeiro inicial pode ser completamente eficaz e matar todos os bacilos, de tal forma que o paciente não apresentará nenhuma chance de desenvolver tuberculose em qualquer momento no futuro (SCHLUGER; ROM, 1998).

No entanto, *M. tuberculosis* evoluiu estratégias para manipular o macrófago, desenvolvendo vários mecanismos para evitar o ambiente hostil do macrófago, permitindo sua sobrevivência intracelular e replicação (HESTVIK; HMAMA; AV-GAY, 2005; KAUFMANN, 2001; MEENA; RAJNI, 2010). Estes mecanismos de sobrevivência incluem o desencadeamento de uma resposta anti-inflamatória, o bloqueio na produção de intermediários reativos de oxigênio nitrogênio, e a redução da acidificação do fagossoma contendo *M. tuberculosis* (SASINDRAN; TORRELLES, 2011).

Isto se deve à produção citocinas anti-inflamatórias (reguladoras), tais como IL-10 e TGF- β que também podem ser produzidas por macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, pois regulam negativamente as citocinas pró-inflamatórias, a proliferação e a ativação de células T, equilibrando a resposta entre a erradicação bacteriana e a sobrevivência do hospedeiro (FLYNN; CHAN; LIN, 2011; VAN CREVEL et al., 2002).

IL-10 inibe a resposta imunológica protetora para agentes patogênicos através do bloqueio da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-12, citocina que polariza a resposta para o padrão Th1, atuando diretamente sobre as células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos e células dendríticas (GAZZINELLI et al., 1992; REDFORD; MURRAY; O'GARRA, 2011).

Além disso, IL-10 também pode inibir a fagocitose e morte microbiana através de limitação da produção de intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio, em resposta ao IFN- γ , todos os quais são fundamentais para mediar a imunidade contra patógenos intracelulares (GAZZINELLI et al., 1992; MOORE et al., 2001; REDFORD; MURRAY; O'GARRA, 2011).

Estudos de tuberculose humana sugerem um papel potencial para a IL-10 na patogênese da tuberculose destacando as duas fontes, inata e adaptativa durante a doença, tornando-se plausível que a fonte celular de IL-10 é dinâmica e é provável que depende da fase da infecção e localização anatômica da tuberculose. Tais estudos também sugerem que durante a infecção crônica, a produção de IL-10 a partir de fontes tanto inata quanto adaptativa pode inibir respostas protetoras no padrão Th1 através de uma ação indireta em macrófagos ou células dendríticas, e embora funcionando para limitar a imunopatologia, pode resultar em infecção crônica. (AWOMOYI et al., 2002; REDFORD; MURRAY; O'GARRA, 2011).

Desta forma, o sistema imunológico inato é também um pré-requisito para a patogênese micobacteriana. Composto por barreiras anatômicas, como a pele, o sistema complemento e vários tipos de células imunitárias inatas, permite a interação dos bacilos com um certo número destas células e liga-se a receptores na sua superfície celular capazes de reconhecer os componentes micobacterianos (DHEDA et al., 2010).

A interação entre a imunidade celular ocorre num ambiente fluido contendo uma grande variedade de mediadores inflamatórios, que apresentam um grande impacto sobre a capacidade do corpo para conter a infecção com êxito (MORTAZ et al., 2012). Logo, o exsudato precoce contém fatores quimiotáticos que atraem monócitos circulantes, neutrófilos e linfócitos, nenhum dos quais consegue eliminar as bactérias de forma muito eficiente (FENTON e VERMEULEN, 1996).

Assim, monócitos sanguíneos e outras células inflamatórias são recrutadas para o pulmão (segunda fase). Estes monócitos diferenciam-se em macrófagos que irão

prontamente fagocitar a fim de eliminá-las (KORBEL; SCHENEIDER; SCHAIBLE, 2008).

Esta fase da infecção é caracterizada pelo surgimento de imunidade mediada por células e a formação de granulomas, onde também ocorre o crescimento bacteriano sob danos teciduais limitados. Por 6-8 semanas após a infecção, células dendríticas apresentadoras de antígenos seguem para os gânglios linfáticos, onde os linfócitos T são ativados e recrutados, migrando para o local da infecção ocorrendo a proliferação destas células formando uma fase precoce do granuloma, em que macrófagos tornam-se ativado para matar micobactérias intracelulares (SASINDRAN; TORRELLES 2011; ULRICH; KAUFMANN, 2006).

No entanto, a contínua ativação de linfócitos T conduz à formação de granulomas, que marcam a fase de persistência da infecção (latência), em que o crescimento e propagação de bactérias em locais de tecido adicionais são limitados. Nesta fase, mais de 90% das pessoas infectadas permanecem assintomáticas, de modo que o *M. tuberculosis* podem sobreviver dentro dos macrófagos alveolares (SASINDRAN; TORRELLES, 2011).

Os granulomas são bem organizados, constituindo em estruturas dinâmicas compostos por células do sistema imunológico em vários estágios de diferenciação, dentre as quais inclui macrófagos derivados do sangue infectados e não infectados, macrófagos espumosos (assim nomeados por conter elevadas concentrações de resíduos lipídicos, procedente da destruição das células infectadas), células epitelióides (singularmente macrófagos diferenciados), e células gigantes multinucleadas (células de Langerhans), linfócitos B e T, e fibroblastos (GUIRADO; SCHELESINGER, 2013; ORDWAY et al. 2005; RUSSELL, 2007; RAMAKRISHNAN, 2012).

Granulomas contendo *M. tuberculosis* são pequenos, compactos, e caracterizados pela presença de um grande número de células T CD4 produtoras de IFN- γ . No entanto, em pessoas imunossuprimidas infectadas pelo bacilo possuem granulomas caracterizados por serem grandes, ricos em macrófagos ativado e com poucos linfócitos circundantes (SASINDRAN; TORRELLES, 2011; ULRICH et al., 2005).

Assim, a principal causa de lesão tecidual e manifestação clínica da doença é a presença de grandes granulomas caseosos e fibróticos cicatriciais devido à inflamação granulomatosa, onde a resposta Th1 do hospedeiro funciona tentando restringir a infecção e impedir o desenvolvimento da doença ativa que ainda não pode

eliminar os bacilos (SASINDRAN; TORRELLES, 2011; SAUNDERS; FRANK; ORME, 1999).

No entanto, é preciso entender que granulomas funcionam tanto como um nicho no qual os bacilos podem crescer ou persistir quanto em um microambiente imunológico em que as células hospedeiras interagem para controlar e prevenir a disseminação. Logo, a mera presença de granulomas é insuficiente para controlar a infecção, em vista disso, o bom funcionamento de todos os granulomas num hospedeiro determina o resultado final da infecção (FLYNN; CHAN; LIN, 2011; GIDEON et al., 2015)

A terceira e última fase é quando a infecção latente e controlada pelo *M. tuberculosis* é reativada. Existem duas principais razões descritas para a ocorrência de um evento de reativação, um declínio na imunidade do hospedeiro devido a causa genética ou ambiental; e um fracasso para desenvolver e manter os sinais imunológicos. Nestas circunstâncias, a estrutura granuloma perturba e resulta em cavitação pulmonar e doença pulmonar (RUSSELL, 2007; SASINDRAN; TORRELLES, 2011; ULRICHS; KAUFMANN, 2006).

Diante disto, a sobrevivência das micobactérias no interior dos macrófagos é um dos principais focos de pesquisa atualmente, uma vez que estas bactérias não apenas são capazes de se adaptarem ao sistema do hospedeiro, como também interferem ativamente na maquinaria de sinalização da célula hospedeira, neutralizando ou inibindo parte do mecanismo utilizado pelos macrófagos que matam as bactérias (HESTVIK; HMAMA; AV-GAY, 2005).

2.5 TRATAMENTO

A tuberculose é uma doença curável em praticamente 100% dos casos novos, sensíveis aos medicamentos antituberculose, desde que realizaos os princípios básicos da terapia medicamentosa e a efetiva operacionalização do tratamento (BRASIL, 2011).

O tratamento ainda possui uma longa duração (seis meses), e o seu abandono ou a irregularidade na manutenção são habituais, constituindo, ainda hoje, um dos maiores desafios para o cumprimento do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT). Por este motivo, este programa incorporou a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) que em 1997 estabeleceu o Tratamento

Diretamente Observado de Curta Duração, denominado no Brasil como DOTS, derivado da sigla em inglês (Directly Observed Therapy Short-Course) (WENDLING et al., 2012).

O DOTS baseia-se na administração direta do medicamento por uma segunda pessoa, que observa e registra a ingestão de cada dose da medicação. A estratégia do DOTS, reputada como uma tecnologia de gestão de cuidado para o controle da tuberculose, inclui, para além do tratamento, outras práticas como investigação do perfil sociocultural e econômico do paciente e de sua família, apoio psicológico aos mesmos, monitoramento do estado de saúde do indivíduo tratado, dentre outras recomendações. Assim, tal tratamento objetiva o aumento da adesão, a maior descoberta das fontes de infecção e o aumento da cura, limitando o risco de transmissão na comunidade (BRASIL, 2005).

Em resumo, a associação medicamentosa correta, as doses ajustadas e o consumo por tempo suficiente são os princípios básicos para o adequado tratamento, evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos, assegurando, portanto, a cura do paciente (BRASIL, 2011).

Ademais, a esses princípios soma-se o DOTS como estratégia essencial para o sucesso do tratamento, visto que estabelece uma mudança na forma de administrar os medicamentos, porém sem mudanças no esquema terapêutico, onde o profissional treinado passa observar a ingestão iorida medicação do paciente desde o início do tratamento até a sua cura, já que o tratamento dos bacilíferos é a atividade prioritária de controle da tuberculose, pois permite interromper a cadeia de transmissão (BRASIL, 2011).

As drogas atuais para tuberculose foram desenvolvidas há 40 anos e tem uma alta taxa de sucesso do tratamento quando os pacientes ingerem corretamente os medicamentos contra a tuberculose ao longo do curso do tratamento. No entanto, os regimes atuais incluem muitos medicamentos e requerem longos períodos de tratamento. Portanto, existem desafios no tratamento atual para tuberculose, tais como encurtar a duração do tratamento, aumentar a adesão e gerenciamento de efeitos adversos das drogas (KWON; JEONG; KOH, 2014; SHIN et al., 2014; SHIN e KWON, 2015).

O tratamento prolongado com múltiplas drogas é necessário para assegurar a cura da doença e para evitar o surgimento de resistência bacteriana, de modo que seu

efeito é determinado principalmente pelos aspectos bacteriológicos, ambientais (anatômicos e bioquímicos) e farmacológicos (WHO, 2004).

Dentre os objetivos gerais para o tratamento da TB estão inseridos: curar a doença no intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes; minimizar a transmissão do *Mycobacterium tuberculosis* a outras pessoas; e impedir uma recaída da doença e propagação da tuberculose resistente a medicamentos, assim, o regime de tratamento bem sucedido tem benefícios tanto para a indivíduo com a tuberculose quanto para a comunidade em que o paciente reside (BLUMBERG et al., 2003).

Além disso, a transmissibilidade se apresenta desde os primeiros sintomas respiratórios, diminuindo drasticamente após o início de tratamento efetivo. Por muitos anos, considerou-se que, após 15 dias de tratamento, o paciente já não seria transmissor da doença, mas o que se verifica é que quando o paciente não tem história de tratamento anterior, nem outros riscos conhecidos de resistência, pode-se considerar que, após 15 dias de tratamento e havendo melhora clínica, este, possa ser reputado como não infectante. Contudo, baseado em evidências de transmissão da tuberculose resistente às drogas, a recomendação é que seja também considerada a negativação da baciloscopia para que as precauções com o contágio sejam efetuadas, principalmente para a biossegurança nos serviços de saúde (BRASIL, 2011).

M. tuberculosis tem características distintas de outras bactérias, incluindo o crescimento lento, com tempos de replicação de 15 a 20 horas e uma capacidade de latência que requer tratamento prolongado para confirmar o sucesso da erradicação. Além disso, este organismo pode multiplicar-se ativamente nos focos caseosos liquefeitos das cavidades pulmonar, que podem conter até 10^8 organismos (SCHLOSSBERG, 2010).

Desta forma, o objetivo do tratamento da tuberculose é garantir cura, livre de recidiva, evitando o surgimento de resistência aos medicamentos, por sua vez, o efeito do tratamento não deve ser considerado pela cura anatômica das lesões, mas sim por sua esterilização, ou, pelo menos, pela eliminação do bacilo na expectoração (WHO, 2004).

Logo, para atingir o objetivo global do tratamento da tuberculose, os seguintes princípios devem ser seguidos: terapia de combinação com mais de três fármacos antituberculose para a prevenção da resistência a fármacos; administração única diária de medicamentos contra a tuberculose e a dosagem exata para otimizar a

eficácia; e ingerir os medicamentos para tuberculose regularmente durante pelo menos 6 meses (SHIN e KWON, 2015).

Em relação ao esquema terapêutico, deve-se atentar ao comportamento metabólico e à localização do bacilo, para que este venha atender a três grandes objetivos (BRASIL, 2011):

- Ter atividade bactericida precoce: capacidade de matar o maior número de bacilos, o mais rapidamente possível, diminuindo a infectividade do caso índice no início do tratamento;
- Ser capaz de prevenir a emergência de bacilos resistentes: o único mecanismo pelo qual emerge a resistência micobacteriana em um indivíduo portador de tuberculose é através da seleção de bacilos mutantes, primariamente resistentes em uma população selvagem. Dessa maneira, o método para evitar a seleção de bacilos resistentes é a utilização de esquemas terapêuticos com diferentes fármacos antituberculose simultaneamente, uma vez que bacilos naturalmente resistentes a um medicamento podem ser sensíveis a outro;
- Ter atividade esterilizante: capacidade de eliminar de forma factível todos os bacilos de uma lesão. A adequada esterilização de uma lesão é a que impede a recidiva da tuberculose após o tratamento.

No Brasil, o tratamento da tuberculose é realizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e é orientado pelas diretrizes do Plano Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT). O Estado fornece o tratamento gratuitamente, seguindo um esquema terapêutico que combina várias drogas (WENDLING et al., 2012).

Os esquemas de tratamento para a tuberculose são padronizados, no Brasil. Em todos os esquemas, a medicação é de uso diário devendo ser administrados preferencialmente em jejum (uma hora antes ou duas horas após o café da manhã), com administração única, ou em caso de intolerância digestiva, com uma refeição (BRASIL, 2011).

Em 1979, o Brasil recomendou um sistema de tratamento para a tuberculose que foi revisto em 2009 pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose, juntamente com o seu comitê técnico assessor baseado nos resultados preliminares do II Inquérito Nacional de Resistência aos Medicamentos antituberculose, que mostrou aumento da resistência primária à isoniazida (de 4,4% para 6,0%),

introduzindo o etambutol como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do Esquema básico (BRASIL, 2011).

O Esquema Básico (quadro 1) é fundamentado 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 Ministério da Saúde preconiza o esquema RHZE por dois meses denominados fase intensiva e RH por quatro meses como fase de manutenção. Tal esquema é indicado para casos novos de tuberculose pulmonar ou extra-pulmonar e em casos de recidiva (independentemente do tempo decorrido do primeiro episódio) ou retorno após abandono com doença ativa em adultos e adolescentes (> 10 anos), exceto a forma meningoencefálica (BRASIL, 2011).

Quadro 1: Esquema Básico para tratamento de Tuberculose no Brasil (BRASIL, 2011)

Regime	Fármacos	Faixa de Peso	Unidades / Dose	Meses
2RHZE Fase Intensiva	RHZE* 150/75/400/275 mg comprimido em dose fixa combinada	20 a 35 kg	2 comprimidos	2
		36 a 50 kg	3 comprimidos	
		> 50 kg	4 comprimidos	
4RH Fase de Manutenção	RH 300/200 mg ou 150/100 mg cápsula ou comprimido	20 a 35 kg	1 comprimido ou cápsula 300/200 mg	4
		36 a 50 kg	1 comp. ou cáps. de 300/200 mg + 1 comp. ou cáps. de 150/100 mg	
		> 50 kg	2 comp. ou cáps. 300/200 mg	

O número antecedendo a sigla indica o número de meses de tratamento.

Dose por comprimido: R = 150mg; H = 75mg; Z = 400mg; E = 275mg.

*RHZE = R (Rifampicina); H (Isoniazida); Z (Pirazinamida); E (Etambutol)

Nos casos de tuberculose meningoencefálica o esquema utilizado (quadro 2) é o RHZE por dois meses (Fase Intensiva) e RH por sete meses (Fase de Manutenção). Nestes casos, o início do tratamento tem que ser o mais precoce possível e deve ser associado ao esquema anti-tuberculose corticosteróide por um período de um a quatro meses dependendo da gravidade (BRASIL, 2011).

Quadro 2: Esquema de tratamento para a forma meningoencefálica (BRASIL, 2011)

Regime	Fármacos	Faixa de Peso	Unidades / Dose	Meses
2RHZE Fase Intensiva	RHZE* 150/75/400/275 mg comprimido em dose fixa combinada	20 a 35 kg	2 comprimidos	2
		36 a 50 kg	3 comprimidos	
		> 50 kg	4 comprimidos	
7RH Fase de Manutenção	RH 300/200 mg ou 150/100 mg cápsula ou comprimido	20 a 35 kg	1 comprimido ou cápsula 300/200 mg	4
		36 a 50 kg	1 comp. ou cáps. de 300/200 mg + 1 comp. ou cáps. de 150/100 mg	
		> 50 kg	2 comp. ou cáps. 300/200 mg	

O número antecedendo a sigla indica o número de meses de tratamento.

Dose por comprimido: R = 150mg; H = 75mg; Z = 400mg; E = 275mg.

*RHZE = R (Rifampicina); H (Isoniazida); Z (Pirazinamida); E (Etambutol)

Na meningoencefalite tuberculosa deve ser associado corticosteróide ao esquema anti-tuberculose: Prednisona oral (1 -2 mg/kg /dia) por quatro semanas ou dexametasona intravenoso nos casos graves (0.3 a 0.4 mg/kg/dia), por quatro a oito semanas, com redução gradual da dose nas quatro semanas subsequentes.

A isoniazida (H) e a Rifampicina (R) são os medicamentos de maior poder esterilizante contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Associadas à pirazinamida (Z) e Etambutol (E), se constituem num esquema altamente eficaz em diminuir rapidamente a população bacteriana, evitando o surgimento de cepas resistentes, interrompendo a transmissibilidade da doença (ARBEX et al., 2010)

Todos os pacientes em tratamento para a tuberculose são recomendados a se submeterem a um acompanhamento regular, não só para observar a resposta ao tratamento, mas também para facilitar a conclusão deste, identificação e gerenciamento de reações adversas. Além disso, o acompanhamento mensal do peso do paciente e, conseqüentemente, o ajuste de dosagem de drogas TB em caso de mudança de peso também é recomendada (BLUMBERG et al., 2003).

O controle do tratamento consiste na execução de atividades planejadas que permitem o acompanhamento da evolução da doença, utilização correta dos medicamentos e o sucesso terapêutico. Sendo assim, faz-se necessária a realização mensal da baciloscopia de controle, nos casos de tuberculose pulmonar, sendo indispensáveis as dos segundo, quarto e sexto meses, no Esquema Básico, com resultados negativos de duas amostras consecutivas no final do tratamento. Em casos de baciloscopia positiva no final do segundo mês de tratamento, é necessária a solicitação da cultura para micobactérias com identificação e teste de sensibilidade (BRASIL, 2011).

No entanto, a resposta por meio de estudos de escarro tem suas limitações, particularmente em doentes com TB pulmonar com baciloscopia e cultura negativa. Nesses pacientes, a radiografia de tórax pode fornecer informações sobre a resposta ao tratamento, mas isso por si só não é recomendado para monitorar a resposta ao tratamento em pacientes com tuberculose pulmonar devido a lesões fibróticas não-responsivas ao tratamento da tuberculose e outras possíveis causas de infiltração pulmonar, tais como câncer de pulmão, pneumonia, bronquiectasia, e hemorragia (SHIN e KWON, 2015).

Haja vista as limitações existentes no monitoramento da tuberculose é preciso enfatizar a necessidade da validação de biomarcadores de resposta à quimioterapia, de modo que eles possam prever o risco de falência terapêutica ou atraso da resposta à terapia antituberculose, contribuindo para melhores resultados no tratamento (RIOU et al., 2012).

2.6 RECEPTORES DE EXAUSTÃO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A característica de uma resposta imunológica eficaz é a geração de células efetoras que eliminam as células infectadas e/ou secretam citocinas que suprimem a replicação de agentes patogênicos, bem como o recrutamento de outros elementos dessa resposta para promover a eliminação destes patógenos. Entretanto, emergentes evidências indicam que algumas condições desfavoráveis à resposta imunológica ocorrem com a estimulação antigênica crônica ou devido à inflamação persistente traduzindo na perda da função das células T efetoras durante a infecção crônica, cujo fenômeno é conhecido como Exaustão (YI; COX; ZAJAC, 2010).

Diante disto, a exaustão de células T se desenvolve sob condições de persistência do antígeno causada pela infecção crônica através da exposição a uma alta carga de antígenos estranhos sendo associado a um programa molecular e fenotípico distintos característico na superfície celular, cujo estímulo pode ser gerado por diversos agentes patogênicos, tais como o HIV, HBV e HCV, assim como em condições em que o organismo está submetido a uma estimulação antigênica crônica de uma infecção subclínica persistente, a qual pode induzir exaustão de células T e contribuir inclusive para a patogênese da tuberculose (SANCHEZ-FUEYO e MARKMANN, 2016; JAYARAMAN et al., 2016; WHERRY, 2011; YI et al., 2010).

Infecções crônicas são frequentemente caracterizadas por diferentes graus de comprometimento funcional de resposta de células T específicas, e esta “falha” é a principal razão para a incapacidade do hospedeiro em eliminar o patógeno persistente. Embora as células T efetoras funcionais são inicialmente geradas durante as fases iniciais da infecção, elas perdem gradualmente sua função durante o curso da infecção crônica (BARBER et al., 2006). O termo exaustão de célula T foi originalmente criado na década de 1990 para descrever a eliminação periférica de células T CD8⁺ antivirais após a infecção crônica pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) em camundongos (GALLIMORE et. al, 1998; MOSKOPHIDIS et. al, 1993; ZAJAC et. al, 1998).

Desde então, a exaustão de células T tem sido demonstrada numa ampla variedade de modelos animais e em seres humanos com infecções virais crônicas, em infecções bacterianas e parasitárias crônicas, no câncer e mais recentemente em situação de inflamação persistente grave devido a septicemia, trauma, cirurgia grande ou lesão por queimadura (BARBER et al., 2006; PAUKEN e WHERRY, 2015; WHERRY, 2011).

O conceito foi posteriormente definido para descrever a persistência das células T antivirais, capazes de realizar proliferação *in vivo*, mas incapazes de exercerem funções efetoras antivirais, seguido pela deleção física destas células T antígeno-específica. Esta condição é um estado hiporreativo de células T em ambiente crônico, com o aumento de receptores inibidores, diminuição das citocinas efetoras e redução da citotoxicidade (JIANG; LI; ZHU, 2015; ZAJAC et. al, 1998).

Para melhor compreensão do processo de exaustão faz-se necessário o resgate acerca do processamento de ativação dos linfócitos T, isto posto, para que as células T expressem receptores inibidores, estas necessitam de ativação prévia a qual depende de sinais fornecidos através do receptor de células T específicos para antígenos e seus respectivos receptores acessórios (correceptores) que estabilizam a interação, aumentando a força de adesão célula-célula gerando sinais intracelulares (CARRENO e COLLINS, 2002; JOHNSON et. al, 2010; LIU e LINSLEY, 1992).

A constatação de que a inativação celular, denominada exaustão de células T foi uma consequência direta da produção regulada de IL-2 levou à busca de um sinal de co-estimulação mestre que tinha como alvo a via de IL-2. Esta pesquisa resultou na identificação da via CD28/B7 como uma via coestimuladora importante para as células

T (DA SILVA et. al, 1991; HARDING et. al, 1992; JENKINS et. al, 1991; SALOMON e BLUESTONE 2001).

Desta forma, receptores de ativação/inibição não funcionam de forma independente, mas modificam as respostas efetuadas através do acoplamento do receptor de células T (TCR) específico para o antígeno nas células T (SALOMON e BLUESTONE 2001).

Por conseguinte, a complexidade da regulação exercida por algumas doenças através do bloqueio da coestimulação de células T tornou-se aparente, portanto, a importância relativa das diferentes vias coestimuladoras é altamente dependente da expressão do tecido, a natureza da resposta inflamatória, e o estado do subconjunto de células T reativas (SALOMON e BLUESTONE 2001).

A modulação da resposta imunológica é necessária para a restauração da homeostase, uma vez que possui função de moderar ou finalizar uma resposta imunológica induzida por um patógeno. Ademais, a expressão de receptores inibidores é de igual importância pois participa do desenvolvimento de tolerância, que é definida como a não responsividade a um antígeno ao qual o organismo foi exposto previamente. Desse modo, a presença de receptores inibidores também é importante para evitar o desenvolvimento de doenças autoimunes (ZAJAC et al., 1998).

A exaustão de células T é um estado de disfunção de células T em ambiente crônico, as quais expressam níveis elevados de receptores inibidores, incluindo receptor de morte celular programada 1 (PD-1, *Programmed Cell Death 1*), gene de ativação linfocitária 3 (LAG-3, *Lymphocyte Activation Gene 3*), domínio de mucina e imunoglobulina em células T (TIM-3, *T cell Immunoglobulin domain, Mucin domain-3*), antígeno de linfócitos T citotóxicos (CTLA-4, *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4*), atenuador de linfócitos T e B (BTLA, *B and T lymphocyte attenuator*) entre outros (CRAWFORD; WHERRY, 2010; JIANG; LI; ZHU, JIN et al., 2010).

Moléculas coinibidoras são reguladores importantes das respostas de células T CD8⁺ em uma variedade de doenças, de modo que receptores como PD-1 e TIM-3 têm atraído a maior atenção (QIU et al, 2015).

PD-1 foi identificado como um marcador para a exaustão das células T, e o bloqueio de sua sinalização na maioria dos casos tem-se mostrado reverter o estado disfuncional de células T CD8⁺ exaustas (BARBER et al, 2006; TRAUTMANN et al, 2006). De igual modo, TIM-3 tem se mostrado semelhante a PD-1 em seu papel como

regulador negativo da função das células T CD8⁺, e seu bloqueio pode restaurar a proliferação e produção de citocinas em células T CD8⁺TIM-3⁺ (JONES et al., 2008; GOLDEN-MASON et al., 2009).

Estudos recentes têm mostrado que a coexpressão de moléculas do *checkpoint* do sistema imunológico ocorre frequentemente em células T específicas do tumor, bem como em células T específica de agentes patogênicos em infecções crônicas (NIRSCHL; DRAKE, 2013).

A co-expressão de PD-1 e TIM-3 nas células T CD8⁺ identifica um subconjunto mais severo de células T CD8⁺ exaustas, e o bloqueio combinado de PD-1 e TIM-3 tem sido mostrado para ser a forma mais poderosa para restaurar a função de células T CD8⁺ exaustas, inclusive, em pacientes com HIV e HCV, a coexpressão de TIM-3 e PD-1 em células T compreendem o menor grupo de células T CD8⁺ e exibem exaustão (FOURCADE et al., 2014; JONES et al., 2008; GOLDEN-MASON et al., 2009; ZHOU et al., 2011).

O desenvolvimento da exaustão de células T provavelmente integra informações de microambientes inflamatórios e tecidos modificados, outras populações de linfócitos tais como células T CD4⁺, células B e células T reguladoras (Treg), sinais também inibidores de citocinas e da superfície celular inibidora e receptores coestimuladores. No entanto, uma característica chave parece ser a exposição crônica e provavelmente contínua do antígeno. Além disso, fatores adicionais, incluindo a ausência de células T CD4⁺ e talvez sinais instrutivos diretamente a partir de receptores inibidores, provavelmente contribuem igualmente para a exaustão das células T (WHERRY; KURACHI, 2015).

Quanto ao seu significado biológico para o hospedeiro, primeiramente é importante salientar que células T exaustas não são inertes, em quase todos os casos as células T exaustas possuem algum grau de função residual que pode ser importante *in vivo*, uma vez que contribuem para a contenção de infecções crônicas se apresentando como um mecanismo de proteção contra danos teciduais, como por exemplo durante infecção pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV) em que a depleção de células T CD8⁺, que inclui células T exaustas, resulta em aumentos rápidos dos títulos virais e progressão para SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), o que sugere um papel importante da função residual de células T exaustas SIV-específicas na

manutenção de um equilíbrio hospedeiro-patógeno, no caso de SIV (JIN *et. al*, 1999; PAUKEN e WHERRY, 2015; WHERRY e KURACHI, 2015).

Em suma, a exaustão de células T manifesta-se normalmente com várias características, tais como a perda progressiva e hierárquica de funções efetoras, regulação positiva sustentada e coexpressão de múltiplos receptores inibidores, expressão alterada e a utilização de fatores de transcrição importantes, perturbações metabólicas, e um fracasso na capacidade da resposta de células de T de memória (SCHIETINGER e GREENBERG, 2014; WHERRY, 2011; WHERRY e KURACHI, 2015).

Portanto, funções tais como a produção de IL-2 e de citocinas polifuncionais, assim como uma elevada capacidade proliferativa, são perdidas precocemente; por consequência ocorrem deficiências na produção de IFN- γ , TNF- α e quimiocinas, bem como na desgranulação, além de um aumento progressivo da quantidade e diversidade de receptores inibidores que são expressos o que é essencial para a manutenção do fenótipo exausto (SANCHEZ-FUEYO e MARKMANN, 2016; JIN *et al.*, 2010; WHERRY e KURACHI, 2015).

No contexto da tuberculose, uma questão crucial na sua patogênese é por que a infecção por *M. tuberculosis* evolui para doença? A maioria das pessoas infectadas por esse microrganismo controlam com sucesso a infecção e apenas uma minoria desenvolvem a doença clínica, apesar de conter a infecção por anos. Tal alegação também é pertinente para modelos animais, visto que algumas linhagens de camundongos controlam a infecção por *M. tuberculosis* por até um ano sem sintomas clínicos, mas, eventualmente, sucumbem à doença (JAYARAMAN *et. al*, 2016; LARSON; SHAFIANI; URDAHL, 2013).

É sabido que o comprometimento da imunidade mediada por células pode levar a uma falha da imunidade, seja causada pelo HIV, drogas imunossupressoras, desnutrição ou outras causas, entretanto, muitas pessoas que desenvolvem a tuberculose não possuem quaisquer fatores de risco identificáveis. Uma possibilidade é que células T reguladoras (Tregs) ou citocinas inibidoras afetam negativamente a resistência do hospedeiro, de igual modo, já foi demonstrado que as células T que expressam receptores inibidores são funcionalmente exaustas, entretanto o que ainda é desconhecido é se a exaustão de células T e a expressão inadequada destes receptores leva ao fracasso imunológico e recrudescimento bacteriano (JAYARAMAN *et. al*, 2016).

Uma possibilidade é que a exaustão de células T poderia desenvolver de forma secundária a recrudescência bacteriana, de maneira que o aumento do crescimento bacteriano aumentaria a carga de antígeno podendo conduzir a estimulação antigênica crônica e gerando por consequência a exaustão de células T (JAYARAMAN *et. al*, 2016).

Por fim, a integração dos sinais através de receptores inibidores e coestimuladores e os seus ligantes é um ponto crítico para a ativação da resposta imunológica e tolerância, portanto, é imprescindível a compreensão destes caminhos pois permitirão o desenvolvimento de novas estratégias para a intervenção terapêutica em doenças mediadas pelo sistema imunológico (CARRENO e COLLINS, 2002).

2.7 DIAGNÓSTICO E BIOMARCADORES

As atuais informações de sucesso terapêutico antituberculose baseia-se, principalmente, na resposta clínica favorável ao tratamento e na negativação da cultura do *M. tuberculosis* após o segundo mês do uso do quimioterápico (HENAO-TAMAYO *et al.*, 2011).

Embora a conversão de cultura de escarro dentro dos primeiros 2 meses de tratamento antituberculose seja preditor de um resultado favorável, a conversão da cultura aos 2 meses nem sempre é preditiva de cura (HONG *et. al*, 2014). Além disso, o estado da cultura de expectoração pode ser mais difícil de controlar em doentes com coinfeção com HIV e não é aplicável no contexto de doença extrapulmonar (RIOU *et al.*, 2012).

O escarro para a avaliação da resposta ao tratamento da doença tem importantes limitações como uma proporção substancial de casos de tuberculose que apresentam baciloscopia do escarro negativa no momento do diagnóstico, haja vista que a coloração álcool-ácido-resistente de escarro apresenta uma baixa sensibilidade, cerca de 50 a 60% para o diagnóstico, tornando urgente o desenvolvimento de novos métodos (HONG *et al.*, 2014; DJOBA SIAWAYA *et al.*, 2008).

É importante ressaltar que um dos principais obstáculos no controle da tuberculose é a longa duração do tratamento. Seis meses de quimioterapia padrão com regimes contendo rifampicina é altamente eficaz, mas muitos pacientes são negligentes. Terapia diretamente observada melhora as taxas de cura, mas requer recursos substanciais de programas. Por consequência, a redução no tempo de tratamento

está entre as mais altas prioridades para programas de controle da tuberculose em todo o mundo (JOHNSON et. al, 2009).

Com efeito, existem relatos sobre a capacidade dos dados clínicos, radiológicos e microbiológicos em prever o resultado do regime de tratamento de curta duração com drogas-padrão, no entanto, não existe atualmente nenhum marcador imunológico substituto que possa prever a resposta à terapia da tuberculose (BRAHMBHATT et. al, 2006).

Estas limitações enfatizam a necessidade de biomarcadores adicionais de resposta ao tratamento da tuberculose. Além disso, a identificação e validação de biomarcadores que são preditivos de risco de falência do tratamento ou resposta atrasada à terapia antituberculose seriam de grande valor no gerenciamento de pacientes e poderia contribuir para melhores resultados (RIOU et. al, 2012).

O reconhecimento e utilização de biomarcadores preditivos que poderiam indicar se uma vacina candidata está funcionando ou se um regime especial de drogas está tendo o efeito desejado são de suma importância (HENAO-TAMAYO et. al, 2011; WALZL et. al, 2011).

A identificação de marcadores imunológicos medidos logo após o início da terapia que predeterminem com precisão o resultado do tratamento beneficiaria os ensaios clínicos de novos agentes antituberculose (BRAHMBHATT et al., 2006).

Vários marcadores vêm sendo estudados como indicadores em testes de eficácia terapêutica de drogas e vacinas (DESTEXHE et. al, 2013; HARROP, 2013), haja vista que a maioria destes marcadores empregam proteínas plasmáticas, refletindo as facilidades de obtenção e avaliação dos resultados, em laboratórios pouco equipados e regiões ainda pouco desenvolvidas. No entanto, fatores relacionados a baixa sensibilidade, considerando que muitos marcadores da tuberculose podem ser produzidos em órgãos específicos sem que haja liberação sistêmica, ou mesmo mediadores produzidos durante infecções por outros organismos infecciosos podem interferir no resultado gerando problemas relacionados a falsa positividade (HENAO-TAMAYO et. al, 2011).

Estudos recentes têm demonstrado que a expressão de receptores inibidores está associada com a função comprometida de células T antígeno-específicas em pacientes com infecções crônicas ou câncer, onde células T específicas ao patógeno permanecem sem resposta a estes antígenos e persistem em um estado de exaustão não funcional (JIN et. al, 2010; NGUYEN e OHASHI, 2015).

Como já relatado anteriormente, a exaustão de células T é um estado de disfunção associado a muitas doenças infecciosas crônicas, incluindo a tuberculose (HENAO-TAMAYO et. al, 2011).

Moléculas como PD-1, TIM-3, CTLA-4 e KLRG-1 possuem um papel importante na modulação negativa e desativação celular em processos inflamatórios (JIN et. al, 2010; BROWN et. al, 2010), além de serem utilizadas como marcadores de células T exaustas em estados de doenças crônicas incluindo autoimunidade e câncer (FRANCISCO; SAGE; SHARPE, 2010; WANG; CHEN, 2011).

Recentemente, o PD-1 tem sido investigado especificamente no contexto da infecção experimental com *M. tuberculosis*, com as facilidades da utilização de animais deficientes para o gene (TOUSIF et. al, 2011). Estes estudos têm sugerido o importante papel desta molécula na modulação da resposta imune inata, limitando as funções de apresentação e diferenciação de células dendríticas, impedindo assim os processos de ativação de linfócitos T e B (RODRIGUE-GERVAIS et. al, 2011).

Recentemente, HENAO-TAMAYO et al., (2011) demonstraram um aumento global do número de linfócitos T CD4+ e CD8+ expressando PD-1 e TIM-3 após a infecção experimental murina por *M. tuberculosis*. Neste mesmo estudo, foi demonstrado a diminuição da expressão relacionada à exaustão imunológica após o início do tratamento específico antituberculose, correlacionando com a diminuição observada nos testes de carga bacilar.

De modo semelhante, Singh; Singh e Chauhan (2013), demonstraram aumento na frequência de monócitos e linfócitos T e B que expressam PD-1 em pacientes com tuberculose pulmonar, e observaram que o bloqueio desse receptor resulta na melhoria da resposta imunológica desses indivíduos, por aumentar a capacidade de produção de IFN- γ .

Além disso, os autores observaram uma significativa redução de PD-1 após o tratamento antituberculose, a qual, foi inversamente proporcional à produção de IFN- γ . Esses dados fortalecem ainda mais a hipótese do impacto negativo da presença de marcadores de exaustão na resposta imunológica de pacientes com tuberculose, bem como seu potencial uso para avaliar a eficácia terapêutica antituberculose (SINGH; SINGH; CHAUHAN, 2013).

Um estudo realizado por McMahan et al. (2010) sugeriu que a expressão de moléculas coinibidoras, TIM-3 e PD-1, demarcaria as células T particularmente

exaustas e determinaria o resultado virológico da infecção aguda pelo vírus da hepatite C (HCV).

Assim, usando análises do fenótipo de superfície e intracelular bem como ensaios multifuncionais em pacientes com infecção aguda e resultados bem definidos, bem como aqueles com infecção por HCV crônica, incluindo amostragem de linfócitos intra-hepáticos, verificou-se que o nível de expressão dupla de TIM-3 e PD-1 em linfócitos T específicos para HCV antecedeu o desenvolvimento de persistência viral, proporcionando uma maior informação do prognóstico de expressão única e o nível viral. Além disso, verificou-se maiores níveis de expressão dessas moléculas inibidoras correlacionadas com diminuição na secreção de citocinas Th1 e potencial citotóxico diminuído (MCMAHAN et. al 2010).

Deste modo, os resultados deste estudo demonstraram que o acúmulo precoce de PD-1⁺ TIM-3⁺ em células T está associada ao comprometimento funcional e, conseqüentemente, com o desenvolvimento de HCV persistente, proporcionando uma base para melhorar as terapias atuais através do bloqueio simultâneo de múltiplas vias inibidoras que poderiam resultar em uma adição de eficácia sem toxicidade excessiva (MCMAHAN et al., 2010).

Em seguimento, a exaustão imunológica também tem emergido como um novo potencial contribuinte para a patogênese do HIV delineando vários mediadores-chave da exaustão de células T durante a infecção pelo HIV, com ênfase em células T reguladoras negativas da superfície celular, PD-1 e TIM-3, uma vez que podem representar um subconjunto de células T com exaustão mais grave. Assim, os efeitos sinérgicos do duplo bloqueio de TIM-3 e PD-1 revelam uma direção para futuras investigações de potenciais intervenções terapêuticas (KHAITAN e UNUTMAZ, 2011).

Com base nisto, é possível determinar a contribuição relativa destas moléculas e outras, tanto como um mecanismo que contribui para um fenótipo exausto e como biomarcadores para melhor discriminar células exaustas ou disfuncionais de populações recentemente ativadas ou senescentes (KHAITAN e UNUTMAZ, 2011).

Até o presente momento nenhum marcador celular está sendo utilizado como referência na indicação de eficácia terapêutica da tuberculose. A presença de marcadores correlacionados com a recuperação das funções efetoras, a exaustão imune de linfócitos TCD4 e TCD8, bem como de monócitos, poderia ser utilizada como uma importante ferramenta no entendimento dos processos de evolução e cura da

tuberculose, além de ser um excelente método de acompanhamento de eficácia do regime quimioterápico.

3. JUSTIFICATIVA

A tuberculose é um grave problema de saúde pública no Brasil e mundo, com gastos anuais de diagnóstico, tratamento e campanhas de conscientização/divulgação superior a meio milhão de reais, somente no Brasil.

Diante da magnitude relacionada a esta doença, que apresenta elevadas taxas de morbidade e mortalidade, é de grande importância do ponto de vista clínico, epidemiológico e de saúde pública, a execução de estudos que visem compreender melhor os fatores responsáveis pelo desenvolvimento da tuberculose pulmonar bem como seus aspectos imunológicos.

Ademais, o surgimento de cepas multidroga-resistentes, associado a grande toxicidade do tratamento e restrição do mesmo para grupos especiais (gestantes, transplantados, etc.), imprime a necessidade do desenvolvimento de testes que utilizem biomarcadores preditivos de eficácia terapêutica.

Até o presente momento nenhum marcador celular está sendo utilizado como referência na indicação de eficácia terapêutica da tuberculose. A presença de marcadores correlacionados com a recuperação das funções efetoras, a exaustão imune de linfócitos TCD4 e TCD8 poderia ser utilizada como uma importante ferramenta no entendimento dos processos de evolução e cura da tuberculose, além de ser um excelente método de acompanhamento de eficácia do regime quimioterápico.

Logo, compreender as vias moleculares alteradas em diferentes subconjuntos de populações celulares, como essas populações de células T exaustas, que poderão ser utilizadas como alvo seletivamente terapêutico se torna uma abordagem promissora para combater a infecção crônica causada por patógenos intracelulares.

Assim, o presente trabalho propôs investigar o potencial preditivo de biomarcadores de exaustão celular como indicadores de sucesso da resposta quimioterápica contra a Tuberculose Pulmonar Ativa.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial preditivo de receptores de exaustão celular como indicadores de sucesso da resposta quimioterápica contra a Tuberculose Pulmonar Ativa.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar a carga bacilar através do isolamento do bacilo e cultura de escarro.
- 2- Analisar o perfil celular e de receptores de exaustão imunológica (PD-1 e TIM-3), em sangue total antes do início do tratamento (T0), após o primeiro (T1) e segundo (T2) meses do tratamento quimioterápico.
- 3- Quantificar a produção *in vitro* de citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL17) e óxido nítrico em sangue total antes do início do tratamento (T0), após o primeiro (T1) e segundo (T2) meses do tratamento quimioterápico.
- 4- Verificar a atividade microbicida em amostras de sangue total.
- 5- Determinar a correlação entre carga bacilar e expressão dos receptores de exaustão imunológica.

5. METODOLOGIA

5.1 MODELO DO ESTUDO

O presente trabalho constituiu um estudo descritivo, transversal, a fim de avaliar o potencial preditivo de receptores de exaustão celular como indicadores de sucesso da resposta quimioterápica contra a Tuberculose Pulmonar Ativa. O estudo foi conduzido nos laboratórios de Micobacteriologia e de Imunologia Celular e Molecular do Núcleo de Doenças Infecciosas, localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

5.2 TESTES DE ELEGIBILIDADE DO ESTUDO

Todos os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. Logo, este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) – UFES, sob o registro de número 26411913.4.0000.5071.

Todos os participantes foram informados sobre os objetivos e a metodologia do estudo proposto, a fim de concordarem com a realização dos procedimentos necessários para a execução da pesquisa, e assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo 1).

Foram elegíveis para participar desse estudo os pacientes com diagnóstico confirmado de infecção por tuberculose, atendidos no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) e no Posto de Saúde de Maruípe no período de agosto de 2014 a fevereiro de 2016. Para compor um grupo controle, selecionamos indivíduos saudáveis com teste tuberculínico negativo com *Purified Protein Derivative* (PPD).

Após receberem detalhadas informações, os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido concordando em participar do estudo cujo objetivo foi avaliar o perfil de marcadores de exaustão celular como indicadores de sucesso da resposta quimioterápica contra Tuberculose Pulmonar Ativa, fazendo-se necessário o estabelecimento de alguns critérios de elegibilidade para a seleção da amostra:

- Maior de 18 anos e menor de 60 anos;
- Não ser portador do vírus HIV, Hepatite B ou C, ou possuir qualquer outra doença crônica;
- Aceitar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1);
- Possuir Tuberculose Pulmonar primária, diagnosticada recentemente, e não ter iniciado o tratamento;

5.3 SELEÇÃO DE PACIENTES

Pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar atendidos no ambulatório de Tisiologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) da UFES encaminhados ao Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do mesmo Hospital e pacientes atendidos no Posto de Saúde de Maruípe foram orientados por seus médicos, conforme Manual de Recomendações para o Controle de Tuberculose no Brasil (BRASIL, 2011a) a realizar exames para confirmação da tuberculose pulmonar fornecendo amostras de escarro para que fossem submetidas à Baciloscopia e Cultura realizados no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI/UFES).

Ao ser emitido o resultado da baciloscopia (em no máximo 72 h) ocorreu a seleção dos pacientes para o estudo, onde os casos confirmados positivos para tuberculose foram convocados para início do tratamento e orientados quanto aos objetivos e metodologia deste estudo onde optaram em serem voluntários ou não.

Pacientes que aceitaram participar deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e antes que fosse iniciado o tratamento tiveram o sangue coletado em tubos heparinizados para execução dos experimentos propostos no estudo e informados quanto ao retorno após 1 mês e 2 meses de iniciado o tratamento (figura 2).

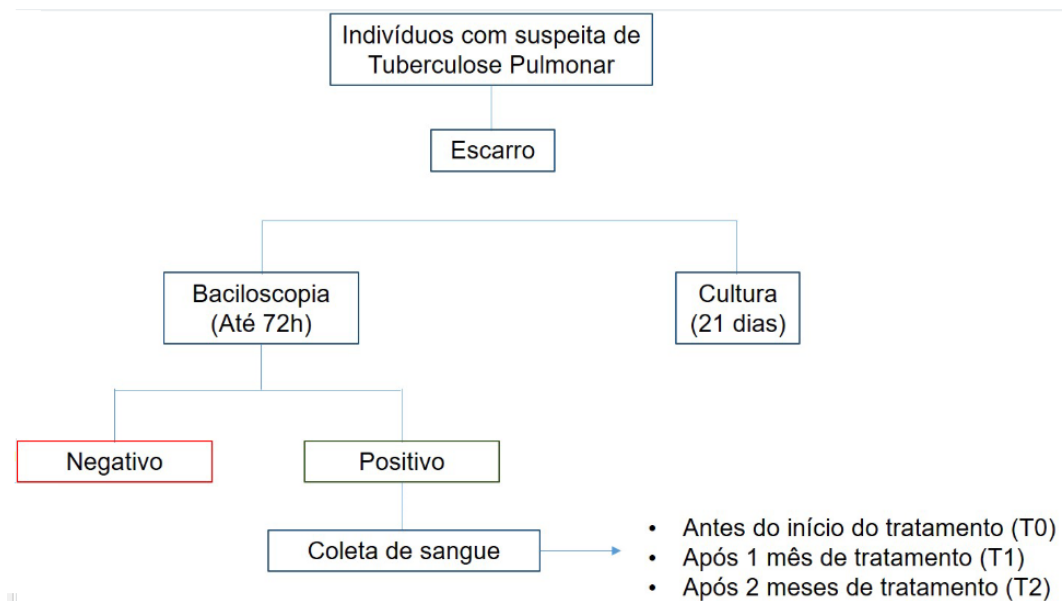


Figura 2: Fluxograma de seleção de pacientes e condução do estudo.

Um grupo foi destinado aos Controles, formado exclusivamente por indivíduos saudáveis, com resultado negativo para o Teste Tuberculínico com *Purified Protein Derivative* (PPD).

5.4 AVALIAÇÃO DA CARGA BACILAR ATRAVÉS DA BACILOSCOPIA E CULTURA DE ESCARRO

Para avaliação da carga bacilar, amostras de escarro dos pacientes foram submetidas à baciloscopia direta do escarro que se caracteriza como um método fundamental pois permite descobrir as fontes mais importantes de infecção.

Desta forma, todas as amostras de escarro chegam ao laboratório de micobacteriologia do NDI/UFES e são processadas no mesmo dia. A rotina consiste na realização de um esfregaço direto em lâmina para baciloscopia (BRASIL, 2008) e de um exame de cultura em meio Ogawa-Kudoh (O-K) através do método de descontaminação de O-K (KUDOH e KUDOH, 1974; BRASIL, 2008), os quais apenas retiram um pequeno volume da amostra.

5.4.1 Baciloscopia

O escarro de pacientes com tuberculose pulmonar ativa – em especial aqueles com lesão cavitária – na maioria das vezes apresentam um grande número de BAAR

(bacilos álcool-ácido-resistentes) que são facilmente detectados pela microscopia direta.

A baciloscopia foi realizada utilizando-se como referência metodológica o protocolo descrito no Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose (BRASIL, 2008), em que a lâmina com o esfregaço é corada pela técnica de Auramina-O para visualização dos bacilos em microscópio de fluorescência. Os resultados positivos são observados através da coloração dos bacilos em amarelo alaranjado em fundo escuro, enquanto nas lâminas com resultados negativos observa-se apenas campos com fundo escuro.

5.4.2 Cultura

O exame de cultura compreende cinco etapas: (1) pré-tratamento das amostras clínicas – visa a preparação das amostras, conforme suas características, para as demais etapas metodológicas; (2) fluidificação-descontaminação – utiliza agentes químicos para homogeneizar a amostra clínica eliminando outros microrganismos da mesma; (3) semeadura em meio de cultura – propicia o contato das micobactérias existentes na amostra com as substâncias nutritivas; (4) incubação – fornece a temperatura correta e constante, necessária para a multiplicação das micobactérias; e (5) leitura dos tubos semeados e registro dos resultados – verifica a presença de colônias e/ou de contaminação, como sinal de presença de micobactérias e registra a ocorrência.

Para a realização da cultura, os escarros foram concentrados por centrifugação e em seguida descontaminados pelo método de Ogawa Kudoh (O-K) e após descontaminação foram semeados diretamente no meio de cultura O-K.

Para descontaminar os escarros, foi introduzido um swab estéril em cada escarro e após serem embebidos nos escarros, os swabs foram colocados em tubos contendo solução de NaOH 4% por 2 min.

Após o término de 2 min, os swabs foram passados imediatamente na superfície dos meios O-K, utilizando movimentos rotatórios e em zigue-zague.

Os meios de cultura foram colocados em estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Os tubos semeados foram lidos após 48 h de incubação e posteriormente de 7 em 7 dias até completar 8 semanas.

5.5 SELEÇÃO DOS ISOLADOS DE *M. tuberculosis*

A cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv - ATCC 27294 (gentilmente cedido pelo laboratório de micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas) foi utilizada devido a suas características de virulência. A cepa foi cultivada em meio Ogawa-Kudoh e armazenada em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Decorrido 14 dias de crescimento foram as bactérias foram aliquotadas e armazenadas em freezers -70°C até posterior preparo para a infecção.

5.5.1 Preparo das cepas

As suspensões-padrão, realizadas de acordo com o procedimento descrito a seguir, podem ser mantidas indefinidamente, sem risco significativo de alteração nas suas características de virulência.

Para o presente estudo foi utilizada a cepa ATCC 27294 (H37Rv), referência de virulência, no modelo experimental de infecção micobacteriana *in vitro*. A preparação das cepas para armazenamento, obedeceu-se ao procedimento abaixo:

A cepa foi crescida em meio de cultura Ogawa-Kudoh (O-K) a 37°C durante 21 dias, onde a bactéria encontrava-se em fase logarítmica de crescimento.

Após o crescimento, as colônias foram retiradas do frasco de cultura com auxílio de alça bacteriológica e inoculadas em tubos com tampa de rosca contendo pérolas de vidro e 2 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) com 0,05% de Tween 80. Em seguida, o tubo foi agitado por 1 min, com a finalidade de realizar o rompimento dos grumos da micobactéria. Após a agitação o tubo permaneceu em repouso por 30 min.

Em seguida, o sobrenadante obtido foi retirado utilizando pipeta Pasteur e armazenado em outro tubo com tampa de rosca, sendo agitado rapidamente e sempre que utilizado para manter a suspensão homogênea.

Concomitantemente, foram separados e preparados tubos de rosca sem pérolas de vidro, contendo 5 mL de PBS com 0,05% de Tween 80 onde foram adicionadas algumas gotas da suspensão bacteriana devidamente homogeneizada.

Para determinar a concentração bacteriana obtida, a densidade óptica (DO) da suspensão foi medida em espectrofotômetro a 265nm, sendo ajustada para o valor desejado com DO equivalente ao padrão 1,0 da escala de McFarland (10^7 UFC/mL). Assim, foi adicionado PBS com 0,05% de Tween 80, quando a DO estava com valor acima do desejado ou acrescentado a suspensão da bactéria quando o valor da DO estava abaixo do esperado.

O volume de 10 mL do conteúdo obtido foi transferido para um tubo cônico de 50 mL e centrifugado a 6000 rpm, sem desaceleração, durante 30 min para formação do *pellet* contendo as micobactérias.

Subsequentemente, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado, o *pellet* ressuspensionado em 50 mL de PBS com 0,05% de Tween 80 e novamente centrifugado a 6000 rpm, sem freio, durante 30 minutos (primeira lavagem). Após a segunda lavagem, o pellet foi ressuspensionado em 1,56 mL de PBS com 80% de Glicerol e 3,44 mL de 7H9 suplementado com OADC, homogeneizado, aliquotado no volume de 0,5 mL em criotubos e armazenados a -70 °C.

5.5.2 Preparação do inóculo

Previamente à realização de cada experimento, suspensões bacterianas previamente preparadas foram retiradas do armazenamento e descongeladas em estufa a 37°C por 1 h, seguindo-se 3 ciclos de sonicação em Lysor por 10 s, com intervalos de 5 min cada, para reduzir os agregados da micobactéria.

Foi utilizada a proporção de uma bactéria para um monócito (1:1) para realizar as infecções. As bactérias na concentração de 10^7 bactérias por mililitro (ml) foram descongeladas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 por 1 h e, no intuito de igualarmos com a quantidade de monócitos realizou-se diluições seriadas.

A partir do inóculo principal (10^7) foram realizadas diluições seriadas, logo:

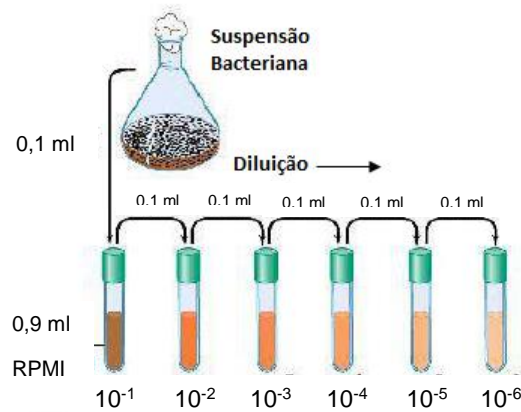


Figura 3: Diluição seriada da suspensão bacteriana para o controle da concentração do inóculo para a infecção.

Como na figura 3, foram 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 retiravam-se 100 μ l transferindo-os para o primeiro tubo de hemólise e assim era obtida a primeira diluição de 10x, neste caso, uma suspensão de 10^6 bactérias/ml (10^{-1}). 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, e assim consequentemente até a sexta e última diluição (10^{-6}).

Finalizada as diluições, placas tripartidas 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 para em seguida ser iniciado o plaqueamento do controle de crescimento interno (CCI).

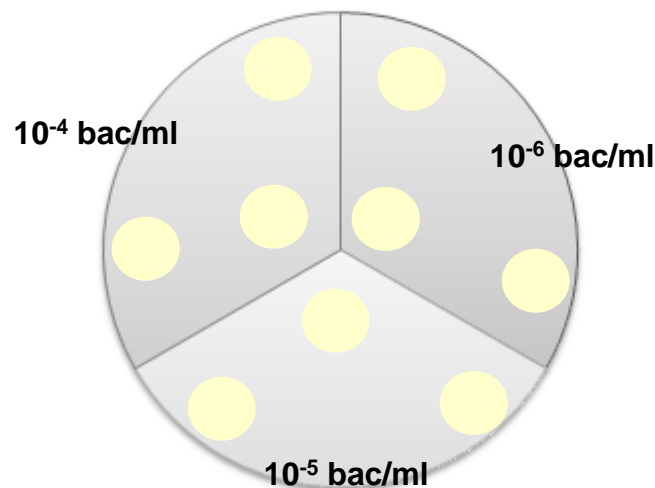


Figura 4: Esquema de plaqueamento das cepas após a diluição.

Para realização 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 μ l de inóculo diluído.

Para a realização dos experimentos aqui descritos, utilizávamos a concentração de 10^5 de bactérias, pois normalmente uma pessoa possui cerca de 1×10^6 de leucócitos os quais cerca de 10% são monócitos (10^5) (LORENZI et al., 2003).

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

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBICIDA DAS AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL (WHOLE BLOOD KILLING ASSAY - WBKA)

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

5.6.1 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 500 μ l de sangue total e 500 μ l de inóculo bacteriano com RPMI em microtubos de 1,5 ml. Os microtubos foram incubados em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante 72h para avaliação da atividade microbicida.

5.6.2 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 min a 13000 rpm, em seguida eram retirados 800 μ l do sobrenadante que foram estocados para pesquisas posteriores em relação à produção de citocinas.

Para a lise das células e libertação das 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 s, ficando em repouso por 10 min, 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 min.

Retirados da centrifuga, eram removidos e descartados 800 μ l do sobrenadante. Para realizar o plaqueamento, 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. Consequentemente, para o plaqueamento, era seguido o mesmo protocolo de realização do CCI.

5.7 AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS

Ensaio imunoenzimático de captura (ELISA) foram utilizados para mensurar a concentração da IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-17 presente no sangue total (*ex vivo*) dos pacientes arrolados no estudo.

A dosagem foi realizada utilizando sistema comercial, o kit da eBioscience ELISA Ready-SET-Go! com pares de anticorpos monoclonais de captura e de revelação biotinilado seguindo as instruções do fabricante.

Para a sensibilização das placas de microtitulação de 96 poços foram utilizados anticorpos de captura - AC (250x: 48µl de AC em 12 ml de *Coating buffer 1x*) durante 18 horas, a 25°C. Em seguida, os poços foram lavados com solução de lavagem (PBS e 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich) e as amostras foram adicionadas e incubadas na mesma temperatura por 2 horas. As placas, então, foram lavadas novamente com solução de lavagem e incubadas com o anticorpo biotinilado - AB (250x: 24 µl de AB em 6 ml de *Diluent Assay*) por 1 hora (25°C). Em seguida, foi feita mais uma lavagem na placa e seguiu-se com a adição e incubação com enzima Avidina-Horseradish peroxidase - HRP (250x: 24 µl de Avidina-HRP em 6 ml de *Diluent Assay*) durante 30 minutos a 25°C.

A reação foi revelada pela adição de 0,005% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% e solução tampão citrato fosfato com 5% ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (1x). Interrompeu-se a reação com adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Gibco) (1%) e prosseguiu-se com a leitura da densidade óptica em um espectrofotômetro (SpectraMax, Molecular Devices) com a absorbância determinada sob o comprimento de onda de 450 nm.

5.8 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRITOS NOS SOBRENADANTES DAS CULTURAS DE SANGUE TOTAL (ENSAIO DE GRIESS)

A formação do óxido nítrico (NO) pode ser determinada indiretamente através da reação de Griess (Green et al., 1982), que quantifica os nitritos acumulados nos sobrenadantes de culturas celulares, uma vez que o NO origina nitritos em solução aquosa.

A reação de Griess compreende na formação de um cromóforo durante a reação dos nitritos com sulfanilamida e aminas heterocíclicas, como a N-(1-naftil)etilenodiamina, em condições de baixo pH. Assim, durante esta reação a pH ácido, os nitritos sofrem diazotação com a sulfanilamida e formam um sal de diazônio. Este, liga a N-(1-naftil) etilenodiamina formando-se um composto rosa que possui um

espectro de absorção característico e que pode ser quantificado por espectrofotometria.

A concentração de nitrito (NO_2^-) produzidos por monócitos como uma medida da produção de óxido nítrico (NO) foi determinada a 540 nm, utilizando o reagente de Griess num espectrofotómetro.

Para esta análise cerca de 50 μl de sobrenadante de cultura de sangue total foi removido dos poços de cultura e plaqueados em duplicata em placas de microtitulação de 96 poços.

Em seguida, as amostras foram incubadas com igual volume de reagente de Griess, composto de 2,5% de ácido orto-fosfórico (H_3PO_4), 1% de sulfanilamida (Sigma-Aldrich) e 0,1% de α -Naftiletilenoaminohidrocloro (Sigma-Aldrich).

A reação foi lida após 10 min no leitor de placas utilizando o comprimento de onda de 540 nm (SpectraMax, Molecular Devices). A concentração de nitrito foi determinada utilizando nitrito de sódio como padrão.

5.9 IMUNOFENOTIPAGEM

A caracterização fenotípica foi realizada com a utilização de sangue total (*ex vivo*) dos pacientes arrolados no estudo, onde foram avaliadas a presença de receptores de exaustão celular (PD-1 e TIM-3) na superfície dos linfócitos T. Para caracterizar o fenótipo dessa população celular, foi utilizado anticorpos adquiridos junto à BD (*Becton, Dickinson and Company*) de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante, utilizando citômetro FACScalibur

Desta forma, foram pesquisados marcadores extracelulares para os receptores CD4, CD8, PD-1 e TIM-3. Para verificação de ligações inespecíficas, utilizou-se anticorpos murinos, específicos para imunoglobulinas de camundongo.

Os anticorpos utilizados durante o estudo estão apresentados na Tabela 1:

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para Imunofenotipagem

TUBOS	ANTICORPOS	MARCADORES
Controle Isotípico	Anti-IgG-1	PE
	Anti-IgI-2a	FITC
	Anti-IgG-2b	PeCy-5
Exaustão de Células T	Anti-CD4	FITC
	Anti-CD8	PeCy-5
	Anti-PD-1	PE
	Anti-TIM-3	APC

Desta forma, para cada marcação celular, foram retirados dos tubos de sangue (*ex vivo*) 0,2 mL. Para primeira etapa da imunofenotipagem, foram adicionados ao sangue a proporção de 1:100 de cada anticorpo em tubos de polipropileno, específicos para citometria de fluxo. Esses permaneceram incubados por 30 minutos a 4°C e ao abrigo da luz. Após essa incubação, os eritrócitos foram lisados com 0,1 mL de solução de lise (BD FACS lysing solution), diluída 10 vezes, por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Então, os tubos foram centrifugados a 1400 rpm por 7 minutos e o sobrenadante descartado. A suspensão de célula obtida depois da lise foi lavada com 1 mL de PBS (*phosphate buffered saline*) gelado e centrifugada a 1400 rpm por 7 minutos. A partir desse ponto, os tubos identificados para o controle isotópico e exaustão foram ressuspensos em Macs Facs, onde as células permaneceriam fixadas e aguardavam a leitura.

A aquisição e leitura das células foram realizadas através do programa BD CELLQUEST Pro e os resultados obtidos foram analisados pelo programa FLOWJO versão v10.0.8. A análise das características fenotípicas da população estudada foi realizada através dos parâmetros de tamanho (FSC - *Foward Scatter*), granulosidade (SSC – *Side Scatter*) e intensidade de fluorescência dos anticorpos marcados com fluorescein isothiocyanate (FITC), *Phicoerithrin* (PE), *Phycoerythrin-Cy5* (PE-Cy5) e Allophycocyanin (APC).

A figura 5 ilustra o processo de análise das amostras estudadas, de acordo com os parâmetros acima citados. Primeiramente foi determinada a população de linfócitos T baseada em a espectros morfométricos através de gráficos de distribuição pontual de tamanho versus granulosidade com a seleção da região de interesse. A partir da

seleção dessa população, foram separados os linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, identificados pelo tamanho celular e expressão desse marcador em FL1 e FL3 respectivamente. Em seguida, foram identificados os eventos de células T CD4⁺, PD1⁺TIM3⁻, PD1⁻TIM3⁺ e PD1⁺TIM3⁺ e CD8⁺, PD1⁺TIM3⁻, PD1⁻TIM3⁺ e PD1⁺TIM3⁺ com base na expressão dos marcadores PD1 e TIM3, cujas fluorescências foram captadas em FL2 e FL4 respectivamente. A avaliação da presença de ligações inespecíficas detectadas através do controle isotópico também foi demonstrada por FL1 versus FL2.

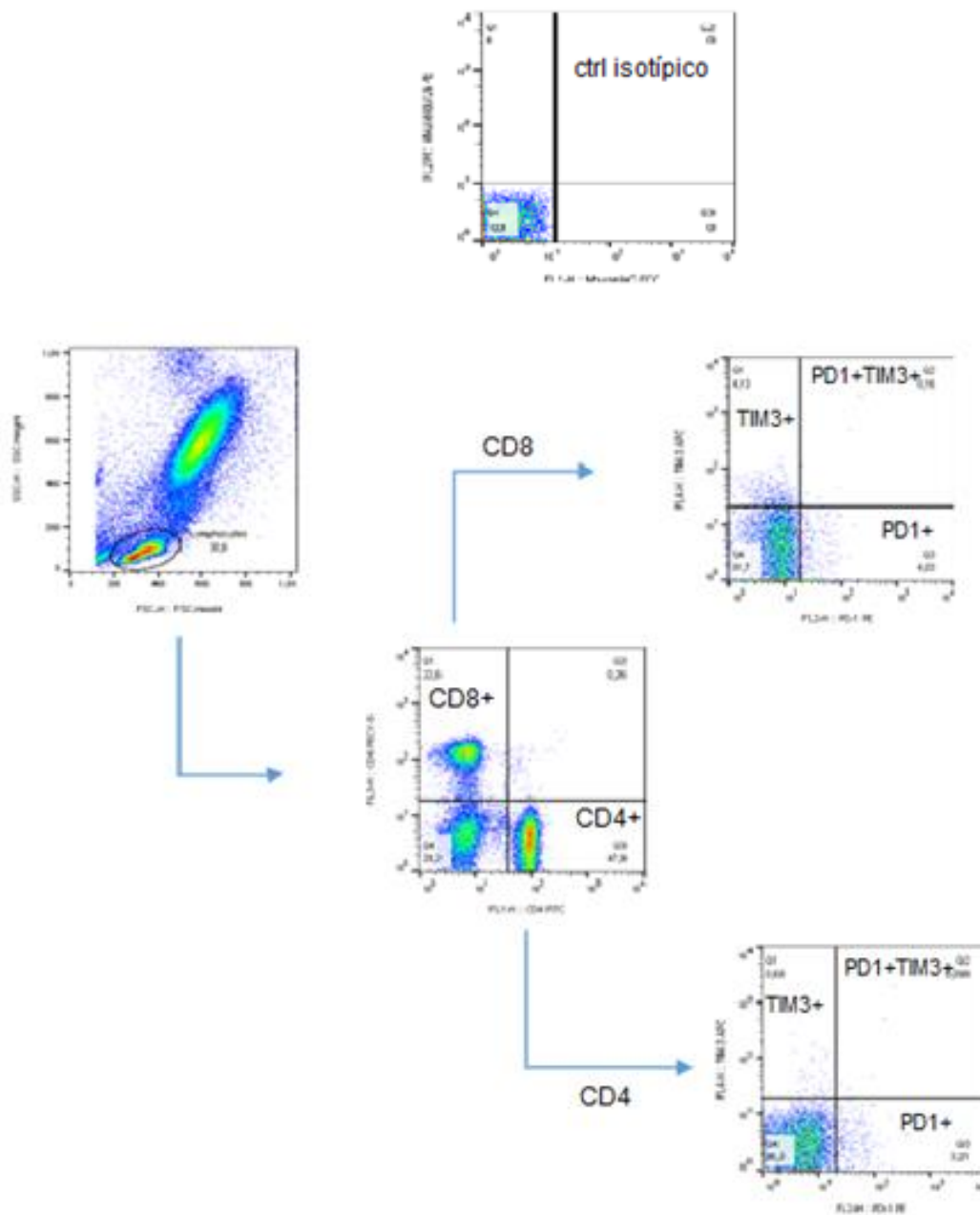


Figura 5: Representação do processo de análise das amostras estudadas por citometria de fluxo através do programa FLOWJO 7.6.5. Representação do controle isotópico, com baixa presença de ligações inespecíficas. Seleção da população de linfócitos, através dos parâmetros de granulosidade versus tamanho. Seleção de células CD4⁺ e CD8⁺, por meio de fluorescência relativa detectada FL1

versus FL3. Quantificação dos eventos de células T CD4⁺ expressando receptores de exaustão celular TIM3 e PD1 mediante a emissão da fluorescência relativa detectada em FL2 versus FL4. Quantificação dos eventos de células T CD8⁺ expressando receptores de exaustão celular TIM3 e PD1 mediante a emissão da fluorescência relativa detectada em FL2 versus FL4.

5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0 levando em consideração a natureza das variáveis estudadas. Para comparação dos dados foi utilizado o teste de T de Student, para amostras não pareadas. Para comparação da frequência da expressão de receptores de exaustão imunológica com a carga bacilar, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson.

Todos os intervalos de confiança foram de 95% e o nível de significância para os testes utilizados foi de 0,05.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS

Dezenove voluntários recém diagnosticados com tuberculose pulmonar e sem tratamento enquadrados nos critérios de inclusão aceitaram participar deste estudo. Desta forma, todos os pacientes que aderiram ao projeto assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e suas amostras de sangue cedidas foram previamente testadas para os vírus da Hepatite B, Hepatite C e HIV de modo a não interferir nos resultados da pesquisa (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados dos Testes de Elegibilidade e Carga Bacilar

	HBsAg ¹	HCV ²	HIV ³	BACILOSCOPIA ⁴
PAC 01	NR ⁵	NR	NR	++
PAC 02	NR	NR	NR	+
PAC 03	NR	NR	NR	+++
PAC 04	NR	NR	NR	+++
PAC 05	NR	NR	NR	+++
PAC 06	NR	NR	NR	+
PAC 07	NR	NR	NR	+
PAC 08	NR	NR	NR	+
PAC 09	NR	NR	NR	+++
PAC 10	NR	NR	NR	+++
PAC 11	NR	NR	NR	+++
PAC 12	NR	NR	NR	+
PAC 13	NR	NR	NR	+
PAC 14	NR	NR	NR	+
PAC 15	NR	NR	NR	+
PAC 16	NR	NR	NR	+
PAC 17	NR	NR	NR	+++
PAC 18	NR	NR	NR	+
PAC 19	NR	NR	NR	+++

6.2 FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T COM FENÓTIPO DE EXAUSTÃO CELULAR NAS CULTURAS DE SANGUE TOTAL *EX VIVO* DE INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE PULMONAR

Com o objetivo de avaliar a frequência de células T de exaustão *in vitro* durante a infecção pelo *M. tuberculosis* e sua expressão durante a doença sem tratamento e nos dois primeiros meses de tratamento, realizamos a análise fenotípica de receptores de exaustão (PD-1 e TIM-3) em populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, através de citometria de fluxo, em amostras de sangue total dos pacientes, em três tempos

distintos (T0 – sem tratamento, T1 – um mês de tratamento e T2 – dois meses de tratamento).

A análise dos grupos revelou uma redução significativa da população de células T CD4⁺ e CD8⁺ que expressavam o receptor de exaustão celular PD-1 antes do tratamento e durante os dois primeiros meses de tratamento.

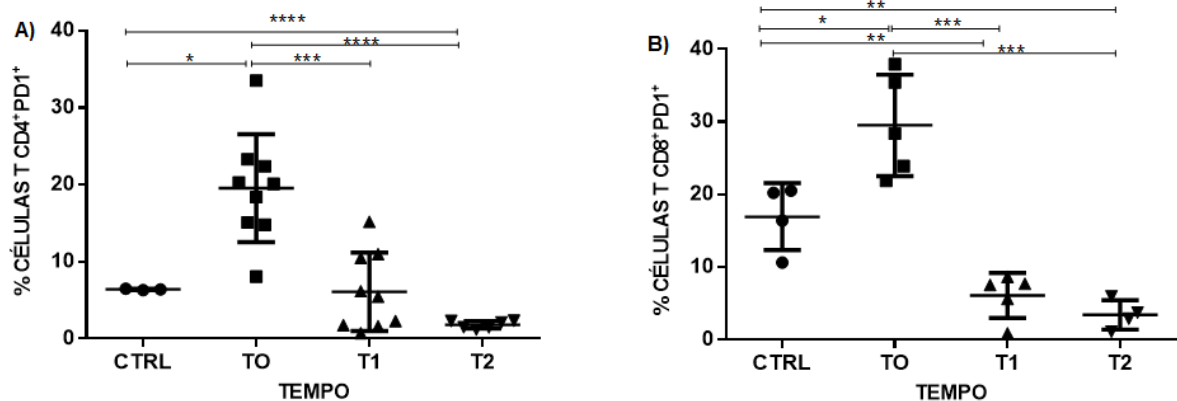


Figura 6: Análise da cinética de expressão de PD-1 em células T CD4⁺ e CD8⁺ em amostras de sangue total de pacientes com tuberculose ativa. As amostras foram obtidas antes do tratamento (T0) ou após o primeiro (T1) e segundo mês de tratamento (T2). [A] Frequência global da expressão de PD-1 em células T CD4⁺ e [B] T CD8⁺.

Desta forma, observamos que durante a doença ativa existe um aumento da frequência desse receptor na população de linfócitos T CD4⁺ (Figura 6a) bem como em linfócitos T CD8⁺ (Figura 6b). Esse aumento é evidente nos pacientes infectados antes do início em relação aos mesmos pacientes após o primeiro e segundo meses de tratamento. Além disso, observamos que na população de linfócitos T CD4⁺, a expressão de PD-1 reduziu significativamente já no primeiro mês de tratamento, permanecendo a frequência desse receptor correspondente entre o primeiro e segundo mês. Por outro lado, na população de linfócitos T CD8⁺ a redução na expressão desse receptor, foi de forma gradual durante o tratamento.

Também analisamos os níveis de expressão de TIM-3 em células T CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes com tuberculose pulmonar ativa antes do início do tratamento e nos dois primeiros meses do tratamento. De igual modo, observou-se um aumento da frequência de células T CD4⁺TIM-3⁺ (Figura 7a) e células T CD8⁺ TIM-3⁺ (Figura 7b) nos pacientes infectados em relação aos mesmos pacientes já no primeiro mês de tratamento.

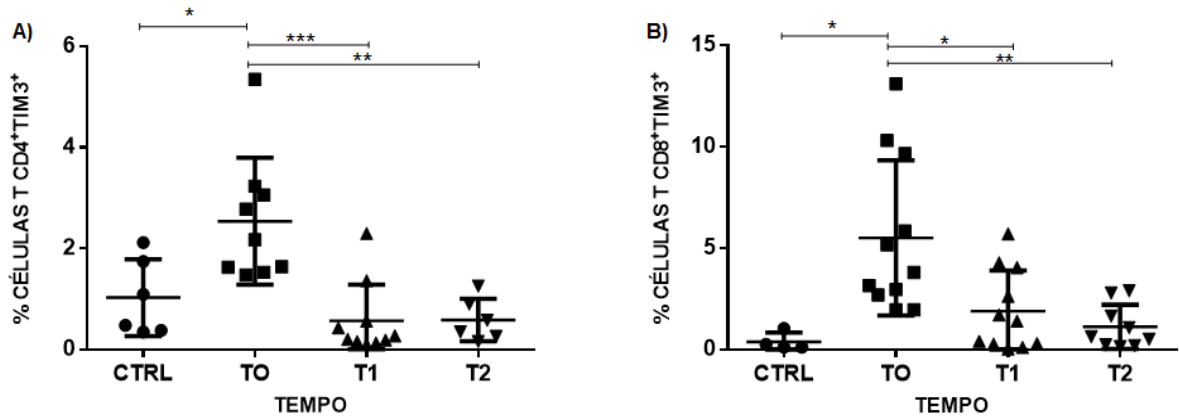


Figura 7. Análise da cinética de expressão de TIM-3 em células T CD4⁺ e CD8⁺ em amostras de sangue total de pacientes com tuberculose ativa. As amostras foram obtidas antes do tratamento (T0), após o primeiro (T1) e segundo mês de tratamento (T2). [A] Frequência global da expressão TIM-3 em células T CD4⁺ e [B] T CD8⁺.

Quanto à frequência da expressão simultânea dos receptores de exaustão celular (Figura 8), observamos maior presença de células T CD4 duplo positivas (CD4⁺PD1⁺TIM3⁺) bem como de células T CD8 duplo positivas (CD8⁺PD1⁺TIM3⁺) no momento da tuberculose ativa antes do início do tratamento sugerindo um perfil de exaustão na Tuberculose pulmonar ativa. Em contrapartida, já no primeiro mês de tratamento a coexpressão desses receptores sofre uma redução significativa deste perfil de exaustão com contínua redução no segundo mês de tratamento sugerindo uma inversão do fenótipo de exaustão expressos por linfócitos T CD4 e CD8 e a possível recuperação do sistema imunológico.

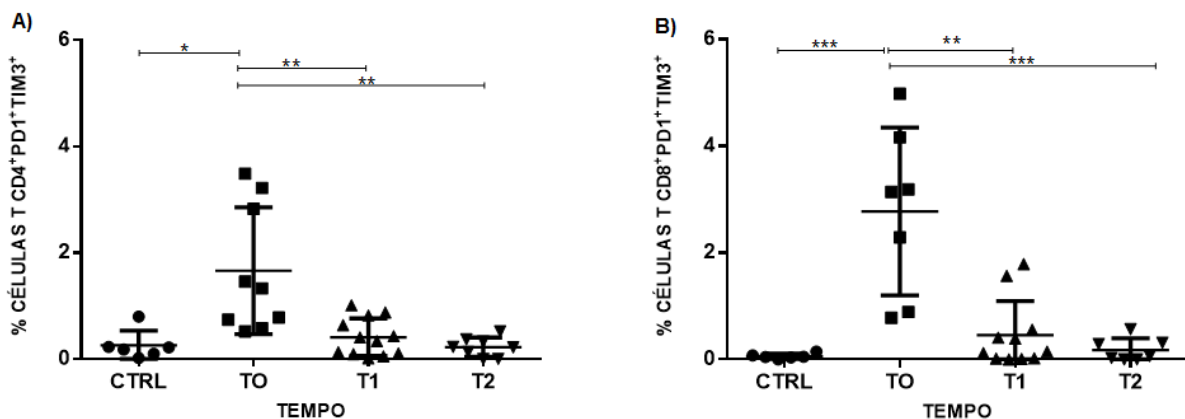


Figura 8. Análise da cinética de coexpressão de PD-1 e TIM-3 em células T CD4⁺ e CD8⁺ em amostras de sangue total de pacientes com tuberculose ativa. As amostras foram obtidas antes do tratamento (T0), após o primeiro (T1) e segundo mês de tratamento (T2).

6.3 PERFIL DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS DE SANGUE TOTAL

Diante dos resultados obtidos com a imunofenotipagem, avaliamos a produção de citocinas nas amostras obtidas através da análises por Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA) das citocinas IL-4, IL10, IL-17A e IFN- γ , a fim de observarmos a comunicação entre as células durante a doença ativa e nos dois primeiros meses de tratamento, uma vez que a produção de citocinas é determinante para o direcionamento e funcionamento adequado da resposta imune celular.

Sendo assim, observamos que durante a doença ativa a proporção de IFN- γ liberado pelas células produtoras de IFN- γ caiu com a persistência da infecção, por outro lado, com o início do tratamento este perfil foi revertido havendo um aumento significativo da liberação desta citocina (Figura 9).

Um comportamento inverso foi observado na análise de IL-10, a qual demonstrou um aumento em sua liberação durante a doença ativa e consequente redução já nos primeiros meses de tratamento (Figura 9).

Quanto aos níveis das citocinas IL-4 e IL-17 (Figura 9), estas não apresentaram diferença significativa.

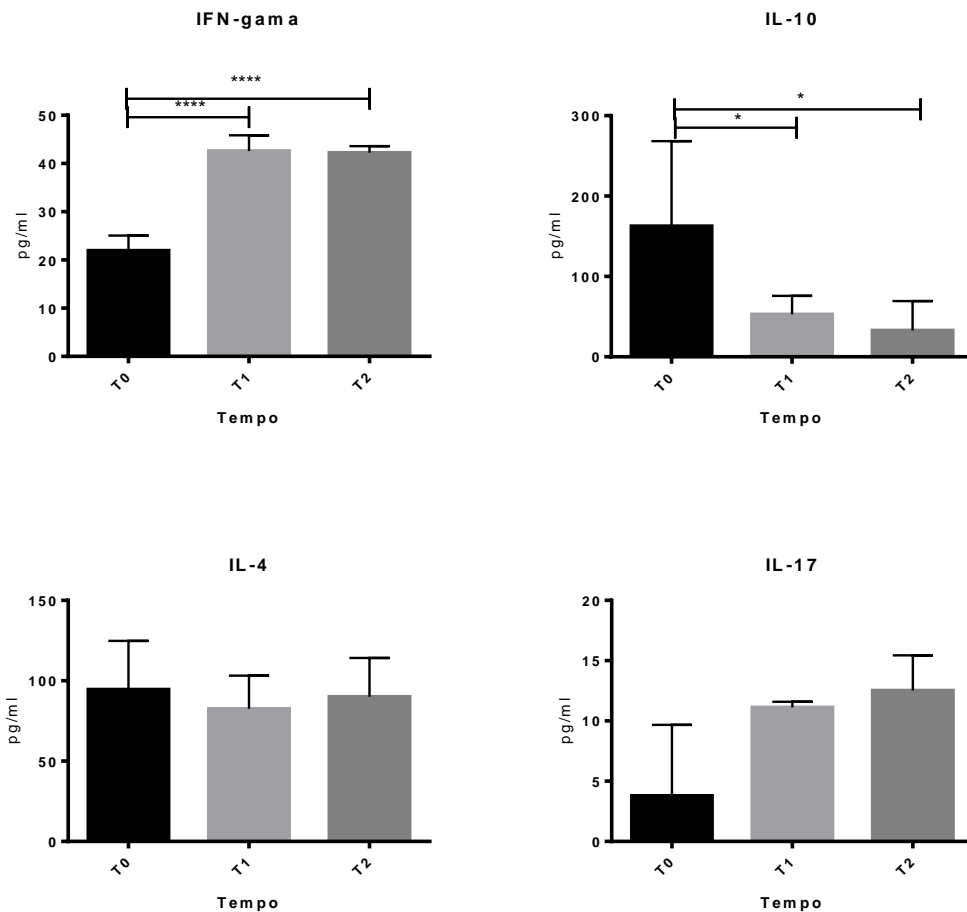


FIGURA 9. Análise da produção de citocinas (IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-17) no sobrenadante de cultura de sangue total de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, antes do tratamento (T0) ou após primeiro mês (T1) ou segundo mês (T2) de tratamento.

6.4 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRITO NOS SOBRENADANTES DAS CULTURAS DE SANGUE TOTAL

Para a dosagem do óxido nítrico, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess, que consiste na detecção de nitrito (NO_2^-), resultante da oxidação do NO nos sobrenadantes de cultura previamente coletados.

A produção de nitrito foi avaliada em amostras de sobrenadantes de culturas de sangue total de indivíduos participantes deste estudo antes do tratamento antituberculose, no primeiro e no segundo meses de tratamento.

Considerando-se que a participação do óxido nítrico (NO) é essencial para eliminar o *M. tuberculosis*, avaliamos se a diferença observada entre a doença ativa e durante o tratamento poderia estar relacionada com a capacidade de produção de nitrito.

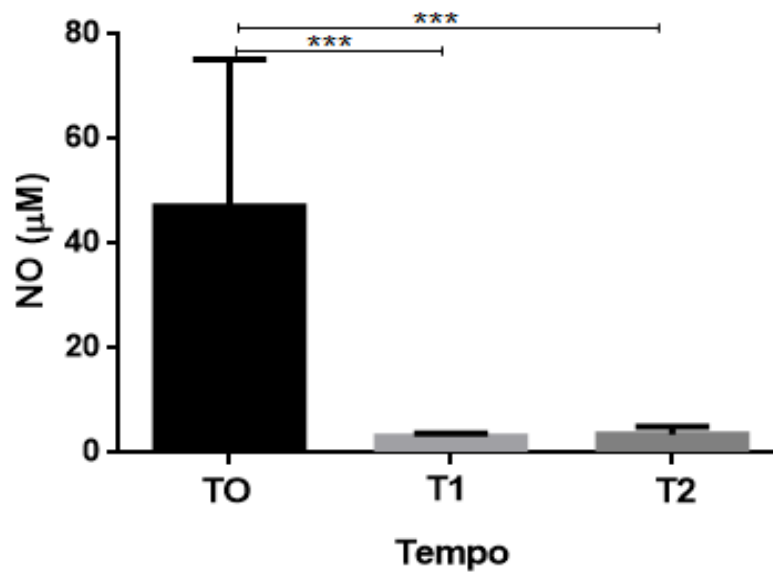


Figura 10. Produção de nitrito entre os grupos de de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, antes do tratamento (T0) ou após o primeiro mês (T1) ou segundo mês de tratamento (T2). Os níveis de nitrito foram determinados através da realização da reação de Griess e expressos em μM .

A análise da concentração de nitrito (NO_2^-) mostra uma maior concentração de nitrito durante a doença ativa, isso ocorre porque um dos mecanismos pelo qual o macrófago mata o bacilo da tuberculose é o aumento da capacidade de sintetizar óxido nítrico (NO). No entanto, com o início do tratamento, observamos uma redução bastante significativa na produção deste radical livre.

6.5 ATIVIDADE MICROBICIDA EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL

Ensaio de morte mediada por células *in vitro* podem proporcionar uma medida promissora da capacidade funcional das células para matar micobactérias.

Desta forma, o ensaio de Atividade Microbica no Sangue Total (Whole Blood Killing Assay - WBKA) tem a vantagem de incluir todas as células com potencial atividade antimicobacteriana em comparação com infecção de monócitos diferenciados isolados, além disso, são mais facilmente adaptáveis para uso em estudos de grande escala.

Com o objetivo de avaliarmos a capacidade microbica dos indivíduos com tuberculose pulmonar ativa sem tratamento e durante os dois primeiros meses de tratamento realizamos o ensaio de Atividade Microbica no Sangue Total (WBKA).

Culturas de sangue total (72 h) foram estabelecidas utilizando-se amostras de cada um dos indivíduos durante os tempos pré-tratamento e tratamento estabelecidos

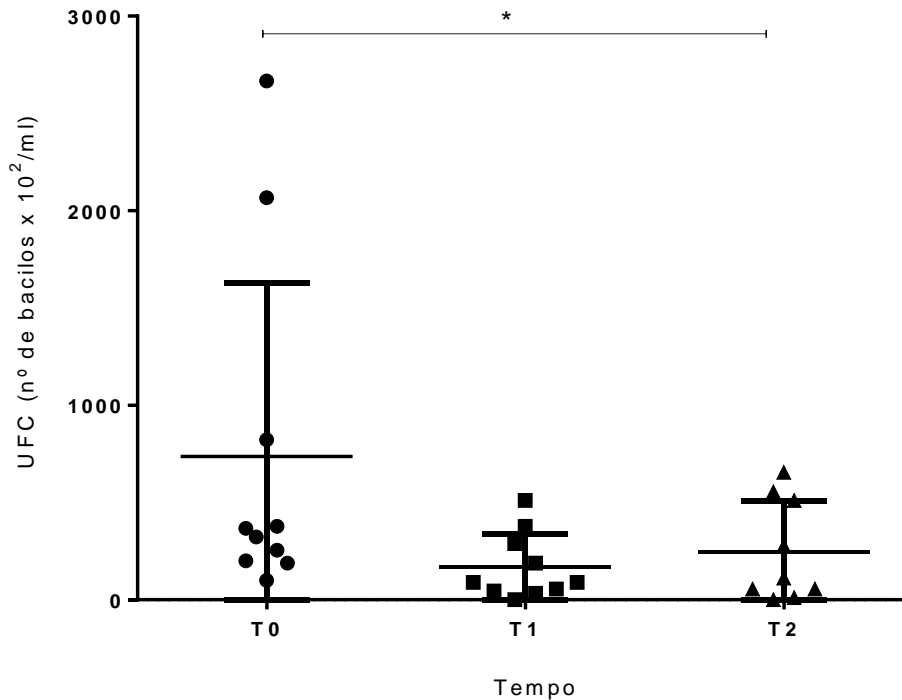


Figura 11: Análise quantitativa do número de unidades formadoras de colônias (UFC) a partir de ensaios WBKA em cultura de sangue total indivíduos com tuberculose pulmonar ativa (n=19) nos tempos: T0, antes do tratamento; T1, um mês de tratamento; T2, dois meses de tratamento. Resultados de cada um dos grupo de tempo refletem as UFCs encontradas, após 72 h de incubação.

Dados do experimento de WBKA demonstram que após 72h, a atividade microbicida dos pacientes no segundo mês de tratamento foi significativamente maior ($p < 0,005$) à dos demais tempos (Figura 11).

6.6 CORRELAÇÃO ENTRE A CARGA BACILAR E EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE EXAUSTÃO IMUNOLÓGICA

Ao se comparar uma possível correlação entre a frequência de receptores de exaustão imunológica com a carga bacilar dos pacientes no momento do diagnóstico de tuberculose pulmonar ativa através da análise do escarro por baciloscopia (Figura 12), não se observou diferença estatística quando analisamos a expressão isolada do

receptor PD-1 em células T CD4⁺ (A), bem como em T CD8⁺ (B). O mesmo foi observado na análise isolada do receptor TIM-3 em células T CD4⁺ (C), ou na avaliação simultânea da expressão destes marcadores (duplo positivo) em células T CD4⁺ (E). De forma diferente, observou-se uma correlação positiva significativa entre a expressão isolada de TIM-3 em células(D), bem como a frequência da expressão de PD-1 e TIM-3 (duplo positivo) em células T CD8⁺ (F).

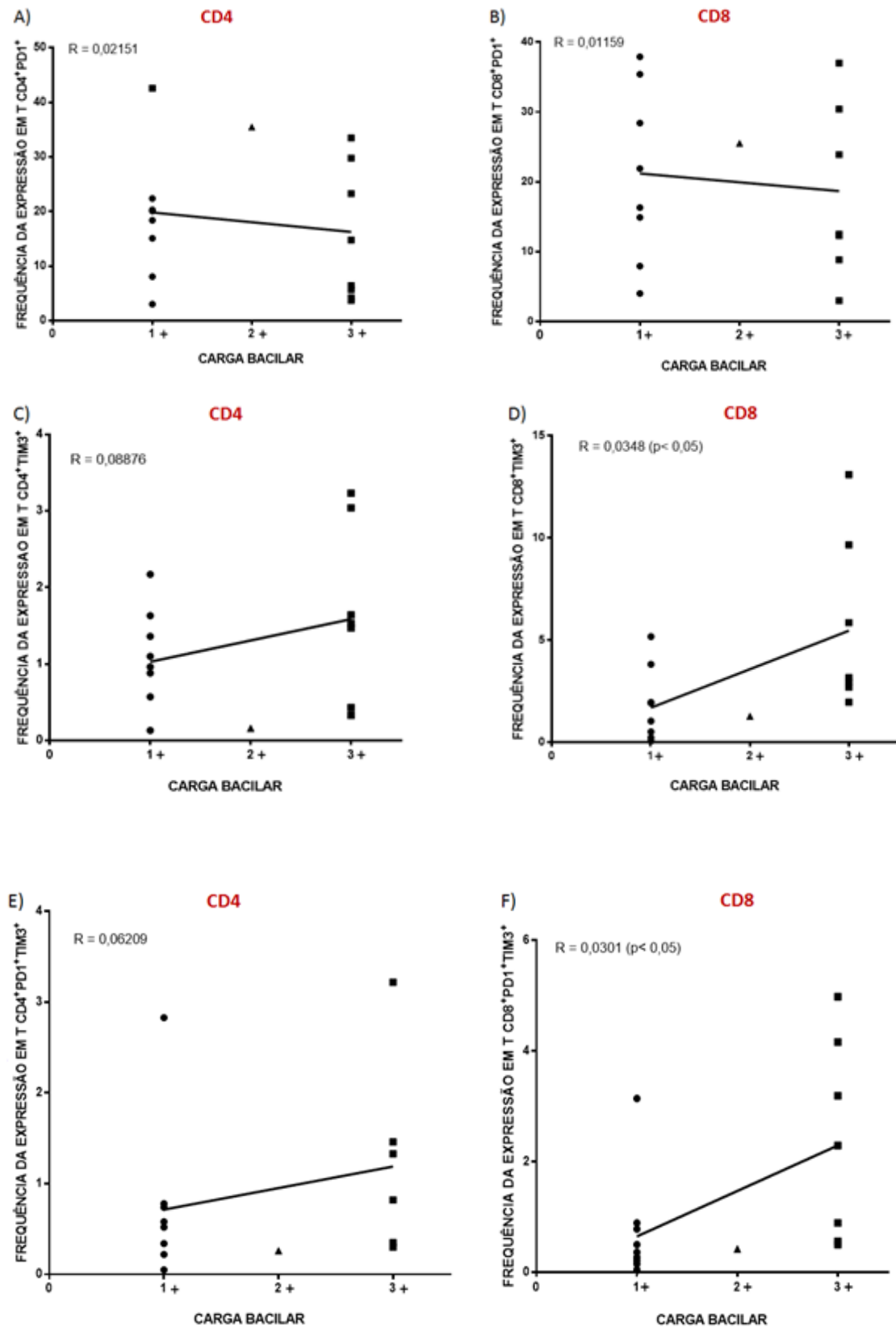


Figura 12: Gráfico de dispersão correspondente aos valores da frequência da expressão de receptores de exaustão celular: PD-1 em células T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B); TIM-3 em células T CD4⁺ (C) e CD8⁺ (D); e duplo positivo (PD-1+TIM-3) em células T CD4⁺ (E) e CD8⁺ (F) em relação à carga bacilar.

7. DISCUSSÃO

Este estudo envolveu dezenove pacientes com tuberculose pulmonar confirmada por Baciloscopia e cultura positivas para o *M. tuberculosis* e com idade maior que dezoito anos e menor que sessenta anos. Desta forma, com o objetivo de avaliar a expressão de receptores de exaustão celular durante a tuberculose ativa e nos dois primeiros meses de terapia antituberculose fez-se necessário o estabelecimento de alguns critérios de elegibilidade para a seleção das amostras, no qual objetivou-se a exclusão de pacientes acometidos por agentes patogênicos que pudessem promover infecções crônicas tais como o HIV, HBV, HCV (Tabela 1) bem como excluir fatores relacionados à idade como a imunossenescência. Tal medida visou assegurar que somente os pacientes que apresentavam as características necessárias para execução desta pesquisa fossem incluídos no estudo, para assim contribuir com resultados confiáveis e concretos no que diz respeito à Exaustão das Células T.

A incapacidade das células T para eliminar esta infecção provavelmente indica que as respostas das células T estão sujeitas a imunorregulação durante a tuberculose. Além disso, a estimulação antigênica persistente durante a infecção crônica leva, muitas vezes, à exaustão de células T (WHERRY, 2011). Entre os vários receptores inibidores, destacam-se PD-1 e TIM-3 como marcadores fenotípicos de células T funcionalmente deficientes, gerados durante infecção patogênica crônica, aliás, de acordo com dados da literatura, durante a tuberculose induzida em camundongos, PD-1 e TIM-3 são os dois receptores inibidores mais abundantemente expressos (JAYARAMAN et al., 2016). A exaustão das células T surge mais comumente durante infecções crônicas, e os níveis e duração da estimulação antigênica são determinantes críticos deste processo. Logo, durante a infecção crônica com *M. tuberculosis*, ocorrem alterações funcionais e fenotípicas em células T específicas para o *M. tuberculosis*, e, o hospedeiro lentamente perde as características importantes das células do sistema imunológico, tais como a secreção de citocinas e propriedade citolítica (HENAO-TAMAYO et al., 2011; JIN et al., 2011; REILEY et al., 2013). Em modelos animais, a infecção tuberculosa em curso foi recentemente relatada dirigir células T em um estágio de diferenciação terminal. Os

dados dos indivíduos infectados fornecem a mesma interpretação geral com comprometimento progressivo das respostas das células T CD4 específicas do *M. tuberculosis* com o aumento da carga de micobactérias, um desenvolvimento que poderia ser anulado através de tratamento antituberculose (LINDENSTROM et.al, 2013). Assim, a resposta imunológica conferida após a infecção pelo *M. tuberculosis* é criticamente dependente de células T CD4⁺ durante a infecção aguda e crônica. A maneira como as respostas de células T CD4 são mantidas durante toda a infecção não está bem compreendida, e os resultados dos outros modelos de infecção sugere que, sob condições de estimulação antigênica crônica, as células T podem ser submetidas à exaustão. Assim, estes resultados levaram-nos a determinar se as subpopulações de células T CD4 expressavam marcadores de exaustão durante a infecção de *M. Tuberculosis* em pacientes com tuberculose pulmonar ativa sem tratamento e após o primeiro e segundo meses de tratamento (REILEY et. al 2010). Nossos achados evidenciam a presença de receptores compatíveis com o perfil fenotípico de exaustão celular (PD-1 e TIM-3) tanto em células T CD4 quanto em células T CD8 em maior frequência na tuberculose ativa, sendo verificada uma redução significativa após o início do tratamento. Esse caráter foi demonstrado tanto na expressão de um único receptor (CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁻; CD4⁺ PD-1⁻TIM-3⁺; CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁻; CD8⁺ PD-1⁻TIM-3⁺) quanto na apresentação duplo positiva (CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺; CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺) (Figuras 6, 7 e 8). Tais achados corroboram evidências recentes as quais sugerem disfunção progressiva das células T CD8 em infecção crônica pelo *M. tuberculosis*, por exemplo, as células T CD8 em camundongos infectados pelo bacilo da tuberculose gradualmente perdem seu potencial lítico durante a progressão para a fase crônica da infecção. Além disso, as células T CD8⁺ de indivíduos com tuberculose pulmonar mostram diminuição da atividade citotóxica e expressão de moléculas citotóxicas, em comparação com as células de controles saudáveis não infectadas (DAY et. al, 2011). Jayaraman et al. (2016) reforçam nossos achados uma vez que avaliaram a perda da função de células T associando-a ao ganho de receptores inibidores da superfície celular, bem como a co-expressão de mais de um destes receptores por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ dos pulmões de camundongos infectados com *M. tuberculosis* sugerindo que a coexpressão de múltiplos receptores inibidores, como TIM3⁺PD1⁺ são mais propensos à exaustão. A evidência a partir de modelos animais e humanos sugere um papel importante para as células T CD4 e CD8 no controle imunológico bem sucedido da infecção por *M.*

tuberculosis (DAY et. al, 2011). A ativação completa das células T requer três sinais, o primeiro sinal é a interação do complexo MHC com peptídeo antigênico via TCR, o segundo sinal é coestimulador ou coinibidor fornecido por células apresentadoras de antígeno, o terceiro sinal é a estimulação por citocinas extracelulares. Entre estes sinais, o segundo sinal determina a promoção ou inibição da produção de citocinas e da função efetora das células T, de sinais coinibidores adequados para amortecer a inflamação evitando danos no tecido a partir da reação imunológica excessiva, enquanto que sinais coinibidores duradouros e excessivos levam à hiporresponsividade das células T. Sinais coinibidores são mediados principalmente por receptores inibidores que são os principais fenótipos de células T de exaustão (JIANG; LI; ZHU, 2015). Assim, uma vez caracterizado o perfil fenotípico de exaustão celular durante a tuberculose ativa, avaliamos a produção de citocinas, visto que esta condição sustenta mecanismos precisos que contribuem para a perda do controle imunológico e a progressão para tuberculose ativa (DAY et al., 2011).

Macrófagos infectados com *M. tuberculosis* são bastante ineficientes para estimular a proliferação e produção de citocinas por células T CD4⁺ micobactérias-específicas, podendo resultar em diminuição da regulação da expressão e apresentação do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC - II). Além disso, outros estudos indicam que o *M. tuberculosis* induz macrófagos a produzir citocinas imunossupressoras, tais como IL-10 ou TNF- β , e estas citocinas prejudicam a capacidade dos macrófagos infectados para estimular as células T de forma eficaz. Um relatório recente indica que macrófagos infectados com *M. tuberculosis* são refratários aos efeitos de IFN- γ , um mediador importante da ativação de macrófagos (JOANNE; FLYNN; CHAN, 2001).

IFN- γ é uma citocina central na resposta imunológica contra agentes patogênicos. Camundongos deficientes do gene do IFN- γ (camundongos *knockout* do gene IFN- γ), desenvolvem uma forma fatal e disseminada da doença quando introduzido um inóculo normalmente subletal de *M. tuberculosis* (COOPER et al., 1993; FLYNN et al., 1993). Esta citocina é responsável pela ativação de macrófagos em tuberculose, incluindo a produção de intermediários reativos de nitrogênio, mecanismo conhecido pelo qual os macrófagos podem matar *M. tuberculosis* intracelular (JOANNE; FLYNN; CHAN, 2001). Além disso, esta citocina é um indutor eficaz de mecanismos antimicrobianos em vários sistemas tendo sido mostrado inibir

o crescimento de micobactérias *in vitro* (COOPER et al., 1993). Nossos achados revelam que os perfis na produção de citocinas diferiram significativamente entre pacientes com tuberculose ativa e pacientes em tratamento. Em relação aos níveis de IFN- γ durante a tuberculose ativa percebeu-se frequências significativamente mais baixas na produção desta citocina tendo esse perfil modificado já no primeiro mês de tratamento com seu aumento significativo (Figura 9). O perfil de IFN- γ após o tratamento é similar aos encontrados no estudo utilizando modelos murinos (JAYARAMAN et al., 2016). Estes resultados indicam, portanto, que o IFN- γ desempenha um papel crucial na expressão de imunidade protetora contra a infecção (COOPER et al., 1993).

Assim, o aumento relativo na proporção de células T CD4⁺ que secretam citocinas durante o tratamento pode refletir a manutenção de uma resposta efetora estável (MILLINGTON et al., 2007). Apesar do efeito protetor da resposta Th1 e Th17 contra a tuberculose, a elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias está relacionada com a imunopatogênese da doença. Para limitar esta ação deletéria, surgem os mecanismos anti-inflamatórios, representados pelos receptores solúveis de TNF- α , que impedem a ligação dessa citocina ao seu receptor, por bloqueio da sinalização, pelas células T reguladoras e pelas citocinas anti-inflamatórias, IL-4, IL-10 e TGF- β . Ademais, várias infecções crônicas, incluindo a tuberculose, estão associadas com a produção de níveis aumentados da citocina imunossupressora, IL-10 (GIDEON et al., 2015; PERESI et al., 2008).

IL-10 é uma citocina imunorreguladora que pode atenuar as respostas inflamatórias, aliás, apresenta efeitos múltiplos e foi mostrado reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, impedindo a função das células apresentadoras de antígeno, amortecendo as respostas das células T, e também afetando a disregulação das células B (JIN et al., 2011). Infecções crônicas pelo EBV (vírus do Epstein Barr), HBV, HCV, HIV ou LCMV (vírus da Coriomeningite Linfocítica) está associada com o aumento da produção de IL-10. Experimentos utilizando modelo murino mostraram que IL-10 sozinha desempenha um papel fundamental durante a fase crônica / latente da tuberculose pulmonar contribuindo potencialmente para a reativação da tuberculose (BEAMER et al., 2008; TURNER et al., 2002). Além disso, em estudos de tuberculose humana, IL-10 mostrou-se elevada no soro de pacientes com tuberculose pulmonar ativa (VERBON et al., 1999). De fato, a indução de IL-10, devido ao seu papel regulador, pode ser considerado como um mecanismo de prevenção contra

danos teciduais durante a infecção crônica de *M. tuberculosis*. Mas, esses “benefícios” são controversos, uma vez que ao mesmo tempo que a IL-10 parece limitar o dano tecidual por suprimir a inflamação, esta citocina também contribui para o ambiente de hospedeiro, que permite a persistência dos bacilos, contribuindo diretamente para a reativação da tuberculose (SASINDRAN; TORRELLES, 2011). A relação entre a IL-10 e a exaustão de células T tem sido bem estudada usando o sistema de análises comparativas de camundongos submetidos a infecções por LCMV aguda (Armstrong) e crônica (clone 13), revelando que ambos os níveis de proteína e RNA mensageiro da IL-10 foram maiores nos grupos cronicamente infectados (BROOKS et al., 2006; EJRNAES et al., 2006; MARIS; CHAPPELL; JACOB, 2007). Aliás, recentemente, estes estudos identificaram a IL-10 como um regulador chave da persistência viral durante a infecção por LCMV crônica (JIN et al., 2011). Camundongos *knockout* para IL-10 ou tratados com um anticorpo bloqueador de IL-10R rapidamente controlaram a replicação de uma estirpe de LCMV crônica e desenvolveram respostas funcionais de células T demonstrando que os níveis de IL-10 podem ter uma profunda influência sobre o resultado da infecção crônica, bem como na qualidade da resposta imunológica celular (BROOKS, et al., 2006; EJRNAES, et. al 2006). Nossos achados revelam um aumento da produção de IL-10 durante a tuberculose ativa seguido de uma significativa redução após início do tratamento. Dados similares foram encontrados nos estudos realizados em camundongos por Jayaraman et al. (2016) sustentando a hipótese proposta por Brooks et al. (2006) e EJRNAES, et. al (2006) onde identificaram IL-10 como uma única molécula que é regulada positivamente durante a infecção viral crônica e que induz diretamente a persistência viral. Nestes estudos, foi documentado que o aumento da produção de IL-10 durante o início de LCMV crônica induz a inativação de células T e resulta na persistência viral. Assim, a infecção crônica por LCMV está associada à exaustão de células T e níveis elevados de IL-10 são observados sob estas condições (YI; COX; ZAJAC, 2010).

Em relação à produção de IL-17, nossos dados não revelaram diferença significativa durante a tuberculose pulmonar e após o início do tratamento (Figura 9), entretanto, os pacientes no início do tratamento apresentaram baixos níveis de IL-17 que tendem a aumentar com o tratamento e morte do patógeno. Estes achados corroboram os dados encontrados por Oliveira et al. (2014), cujos achados foram semelhantes, revelando uma frequência de células Th17 em pacientes com

tuberculose pulmonar como significativamente menor do que em controles saudáveis e indivíduos com tuberculose latente, sugerindo que uma resposta Th17 reduzida poderia estar associada com a manifestação clínica da tuberculose pulmonar e que este subtipo celular pode estar envolvido na proteção e não na imunopatogênese da doença. As células Th17, que estão envolvidas no desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias, estão também envolvidas na proteção contra certos patógenos intracelulares como o *M. Tuberculosis*, no entanto, o papel exato dessas células em indivíduos com tuberculose pulmonar, principalmente durante o tratamento antituberculose, ainda não está muito esclarecido (CHEN et al., 2010; LOCKHART; GREEN; FLYNN, 2006). Estudos recentes mostram que a infecção por *M. tuberculosis* em humanos pode induzir respostas de células Th17 antígeno-específicas, que é diminuída em pacientes com manifestações da doença ativa em comparação com indivíduos saudáveis expostos às micobactérias (CHEN et al., 2010). Logo, um mecanismo provável subjacente à resposta Th17 suprimida seria o efeito inibitório de células T reguladoras (Tregs) já que estas podem inibir o desenvolvimento de células Th17 (ZIEGLER; BUCKNER, 2009).

Quanto à produção de óxido nítrico (NO), sua formação foi determinada indiretamente através da reação de Griess (Green et al., 1982), que quantifica os nitritos acumulados nos sobrenadantes de culturas celulares, uma vez que o NO origina nitritos em solução aquosa. O óxido nítrico (NO) tem sido bem demonstrado ser essencial para a atividade micobactericida de fagócitos murinos. O papel do NO na resposta humana às micobactérias está menos bem caracterizado. A presença de óxido nítrico sintase (NOS₂) foi recentemente descrito em macrófagos alveolares de pacientes com tuberculose, mas a cinética da sua produção e o seu papel na tuberculose ainda é controverso (ASTON et al., 1998; NICHOLSON et al., 1996; NUNES-ALVES et al., 2014). NO é considerado um dos principais mediadores envolvidos na destruição do *M. tuberculosis* e a sua geração está dependente da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (YUHAS et al., 2009). Em nosso estudo observamos uma redução significativa de NO logo após o início do tratamento antituberculose (Figura 10). Resultados semelhantes foram evidenciados por Oliveira et al. (2014) onde indivíduos apresentaram uma inibição na expressão gênica de iNOS durante o tratamento em comparação com indivíduos controle. Em outro estudo, Nicholson et al. (1996) detectou iNOS na média de 65% de macrófagos alveolares de 100% dos 11 pacientes com diagnóstico recente de tuberculose pulmonar não tratada.

Em contraste, nos 5 indivíduos normais, células alveolares NOS₂-positivas obtiveram em média 10% da população de lavado broncoalveolar. O grau substancialmente maior de expressão de NOS₂ em macrófagos alveolares de pacientes com tuberculose em comparação com indivíduos sadios pode significar que NOS₂ foi induzida em macrófagos alveolares dos doentes por citocinas e/ou produtos de micobactérias (NICHOLSON et al., 1996).

Alguns antígenos de *M. tuberculosis*, como CFP-10 e a proteína 19 kDa, podem agir em função dos macrófagos, inibindo a sua capacidade microbicida, criando um ambiente favorável para a sobrevivência do *M. tuberculosis*. O componente da parede celular das micobactérias, lipoarabinomanano (LAM), pode inibir diretamente a fusão do fagolisossomo e estudos têm sugerido que o *M. tuberculosis* pode impedir o seu recrutamento para o fagolisossomo, também caracterizando um mecanismo de fuga para esta bactéria (GUPTA et. al 2010). Outro fato que deve ser considerado é que outros mecanismos microbicidas, tais como metabólitos de oxigênio podem ser importantes na destruição de bactérias, incluindo os ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (OLIVEIRA et al., 2014). Quando avaliamos a atividade microbicida encontramos um aumento significativo da fagocitose durante o segundo mês de tratamento antituberculose (Figura 11), indicando a normalidade da função fagocitária dos macrófagos sugerindo que após o início do tratamento antituberculose bacilos viáveis e antígenos do *M. tuberculosis* podem ser eliminados. Esses achados estão em conformidade com Millington et al. (2007) cujos experimentos revelaram que a carga bacteriana e a carga antigênica são elevadas na doença ativa e diminuem substancialmente após o tratamento bem sucedido quando o indivíduo se recuperou. Estes ainda sugerem que o equilíbrio entre as frequências de células T secretoras de IFN- γ e IL-2 poderia ser alterado após o tratamento de tuberculose ativa e que os pacientes com tuberculose ativa não tratada teriam distintos perfis funcionais de células T secretoras de IFN- γ e IL-2 de pacientes tratados com sucesso.

Nosso resultados demonstraram que células T CD8⁺ expressando receptores de inibição como TIM-3⁺ e coexpressando PD-1⁺TIM-3⁺ obtiveram uma correlação significativa com cargas bacilares mais elevadas (figura 12), de modo que pacientes que apresentaram os exames de baciloscopia positiva com 3+ em seus resultados, tiveram a maior expressão desses receptores na superfície das células. Desta forma, estas implicações corroboram os achados de Jayaraman et al. (2016), os quais verificaram que com a progressão da infecção por *M. tuberculosis*, havia mais células

T CD8⁺PD-1⁺TIM3⁺ em pulmões de camundongos C3HeB/FEJ, dados coerentes com a ideia de que os níveis cronicamente elevados de antígeno promovem a exaustão de células T. O mesmo estudo observou que o bloqueio de TIM3 conduziu a uma redução de CFU nos pulmões e baços de camundongos C3HeB/FEJ infectadas com *M. tuberculosis*.

À vista disso, nossos achados podem estar relacionados à estimulação antigênica crônica da infecção subclínica persistente promovida pela elevada carga de bacilos do *M. tuberculosis* internalizados nos macrófagos que estimulam a manutenção da viabilidade da célula hospedeira através de sinais antiapoptóticos e imunossupressoras, afim de preservar um ambiente intracelular favorável a sua replicação, que pode estar induzindo a exaustão de células T, contribuindo para a patogênese da tuberculose.

8. CONCLUSÕES

- A expressão dos receptores PD-1 e TIM-3 apresentam potencial para serem utilizados como marcadores de eficácia terapêutica durante a Tuberculose humana.
- A redução da expressão dos receptores de exaustão está correlacionada com a melhora da resposta imune, observada pela produção de Citocinas.
- Nossos resultados ampliam o conhecimento para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico preditivo de eficácia terapêutica, que podem ser mais explorados para o auxílio da eliminação da tuberculose no mundo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ADEREM, A.; UNDERHIL, D. M. **Mechanisms of phagocytosis in macrophages.** Annual review of Immunology, v. 17, p. 593 – 623, 1999.
- ADLER, H.; STRAUB, C.; FREI, R. **Comparison of BacT/ALERT 3D, Lowenstein-Jensen medium and Middlebrook 7H10/7H11 biplate for recovering mycobacteria from clinical specimens.** Europe Journal Clinical Microbiology Infection Disease, v. 24, p. 449-500, 2005.
- AIT-KHALED, N.; ENARSON, D. A. **Tuberculosis: a Manual for Medical Students.** Who, 2003.
- ALMEIDA, A. R. **A tuberculose: doença do passado, do presente e do futuro.** Porto: Bial, 1995.
- ARBEX, M. A. et al. **Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations.** Part 1: First-line drugs. J Bras Pneumol., v. 36, n. June, p. 626–640, 2010.
- ASTON, C. et al. **Early Inhibition of Mycobacterial Growth by Human Alveolar Macrophages is not Due to Nitric Oxide.** Am J Respir Crit Care Med, v. 157, p. 1943–1950, 1998.
- AWOMOYI, A. A. et al. **Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis.** Journal Infectious Diseases, v. 1, p. 1808–1815, 2002.
- BARBER, D. L. et al. **Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection.** Nature, v. 439, n. 7077, p. 682–687, 2006.
- BEAMER, G. L., et al. **Interleukin-10 promotes *Mycobacterium tuberculosis* disease progression in CBA/J mice.** J. Immunol, v. 181, p. 5545–5550, 2008.
- BEATTY, W. L. et al. **Trafficking and Release of Mycobacterial Lipids from Infected Macrophages.** Traffic, v. 1, n. 3, p. 235–247, 2000.
- BLEVINS, S. M.; BRONZE, M. S. **Robert Koch and the “golden age” of bacteriology** International Journal of Infectious Diseases. International Journal of Infections Diseases, v. 14, p. 744 – 751, 2010.
- BLOCH, H. **Studies on the virulence of tubercle bacilli.** The Journal of experimental medicine, p. 197-219, 1950.
- BLOOM, B. R.; MURRAY, C. J. L. **Tuberculosis: Commentary on a Reemergent Killer.** Science, v. 257, n. 5073, 1992.

BLUMBERG, H. M.; BURMAN, W. J.; CHAISSON, R.E.; DALEY, C. L.; ETKIND, S.C.; FRIEDMAN, L.N.; et al. **American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis**. Am J Respir Crit Care Med, v. 167, p. 603-62, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Técnico para o Controle da Tuberculose**. n. 148, 6ª ed, 2002.

_____. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6ª ed. Brasília (DF): MS; 2005.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância à Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras microbactérias**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília, 2010.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011a.

_____. Ministério da Saúde. **Tuberculose no Brasil e no mundo**. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2011b. [acesso: 16/08/2015]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31109.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 9, 2015 [acesso: 01/05/2016]. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/25/Boletim-tuberculose-2015.pdf>

BRENNAN, P. J. **Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis***. Tuberculosis, v. 83, p. 91-97, 2003.

BRIGHENTI, S.; LERM, M. **How *Mycobacterium tuberculosis* Manipulates Innate and Adaptive Immunity – New Views of an Old Topic**. Understanding Tuberculosis – Analyzing the Origin of *Mycobacterium Tuberculosis* Pathogenicity, p. 208–234, 2012.

BROOKS, D. G. et al. **Interleukin-10 determines viral clearance or persistence *in vivo***. NIH Public Access. v. 12, n. 11, p. 1301–1309, 2006.

BROWN, K. E. et al. **Role of PD-1 in regulating acute infections**. Curr. Opin. Immun., v. 22, p. 397-401, 2010.

CAMINERO, L. J. A. **Guía de la tuberculosis para médicos especialistas**. En: Disease IUATaL, editor. Paris: Imprimerie Chirat, 2003.

CASTIGLIONI, A. **History of Tuberculosis**. Medical Life, Froben Press, New York, v. 40, p.1, 1933.

CARRENO, B. M.; COLLINS, M. **The B7 family of ligands and its receptors: New Pathways for Costimulation and Inhibition of Immune Responses**. Annual Review of Immunology, v. 20, n. 1, p. 29–53, 2002.

CHAIMOWICZ, F. **Age transition of tuberculosis incidence and mortality in Brazil/ Transição etária da incidência e mortalidade por tuberculose no Brasil**. Rev Saúde Pública, v. 35, n. 1, p. 81–87, 2001.

CHEN, X. et al. **Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4+ T cells**. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 181, n. 7, p. 734–742, 2010.

COAR, T. **The aphorisms of Hippocrates with a translation into Latin and English**. Birmingham, AB: Gryphon Editions, 1982.

COLLINS, H. L.; KAUFMANN, S. H. E. **The many faces of the host response to tuberculosis**. Immunology, v. 103, p. 1–9, 2001.

COLSTON, M. J.; COX, R. A. **Mycobacterial growth and dormancy**, p. 198-219. In C. Ratledge and J. Dale (ed.), *Mycobacteria: molecular biology and virulence*. Blackwell Science, London, United Kingdom, 1999.

COOPER, B. A. M. et al. **Disseminated Tuberculosis in Interferon gamma Gene-disrupted Mice**. Journal of Experimental Medicine, v. 178, n. December, p. 2243–2247, 1993.

CRAWFORD, A.; WHERRY, E. J. The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. **NIH Public Access**. v. 21, n. 2, p. 179–186, 2010.

CROFTON, J.; MITCHISON, D. A. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1009-1015, 1948.

CRUMP, J. A. et al. Controlled comparison of BACTEC 13A, MYCO/F LYTIC, BacT/ALERT MB, and ISOLATOR 10 systems for detection of mycobacteremia. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1987-1990, 2003.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, 2006.

DANNENBERG, A. M. **Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis**. Clinical Infectious Diseases, v. 11, n. Supplement 2, p. S369–S378, 1989.

DAY, C. L. et al. **Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load**. Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950), 187(5), 2222–2232, 2011.

DESTEXHE, E. et al. **Evaluation of C-reactive protein as an inflammatory biomarker in rabbits for vaccine nonclinical safety studies.** Journal of pharmacological and toxicological methods, v. 68, n. 3, p. 367-73, 2013.

DHEDA, K. et al. **The immunology of tuberculosis: From bench to bedside.** Respiriology, v. 15, n. 3, p. 433–450, 2010.

DJOBA SIAWAYA, J. F. et al. **Immune parameters as markers of tuberculosis extent of disease and early prediction of anti-tuberculosis chemotherapy response.** Journal of Infection, v. 56, n. 5, p. 340–347, 2008.

DORMANDY T. **The White Death: A History of Tuberculosis.** London: The Hambledon Press, 1999

EDWARDS, D.; KIRKPATRICK, C. H. **The immunology of mycobacterial diseases.** Am. Rev. Resp. Dis, v.134, p. 1062-1071, 1986.

EJRNAES, M. et al. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 11, p. 2461–72, 2006.

FENTON, M. J.; VERMEULEN, M. W. Immunopathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 3, p. 683–690, 1996.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. **Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: Living with the enemy.** Current Opinion in Immunology, 2003.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. **Immunology of tuberculosis.** Annu. Rev. Immunol, v. 19, p. 93–129, 2001.

FLYNN, J. L.; CHAN, J.; LIN, P. L. **Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis.** Mucosal Immunology, v. 4, n. 3, p. 271–278, 2011.

FORRELLAD, M. A. et al. **Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex.** Virulence, v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.

FOURCADE, J. et al. **PD-1 and Tim-3 regulate the expansion of tumor antigen-specific CD8(+) T cells induced by melanoma vaccines.** Cancer Res, v. 74, p. 1045–1055, 2014.

FRANCISCO, L. M.; SAGE, P. T.; SHARPE, A. H. The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity. **Immunological Reviews**, v. 234, p. 219 – 42, 2010.

GALLIMORE A. et al. **Induction and Exhaustion of Lymphocytic Choriomeningitis Class I – Peptide Complexes.** J. Exp. Med., v. 187, n. 9, p. 1383 – 1393, 1998.

GAZZINELLI, R . T. et al. **IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages.** J. Immunol., v. 148, p. 1792 – 1796, 1992.

GIDEON, H. P. RIYADARSHINI et al. **Variability in tuberculosis granuloma T cell responses exists, but a balance of pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with sterilization.** PLoS pathogens, v. 11, n. 1, p. e1004603, 2015.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Doenças Pulmonares.** In:_____. Tratado de Medicina Interna, 22^a ed., 2005.

GOLDEN-MASON, L. et al. **Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells.** J Virol, v. 83, p. 9122-9130, 2009.

GREEN, L. C. et al. **Analysis of nitrite, nitrate, and [¹⁵N]-nitrate in biological fluids.** Analytical Biochemistry, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GUIRADO, E.; SCHLESINGER, L. S. **Modeling the Mycobacterium tuberculosis granuloma - the critical battlefield in host immunity and disease.** Frontiers in Immunology, v. 4, n. APR, p. 1–7, 2013.

GUPTA, D. et al. **Suppression of TLR2-induced IL-12, reactive oxygen species, and inducible nitric oxide synthase expression by Mycobacterium tuberculosis antigens expressed inside macrophages during the course of infection.** Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), v. 184, n. 10, p. 5444–5455, 2010.

HARDING, F.A. et al. **CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones.** Nature, v. 356, p. 607 – 609, 1992.

HARDING, C.; BOOM, W. H. **Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors.** Nature Reviews Microbiology, v. 8, n. 4, p. 296–307, 2010.

HARROP, R. **Cancer vaccines: Identification of biomarkers predictive of clinical efficacy.** Human Vaccines and Immunotherapeutics, v. 9, n. 4, p. 800–804, 2013.

HENAO-TAMAYO, M. et al. **T Lymphocyte Surface Expression of Exhaustion Markers as Biomarkers of the Efficacy of Chemotherapy for Tuberculosis.** Tuberculosis (Einburgh, Scotland) 91(4): 308–313. 2011.

HERZOG, H. **History of Tuberculosis.** Respiration, v. 65, p. 5 – 15, 1998.

HESTVIK, A. L. K.; HMAMA, Z.; AV-GAY, Y. **Mycobacterial manipulation of the host cell.** FEMS Microbiology Reviews, v. 29, n. 5, p. 1041–1050, 2005.

HIJAR, M. A. et al. **Epidemiologia da Tuberculose.** In: Procópio MJ, organizadora. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: EAD/ENSP, p.87-116, 2014.

HONG, J. Y. et al. **Efficacy of IP-10 as a biomarker for monitoring tuberculosis treatment.** Journal of Infection, v. 68, n. 3, p. 252–258, 2014.

JAYARAMAN, P. et al. **TIM3 Mediates T Cell Exhaustion during Mycobacterium tuberculosis Infection.** PLOS Pathogens, v. 12, n. 3, p. e1005490, 2016.

JENKINS, M. K. et al. **CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells.** The Journal of Immunology, v. 147, n. 8, p. 2461 – 2466, 1991.

JIANG, Y.; LI, Y.; ZHU, B. **T-cell exhaustion in the tumor microenvironment.** Cell death & disease, v. 6, p. e1792, 2015.

JIN, H.-T. et al. **Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, p. 14733–14738, 2010.

JIN, H. T. et al. **Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment.** BMB Reports, v. 44, n. 4, p. 217–231, 2011.

JIN, X. et al. **Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques.** The Journal of experimental medicine, v. 189, n. 6, p. 991–8, 1999.

JOHNSON, J. L. et al. **Shortening treatment in adults with noncavitary tuberculosis and 2-month culture conversion.** American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 180, n. 6, p. 558–563, 2009.

JONES, R. B. et al. **Tim- 3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection.** J Exp Med, v. 205, p. 2763- 2779, 2008.

KAUFMANN, S. H. **How can immunology contribute to the control of tuberculosis?** Nature reviews. Immunology, v. 1, n. 1, p. 20–30, 2001.

KAUFMANN, S. H. E. **Tuberculosis: Back on the Immunologists' Agenda.** Immunity, v. 24, n. 4, p. 351–357, 2006.

KESHAVJEE, S.; FARMER, P. E. **Tuberculosis, Drug Resistance, and the History of Modern Medicine.** N Engl J Med, v. 367, n. 10, p. 931–936, 2012.

KHAITAN, A.; UNUTMAZ, D. **Revisiting Immune Exhaustion During HIV Infection.** Current HIV/AIDS Reports, v. 8, n. 1, p. 4–11, 2011.

KOCH, R. **Die Ätiologie der Tuberkulose.** Berliner Medizinische Wochenschrift, v. 19, p. 221-230, 1882.

KOCH, R. **Die Aetiologie der Tuberculose, a translation by B. Pinner and M. Pinner with an introduction by A.K. Krause.** Annu. Rev. Tuberc., v. 25, p. 285, 1932.

KOLATTUKUDY, P. E. et al. **Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria.** Mol Microbiol, v.24, p. 263–270, 1997.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; JUNIOR, W. C. W. **Diagnóstico Microbiológico**. In: Micobactérias, Medsi, 2001. p. 903-946.

KORBEL, D. S.; SCHNEIDER, B. E.; SCHAIBLE, U. E. **Innate immunity in tuberculosis: myths and truth**. *Microbes and Infection*, v. 10, n. 9, p. 995–1004, 2008.

KUDOH, S.; KUDOH, T. **A simple technique for culturing tubercle bacilli**. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 51, n. 1, p. 71–82, 1974.

KWON, Y. S.; JEONG, B. H.; KOH, W. J. **Tuberculosis: clinical trials and new drug regimens**. *Curr Opin Pulm Med*, v. 20, p. 280-6, 2014.

LARSON, R. P.; SHAFIANI, S.; URDAHL, K. B. **Foxp3(+) regulatory T cells in tuberculosis**. *Advances in Experimental Medicine and Biology - Springer*, v. 783, p. 165-80, 2013.

LEE, J.; HARTMAN, M.; KORNFELD, H. **Macrophage apoptosis in tuberculosis**. *Yonsei Medical Journal*, v. 50, n. 1, p. 1–11, 2009.

LEROY, V. et al. **Progression of Human Immunodeficiency Virus Infection in Patients with Tuberculosis Disease A Cohort Study in Bordeaux, France, 1988–1994**. *American journal of epidemiology*, v. 145, n. 4, p. 293–300, 1997.

LIMA, V. M. F. et al. **Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis**. *Infection and Immunity*, v. 69, p. 5305-5312, 2001.

LINDENSTROM, T. et al. **Control of chronic mycobacterium tuberculosis infection by CD4 KLRG1- IL-2-secreting central memory cells**. *J Immunol*, v. 190, n. 12, p. 6311–6319, 2013.

LIU, Y.; LINSLEY, P. S. **Costimulation of T-cell growth**. *Curr Opin Immunol.*, v.4, n. 3, p. 265–270, 1992.

LOCKHART, E.; GREEN, A. M.; FLYNN, J. L. **IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection**. *Journal of Immunology*, v. 177, n. 7, p. 4662–4669, 2006.

LORENZI, T. F. et al. **Manual de Hematologia - propedêutica e clínica**. Medsi editora médica, 3ª ed., cap. 9, p. 595-608, 2003.

MADEGAN, B.; PARKER, M. **Biology of Microorganisms**, 7ª ed. Englewoods Cliffs, Prentice Hall, 1994.

MARIS, C. H.; CHAPPELL, C. P.; JACOB, J. **Interleukin-10 plays an early role in generating virus specific T cell anergy**. BMC Immunol, v.8, n. 8, 2007.

MCKINNEY, E. F. et al. **T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection**. Nature, v. 523, n. 7562, p. 612–616, 2015.

MCMAHAN, R. H. et al. **Tim-3 expression on PD-1+ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity**. Journal of Clinical Investigation, v. 120, n. 12, p. 4546–4557, 2010.

MEDCALF, A. et al. **Tuberculosis – A Shot History**. The University of York. Centre for Chronic Diseases and Disorders. Centre for Global Health Histories. Humanities Research Centre. Orient Blackswan, 2013.

MEENA, L. S.; RAJNI, T. **Survival mechanisms of pathogenic Mycobacterium tuberculosis H 37Rv**. FEBS Journal, v. 277, n. 11, p. 2416–2427, 2010.

MILLINGTON, K. A. et al. **Dynamic relationship between IFN- γ and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load**. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), 178(8), 5217–5226, 2007.

MOORE, K. W. et al. **Interleukin -10 and the Interleukin -10 Receptor**. Annual Review of Immunology, v. 19, n. 1, p. 683–765, 2001.

MORTAZ, E. et al. **New Aspects in Immunopathology of Mycobacterium tuberculosis**. ISRN Immunology, v. 2012, p. 1–11, 2012.

MOSKOPHIDIS, D. et al. **Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells**. Nature, v. 362, n. 6422, p. 758-761, 1993.

NICHOLSON, S. **Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis**. Journal of Experimental Medicine, v. 183, n. 5, p. 2293–2302, 1996.

NIKAIDO H, JARLIER V. **Permeability of the mycobacterial cell wall**. Res Microbiol, v. 142, p. 437–443, 1991.

NIRSCHL C. J.; DRAKE, C. G. **Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy**. Clin Cancer Res, v. 19, p. 4917-4924, 2013.

NGUYEN, L. T.; OHASHI, P. S. **Clinical blockade of PD1 and LAG3 — potential mechanisms of action.** *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 1, p. 45–56, 2014.

NUNES-ALVES, C. et al. **In Search of a New Paradigm for Protective Immunity to TB.** *Nature reviews. Microbiology* 12 (4), 289–299, 2014.

OLIVEIRA, L. R. C. et al. **Analysis of toll-like receptors, iNOS and cytokine profiles in patients with pulmonary tuberculosis during anti-tuberculosis treatment.** *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, 2014.

ORDWAY, D. et al. **Foamy macrophages within lung granulomas of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* express molecules characteristic of dendritic cells and antiapoptotic markers of the TNF receptor-associated factor family.** *Journal Immunology*, v. 175, n. 6, p. 3873- 81, 2005.

PAUKEN, K. E.; WHERRY, E. J. **Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer.** *Trends in Immunology*, v. 36, n. 4, p. 265–276, 2015.

QIU, M.-K. et al. **PD-1 and Tim-3 Pathways Regulate CD8+ T Cells Function in Atherosclerosis.** *PLoS one*, v. 10, n. 6, 2015.

RAJA, A. **Immunology of tuberculosis.** *Indian Journal of Medical Research*, v. 120, n. 4, p. 213 – 232, 2004.

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. 274-693, 2011.

RAMAKRISHNAN, L. **Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis.** *Nature reviews. Immunology*, v. 12, n. 5, p. 352–66, 2012.

RASTOGI, N. **Potencial drug targets for *Mycobacterium avium* defined by usig radiometric drug-inhibitor combination techniques.** *Antimicrobial Agents Chemotherapeutic*, v. 145, p. 243-252, 1994.

REDFORD, P. S.; MURRAY, P. J.; O’GARRA, A. **The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection.** *Mucosal Immunology*, v. 4, n. 3, p. 261–270, 2011.

REILEY, W. W. et al. **Distinct functions of antigen-specific CD4 T cells during murine *Mycobacterium tuberculosis* infection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 45, p. 19408–19413, 2010.

RIOU, C. et al. **Effect of standard tuberculosis treatment on plasma cytokine levels in patients with active pulmonary tuberculosis.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, 2012.

RODRIGUE-GERVAIS, I. G. et al. **Dendritic cell inhibition is connected to exhaustion of CD8+ T cell polyfunctionality during chronic hepatitis C virus infection.** *J Immunol*, v. 184, n. 6, p. 3134-44, 2011.

RUSSELL, D. G. **Who puts the tubercle in tuberculosis?** Nature reviews. Microbiology, v. 5, n. 1, p. 39–47, 2007.

SAKULA, A. **Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882.** Thorax, v. 37, p. 246–251, 1982.

SALGAME, P. **Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection.** Current Opinion in Immunology, v. 17, n. 4 SPEC. ISS., p. 374–380, 2005.

SALOMON, B.; BLUESTONE, J. A. **Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation.** Annual Review of Immunology, v. 19, p. 225 – 252, 2001.

SANCHEZ-FUEYO, A.; MARKMANN, J. F. **Immune Exhaustion and Transplantation.** American Journal of Transplantation, v. 16, 2016.

SASINDRAN, S. J.; TORRELLES, J. B. ***Mycobacterium tuberculosis* infection and inflammation: What is beneficial for the host and for the bacterium?** Frontiers in Microbiology, v. 2, n. JAN, p. 1–16, 2011.

SAUNDERS, B. M.; FRANK, A. A.; ORME, I. M. **Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*.** Immunology, v. 98, n. 3, p. 324–328, 1999.

SCHIETINGER, A.; GREENBERG, P. D. **Tolerance and Exhaustion: Defining Mechanisms of T cell Dysfunction.** Trends in Immunology, v. 35, n. 2, p. 51–60, 2014.

SCHLUGER, N. W.; ROM, W. N. **State of the Art The host: Immune response to tuberculosis.** Am J Respir Crit Care Med, v. 157, n. 19, p. 679–691, 1998.

SCHLOSSBERG, D. **Acute tuberculosis.** Infectious Disease Clinics, v. 24, n. 1, p. 139 – 146, 2010.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde, 2014. **Boletim Epidemiológico: Especial Tuberculose.** Brasília - DF: v. 44, n. 2. 2014.

SHIN, H. J.; LEE, H. S.; KIM, Y. I.; LIM, S. C.; JUNG, J. P.; KO, Y. C.; et al. **Hepatotoxicity of anti-tuberculosis chemotherapy in patients with liver cirrhosis.** Int J Tuberc Lung Dis, v. 18, p. 347-51, 2014.

SHIN, H. J.; KWON, Y. S. **Treatment of drug susceptible pulmonary tuberculosis.** Tuberculosis and Respiratory Diseases, v. 78, n. 3, p. 161–167, 2015.

SINGH, P. K.; SINGH, A. V.; CHAUHAN, D. S. **Current understanding on micro RNAs and its regulation in response to Mycobacterial infections.** Journal of Biomedical Science 2013, 20:14.

SMITH, I. **Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence.** Clinical Microbiology Reviews, 2003.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. **Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso.** J. bras. pneumol. [online]. 2007, vol.33, n.3, pp.323-334.

TRAUTMANN, L. et al. **Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction.** Nat Med, v. 12, p. 1198–1202, 2006.

TURNER, J. et al. **In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice.** J. Immunol., v. 169, p. 6343–6351, 2002.

ULRICHS, T. et al. **Differential organization of the local immune response in patients with active cavitary tuberculosis or with nonprogressive tuberculoma.** The Journal of infectious diseases, v. 192, n. 1, p. 89–97, 2005.

ULRICHS, T.; KAUFMANN, S. H. E. **New insights into the function of granulomas in human tuberculosis.** Journal of Pathology, v. 208, n. 2, p. 261–269, 2006.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H. M.; VAN DER MEER, J. W. M. **Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis.** Clinical microbiology reviews, v. 15, n. 2, p. 294–309, 2002.

VAN-LUME, D. S. M. et al. **Preliminary results in the immunodiagnosis of tuberculosis in children based on T cell responses to ESAT-6 and PPD antigens.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]. 2008, vol.103, n.4.

VERBON, A. et al. **Serum concentrations of cytokines in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment.** Clinical and experimental immunology, v. 115, n. 1, p. 110–3, 1999.

WALZL, G. et al. **Immunological biomarkers of tuberculosis.** Nature Reviews Immunology, v. 11, p. 343 – 354, 2011.

WANG, S.; CHEN, L. **Immunobiology of cancer Therapies Targeting CD137 and B7-H1/PD-1 Cosignal Pathways.** Curr Top Microbiol Immunol., v. 344, p. 245 – 67, 2011.

WHERRY, E. J. **T cell exhaustion.** Nature Reviews Immunology, v. 12, n. 6, p. 492–499, 2011.

WHERRY, E. J.; KURACHI, M. **Molecular and cellular insights into T cell exhaustion.** Nature Reviews Immunology, v. 15, n. 8, p. 486–499, 2015.

WILLIAMS, G. T.; WILLIAMS, W. J. **Granulomatous inflammation - a review.** J Clin Pathol, p. 723–733, 1983.

World Health Organization, WHO. **Toman's Tuberculosis case detection, treatment and monitoring: questions and answers.** Geneva, 2004.

World Health Organization, WHO. **Global Tuberculosis Report 2014.** WHO, Geneva, Switzerland (2014).
http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_main_text.pdf [acessado em 10/09/2015]

YI, J. S.; COX, M. A.; ZAJAC, A. J. **T-cell exhaustion: Characteristics, causes and conversion.** Immunology, v. 129, n. 4, p. 474–481, 2010.

YUHAS et al. **Roles of NF-κB Activation and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Inhibition in the Effect of Rifampin on Inducible Nitric Oxide Synthase Transcription in Human Lung Epithelial Cells.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 53, p. 1539–1545, 2009.

ZAHRT, T. C. **Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection.** Microbes Infect. v. 5, p. 159-67, 2003.

ZAJAC, A. J. et al. **Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function.** The Journal of experimental medicine, v. 188, n. 12, p. 2205–2213, 1998.

ZAJACZKOWSKI, T. **Genitourinary tuberculosis: Historical and basic science review: Past and present.** Central European Journal of Urology, v. 65, n. 4, p. 182–187, 2012.

ZHOU, Q. et al. **Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia.** Blood, v. 117, p. 4501–4510, 2011.

ZIEGLER, S. F.; BUCKNER, J. H. **FOXP3 and the Regulation of Treg/Th17 Differentiation.** NIH Public Access. v. 11, n. 5, p. 594–598, 2010.

ANEXO

Termo de Consentimento Livre Esclarecido
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas
Núcleo de Doenças Infecciosas
Lab. de Imunologia Celular e Molecular

Projeto de Pesquisa: Análise do Potencial Preditivo de Marcadores de Exaustão Celular e Memória Imunológica como Indicadores de Sucesso da Resposta Terapêutica Antituberculose em Pacientes com Tuberculose Pulmonar Ativa

Pesquisadores e suas funções:

Dr. Daniel Cláudio de O Gomes – Coordenador, Lab. de Imunologia Celular e Molecular, NDI-UFES

Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues – Colaborador, Lab. de Imunologia Celular e Molecular, NDI-UFES

Dr. David– Centro de Pesquisa Clínica –HUCAM-UFES

Nome do(a) voluntário(a) ou responsável _____

O(a) Sr.(a) está sendo solicitado(a) a participar, como voluntário(a), de uma investigação científica conduzida pelo Núcleo de Doenças Infecciosas –NDI-UFES, com o objetivo de avaliar o papel de Marcadores de Exaustão Celular e Memória Imunológica como Indicadores de Sucesso da Resposta Terapêutica Antituberculose

Este documento procura fornecer ao (a) Sr. (a) as informações necessárias sobre todos procedimentos a serem adotados, bem como os exames e benefícios. O(a) Sr.(a) poderá recusar-se a participar da pesquisa, ou dela afastar-se em qualquer tempo, sem que este fato lhe venha causar constrangimento ou penalidade por parte desta instituição.

Em **nenhuma** momento será revelada a identidade dos(as) voluntários(as), garantindo o total anonimato e confidencialidade dos mesmos. Antes de assinar este

termo, o(a) Sr.(a) deve informar-se plenamente, não hesitando em formular perguntas sobre quaisquer aspectos que julgue conveniente.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES

- Procedimentos que serão realizados: Coleta de amostra de sangue e escarro induzido, solicitados pelo seu médico acompanhante. As amostras serão processadas no Laboratório executor e sua utilização será feita somente pelo mesmo.
- Benefícios: Os resultados encontrados pelo laboratório serão encaminhados ao seu médico na forma de um relato, auxiliando-o juntamente com os demais resultados obtidos e achados laboratoriais, na melhor alternativa de tratamento.
- Riscos potenciais: Os riscos envolvidos na Coleta de sangue são mínimos. No entanto, manchas arroxeadas no braço (decorrentes da retirada de sangue) podem ocorrer.

Declaro estar ciente do inteiro teor deste **Termo de Consentimento Livre Esclarecido**, decidindo-me a participar da investigação proposta. Declaro ainda que formulei e recebi todo esclarecimento que julguei pertinente, consentindo em participar desta investigação.

Assinatura do responsável

RG: _____

Assinatura do investigador responsável:

Data: _____

Vitória, Dezembro de 2015